

**IRSN**INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

# Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*

**Sandrine MASSARIN**

Décembre 2010

N° ISRN/IRSN-2011/145

Laboratoire de Modélisation Environnementale



**Thèse**

Présentée à

**L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II – UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE**

Ecole doctorale

**ED 251 SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

Pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de la Méditerranée**

Spécialité Océanographie

---

**Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la  
dynamique de population de *Daphnia magna***

---

Par

**Sandrine MASSARIN**

Thèse réalisée sous la direction de Jean-Christophe Poggiale

Thèse soutenue le 15 décembre 2010

Devant le jury d'examen composé de :

Mme Vasseur P.	Professeur à l'université Paul Verlaine de Metz	Rapporteur
Mme Aliaume C.	Professeur à l'université de Montpellier II	Rapporteur
Mme Charles S.	Maître de conférence à l'université Lyon I	Examineur
M Péry A.	Chercheur INERIS, responsable unité METO	Examineur
M Carlotti F.	Directeur de recherche CNRS	Examineur
M Poggiale J.C.	Professeur à l'université de la Méditerranée	Directeur de thèse
M Alonzo F.	Chercheur IRSN	Tuteur de thèse



# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Merci à M. François Carlotti, Directeur de recherche CNRS, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, à Mlle Paule Vasseur, professeur à l'université Paule Verlaine de Metz et à Mme Catherine Aliaume, professeur à l'université de Montpellier II d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à M. Alexandre Péry, responsable de l'unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie de l'INERIS et Mme Sandrine Charles, maître de conférence à l'université de Lyon I pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partir de mon jury de thèse. Les remarques et suggestions de l'ensemble des membres du jury m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de mon manuscrit.

Je tiens ensuite à remercier Jean-Christophe Poggiale, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour l'intérêt qu'il a porté à l'avancement de mes travaux et pour son implication lors des moments importants de cette thèse.

Je tiens également à remercier très chaleureusement Frédéric Alonzo pour son aide précieuse sur le plan scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et ses compétences m'ont permis de mener à bien mes travaux, d'enrichir mes connaissances et de faire mes premiers pas dans le monde de la modélisation. Je tiens également à le remercier pour la confiance et les encouragements qu'il m'a témoignés durant ces trois années de thèse.

Je remercie aussi Jacqueline Garnier-Laplace Rodolphe Gilbin et Philippe Calmon, de m'avoir accueillie dans leur équipe et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour effectuer ce travail de thèse dans de bonnes conditions.

Merci à Marie Simon-Cornu et Karine Beaugelin-Seiller pour leurs conseils toujours très pertinents et leurs encouragements qui m'ont beaucoup aidé, surtout pendant les derniers mois de ma thèse. Merci à Laurent Garcia-Sanchez, pour son aide précieuse pour toutes ces analyses statistiques, et surtout pour sa patience à m'expliquer les lignes de codes sous R.

Mes remerciements vont ensuite à Marcel Morello et Daniel Orjollet, pour les nombreux dosages en scintillation liquide, à Virginie Camilleri pour les montagnes d'échantillons dosés en ICP-AES, sans oublier Sylvie Pierrisnard, pour les mesures en chromatographie ionique et Sandrine Frelon pour les dosages en ICP-MS.

Je remercie Emilie et Guillaume, sans oublier Claude avec qui les pauses au travail ont toujours été de bons moments d'évasion et de détente.

Merci à Claudine et Véronique, pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Merci à tout le reste de l'équipe du LME et LRE pour les moments agréables passés à la salle à café et leurs encouragements jusqu'au bout de cette thèse.

Merci à Magali, Stéphanie, Amandine, Isabelle, Houda et Valérie pour les soirées passées à décompresser et pour votre soutien dans les moments les plus difficiles.

Merci à Georges et Laure, mes partenaires de squash, pour les bons moments passés sur le terrain à oublier les tracas de la thèse et pour vos sincères encouragements.

Je remercie mes parents et mon frère qui ont toujours cru en moi. Merci à Jo qui a relu attentivement ce manuscrit à l'affût des dernières fautes d'orthographe.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour celui qui est dans mon cœur. Tu as su me motiver, me reconforter et m'inciter à me jamais baisser les bras, malgré la distance qui nous a séparée pendant ces 3 années de thèse. Je ne te remercierai jamais assez.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
--------------------------	----------

## **PARTIE A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM.....</b>	<b>11</b>
1.1. Propriétés physico-chimiques de l'uranium.....	11
1.1.1. Propriétés physiques de l'uranium.....	11
1.1.2. Propriétés chimiques de l'uranium.....	12
1.2. Origine et redistribution de l'uranium dans l'environnement.....	12
1.2.1. Spéciation et distribution dans les écosystèmes terrestres.....	12
1.2.2. Spéciation et distribution dans les écosystèmes aquatiques.....	14
1.2.3. Applications et impacts anthropiques.....	17
1.3. Facteurs influençant la toxicité de l'uranium.....	19
1.3.1. Spéciation et biodisponibilité.....	19
1.3.2. Voies d'exposition.....	20
1.3.3. Bioaccumulation.....	22
1.4. Toxicité de l'uranium.....	23
1.4.1. Toxicité chimique et toxicité radiologique.....	23
1.4.2. Toxicité au niveau cellulaire, moléculaire et tissulaire.....	24
1.4.3. Toxicité de l'uranium au niveau individuel chez les organismes aquatiques.....	25
1.5. Valeurs guides pour la protection de l'environnement.....	30
<b>CHAPITRE 2. DAPHNIA MAGNA COMME MODELE BIOLOGIQUE.....</b>	<b>32</b>
2.1. Anatomie et physiologie de <i>Daphnia magna</i> .....	32
2.2. Cycle de vie de la Daphnie.....	34
<b>CHAPITRE 3. TOXICITE DE L'URANIUM ET AUTRES CONTAMINANTS CHEZ DAPHNIA MAGNA.....</b>	<b>36</b>
3.1. Effets de contaminants sur le métabolisme de <i>Daphnia magna</i> .....	36
3.1.1. L'hypothèse des coûts métaboliques.....	36
3.1.2. Notions de Scope For Growth.....	37
3.1.3. Altérations indirectes du statut énergétique.....	39
3.1.4. Effets de contaminants sur les traits physiologiques de <i>Daphnia magna</i> .....	39
3.1.5. Effets de facteurs environnementaux sur l'acquisition d'énergie.....	42
3.2. Effets de contaminants sur les traits d'histoire de vie de <i>Daphnia magna</i> .....	43
3.3. Recommandations de l'OCDE dans le cadre des tests d'écotoxicité.....	44

3.4. Le cas d'exposition multigénérationnelle chez <i>Daphnia magna</i> .....	44
---	----

**CHAPITRE 4. MODELISATION DES EFFETS D'UN CONTAMINANT DE L'INDIVIDU A LA POPULATION.....47**

4.1. Généralités.....	47
4.2. Modèles de budget énergétique.....	48
4.2.1. Modèle toxico-cinétique.....	49
4.2.2. Modèles d'effets sur la croissance et la reproduction.....	50
4.2.3. Apport des modèles DEBtox dans l'évaluation du risque pour l'environnement...52	
4.3. Extrapolation des effets au niveau populationnel.....	53
4.3.1. Modèles démographiques.....	53
4.3.2. Les modèles matriciels.....	54
4.4. Influence des différents critères d'effets individuels sur la dynamique de population...55	
4.5. Prise en compte de modèles DEBTox en dynamique de population.....	57
4.6. Apport des études multigénérationnelles en dynamique de population.....	58

**OBJECTIFS DE L'ETUDE.....59**

**PARTIE B. EFFETS DE L'URANIUM SUR L'INDIVIDU – EXPERIMENTATION ET DISCUSSION**

**RAPPELS DES OBJECTIFS.....63**

**CHAPITRE 1. MATERIELS ET METHODES.....64**

1.1. Conditions d'élevage de <i>Daphnia magna</i> au laboratoire.....	64
1.2. Composition des milieux artificiels.....	65
1.2.1. Milieu M4.....	65
1.2.2. Milieu M4-pH7.....	66
1.3. Exposition à l'uranium.....	66
1.4. Plans expérimentaux mis en œuvre.....	67
1.4.1. Etude d'une exposition à l'uranium sur 3 générations successives débutées avec des néonates issus de ponte 5 (B5).....	67
1.4.2. Etude d'une exposition à l'uranium sur 2 générations successives débutées avec des néonates issus de ponte 1 (B1).....	69
1.4.3. Etude des conséquences d'une exposition à l'uranium au cours de l'embryogénèse.....	70
1.5. Critères d'effets mesurés.....	72
1.5.1. Survie.....	72
1.5.2. Reproduction.....	72

1.5.3. Taux d'ingestion et d'assimilation.....	73
1.5.4. Taux de respiration.....	76
1.5.5. Croissance somatique en masse et en taille.....	77
1.5.6. Bioaccumulation.....	78
1.5.7. Calculs des débits de dose.....	78
1.6. Suivi des conditions des milieux d'exposition.....	80
1.7. Ajustements réalisés sur les différents critères d'effets mesurés.....	82
1.7.1. Reproduction.....	82
1.7.2. Taux d'ingestion et d'assimilation.....	82
1.7.3. Taux de respiration.....	83
1.7.4. Croissance somatique.....	83
1.7.5. Concentration en uranium dans le corps des daphnies.....	84
1.8. Analyses statistiques.....	84

## **CHAPITRE 2. ETUDE DES EFFETS D'UNE EXPOSITION A L'URANIUM SUR 3 GENERATIONS SUCCESSIVES.....86**

2.1. Survie.....	87
2.2. Croissance somatique en taille.....	88
2.3. Croissance somatique en masse.....	90
2.4. Taux d'ingestion et d'assimilation.....	91
2.5. Respiration.....	93
2.6. Reproduction.....	93
2.7. Bioaccumulation et débits de dose.....	95
2.8. Discussion.....	97
2.8.1. Aspects techniques de la quantification de l'assimilation chez <i>D. magna</i> .....	97
2.8.2. Chimiotoxicité vs radiotoxicité de l'uranium.....	99
2.8.3. Effets de l'uranium sur le budget énergétique de <i>D. magna</i> .....	99
2.8.4. Effets d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium chez <i>D. magna</i> .....	102
2.8.5. Effets d'un transfert en milieu non contaminé après exposition à l'uranium.....	106

## **CHAPITRE 3. ETUDE DE LA SENSIBILITE A L'URANIUM DE DAPHNIES ISSUES D'UNE PONTE B1.....107**

3.1. Survie.....	108
3.2. Croissance somatique en taille.....	108
3.3. Croissance somatique en masse.....	110
3.4. Reproduction.....	111
3.5. Bioaccumulation et débits de dose.....	113
3.6. Discussion.....	114

<b>CHAPITRE 4. ETUDE DES CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION A L'URANIUM AU COURS DE L'EMBRYOGENESE.....</b>	<b>116</b>
4.1 Masse sèche des œufs au cours de l'instar B5.....	117
4.2. Bioaccumulation d'uranium au cours de l'instar B5.....	118
4.3. Conséquences pour la survie.....	120
4.4. Conséquences pour la croissance somatique en taille.....	120
4.5. Conséquences pour la croissance en masse.....	122
4.6. Conséquences pour la reproduction.....	123
4.7. Bioaccumulation et débits de dose.....	125
4.8. Discussion.....	126
<b>CONCLUSIONS DE LA PARTIE B.....</b>	<b>128</b>

## **PARTIE C. EFFETS DE L'URANIUM DE L'INDIVIDU A LA POPULATION – MODELISATION ET DISCUSSION**

<b>CHAPITRE 1. APPLICATION DU DEBTOX AU CAS DE L'URANIUM.....</b>	<b>131</b>
1.1. Choix des hypothèses.....	131
1.2. Ajustements.....	132
1.3 Résultats.....	134
1.4. Discussion.....	138
1.4.1. Mode d'action de l'uranium chez <i>Daphnia magna</i> .....	138
1.4.2. Cinétique et transfert de l'uranium chez <i>Daphnia magna</i> .....	139
1.4.3. Vers la détermination d'une concentration seuil sans effet au niveau individuel.....	141
<b>CHAPITRE 2. EXTRAPOLATION DES EFFETS DE L'URANIUM DE L'INDIVIDU A LA POPULATION.....</b>	<b>142</b>
2.1. Choix du modèle de dynamique de population.....	142
2.2. Fonctionnement des modèles matriciels de population.....	143
2.2.1. Hypothèses des modèles.....	143
2.2.2. Scenarii d'études et origine des données.....	143
2.3. Construction des matrices de population.....	145
2.4. Estimation de l'intervalle d'incertitude du Lambda par Bootstrap, sur les données observées.....	156
2.5. Implémentation du DEBTox dans la dynamique de population.....	156
2.5.1. Hypothèses d'application du DEBtox.....	157
2.5.2. Effet de l'uranium sur la survie.....	157
2.5.3. Estimation de lambda et de son intervalle d'incertitude par Bootstrap.....	157
2.6. Résultats.....	158

2.6.1. Dynamique de population dans le cas d'une exposition à l'uranium sur 1, 2 ou 3 générations successives (sans distinction de la sensibilité entre B1 et B5).....	158
2.6.2. Dynamique de population dans le cas d'une exposition à l'uranium sur 1 ou 2 générations successives, avec distinction de la sensibilité entre B1 et B5.....	162
2.6.3. Etude de la dynamique de population en combinant modèles DEBtox et modèles matriciels.....	165
2.7. Discussion.....	167
2.7.1. Apport de l'étude des effets au niveau populationnel.....	167
2.7.2. L'apport des études multigénérationnelles dans l'extrapolation des effets au niveau populationnel.....	168
2.7.3. L'intégration des modèles de budget énergétique dans des dynamiques de population.....	169
2.7.4. L'importance de la sensibilité des individus dans des dynamiques de population.....	170
<b>CONCLUSIONS DE LA PARTIE C.....</b>	<b>172</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>174</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>211</b>

# **INTRODUCTION**

## Contexte général

Les éléments radioactifs, et notamment l'uranium, font parti des contaminants capables d'induire des risques pour le fonctionnement des écosystèmes et la santé de l'Homme. En effet, en plus de posséder les caractéristiques d'un métal lourd, l'uranium est doté d'une activité radioactive, qui se manifeste sous la forme de l'émission de particules alpha pour l'ensemble de ses isotopes<sup>1</sup>. Bien qu'il soit naturellement présent à l'état de traces dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, l'uranium est utilisé dans différents secteurs industriels, notamment dans le cycle du combustible nucléaire, dans le milieu médical, dans l'armement, et il est aussi retrouvé dans l'agriculture. Sa présence dans ces divers domaines d'activités, associée à des processus naturels de transport tels que l'érosion et le lessivage des sols par les eaux de pluies, contribuent à accentuer les cas de pollutions dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce.

La prise en considération de l'importance de protéger l'environnement contre les effets des rayonnements ionisants a fait émerger un certain nombre de recommandations et travaux au cours des deux dernières décennies. Dans un premier temps, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a postulé que l'Homme est l'être le plus radiosensible et que le protéger revient donc à ne pas mettre en danger les autres espèces (CIPR, 1991). Ce postulat, sans être remis fondamentalement en cause, est discuté en 1992 par un rapport technique de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA, 1992) qui indique "qu'il n'existe pas d'évidence, à partir de la littérature scientifique, que des débits de doses inférieurs à 1 mGy.j<sup>-12</sup> affecteront les populations animales ou végétales". Puis en 1996, un rapport à l'assemblée générale du Comité scientifique des Nations Unies sur les effets des rayonnements atomiques (UNSCEAR, 1996) conclut que pour les organismes aquatiques, une irradiation chronique à des débits de dose maximaux de 400 Gy.h<sup>-1</sup> appliqués à une faible proportion d'individus occasionnerait un débit de dose moyen plus faible à l'autre partie de la

---

<sup>1</sup> Nucléides ayant le même nombre de protons au sein de leur noyau mais un nombre de neutrons différents. Les isotopes d'un même élément se comportent de manière identique d'un point de vue chimique, mais leurs caractéristiques radioactives (période radioactive, activité spécifique, mode de décroissance, etc.) sont spécifiques de l'isotope considéré.

<sup>2</sup> Le gray (Gy) est l'unité du Système International qui permet de mesurer la quantité de rayonnements absorbés par un organisme ou un objet exposé aux rayonnements. Il a remplacé le rad en 1986. 1 gray = 100 rads = 1 joule par kilo de matière irradiée.

population. Par conséquent, une exposition de ce type ne produirait pas de dommage au niveau de la population. Sur la base de ces constats, il est apparu nécessaire de changer la perception que protéger l'Homme, face aux radionucléides, était censé garantir la protection de l'environnement. De ce fait, des méthodes d'évaluation du risque adaptées à l'environnement ont été mises en place.

Dans ce contexte, des programmes européens tels que FASSET (**Framework for Assessment of Environmental Impact, 2003**) et ERICA (**Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management, 2006, 2007**) ont été élaborés. Ils ont donné lieu à la mise à jour d'une base de données concernant les effets des rayonnements ionisants sur les organismes non-humains. De plus, l'exploitation de cette base de données a permis de définir des critères de protection des écosystèmes et de concevoir une méthode de caractérisation du risque écologique. La mise en place de ces programmes a néanmoins souligné les lacunes importantes subsistantes sur la connaissance des effets des radionucléides sur les organismes vivants dans un contexte chronique à faibles doses. L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire s'attache donc à éclaircir cette facette dans le cadre du volet "environnement" du programme ENVIRHOM (Radioprotection de l'ENVIRonnement à l'HOMme). Son objectif est d'apporter des connaissances scientifiques en support de l'évaluation du risque pour l'environnement lié à l'exposition chronique aux radionucléides à faibles doses.

Enfin, l'évaluation des effets liés aux contaminants s'appuie généralement sur des expérimentations de laboratoire dans lesquelles les effets observés vont des dommages cellulaires aux effets sur les traits de vie des individus. Néanmoins l'interprétation ciblée porte sur des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (populations, écosystèmes). C'est la raison pour laquelle l'écotoxicologie se tourne de plus en plus vers la modélisation pour étudier l'influence de contaminants sur la dynamique de population. Elle est en effet un outil incontournable pour extrapoler les effets observés au niveau individuel aux échelles d'organisation supérieures, critères plus pertinents d'un point de vue écologique.

## Objectifs de recherche

Dans ce contexte général, ce travail de doctorat vise à apporter de nouvelles connaissances relatives à la toxicité de l'uranium appauvri sur une espèce représentative des écosystèmes aquatiques d'eau douce, *Daphnia magna*. La démarche consiste dans un premier temps à mettre en évidence, sous différents scénarii d'exposition à l'uranium, des perturbations sur la biomasse et la physiologie de l'individu. Les effets sur ces traits physiologiques sont ensuite intégrés dans un modèle de budget énergétique, permettant ainsi de faire le lien entre traits physiologiques et traits d'histoire de vie. Par la suite, pour une meilleure pertinence écologique (**Forbes et Calow, 1999**), les perturbations au niveau des grandes fonctions biologiques de l'individu (survie, âge de reproduction, fécondité...) sont implémentées dans des modèles de dynamique de population. Les conséquences au niveau populationnel des effets au niveau individuel sont mises en évidence par des analyses de sensibilité aux variations des différents traits d'histoire de vie.

## Articulation du document

Cette thèse s'organise en trois grandes parties.

La partie A présente l'étude bibliographique, dont un chapitre est un état de l'art sur l'uranium, avec notamment un descriptif de ses propriétés physico-chimiques, de sa présence dans l'environnement et de sa toxicité. Les deux chapitres suivants concernent le modèle biologique retenu, *Daphnia magna*, et les effets toxiques de l'uranium et autres contaminants sur cette espèce. Enfin, un dernier chapitre présente la modélisation en écotoxicologie avec un descriptif des modèles de budget énergétique et des outils permettant d'extrapoler les effets observés au niveau individu à la population.

La partie B est dédiée aux expérimentations réalisées sur les effets de l'uranium avec un premier chapitre illustrant les techniques de mesures développées au laboratoire et les scénarii d'exposition à l'uranium mis en œuvre. Dans les chapitres suivants, les résultats expérimentaux sont présentés. Chaque expérimentation est accompagnée d'une discussion.

La partie C est consacrée à modéliser le mode d'action de l'uranium à l'aide d'un modèle de budget énergétique, puis à extrapoler ces effets observés du niveau individuel à la population *via* des modèles matriciels. Pour cette extrapolation, deux approches sont

développées : la première se fonde directement sur les données observées, à chaque concentration d'uranium testée, et la deuxième approche combine les sorties du modèle de budget énergétique aux modèles matriciels, en considérant la concentration d'uranium comme une variable continue. Une discussion conclue chaque étude.

Ce travail de thèse se termine sur une conclusion générale avant de présenter les perspectives sur lesquelles ces travaux de recherche sont susceptibles de déboucher.

***Note au lecteur :***

*Des encadrés ont été insérés dans la synthèse bibliographique. Ils offrent au lecteur des informations complémentaires sur les concentrations en uranium retrouvées dans les eaux de consommations, sur son comportement et ses effets sur l'Homme.*

## **PARTIE A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1. Etat de l'art sur l'uranium

En 1896, Henri Becquerel découvre que des sels d'uranium sont capables d'émettre des rayonnements ayant comme propriété de noircir les plaques photographiques (**Genet, 1996**). Cette découverte marque le début de l'histoire de la radioactivité. L'uranium devient rapidement un élément très important pour l'activité humaine, à partir de 1939 notamment, après la découverte de sa fission. Il est d'abord utilisé dans la fabrication de la bombe d'Hiroshima, puis dans la production d'énergie électrique. Aujourd'hui, l'uranium est exploité par de nombreuses activités industrielles et sa dispersion dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire génère des inquiétudes pour la santé humaine et la protection de l'environnement.

## 1.1. Propriétés physico-chimiques de l'uranium

### 1.1.1. Propriétés physiques de l'uranium

Quatre vingt douzième élément de la table périodique, l'uranium est l'atome le plus lourd présent naturellement sur la Terre. A l'état pur, c'est un métal gris et dur, très dense (masse volumique de  $19.1 \text{ g.cm}^{-3}$ ) avec un point de fusion de  $1130^\circ\text{C}$ . Il est fortement électropositif (c'est-à-dire qu'il a tendance à perdre des électrons), très réactif à l'oxygène et, sous la forme de fines particules, il est capable de s'enflammer spontanément à température ambiante, il est dit pyrophorique (**WHO, 2001**).

L'uranium naturel est composé de trois isotopes, tous radioactifs. Les isotopes primordiaux  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$  sont présents depuis l'origine de la planète, il y a environ  $4.5.10^9$  ans. Le troisième isotope  $^{234}\text{U}$ , issu de la désintégration alpha de  $^{238}\text{U}$ , ne représente qu'une infime partie de la masse totale en uranium. En revanche, il est plus radioactif que les précédents et contribue pour 50% approximativement à la radioactivité totale de l'uranium naturel (Tableau 1).

Dans le cycle du combustible nucléaire, l'uranium subit différents traitements depuis l'extraction du minerai jusqu'à l'entreposage du combustible nucléaire usé. Parmi ces traitements, on trouve l'étape d'enrichissement de l'uranium qui vise à accroître la teneur en

$^{235}\text{U}$  (seul isotope capable de subir la fission nucléaire, et de libérer de l'énergie). La production d'uranium enrichi entraîne la production d'uranium appauvri contenant de plus faibles proportions de  $^{235}\text{U}$  (0.2% à 0.3%) et de  $^{234}\text{U}$  (Tableau 1). L'uranium appauvri peut aussi être issu de la filière de retraitement du combustible usé des réacteurs et être, dans ce cas, composé d'isotopes non naturels de l'uranium tels que  $^{236}\text{U}$  et  $^{232}\text{U}$ . Quelle que soit son origine, l'uranium appauvri est environ 40% moins radioactif que l'uranium naturel.

Isotope	Masse (%)			Activité (%)			Activité spécifique ( $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
	$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{234}\text{U}$	$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{234}\text{U}$	$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{234}\text{U}$
U naturel	99.27	0.72	0.005	48.2	2.3	49.5	12 400	580	12 474
U appauvri	99.80	0.20	0.0008	86.1	1.1	12.8	12 400	158	1 843

**Tableau 1 :** composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0.2% en  $^{235}\text{U}$  (Aigueperse et al., 2001)

### 1.1.2. Propriétés chimiques de l'uranium

Cet élément se positionne dans la classe A de la classification des éléments définie par **Nieböer et Richardson (1980)**, qui regroupe les éléments métalliques ayant une forte affinité pour l'oxygène et ayant tendance à former des complexes stables.

L'uranium peut adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes:  $\text{U}^{3+}$ (+III),  $\text{U}^{4+}$ (+IV),  $\text{UO}_2^+$ (+V) et l'ion uranyl  $\text{UO}_2^{2+}$ (+VI), fortement électropositif (**Ribera et al., 1996**). Les formes prépondérantes retrouvées dans l'environnement sont celles caractérisées par les degrés d'oxydation (+IV) et (+VI). En solution aqueuse, l'état d'oxydation de l'uranium va dépendre des conditions oxydoréductrices du milieu, ainsi que du pH.

## 1.2. Origine et redistribution de l'uranium dans l'environnement

### 1.2.1. Spéciation et distribution dans les écosystèmes terrestres

La répartition de l'uranium est très hétérogène, avec une teneur très faible dans le noyau et le manteau terrestre. Au niveau de la croûte terrestre, il est largement dispersé dans les différentes roches. Les teneurs les plus importantes sont retrouvées dans les roches acides,

type roche sédimentaire saturée en silice, on en trouve encore dans les granites (3 à 4 mgU.kg<sup>-1\*</sup>) et les roches phosphatées (20 à 120 mgU.kg<sup>-1</sup>). Des concentrations moindres sont retrouvées dans les roches basiques, comme les basaltes (**Langmuir, 1978**).

Des mécanismes tels que le transport par le biais des eaux de pluies (lixiviation), des phénomènes de diffusion, le transport par des organismes biologiques ou encore la resuspension par l'eau et l'air peuvent influencer la distribution de l'uranium dans les sols (**Ribera et al., 1996**).

Le comportement de l'uranium dans les écosystèmes terrestres peut aussi être influencé par les conditions d'oxydoréduction du milieu (**Gueniot et al., 1988a,b**). Lorsque les conditions oxydantes du sol prévalent, l'uranium se trouve sous la valence +VI (ion uranyle, UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>) qui est la forme la plus mobile. Sous cette forme, l'uranium se complexifie facilement avec la matière organique, les carbonates, les phosphates et les sulfates. Ces composés plus ou moins solubles déterminent pour une grande part la mobilité de l'uranium dans les sols. Ces phénomènes conduisent à l'existence de zones d'accumulation dans les horizons riches en matières organiques. En condition anaérobie, il peut être réduit à l'état +IV en U(OH)<sub>4</sub> ou U(OH)<sub>3</sub>, ou encore réagir avec les sulfures. Sous cette forme, il a alors tendance à précipiter.

Le FOREGS (Forum of the European Geological Surveys) a publié un atlas géochimique à l'échelle européenne recensant les paramètres physico-chimiques de différents compartiments, tels que l'eau, les sédiments et le sol ainsi que la répartition d'une cinquantaine d'éléments chimiques, notamment pour les éléments très rarement dosés (**Salminen, 2005**). Il détermine ainsi des concentrations médianes en uranium retrouvées dans les sous-sols de 2.03 mgU.kg<sup>-1</sup> (avec des concentrations s'échelonnant de 0.1 mgU.kg<sup>-1</sup> à 30.3 mgU.kg<sup>-1</sup>) et de 2.00 mgU.kg<sup>-1</sup> dans les couches supérieures des sols (avec une gamme de concentrations variant de 0.21 à 53.2 mgU.kg<sup>-1</sup>).

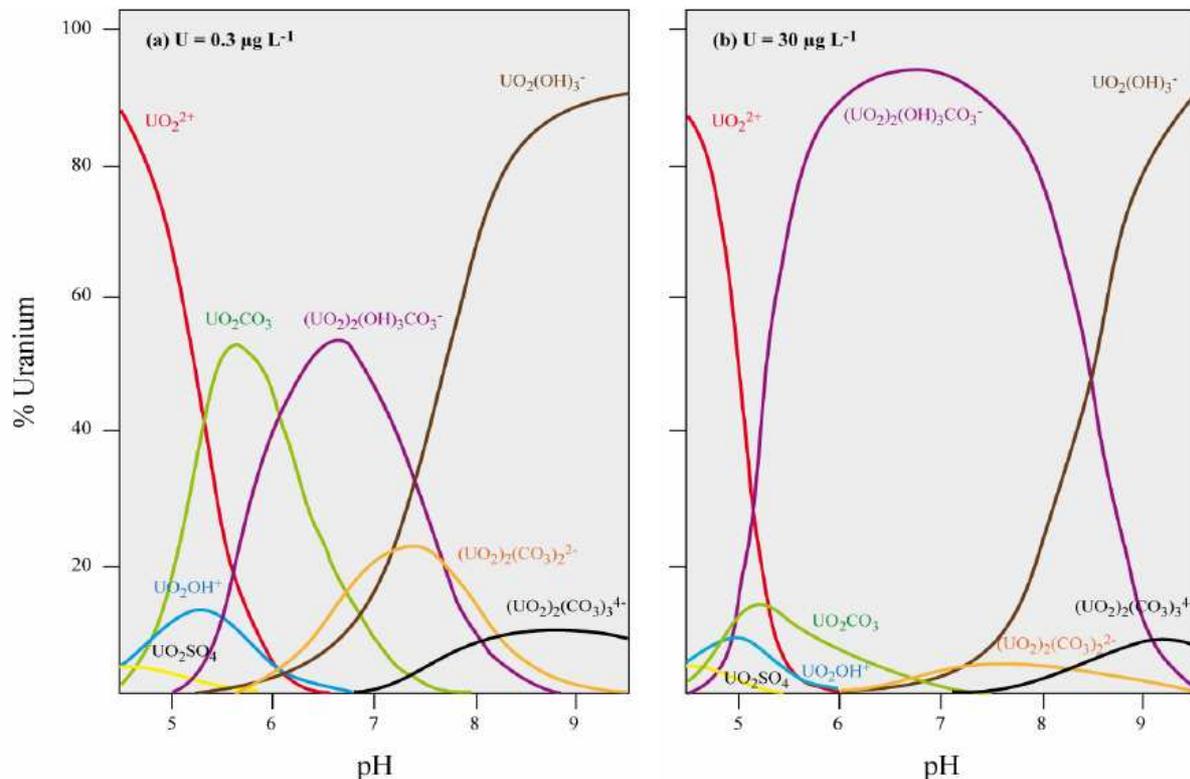
---

\* Dans le présent document, la notation des concentrations en uranium n'a pas suivi les règles typographiques du Système International d'unités. Par commodité, les concentrations en uranium retrouvées ou mesurées en milieu aquatique et terrestre ont été abrégées  $x$  gU.L<sup>-1</sup> d'eau et  $x$  gU.kg<sup>-1</sup> de sédiment, respectivement.

## 1.2.2. Spéciation et distribution dans les écosystèmes aquatiques

Au sein du compartiment aquatique, l'uranium est aussi bien retrouvé dans les eaux de surfaces que dans les eaux profondes. De la même manière que dans les écosystèmes terrestres, la mobilité de l'uranium dans les eaux est gouvernée par les conditions d'oxydoréduction du milieu.

Si les conditions sont oxydantes, l'uranium est majoritairement sous la forme d'ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$  (VI) pour des pH inférieurs à 6. Pour des pH supérieurs à 6, les formes hydroxylées apparaissent ( $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ ) puis, pour des pH supérieurs à 8, les formes carbonatées ( $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ ) (Figure 1).



**Figure 1 :** distribution de l'uranium en fonction du pH pour un modèle d'eau douce à (a)  $0.3 \mu\text{g U.L}^{-1}$  et (b)  $30 \mu\text{g U.L}^{-1}$  sans substance humique. Par mesure de clarté, les formes représentées à moins de 2% ne sont pas rapportées. Spéciation modélisée par HARPHRQ pour la composition ionique d'une rivière australienne (carbonates :  $40 \text{ mg.L}^{-1}$ , sulfates :  $9.4 \text{ mg.L}^{-1}$ , chlorures :  $5.1 \text{ mg.L}^{-1}$ , force ionique :  $0.002 \text{ M}$ , à  $25^\circ\text{C}$ , d'après Markish, 2002)

En conditions réductrices, dans les eaux anoxiques et dans les sédiments, l'uranium se trouve dans un état tétravalent (U(+IV)). Sous cette forme, l'uranium a une solubilité plus faible (Colle *et al.*, 2001 ; Denison *et al.*, 2004).

En plus du pH et du potentiel d'oxydoréduction, la spéciation de l'uranium en eau douce peut être influencée par la concentration des ligands organiques. La matière organique dissoute, et notamment les substances humiques représentant jusqu'à 75% du carbone organique dissous dans les hydrosystèmes fluviaux, favorise la formation de complexes organiques stables de l'ion uranyle et contribue ainsi à sa migration dans les systèmes aquatiques (Colle *et al.*, 2001).

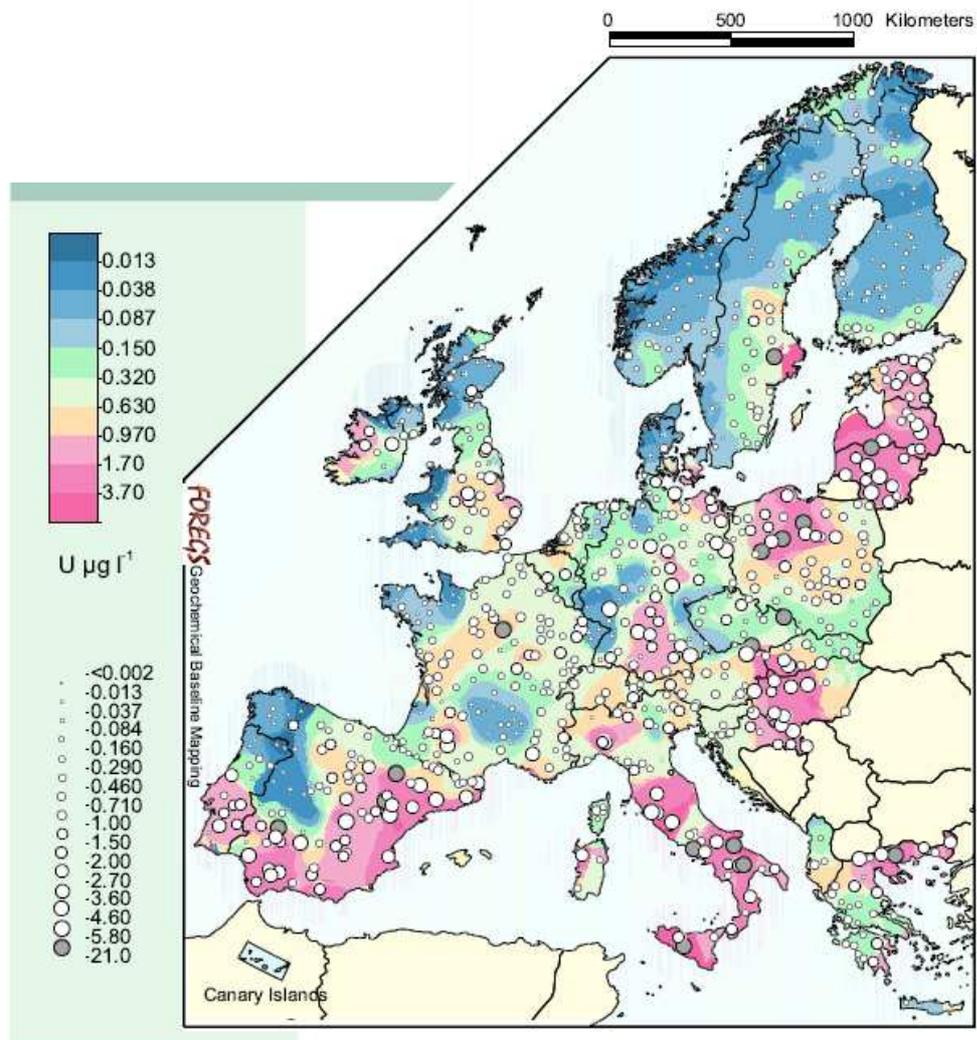


Figure 2 : distribution de l'uranium dans les cours d'eau d'Europe (Salminen, 2005)

Dans les eaux de surfaces oxygénées, l'uranium est mobile et les concentrations retrouvées sont variables bien que généralement assez faibles. A titre d'exemple, les valeurs

en uranium dans les cours d'eau européens varient de 4 ordres de magnitude, allant de concentrations inférieures à 0.002 à 11.1  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , avec une valeur médiane en Europe de 0.32  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (Figure 2).

La répartition de l'uranium dans les cours d'eau européens est très hétérogène, avec les valeurs les plus faibles retrouvées généralement au Nord et à l'Ouest de l'Europe et les augmentations des concentrations en uranium ( $> 1.7 \mu\text{gU.L}^{-1}$ ) se retrouvent plutôt au Sud et à l'Est de l'Europe.

La géochimie du terrain environnant, la proximité d'une zone impactée par l'activité humaine, couplées à des processus naturels tels que l'érosion et le lessivage des sols par les eaux de pluies peuvent expliquer l'élévation localement importante des teneurs en uranium dans les écosystèmes aquatiques (Colle *et al.*, 2001).

#### Uranium dans les eaux de consommation :

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande des valeurs-guides pour la concentration des radionucléides dans l'eau de consommation humaine. D'une façon générale, ces valeurs correspondent à une dose efficace annuelle de 0.10 mSv\*, sous l'hypothèse d'une consommation quotidienne de 2 litres d'eau. Dans le cas de l'uranium, la valeur guide est fondée sur la toxicité chimique et non sur la toxicité radiologique et est égale à 15  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (WHO, 2004).

Néanmoins, dans certaines régions du monde, les concentrations en uranium retrouvées dans les eaux de consommation peuvent être supérieures à cette valeur guide, comme par exemple dans des zones où des puits de forage ont été creusés dans des roches uranifères, comme en Finlande, où certains puits privés contiennent en moyenne 28  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (Kurtio *et al.*, 2002 ; 2005) et au Canada, où des puits peuvent contenir jusqu'à 700  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (WHO, 2004).

---

\* Le sievert (Sv) est la grandeur utilisée en radioprotection humaine pour exprimer la dose efficace et la dose équivalente afin de tenir compte respectivement de la différence de nocivité des divers rayonnements pour produire le même effet biologique stochastique (rayonnement de référence  $\gamma$  ou X) et de la différence de radiosensibilité des organes ou tissus.

### 1.2.3. Applications et impacts anthropiques

Avant la découverte de sa radioactivité, l'uranium était principalement utilisé comme colorant dans la verrerie, la céramique et la faïence, sous forme de diuranate de sodium et d'ammonium (WHO, 2001). Jusque dans les années 1980, il était aussi utilisé pour colorer des céramiques dentaires à très faibles concentrations (WHO, 2001). L'uranium était aussi employé comme catalyseur dans certaines réactions chimiques spécialisées et dans des films photographiques (WHO, 2001).

Aujourd'hui, l'uranium est présent dans différents secteurs industriels. Dans le domaine de l'agriculture, la production d'engrais, à partir de roches riches en phosphates contenant l'élément uranium, et sa dispersion sur des terres agricoles, peuvent augmenter localement les teneurs en uranium dans les sols. De plus, le phosphogypse, gypse non naturel issu du traitement industriel de la roche phosphatée pour la fabrication d'engrais phosphatés et de l'acide phosphorique, pose de sérieux problèmes écologiques. Seulement 15% de la production mondiale est recyclé, tandis que 85% est stocké à proximité des industries (Tayibi *et al.*, 2009). Or ces terrils contiennent encore des éléments traces et des radionucléides. Luther *et al.* (1993) déterminent des teneurs en uranium de 6 à 13 mg.kg<sup>-1</sup> dans des phosphogypses stockés dans l'Etat de l'Idaho soulevant ainsi de sérieux problèmes écologiques.

Le fonctionnement normal d'une centrale nucléaire entraîne la production de déchets radioactifs et non radioactifs. Parmi les déchets radioactifs, de nature gazeuse ou liquide, on retrouve des métaux, l'iode, le <sup>14</sup>Carbone (<sup>14</sup>C), le tritium, des aérosols ou encore des gazes rares. Différents systèmes de récupération existent, de façon à extrêmement limiter, régler et contrôler leurs productions. Néanmoins, des accidents peuvent survenir. En 2008, le débordement d'une cuve d'entreposage de la station de traitement des effluents uranifères de l'usine de Socatri du Tricastin a entraîné la fuite d'une solution contenant de l'uranium. La surveillance sur le lieu même de l'accident a permis de mesurer une concentration transitoire maximale en uranium de 85 µg.L<sup>-1</sup>. Les expertises n'ont pas mis en évidence de transfert significatif vers les eaux souterraines, confortant l'hypothèse d'un transfert majoritaire par les eaux de surface (Gagnaire *et al.*, 2011).

L'exploitation des mines d'uranium, en amont du cycle du combustible nucléaire, contribue largement à l'augmentation des concentrations de cet élément dans les hydrosystèmes. Par exemple, les concentrations retrouvées en mer d'Aral, peuvent atteindre  $141 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . Ces élévations anormalement importantes proviennent essentiellement de la rivière Syrdarya contaminée par l'activité minière (**Friedrich, 2009**). De plus, à proximité de certains sites miniers aux Etats-Unis, des concentrations allant de  $10 \text{ mgU.L}^{-1}$  jusqu'à  $20 \text{ mgU.L}^{-1}$  ont été mesurées (**Ragnarsdottir et Charlet, 2000**).

Du fait de sa haute dureté et forte densité, l'uranium appauvri, un sous produit de l'enrichissement de l'uranium, est utilisé dans le secteur de l'armement en rentrant dans la fabrication des munitions. Ainsi des obus à base d'uranium appauvri ont été utilisés lors des guerres du Golfe (guerre du Koweït et guerre en Irak), en Bosnie-Herzégovine et au Kosovo (**WHO, 2001**). On le retrouve aussi dans la composition de missiles capables de perforer aisément les blindages et de s'enflammer lors de son impact avec un bâtiment ou véhicule. L'uranium appauvri est également utilisé pour faire des plaques de blindage (**WHO, 2001**). L'équivalent de 300 tonnes d'uranium appauvri a été utilisé lors de la guerre du Golfe, 10 tonnes au Kosovo et 2 tonnes en Bosnie-Herzégovine. Lors des tirs, l'uranium se disperse sous forme de fines particules d'oxydes d'uranium peu solubles qui se déposent rapidement sur le sol (**Bem et Bou-Rabee, 2004**). Il est aussi utilisé comme contrepoids dans certains avions, comme sur les premiers Boeing 747, les McDonnell Douglas DC-10, les Lockheed L1011 TriStar (**WHO, 2001**), ce qui pose, aujourd'hui, le problème du recyclage de ces avions qui, pour beaucoup, arrivent en fin de vie. Les propriétés de l'uranium appauvri font qu'il est également utilisé dans le milieu médical pour faire des écrans de protection contre les rayonnements ionisants.

La gestion des déchets contenant de l'uranium ne pose pas de souci quand les rejets sont contrôlés. Néanmoins, les rejets accidentels (*e.g.* Socatri) ou résiduels (*e.g.* terrils des mines uranifères ou de phosphogypse, ou résidus d'explosion de bombes et de missiles) peuvent engendrer des concentrations en uranium localement importantes dans les écosystèmes aquatiques et terrestres.

### 1.3. Facteurs influençant la toxicité de l'uranium

#### 1.3.1. Spéciation et biodisponibilité

La connaissance de la distribution de l'uranium parmi ses multiples formes physicochimiques est fondamentale pour comprendre l'interaction de l'uranium avec la surface des cellules des organismes. En effet, dans les systèmes aquatiques, l'uranium se trouve sous une variété de formes physicochimiques, incluant l'ion métal libre ( $U^{4+}$  ou  $UO_2^{2+}$ ) et des formes complexes. Pour qu'il exerce un effet sur les organismes vivants, il doit être sous une forme chimique ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques. En d'autre terme, il doit être biodisponible.

Deux modèles sont couramment utilisés pour évaluer la toxicité chimique de métaux : le modèle de l'ion libre (FIAM, Free-Ion Activity Model) et 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 varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution. Le modèle 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 (**De Schamphelaere et Janssen, 2002; Paquin, 2002 ; Denison, 2004**).

Selon ces modèles, les différentes substances présentes dans le milieu peuvent interagir avec la biodisponibilité du métal en formant des complexes métalliques (*i.e.* réduisant l'activité de l'ion libre) ou *via* une compétition pour le site de liaison surfacique. Concernant l'uranium, l'application de ces modèles semble plus complexe dans la mesure où les études sont partagées quant à la corrélation entre la concentration de l'ion libre, la biodisponibilité et la toxicité. En effet **Markich et al. (2000)** trouvent que les mouvements valvaires de *Velesunio angasi*, un bivalve d'eau douce, en réponse à la présence d'uranium, sont fortement dépendants du pH et/ou de la concentration en matière organique dissoute. **Nakajima et al. (1979)** et **Greene et al. (1986)** montrent que les taux d'absorption de l'uranium pour deux types d'algues vertes unicellulaires, *Chlorella regularis* et *Chlorella vulgaris*, diminuent avec la concentration en carbonate, quand le pH et la dureté sont maintenus constants. Les auteurs en concluent que la complexation de l'uranium par les

carbonates réduit l'activité de  $\text{UO}_2^{2+}$  et donc l'absorption de l'uranium par les algues. **Nakajima et al. (1979)** et **Ebbs et al. (1998)** tirent les mêmes conclusions en présence de phosphate. De plus, **Charles et al. (2002)** montrent que l'augmentation de la dureté de l'eau (passant de 8 à 400  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ) diminue la toxicité de l'uranium chez l'algue, *Chlorella* sp. L'explication de cette réduction de toxicité de l'uranium avec l'augmentation de la dureté de l'eau reposerait sur une compétition entre l'uranium et le calcium et/ou le magnésium pour les sites de fixation à la surface des cellules des organismes.

Ainsi, la biodisponibilité et toxicité de l'uranium dans les eaux douces seraient fortement influencées par une multitude de paramètres physicochimiques, incluant notamment le pH, la teneur en matières organiques, la dureté (concentrations en Ca et Mg généralement exprimées en équivalent  $\text{CaCO}_3$ ) et l'alcalinité de l'eau (concentration en carbonate aussi généralement exprimée en équivalent  $\text{CaCO}_3$ ).

### 1.3.2. Voies d'exposition

L'entrée d'uranium chez un organisme aquatique peut se faire selon différentes voies :

- la voie trophique, par l'ingestion et l'assimilation de la nourriture contaminée ;
- la voie directe, au contact du sédiment ou du milieu environnants ;
- la voie maternelle, par un transfert *via* les parents contaminés.

La contribution de chacune de ces voies est encore mal connue, mais les données existantes montrent que le transfert de l'uranium dans les chaînes alimentaires est considéré comme faible et diminue quand le niveau trophique augmente (**Poston, 1982 ; Swanson, 1982 ; Ahsanullah et Williams, 1989 ; Ribera et al., 1996**). Parallèlement à cette diminution du facteur de concentration (grandeur évaluant la bioaccumulation d'un polluant par un organisme vivant, défini comme le rapport entre la concentration du polluant dans l'organisme et sa concentration dans l'eau), une diminution du facteur trophique (facteur défini comme le ratio des concentrations de radionucléide dans le prédateur et dans la proie) est également observé (**Colle et al., 2001**). En effet **Simon et Garnier-Laplace (2004, 2005)** montrent que les niveaux d'uranium accumulés dans les prédateurs sont moindres par rapport à ceux retrouvés dans les proies, indiquant qu'il n'y a pas de bioamplification de l'uranium à partir de la nourriture, cette absence résultant d'un très faible taux d'assimilation de l'uranium lors de l'ingestion (1 à 13%). De plus, **Bourrachot (2005)** révèle peu d'effets sur les taux d'ingestion et la reproduction chez *Daphnia magna* après une exposition à l'uranium par voie

trophique en contaminant la source de nourriture. Cela s'explique par le très faible niveau de bioaccumulation en uranium des algues ( $3.7 \mu\text{gU.L}^{-1}$  retrouvé dans les algues pour un marquage à  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant 3 heures). De plus une perte de plus de 50% en uranium contenu dans les algues se retrouve dans le milieu, après 24 heures, suggérant une contamination potentielle des individus par voie directe. Cette étude révèle la complexité de mise en œuvre et d'interprétation des résultats de tests par contamination indirecte à l'uranium.

Le sédiment étant un des compartiments du système aquatique qui peut comporter de très fortes concentrations en uranium (**Hart et al., 1986 ; Lottermoser et al., 2005**), cette source de contamination pourrait se révéler plus importante pour des espèces benthiques qui, soit ingèrent du sédiment pour trouver leur nourriture, soit vivent au contact direct de ce sédiment (**Swanson, 1985 ; Ribera et al., 1996**). **Lagauzère et al. (2009)** retrouvent des concentrations en uranium dans le corps de vers, du genre *Tubifex tubifex*, variant de 38 à  $3070 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de poids sec, pour des concentrations d'exposition initiale en uranium allant de 0 à  $5980 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de masse sèche de sédiments. Considérant le mode de vie de cet animal, les auteurs suggèrent deux modes possibles de voie d'exposition : l'uranium pourrait s'incorporer par ingestion de particules de sédiments et/ou par diffusion passive au travers de l'épiderme au niveau de la partie caudale restée au contact direct de l'eau.

D'après l'étude de **Chassard-Bouchaud (1988)**, l'entrée d'uranium chez la moule marine, *Mytilus edulis*, après exposition par voie directe, via l'eau du milieu environnant se fait au niveau des branchies, palpes labiaux et au niveau du manteau. Chez les poissons, l'entrée d'uranium s'effectue principalement, comme tout élément en eau douce, par la voie branchiale, parallèlement au processus de respiration/osmorégulation et par ingestion de nourriture (**Colle et al., 2001**).

Pour ce qui est de la contamination par transfert parental, **Bourrachot (2009)** montre un transfert significatif de l'uranium de la mère aux œufs de *Danio rerio*, après exposition des parents. L'uranium se situerait à 90% à l'intérieur de l'œuf et non sur le chorion (enveloppe externe) avec des concentrations de 2.96 et  $9.61 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de poids sec d'œufs après 20 jours d'exposition des parents à 20 et  $250 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , laissant ainsi présager des dommages à l'ADN dans ces embryons.

### 1.3.3. Bioaccumulation

Passé les différentes barrières biologiques, l'uranium a la capacité de se concentrer au sein de l'organisme. D'après **Labrot et al. (1999)**, la masse viscérale et les branchies de *Corbicula fluminea* sont les sites d'accumulation prédominants de l'uranium chez ce bivalve. Ces résultats sont confirmés par **Simon et Garnier-Laplace (2004)** qui examinent la distribution de l'uranium dans les organes chez ce même bivalve après 42 jours d'exposition à  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$  et trouvent les niveaux d'accumulation les plus élevés dans la masse viscérale et les branchies. D'après **Ribera et al. (1996)**, les glandes digestives et les gonades des mollusques sont un lieu de stockage, l'activité rénale assurant l'excrétion. Par la suite, **Simon et Garnier-Laplace (2005)** découvrent chez des écrevisses (*Orconectes limosus*) que l'uranium s'accumule dans l'estomac et plus particulièrement au niveau de la glande digestive.

**Swanson (1985)** et **Waite et al. (1988)** montrent chez des poissons sauvages que les sites majeurs d'accumulation de l'uranium sont les os, le tractus gastro-intestinal, les reins et le foie. Suite à plusieurs études menées *in situ* dans un bassin versant influencé par l'exploitation de minerais d'uranium au Canada, **Clulow et al. (1998)** montrent que le niveau moyen d'accumulation d'uranium dans les os est plus élevé par rapport à ceux retrouvés dans les muscles pour 3 espèces de poissons. Plus récemment, **Lerebours et al. (2009)** ont exposé *Danio rerio* à des concentrations moyennes en uranium de 23 et  $130 \mu\text{gU.L}^{-1}$  et ont mesuré des concentrations en uranium dans les branchies, le cerveau, le foie et le muscle. Les niveaux d'accumulation en uranium retrouvés étaient 10 fois supérieurs dans le foie et les branchies que dans le cerveau et le muscle aux deux concentrations d'exposition.

**Comportement de l'uranium chez l'Homme:**

Une contamination à l'uranium chez l'homme se fait essentiellement par l'ingestion de nourriture ou d'eaux. L'OMS estime l'apport quotidien en uranium par l'ingestion à 1-4  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , soit 1000 fois plus que la quantité inhalée (**WHO, 2004**).

Le comportement et la distribution de l'uranium chez l'homme sont dépendants à la fois de la voie d'exposition et de la forme chimique de l'uranium. En effet, les sels d'uranium insolubles sont retenus de manière plus importante au niveau des sites d'entrée, comme les poumons après inhalation (**Leach et al., 1970**), alors que les composés solubles entrent dans le sang et sont très rapidement transférés aux organes cibles. Quelques jours après absorption ou injection d'uranium dans le sang, la majeure partie de l'uranium se retrouve principalement fixée sur les os, une partie beaucoup plus faible dans le foie et les tissus mous (**Métivier et al., 2001**). Les reins sont aussi le siège d'effets délétères prédominants (**Kurtio et al., 2005**).

**1.4. Toxicité de l'uranium**

Du fait de ses caractéristiques de métal lourd, l'uranium est considéré comme chimiotoxique. Mais, les propriétés radioactives de ses isotopes en font un composé potentiellement radiotoxique, notamment lorsqu'il est enrichi en  $^{235}\text{U}$ , beaucoup plus énergétique.

**1.4.1. Toxicité chimique et toxicité radiologique**

La toxicité radiologique de l'uranium est donc liée à sa composition isotopique et à l'activité spécifique de ses isotopes. L'émission de radiations ionisantes dans les cellules est susceptible de créer des interactions avec les molécules de façon directe ou indirecte. Dans le premier cas, il s'agit d'un dépôt d'énergie (excitation) et de l'arrachement consécutif d'un électron (ionisation) sur la molécule. Des études *in vitro* ont montré que les particules alpha émises par l'uranium peuvent causer directement des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (**Miller et al., 2002**). Dans le deuxième cas, les rayonnements ionisants peuvent augmenter la production de radicaux libres par radiolyse de l'eau, ce qui peut conduire à l'altération des macromolécules biologiques.

Les résultats récents de **Mathews *et al.* (2009)** corroborent de précédentes études qui suggèrent que la toxicité chimique de l'uranium serait plus dangereuse que sa toxicité radiologique. Chimiquement, la présence d'uranium dans les cellules peut entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), pouvant être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire. Celui-ci se caractérise par des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de désamination, de réduction, de rupture de chaînes carbonatées et de polymérisation, ayant pour cibles principales les macromolécules tels que les protéines, les phospholipides membranaires et les acides nucléiques (**Ribera *et al.*, 1996**).

Dans le but de mettre en évidence quels sont les effets liés à la chimiotoxicité de l'uranium par rapport à sa radiotoxicité chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, **Bourrachot (2009)**, a conduit des expériences avec de l'uranium appauvri et l'isotope 233 de l'uranium ( $^{233}\text{U}$ ), ayant une activité radiologique 14 000 fois supérieur à l'uranium appauvri. Le comportement de bioaccumulation de l'uranium n'est pas dépendant de la composition isotopique (**Barrillet *et al.*, 2007**). Par conséquent, les éventuelles différences d'effets observées entre une exposition à l'uranium appauvri et une exposition à l' $^{233}\text{U}$ , pour une même concentration d'exposition, sont attribuées à la part de radiotoxicité si ces différences d'effets n'apparaissent que dans les expériences avec l' $^{233}\text{U}$ . En étudiant les effets sur le temps nécessaire pour que 50% des œufs éclosent et sur le pourcentage de dommages à l'ADN, les résultats permettent de conclure qu'à faible concentration massique ( $20 \mu\text{gU.L}^{-1}$ ), la différence d'effets entre les deux compositions d'uranium est due à la radiotoxicité supplémentaire dans le cas de l' $^{233}\text{U}$ .

#### 1.4.2. Toxicité au niveau cellulaire, moléculaire et tissulaire

Les dommages moléculaires et cellulaires précèdent toujours les effets macroscopiques (**Ribera *et al.*, 1996**).

**Labrot *et al.* (1999)** montrent chez *Corbicula fluminea* et *Brachydanio rerio*, que des concentrations de  $0.56$  et  $3000 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acétate d'uranium, sur une durée de 4 à 11 jours, déclenchent *in vitro* des mécanismes de peroxydation lipidique membranaire et inhibent l'activité catalytique de diverses enzymes intervenant dans les défenses antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et réductase...). Plus récemment, les travaux *in vivo* de **Barillet *et al.* (2007)** montrent une perturbation du système antioxydant hépatique de poissons zèbres mâles avec des diminutions des niveaux d'activités de la

catalase et de la superoxyde dismutase, ainsi qu'une augmentation de l'activité acétylcholinestérase, pour une concentration d'exposition en uranium de  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$ .

#### 1.4.3. Toxicité de l'uranium au niveau individuel chez les organismes aquatiques

##### *1.4.3.1. Toxicité aiguë*

La majorité des travaux sur les effets de l'uranium concernent des données acquises dans le cadre d'expositions aiguës à forte concentration en uranium. Elles sont majoritairement axées sur des modèles pélagiques d'invertébrés et de vertébrés, type poissons et elles visent à déterminer des concentrations d'exposition entraînant 50% de mortalité chez les organismes étudiés ( $CL_{50}$ ) (Tableau 2).

	Espèce	Paramètre estimé	Valeurs (mg U L <sup>-1</sup> )	Dureté de l'eau	Référence
<b>Phytoplancton</b>	<i>Chlorella</i> sp.	CE <sub>50</sub> 72 h	0.044 – 0.078	2-4 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Franklin et al., 2000</b>
	<i>Chlorella</i> sp	CE <sub>50</sub> 72 h	0.137 - 0.238	25 µS cm <sup>-1</sup>	<b>Hogan et al., 2005</b>
<b>Cladocères</b>	<i>Daphnia magna</i>	CL <sub>50</sub> 48 h	5.3 - 7.6 30 - 44	66-73 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> 126-140 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Poston et al., 1984</b>
	<i>Diaphanosoma excisum</i> <i>Latonopsis fasciculata</i> <i>Dadaya macrops</i> <i>Moinodaphnia macleayi</i>	CL <sub>50</sub> 24 h	0.4 - 6.4	3.3 mg L <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub>	<b>Bywater et al., 1991</b>
	<i>Moinodaphnia macleayi</i>	CL <sub>50</sub> 48 h	0.16 – 0.39	350 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Semaan et al., 2001</b>
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL <sub>50</sub> 96 h	10.50	182 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Khune et al., 2002</b>
	<i>Daphnia magna</i>	CL <sub>50</sub> 48 h	5.8 – 25.4	91 - 180 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Barata et al., 1998</b>
	<i>Daphnia magna</i>	CL <sub>50</sub> 48 h	0.39 – 7.8		<b>Zeman et al., 2008</b>
	<i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia longispina</i>	CL <sub>50</sub> 48 h	0.71 0.40	1000 µS cm <sup>-1</sup>	<b>Antunes et al., 2007</b>
	<b>Bivalves</b>	<i>Corbicula fluminea</i>	CL <sub>50</sub> 96 h	1872	178 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>
<i>Velesunio angasi</i>		CE <sub>50</sub> 48 h	0.117 – 1.228	2.5 mg L <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> +/- 7.5 mg L <sup>-1</sup> COD	<b>Brown et al., 1994</b>
<b>Cnidaires</b>	<i>Hydra</i> sp.	LOEC 96 h	0.15 – 0.40	12 – 20 µS cm <sup>-1</sup>	<b>Hyne et al., 1992</b>
	<i>Hydra</i> sp.	CE <sub>50</sub> 96 h	0.114 0.177 0.219	6.6 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> 165 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> 330 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Riethmuller et al., 2001</b>
<b>Poissons</b>	<i>Brachydanio rerio</i>	CL <sub>50</sub> 96 h	3.05	178 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Labrot et al., 1996</b>
	<i>Pimephales promelas</i>	CL <sub>50</sub> 96 h	2.8 – 3.1	20 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Tarzwil et Henderson 1960</b>
	<i>Pimephales promelas</i>	CL <sub>50</sub> 96 h	135 16.7	400 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> 66 – 73 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	<b>Poston et al., 1982</b>
	<i>Melanotaenia nigrans</i> <i>Melanotaenia splendida inornata</i> <i>Craterocephalus marianae</i> <i>Pseudomugil tenellus</i> <i>Ambassis macleayi</i> <i>Mogurnda mogurnda</i>	CL <sub>50</sub> 96	0.73 – 3.46	3.3 mg L <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub>	<b>Bywater et al., 1991</b>

**Tableau 2 :** synthèse des différentes valeurs de toxicité aiguë retrouvées dans la littérature, en fonction de la chimie de l'eau, chez des organismes aquatiques d'eau douce

Pour les invertébrés aquatiques, la toxicité aiguë de l'uranium varie de 0.16 à 44 mgU.L<sup>-1</sup> chez les cladocères, de 0.117 à 1872 mgU.L<sup>-1</sup> chez les bivalves et de 0.1 à 0.4 mgU.L<sup>-1</sup> chez les cnidaires (Tableau 2). Cette variation de toxicité est fonction de l'espèce

considérée et des concentrations en  $\text{CaCO}_3$  dans le milieu d'exposition. Cette variabilité dans les résultats montre l'importance de contrôler la composition du milieu d'exposition dans les expériences.

Comme pour les invertébrés aquatiques, la toxicité de l'uranium chez les poissons se trouve être fortement dépendante de la dureté de l'eau du milieu d'exposition. Les valeurs de  $\text{CL}_{50}$  à 96 h chez les poissons sont comprises entre 0.73 et 135  $\text{mgU.L}^{-1}$  (**Tarzwel et Henderson 1960 ; Poston *et al.*, 1982 ; Bywater *et al.*, 1991 et Labrot *et al.*, 1996**)

Dans une revue de données issues de la littérature, **Sheppard *et al.* (2005)** développent une relation pour prédire la concentration entraînant 50% de létalité à 96 h chez les poissons. Cette relation est fonction de l'alcalinité et dureté du milieu d'exposition :

$$\log_{10}[\text{U}] = -0.52 + 0.96 \log_{10} [\text{CaCO}_3]$$

où  $[\text{U}]$  et  $[\text{CaCO}_3]$  sont exprimées en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

#### 1.4.3.2. Toxicité chronique

Peu de travaux concernent les effets d'une exposition chronique à l'uranium pouvant entraîner des effets sub-létaux chez des organismes aquatiques. Parmi les études relatives à la toxicité chronique de l'uranium chez les cladocères, les valeurs de toxicité déterminées par **Pickett *et al.* (1993)** seraient les plus drastiques. Ainsi, ces auteurs déterminent une  $\text{CE}_{25}$  chez *Ceriodaphnia dubia*, à 7 jours, sur la reproduction, égale à 2.7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nitrate d'uranyl. **Poston *et al.*, 1984**, reportent une LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) pour le critère de reproduction à 21 jours chez *Daphnia magna* égale à 0.52  $\text{mgU.L}^{-1}$ . Une LOEC reproduction à 5 jours chez *Moinodaphnia macleayi* a été déterminée par **Semaan *et al.* (2001)** à 20-49  $\text{mg.U.L}^{-1}$ . Chez *Ceriodaphnia dubia*, les effets sur la reproduction montrent une LOEC de 3.91  $\text{mgU.L}^{-1}$  avec une NOEC de 1.97  $\text{mgU.L}^{-1}$  (**Kuhne *et al.*, 2002**). Plus récemment, **Zeman *et al.* (2008)** déterminent une  $\text{CE}_{50}$  et une  $\text{CE}_{10}$  sur la reproduction, chez *Daphnia magna*, égales à  $91 \pm 15$  et  $14 \pm 7$   $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , respectivement. Ces valeurs de toxicité plus faibles sont dues à une réduction du pH et donc de l'alcalinité, augmentant ainsi la proportion d'ion libre  $\text{UO}_2^{2+}$ .

En ce qui concerne les poissons, le nombre d'études sur les effets d'une exposition chronique à l'uranium au niveau de l'individu sont assez limitées. **Bourrachot et al. (2008)** étudient les conséquences d'une exposition chronique à l'uranium sur la reproduction et le développement du poisson zèbre. Les résultats révèlent que l'uranium affecte l'éclosion des œufs, la survie des œufs et des larves ainsi que le succès reproducteur des adultes dès  $20 \mu\text{gU.L}^{-1}$ .

Les sédiments peuvent représenter un compartiment important de stockage pour l'uranium dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce. La présence d'uranium dans ce compartiment peut avoir des effets toxiques sur les macro-invertébrés benthiques ou encore les poissons qui s'en nourrissent. Il existe peu d'études sur les impacts de l'uranium sur les macro-invertébrés exposés *via* le sédiment. L'étude de **Dias et al. (2008)** montre des effets toxiques significatifs sur la survie, le temps de développement et la croissance de larves de *Chironomus riparius* dès  $2.97 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de poids sec de sédiments. De plus, **Lagauzère et al. (2009)** observent des malformations, des réductions de la survie, de la biomasse et de l'activité de bioturbation chez le ver *Tubifex tubifex* pour des concentrations  $\geq 599 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de poids sec de sédiments, après 12 jours d'exposition. Cette résistance relativement plus élevée, en comparaison aux effets mis en évidence chez *C. riparius*, s'expliquerait par des modifications morphologiques comme l'autotomie\*, déclenchée dans le cas des sédiments les plus contaminés. *T. tubifex* serait aussi capable d'augmenter sa production de mucus, limitant ainsi les échanges entre son corps et le sédiment contaminé. Un effet hormésis sur la biomasse est aussi observé. Le mécanisme qui induit une augmentation de la biomasse pour de faibles concentrations en uranium est inconnu, mais l'hypothèse d'une augmentation de la consommation de nourriture et/ou augmentation de l'assimilation dans ces conditions n'est pas à écarter. Il est aussi probable que les vers aient modifié leur comportement et se soient enfoncés plus profondément dans le sédiment par évitement. En 1998, BEAK International Inc. évalua la toxicité d'un sédiment contaminé en uranium sur un amphipode épibenthique : *Hyalella azteca*. Après 14 jours d'exposition, une décroissance significative de la survie des juvéniles de *H. azteca* a été observée pour des concentrations d'uranium  $\geq 6.1 \mu\text{gU.g}^{-1}$  de poids sec de sédiments.

---

\* L'autotomie est la capacité d'un animal à perdre volontairement une partie de son corps.

**Toxicité de l'uranium chez les vertébrés supérieurs :**

Concernant les expositions de particules uranifères après inhalation, des études révèlent que des expositions aiguës à de fortes quantités d'uranium induisent principalement une inflammation interstitielle de l'épithélium alvéolaire conduisant éventuellement à une fibrose pulmonaire (ATSDR, 1999, Coggle *et al.*, 1986, Cooper *et al.*, 1982). Des expositions chroniques à l'uranium, chez différentes espèces animales, induisent des œdèmes pulmonaires, une inflammation des bronches et des alvéoles, des emphysèmes, une prolifération cellulaire (carcinomes et adénomes) et des zones de fibrose et/ou de nécrose (ATSDR, 1999).

Une fois l'uranium internalisé, les reins et les tissus osseux constituent les cibles majeurs (Morrow *et al.*, 1982 ; La Touche *et al.*, 1987 ; Diamond *et al.*, 1989 ; Walinder, 1989). Le rein est considéré comme faiblement radiosensible, il constitue l'organe le plus touché par l'effet chimiotoxique de l'uranium (Diamond *et al.*, 1989, Leggett, 1989, Taulan, 2004). Chez diverses espèces animales, l'inhalation de composés uranifères relativement solubles induit une néphrotoxicité se traduisant par l'apparition de nécroses de l'épithélium tubulaire, de protéinuries ou encore de glucosuries (ATSDR, 1999, Morrow *et al.*, 1982). Le tissu osseux est l'organe majeur de fixation à long terme (Leggett, 1994). En effet 15 à 30% de la quantité initiale dans le sang se retrouve dans les os au niveau desquels l'uranium peut exercer un effet radiologique. D'autres organes, incluant le foie et la rate, accumulent aussi l'uranium après une exposition chronique.

Les effets observés au niveau des organes sont le reflet d'actions de l'uranium aux niveaux cellulaires et moléculaires. Principalement par des études *in vitro*, il a été montré que l'uranium est capable d'interagir avec des protéines, d'induire des dommages de l'ADN et de moduler l'expression de gènes conduisant à la mort ou à la transformation de cellules.

### 1.5. Valeurs guides pour la protection de l'environnement

Dans la directive cadre européenne sur l'eau du 22 décembre 2000, les Etats membres ont décidé de mettre en place des approches combinant le contrôle de la pollution à la source avec la détermination de valeurs limites de rejets et la prévention par détermination de Normes de Qualité Environnementale pour les substances dangereuses (NQE). Une circulaire du 7 mai 2007 DCE/23 définit ainsi les "Normes de Qualité Environnementale provisoires (NQEp)" de plusieurs substances chimiques, parmi lesquelles se trouve l'uranium. La NQEp proposée pour l'uranium est égale à la somme de la concentration définissant le bruit de fond géochimique et de la PNEC (Predicted No Effect Concentration, concentration en dessous de laquelle aucun effet inacceptable n'est attendu) de  $0.3 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans l'eau filtrée à  $0.45 \mu\text{m}$  pour les eaux continentales de surface. Les résultats obtenus ces dernières années *via* des travaux sur le devenir et les effets biologiques de l'uranium au sein des écosystèmes d'eau douce ont amené à une révision de la PNEC. Une valeur de PNEC chronique de  $5 \mu\text{gU.L}^{-1}$  à utiliser en incrément du bruit de fond géochimique du milieu est ainsi proposée (**Beaugelin-Seiller *et al.*, 2009**)

Pour l'évaluation du risque radiotoxique, le projet européen ERICA a émis la recommandation d'adopter une valeur de  $10 \mu\text{Gy.h}^{-1}$  en tant que PNEDR (Predicted No Effect Dose Rate) (**ERICA, 2004**).

D'autres organismes internationaux (**MOEE, 1994; ANZECC et ARMCANZ, 2001; Environnement Canada, 2003,2008; Saskatchewan Environment, 2006**) ont émis des critères de protection des milieux d'eaux douces pour l'uranium, basés principalement sur des critères de toxicité chimique (Tableau 3). Ces valeurs varient de 0.5 à  $280 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , mettant en évidence la nécessité d'une homogénéisation des valeurs guides au niveau international.

Toutefois, à cause des différences de toxicité selon la nature de l'uranium considérée et de sa double toxicité (chimique et radiologique), l'uranium présente un challenge pour l'évaluation du risque environnemental. **Mathews *et al.* (2009)** révèlent que les écosystèmes aquatiques d'eau douce ne sont presque jamais protégés par la valeur de référence chimique. Ces résultats soulignent l'importance de déterminer des valeurs de référence chimique et radiologique pour l'évaluation du risque environnemental dans le cas des écosystèmes aquatiques contaminés en uranium.

Programme	Valeurs guides	Concentrations $\mu\text{gU.L}^{-1}$	Références
Oak Ridge National Laboratory (ORNL)	Valeurs de screening pour l'étape II de la méthode d'évaluation du risque	2.6	<b>Suter, 1996</b>
SRS Remediation Programme	Valeurs de référence pour prioriser les polluants et les sites à considérer pour la remédiation dans une étape de screening	2.6	<b>Friday, 2005</b>
Environment Canada et Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME)	Valeurs estimées sans effet observé Canadian Water Quality guidelines for the Protection of Aquatic life	Poissons : 280 <i>Daphnia pulex</i> : 22 <i>Ceriodaphnia dubia</i> : 3	<b>Environment Canada, 2003</b>
Quebec Regional Water Quality Objective	Valeur guide pour la protection de la vie aquatique (CVAC, provisional aquatic life chronic value)	14 (20-100 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> ) 100 (100-210 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	<b>Boudreau et Guay, 2002</b>
Saskatchewan Surface Water Quality Objectives for the Protection of Aquatic Life	Valeur guide pour la protection de la vie aquatique	15	<b>Saskatchewan Environment, 2006</b>
Ontario Interim Provincial Water Quality Objective	Valeur à employer en cas d'urgence, avec précaution	5	<b>MOEE, 1994</b>
Environment Canada	Canadian Water Quality guidelines for the Protection of Aquatic life – exposition à long terme	19	<b>Environnement Canada, 2008</b>
Australian and New Zeland Environment and Conservation Council (ANZECC) et Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zeland (ARMCANZ)	Valeurs guides pour la qualité de l'eau ou WQG	0.5 (valeur provisoire)	<b>ANZECC et ARMCANZ, 2001</b>

**Tableau 3 :** synthèse des valeurs guides définies par les organismes nationaux ou internationaux dans la détermination de critères de protection des milieux aquatiques vis-à-vis de l'uranium

## Chapitre 2. *Daphnia magna* comme modèle biologique

*Daphnia magna* est un microcrustacé planctonique d'eau douce, de l'ordre des Cladocères, recommandée en tant que modèle biologique de référence dans différents bioessais standardisés pour l'évaluation des effets toxiques potentiels de substances chimiques (ASTM, 2004, ISO, 1996, OCDE, 2004 et 2008). En effet, *D. magna* est facile à manipuler et à étudier en laboratoire du fait de sa petite taille, son cycle de vie court, son mode de reproduction asexuée et sa fécondité élevée. En tant que consommateur primaire, l'espèce occupe une place importante dans les transferts de matière et d'énergie dans les chaînes alimentaires des écosystèmes aquatiques d'eau douce.



**Figure 3 :** *Daphnia magna*

### 2.1. Anatomie et physiologie de *Daphnia magna*

Comme tout crustacé, *D. magna* possède une carapace, à double paroi constituée de chitine et de polysaccharides. La longueur du corps varie de 0.5 mm à 6 mm, suivant le stade de développement. La daphnie possède 10 paires d'appendices, qui sont, du haut vers le bas (Figures 3 et 4):

- les antennules, munies d'organes sensoriels, présentant un dimorphisme sexuel ;
- les antennes, pourvues de soies natatoires, permettant la nage ;
- les maxillaires ;
- les mandibules ;

- 5 appendices thoraciques foliacés (ou phyllopoies), munies d'appareils branchiaux, au niveau desquelles se font les échanges gazeux. Ces pattes thoraciques assurent aussi la filtration du plancton. A l'extrémité de l'abdomen se trouve une paire de pinces.

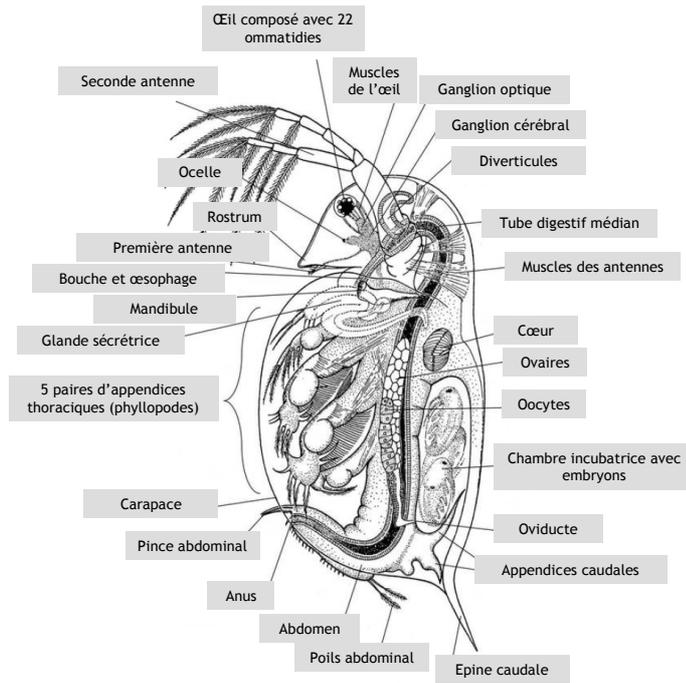
Les mâles se distinguent des femelles par une taille plus petite, des antennules plus larges, et une modification des premières pattes qui sont armées d'un crochet servant à étreindre les femelles. Les embryons présentent deux ébauches d'œil brunâtres qui fusionnent pendant la dernière partie de leur développement, donnant chez les juvéniles et adultes un œil unique, composé, médian, de taille importante, mobile dans une cavité sans communication vers l'extérieur. Cet œil composé aide l'animal à s'orienter au cours de la nage.

Les daphnies se nourrissent de petites particules en suspension dans l'eau, et en particulier d'algues vertes. La nourriture est collectée avec les phyllopoies qui assurent le courant d'eau dans l'organisme. Les particules sont transférées *via* un sillon alimentaire muni de poils spéciaux, jusqu'à la bouche.

Le système digestif est plus ou moins tubulaire et se compose de trois parties : l'œsophage, une partie médiane et une partie terminale. Deux petits diverticules, visibles au niveau de l'intestin médian, ont un rôle de production de fluides assurant la digestion. La partie médiane de l'intestin est constituée de cellules épithéliales, possédant des microvillosités au niveau desquelles se font la digestion des aliments et l'assimilation des nutriments (**Ebert, 2005**). La nourriture non assimilée est expulsée de l'intestin par des mouvements péristaltiques du corps.

Les daphnies ont un système circulatoire sanguin ouvert. Le transport de l'oxygène est assuré par des protéines d'hémoglobine extra-cellulaires. Le cœur se situe au niveau dorsal et il est antérieur à la chambre de ponte. A une température de 20°C, il bat environ 200 fois par minute (**Ebert, 2005**). Les cellules sanguines, circulant rapidement, sont facilement visibles au travers du corps transparent.

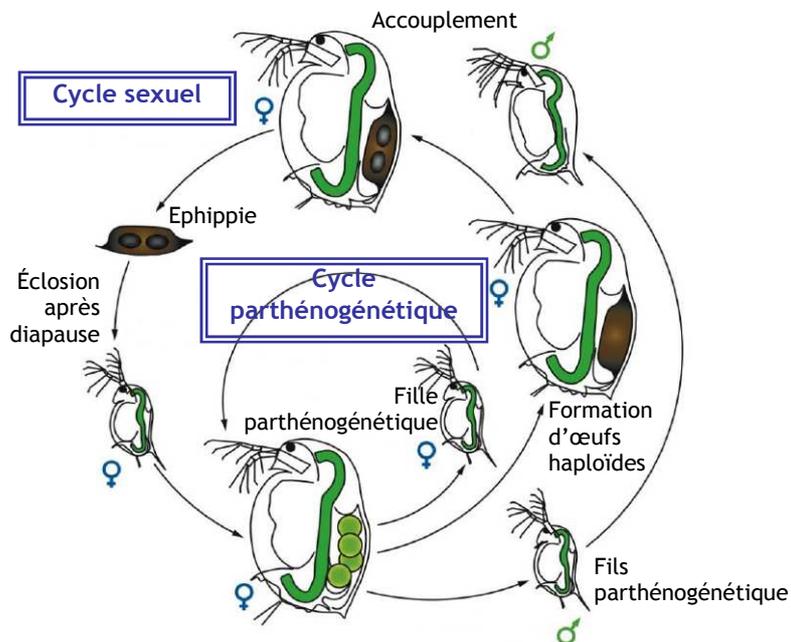
Le système nerveux est caractérisé par un ganglion cérébral, localisé entre l'œil et le début du tube digestif.



**Figure 4 :** anatomie de *Daphnia magna* femelle adulte (Ebert, 2005)

## 2.2. Cycle de vie de la daphnie

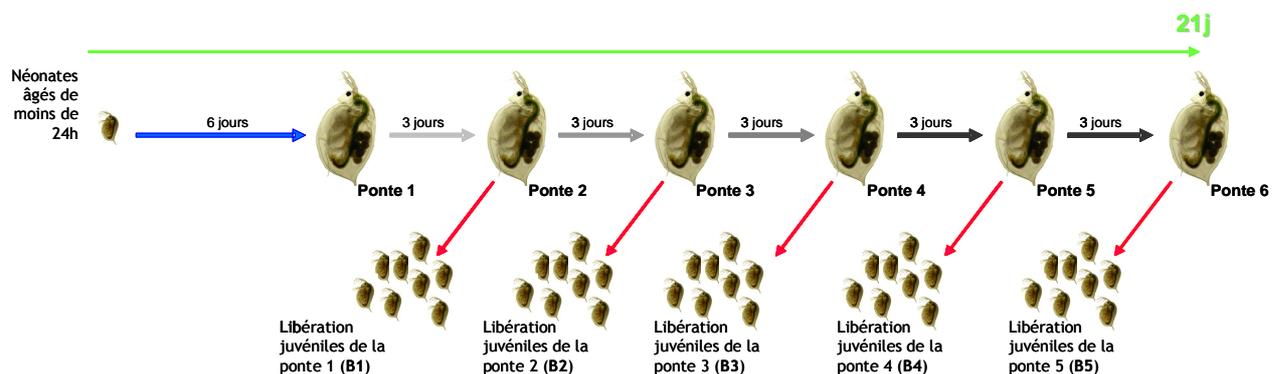
La daphnie a deux modes de reproduction (Figure 5):



**Figure 5 :** schéma du cycle de vie de la daphnie (Ebert, 1995)

- une reproduction asexuée, lorsque les conditions de vie sont favorables. Une femelle adulte produit une ponte d'œufs parthénogénétiques après chaque événement de mue. Les œufs sont déposés dans la chambre incubatrice, localisée dorsalement sous la carapace. Le développement des œufs est direct. Les embryons éclosent après un jour mais restent dans la poche incubatrice où ils se développent. Après trois jours de développement, de jeunes daphnies (stade néonate<sup>\*</sup>) sont libérées par des flexions ventrales. Les néonates sont morphologiquement proches des adultes de daphnies, à l'exception de la chambre incubatrice non développée. Avant de devenir des individus capables de se reproduire, les juvéniles passent par quatre à six instars (période séparant deux événements de mue). Dans des conditions optimales, les daphnies sont matures à  $7 \pm 1$  jour, et déposent leur première ponte (B1)<sup>†</sup> dans la poche incubatrice. Une femelle adulte peut produire une ponte tous les 3 à 4 jours, jusqu'à sa mort (Figure 6). La taille des pontes varie d'environ 10 à 30 œufs selon l'âge de la mère.

- quand les conditions de vie deviennent défavorables, une génération sexuée est produite. Les mâles apparaissent. Les femelles produisent alors des œufs haploïdes qui requièrent une fertilisation par les mâles. Ces œufs de résistance sont encapsulés dans une structure protectrice, appelée éphippium, contenant généralement 2 gros œufs, issus de chaque ovaire. L'éphippie est expulsé à la mue suivante. Ces œufs de résistance n'éclosent que lorsque les conditions sont de nouveau favorables. Ils donnent naissance à une population génétiquement différente des daphnies mères.



**Figure 6 :** reproduction de la daphnie par parthénogénèse en conditions favorables, d'après Zeman, 2008.

\* Le terme *néonates* est un anglicisme faisant référence aux daphnies nouvellement écloses expulsées de la poche incubatrice de leur mère. Dans notre étude, nous l'avons préféré à sa traduction littérale de *nouveau-nés*, plus adapté au cas de l'Humain.

† Dans la suite de ce document, l'identification des pontes aura souvent recours à l'anglais sous le terme de "Brood", réduit à la lettre B, suivi du numéro de ponte (i.e. B1, B2...).

## Chapitre 3. Toxicité de l'uranium et autres contaminants chez *Daphnia magna*

En tant que modèle biologique standard, *Daphnia magna* a permis de caractériser les effets de nombreux contaminants. Néanmoins, les études dédiées à la toxicité chronique de l'uranium sur *D. magna* sont plus rares et limitées à **Poston et al. (1984)**, **Antunes et al. (2007)** et **Zeman et al. (2008)**. Ce chapitre est consacré aux altérations de la physiologie (nutrition, maintenance, croissance en taille et en masse) et l'histoire de vie (survie, fécondité, âge de maturité) induites chez *D. magna* par l'exposition à l'uranium et, à titre comparatif, aux autres contaminants.

### 3.1. Effets de contaminants sur le métabolisme de *Daphnia magna*

#### 3.1.1. L'hypothèse des coûts métaboliques

La présence d'uranium et autres contaminants dans l'environnement peut induire des perturbations du fonctionnement de l'organisme, entraînant des dommages moléculaires, génétiques, histologiques mais aussi des perturbations du métabolisme, de la physiologie et du comportement de l'individu. Face à un stress, les organismes mettent en place des mécanismes de compensation (réparation de l'ADN, mise en place de systèmes anti-oxydants, maintien de l'homéostasie, etc). Or ces mécanismes de défense ont un coût énergétique. Cependant en raison de la limitation de la nourriture dans le milieu environnant et des contraintes propres aux organismes, toute augmentation des coûts métaboliques associée à l'exposition à un contaminant intervient aux dépens des processus importants requérant de l'énergie (**Calow et Sibly, 1990; Calow, 1991**), notamment la survie et la reproduction qui jouent un rôle crucial dans la pérennité des espèces.

Ainsi, examiner les perturbations du métabolisme énergétique est apparu comme une bonne approche pour évaluer les effets de contaminants sur les organismes. Différents marqueurs d'effets en lien avec le métabolisme énergétique peuvent être étudiés, selon le niveau d'organisation biologique, tels que :

- la charge énergétique en adénylates, calculée à partir des concentrations en ATP, ADP et AMP. Elle permet d'estimer l'état physiologique des cellules ;

- l'allocation énergétique cellulaire (AEC), basée sur l'évaluation biochimique de changements des réserves énergétiques (composition en sucres, protéines et lipides) et de la consommation d'énergie (respiration cellulaire). C'est un paramètre qui intègre l'énergie disponible et aussi l'énergie dépensée par les organismes (**Durou et al., 2008**) et qui permet d'évaluer les effets d'un facteur de stress sur le budget énergétique. **De Coen et Janssen (1997)** montrent clairement que l'exposition de *D. magna* à des concentrations de lindane et de chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) entraînant des effets sub-létales diminue l'AEC ;

- les réserves énergétiques en lipides ou glycogène, qui sont les principales formes de stockage de l'énergie chez les animaux ;

- le Scope For Growth qui témoigne de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction des individus.

Toute variation de ces indices témoigne d'une modification réelle du métabolisme énergétique, mais les conséquences à un niveau d'organisation supérieur, comme l'individu, s'avèrent plus difficiles à appréhender. Parmi eux, seule l'étude du budget énergétique, dérivée du concept de Scope For Growth, donne une meilleure appréciation du statut physiologique des individus et donc de l'énergie pouvant être réellement allouée aux fonctions vitales en présence de facteur de stress.

### 3.1.2. Notions de Scope For Growth

**Warrens et Davis (1967)** sont les premiers à établir le concept de Scope For Growth (SFG), défini comme la différence entre l'entrée d'énergie dans un individu et ses pertes métaboliques totales, liées à son fonctionnement. Le SFG est calculé selon l'équation :

$$\text{SFG} = \text{A} - \text{R} - \text{E}$$

où A est l'énergie assimilée issue de la nourriture, R est l'énergie métabolisée au travers de la respiration et E est l'énergie perdue dans l'excrétion. Dans ce type de modèle, l'énergie assimilée est immédiatement disponible pour la maintenance, l'énergie restante étant utilisée pour la croissance et/ou la reproduction. Un SFG positif indique que les organismes prennent plus d'énergie qu'ils n'en consomment pour leur fonctionnement métabolique normal et donc que l'individu est capable d'allouer de l'énergie pour sa croissance et sa reproduction. Un SFG négatif signifie que plus d'énergie est métabolisée qu'assimilée et donc que les réserves énergétiques de l'organisme sont en train d'être consommées.

Le concept de SFG est très utilisé dans la littérature sur diverses espèces, comme par exemple **Riisgard et Randlov (1981)** et **Okumus et Stirling (1994)** qui montrent une bonne corrélation du SFG avec la croissance somatique de *Mytilus edulis* ou encore avec la reproduction de *Gammarus pulex* (**Maltby et Naylor, 1990**). De ce fait, **Widdows et Johnson (1988)** quantifient, sur *Mytilus edulis*, les effets d'un gradient de pollution environnementale sur les taux de nutrition, de respiration et d'excrétion et ils se servent du SFG pour déterminer l'énergie potentiellement allouée à la croissance et à la reproduction, critères d'effets difficilement mesurables *in situ*.

**Zeman et al. (2008)** étudient les effets chroniques de l'uranium sur les fonctions physiologiques (ingestion et respiration), la survie et la reproduction de *Daphnia magna*. Les résultats montrent une réduction significative du SFG masse-spécifique pour des concentrations en uranium  $\geq 25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  après 21 jours d'exposition. A la plus forte concentration d'exposition de  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , le SFG représente seulement 10% de la valeur mesurée en condition témoin. Cette forte réduction est principalement associée à la réduction d'ingestion et à l'augmentation de la demande respiratoire pour faire face au facteur de stress.

**Smolders et al. (2005)** examinent si des daphnies avec des niveaux de réserves énergétiques élevées sont capables de mieux affronter un facteur de stress. Pour cela, *Daphnia magna* est nourrie à différents niveaux de nourriture puis exposée à des concentrations croissantes de cadmium. Les résultats montrent que des daphnies avec des statuts énergétiques plus importants ne sont pas forcément plus résistantes à un stress en comparaison à des daphnies avec un plus faible niveau de réserves énergétiques. Sur certains aspects, les daphnies nourries avec des niveaux de nourriture plus élevés sont plus sensibles aux augmentations de Cd que des daphnies ayant eu un plus faible régime alimentaire. Un mécanisme pouvant expliquer cette augmentation de sensibilité serait que dans des conditions où les niveaux de nourriture sont élevés, les daphnies allouent une large proportion de leur énergie à la reproduction (**Porter et al., 1983 ; Barry, 1996 ; Glazier, 1998 ; Hanazato, 1998**). Cette augmentation de l'allocation à la reproduction se ferait au dépens de l'énergie allouée aux mécanismes de maintenance, et donc à la résistance de la présence potentielle de stressseurs.

### 3.1.3. Altérations indirectes du statut énergétique

D'après les concepts généraux des modèles de budget énergétique, l'assimilation de nourriture et la respiration sont corrélés à la taille des organismes. Généralement, les taux d'assimilation et de consommation absolus augmentent avec la taille tandis que l'assimilation et la respiration masse-spécifiques diminuent (**Peters, 1984 ; Kooijman et Bedaux, 1996 ; Kooijman, 2001**). Tout facteur de stress environnemental induisant une croissance réduite conduit à un organisme de plus petite taille et affecte donc le budget énergétique à la fois directement (coût énergétique) et indirectement (au travers de cette réduction de taille).

A titre d'exemple, **Knops et al. (2001)** étudient la relation entre les modifications énergétiques et les altérations de croissance, de développement et de reproduction de *D.magna* exposées à des métaux lourds et un détergent, le bromure d'hexadécyltriméthylammonium. Les résultats suggèrent que la diminution du SFG est principalement due à une réduction de l'ingestion. Cette réduction de SFG est à corrélérer à un retard de croissance des individus, induit par des taux d'ingestion significativement réduits en présence de contaminants.

En présence de contaminants, les taux métaboliques absolus et masse-spécifiques varient donc avec la taille des organismes. Il est alors difficile de savoir si les variations observées chez les individus exposés sont dues à un effet direct du polluant ou bien seulement le résultat d'une réduction de taille suite à l'exposition. Pour cela, les taux physiologiques peuvent être recalculés en fonction de relations allométriques dépendantes de la taille des individus (**Withers, 1992 ; Kooijman, 2000 ; Baillieul et al., 2005**). Cette approche permet de prendre en compte l'effet de la taille et de détecter de réelles différences sur les taux physiologiques.

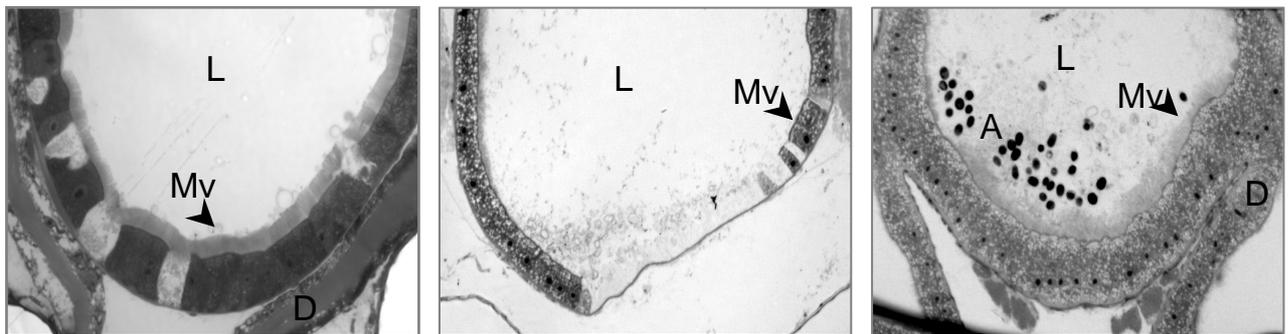
### 3.1.4. Effets de contaminants sur les traits physiologiques de *Daphnia magna*

Le principe des modèles de budget énergétique nécessite d'étudier plus en détail les processus d'acquisition d'énergie. L'entrée d'énergie au sein d'un organisme se fait au travers de l'ingestion et de l'assimilation. L'ingestion correspond à la prise de nourriture par l'individu. L'assimilation est, quant à elle, définie comme la fraction de nourriture ingérée qui passe réellement dans l'organisme, au travers des microvillosités de la paroi du tube digestif après hydrolyse par des enzymes digestives. C'est un processus important à prendre en

compte pour faire des bilans énergétiques car il correspond à l'énergie réellement disponible pour le fonctionnement des organismes.

Le rapport entre l'énergie assimilée par l'individu et celle qui est contenue dans la fraction de nourriture ingérée définit l'efficacité d'assimilation. Son calcul permet d'avoir une idée de la façon dont un toxique affecte la nutrition. L'efficacité d'assimilation est toutefois dépendante de la taille des individus, ce qui rend son étude plus complexe. **Urabe et Watanabe (1991)** montrent que l'efficacité d'assimilation de *Daphnia galeata*, augmente avec la taille, mais diminue graduellement après le dernier instar juvénile ou premier instar adulte, quel que soit le niveau de nourriture. Ce pic d'efficacité d'assimilation pourrait s'expliquer par des modifications métaboliques résultant d'une initiation à la reproduction. En effet, certaines espèces de crustacés sont connues pour augmenter leur demande nutritionnelle quand elles commencent leur activité de reproduction (**Clutter et Theilacker, 1971**). De la même manière, **Schindler (1968)** montre que les taux d'assimilation sont dépendants de l'état de reproduction dans lequel se trouvent les daphnies, ces taux étant plus importants chez des daphnies portant de plus grosses pontes. Selon **Tessier et al. (1983)**, les daphnies juvéniles dépensent 55% de leur assimilation nette à la croissance, alors que les adultes investissent 70% de leur énergie assimilée dans la reproduction.

Récemment, **Zeman (2008)** étudie les effets de l'uranium sur l'état des cellules intestinales de daphnies exposées pendant 21 jours à 50 et 100  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  par microscopie optique.



**Figure 7 :** observations au microscope optique de tube digestif de *Daphnia magna* contrôle et exposées à 50 et 100  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  avec L: Lumière du tube digestif; Mv: Microvillosités, A: Algues, D : Diverticule (Zeman, 2008).

Alors que les daphnies témoins présentent une paroi intestinale assez régulière malgré l'absence de quelques cellules de l'épithélium, la paroi du tube digestif de daphnies exposées à  $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$  révèle des espacements beaucoup plus importants et nombreux. En ce qui concerne les daphnies exposées à  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , il y a des perturbations importantes dans la structure de la paroi intestinale avec l'apparition d'un nombre d'important de vacuoles et un gonflement des cellules épithéliales (Figure 7).

Ces dommages au niveau de la structure de la paroi intestinale suggèrent donc que l'acquisition de l'énergie chez *Daphnia magna* en présence d'uranium pourrait être affectée au niveau de l'assimilation mais des mesures directes n'ont jusque-là jamais été effectuées.

Les perturbations affectant la nutrition vont avoir un effet prépondérant dans le budget énergétique des individus. En effet, la réalisation de toutes les fonctions vitales dépend directement de l'énergie préalablement acquise à partir de la nourriture. A titre d'exemple, **Bodar et al. (1988)** montrent que les taux d'assimilation à 14 jours de *Daphnia magna* exposées à  $5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$  diminuent fortement, sans affecter l'efficacité d'assimilation, car les taux d'ingestion sont aussi réduits. Donc, les animaux exposés au cadmium ne semblent pas être capables de maintenir les mécanismes de filtration et collectes des particules ou encore la digestion et absorption de la nourriture au travers des cellules épithéliales à des niveaux contrôlés. **Gulati et al. (1988)** confirment ces résultats en montrant des taux d'assimilation fortement inhibés à des concentrations beaucoup plus importantes en cadmium (10, 25, 50 et  $100 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ ).

Face à un facteur de stress, les daphnies peuvent augmenter leur allocation d'énergie aux mécanismes de maintenance, prolongeant leur longévité et donc leur durée de vie pour se reproduire. **Baird et al. (1990)** montrent une augmentation de la demande énergétique pour la maintenance pour faire face à une exposition au cadmium ou au 3,4 dichloroaniline. Ces résultats sont en accord avec **Barber et al. (1990)**. Cette augmentation des coûts métaboliques pour faire face au stress est à corrélérer avec l'augmentation du temps de développement et une réduction du rendement reproductif des daphnies.

### 3.1.5. Effets de facteurs environnementaux sur l'acquisition d'énergie

**Schindler (1968)** montre que la température du milieu ambiant modifie nettement les taux d'assimilation mais pas les taux d'ingestion. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que l'activité des enzymes digestives est dépendante de la température et donc, que toute perturbation de la température du milieu ambiant pourrait modifier l'activité des processus chimiques.

**Porter et al. (1982)** montrent que les taux d'assimilation nets augmentent avec le niveau de nourriture dans le milieu, jusqu'à une certaine concentration, puis diminuent. Une corrélation négative entre l'efficacité d'assimilation et la concentration de nourriture est fréquemment observée chez *Daphnia* (**Richman, 1958 ; Schindler, 1968 ; Lei et Armitage 1980**). Ce phénomène est appelé "Superfluous feeding" (**Beklemischev, 1962**). En fait, la diminution de l'efficacité d'assimilation avec l'augmentation des concentrations de nourriture semble être liée à une maximisation du taux d'assimilation pour une concentration de nourriture donnée. En supposant le volume du tube digestif constant, l'efficacité d'assimilation divisée par le temps de rétention de la nourriture dans le tube digestif donne un indice du gain d'énergie (**Sibly, 1981**). Si le temps de rétention de la nourriture dans le tube digestif diminue plus rapidement que l'efficacité d'assimilation avec les concentrations de nourriture croissantes, la diminution de l'efficacité d'assimilation n'est pas désavantageuse. D'après **Geller (1975)**, le temps de rétention de la nourriture dans le tube digestif des daphnies diminue de plus de 5 fois avec des concentrations de nourriture variant de 0.05 à 2.50 mgC.L<sup>-1</sup>. Cependant, l'efficacité d'assimilation estimée chez **Urabe et Watanabe (1991)** diminue de plus de 3 fois avec des concentrations de nourriture similaires. Cela suggère que l'augmentation des taux d'ingestion avec les concentrations de nourriture est énergétiquement avantageuse chez *Daphnia galeata*, bien que la diminution du temps de turn-over de la nourriture dans le tube digestif montre une diminution de l'efficacité d'assimilation.

### 3.2. Effets de contaminants sur les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna*

**Antunes et al. (1997)** évaluent la toxicité chronique d'échantillons d'eau prélevés à proximité d'une mine d'uranium abandonnée au centre du Portugal. Un mélange complexe de métaux, tels que le manganèse, le cobalt et l'aluminium sont présents à des concentrations supérieures aux recommandations de l'eau utilisée pour l'irrigation des cultures. Les concentrations moyennes en uranium sont de 1200-1400  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Les tests de toxicité chronique sur *D. magna* montrent une réduction de la fécondité et du taux de croissance des individus. Ces effets délétères entraînent des diminutions significatives du taux de croissance de la population. Bien que ces effluents miniers soient un mélange complexe de métaux et autres composés, une  $\text{EC}_{50}$  reproduction avoisinant les 500  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  a été déterminée.

En condition chronique, les résultats de **Zeman et al. (2008)** montrent un taux de mortalité de 10% chez *D. magna* exposée à 100  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . La fécondité et la reproduction sont affectées dès 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , suggérant que ce sont les paramètres les plus sensibles. Une  $\text{CE}_{10}$  à 21 jours pour la reproduction est déterminée et égale à  $14 \pm 7 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . De plus, le suivi des daphnies exposées à l'uranium a permis de montrer que l'uranium entraîne une réduction de la masse sèche des œufs. Ces effets sur la croissance et la reproduction sont à associer à une diminution de l'ingestion et une augmentation de la respiration significatives.

En présence de contaminants et/ou dans des milieux pauvres en nourriture, les daphnies sont capables de produire des pontes plus petites mais avec des néonates de masse plus importante. Ces néonates, contenant de plus grande quantité de lipides (**Enserink et al., 1993**), sont supposés être capables de mieux résister au stress (**Enserink et al., 1990; Gliwicz et Guisande, 1992; Ebert, 1993; Enserink et al., 1995; Cleuvers et al., 1997; Coors et al., 2004**).

### 3.3. Recommandations de l'OCDE dans le cadre des tests d'écotoxicité

Dans le cadre de la gestion des risques liés aux produits chimiques pour la santé humaine et l'environnement, des organismes tels que l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) ont mis en place des méthodes d'évaluation sur lesquelles sont fondées les décisions. Ces méthodes d'évaluation passent par des essais pour évaluer la toxicité de ces produits, notamment sur des invertébrés, et plus particulièrement sur le genre *Daphnia*. Parmi eux se trouve l'essai n°202 (OCDE, 2004) qui évalue l'immobilisation immédiate de *Daphnia sp* et l'essai n°211 (OCDE, 2008) qui est un test sur la reproduction de *Daphnia* sur 21 jours, après exposition aux substances testées. Dans les lignes directrices des essais n°202 et n°211, il est fortement recommandé de ne pas utiliser les néonates issus de la première ponte, pour réaliser le test.

En fait, les néonates de daphnies issus d'une première ponte sont plus petits en masse et en taille. Or, les néonates de petite taille, donc potentiellement issus d'œufs de masse plus faible, montrent une plus grande sensibilité aux effets toxiques après une exposition parentale à l'<sup>241</sup>Américium (<sup>241</sup>Am) (Alonzo *et al.*, 2008a), une irradiation gamma externe (Gilbin *et al.*, 2008) ou encore une exposition au cadmium (Enserink *et al.*, 1990). Dans le cas de l'uranium, Zeman *et al.* (2008) révèlent une réduction significative de la masse des œufs de la ponte B1 pour des concentrations en uranium  $\geq 50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , laissant pressentir une augmentation de la sévérité des effets de ce contaminant pour les individus issus de cette ponte.

### 3.4. Le cas d'exposition multigénérationnelle chez *Daphnia magna*

Dans l'environnement, les expositions à des polluants peuvent être supérieures à la durée de vie et à la longévité des organismes, faisant apparaître des phénomènes rarement pris en compte dans les études de toxicité chronique, comme l'acclimatation (modifications phénotypiques) et l'adaptation (modifications génotypiques). Les études multigénérationnelles mettent en évidence des réponses des organismes variables sur le long terme, à des échelles de temps beaucoup plus pertinentes dans un contexte écologique.

A titre d'exemple, Münzinger (1990) montre, chez *Daphnia magna*, un phénomène de résistance au nickel des organismes exposés pendant 7 générations, avec un taux de

croissance intrinsèque de la population augmentant, malgré une diminution de la durée de vie et une réduction de la taille des descendants. Une acclimatation au cuivre chez *D. magna* a aussi été révélée par **LeBlanc (1982)**. En effet, des néonates issus d'individus pré-exposés au cuivre sur 12 générations montrent des taux de survie significativement plus élevés dans des tests de toxicité aiguë au cuivre en comparaison à des néonates issus de parents non exposés. D'après **LeBlanc (1982)**, cette résistance au cuivre ne serait pas héréditaire, mais serait le résultat d'une modification physiologique de chaque génération. **Muysen et Janssen (2004)** acclimatent 7 générations de *D. magna* au cadmium et révèlent une augmentation de la tolérance aux concentrations aiguës sur les deuxième et troisième générations. **Bodar et al. (1990)** montrent eux aussi une augmentation de la tolérance aux concentrations aiguës après acclimatation.

Après 7 générations acclimatées au cadmium, les résultats de **Muysen et Janssen (2004)** montrent une absence d'augmentation de la tolérance aux expositions chroniques, suggérant que l'effet potentiel positif d'une acclimatation au cadmium disparaît au travers des générations successives.

D'autres effets peuvent être observés. Par exemple, **Pane et al. (2004)** montrent une augmentation de la sensibilité de *D. magna* après une exposition au nickel. La masse d'individus issus d'une exposition parentale se retrouve être significativement réduite (20%). Chez d'autres espèces aquatiques d'eau douce, **Oliveira-Filho et al. (2009)** étudient les effets d'un pesticide, l'endosulfane, sur un escargot d'eau douce, *Biomphalaria tenagophila*, exposé sur trois générations successives. A la plus forte concentration, de 0.1 mg.L<sup>-1</sup>, la production d'œufs est inhibée, la mortalité et les malformations augmentent et le succès d'éclosion des embryons diminuent. **White et al. (1999)** ont aussi montré une réduction de la survie de la deuxième génération chez le poisson *Pimephales minnow*, après exposition au benzo[a]pyrène. Il a aussi été révélé que la capacité de reproduction et la survie des larves étaient significativement plus faibles dans la deuxième génération.

Au travers de ces études, il s'avère que l'exposition à un contaminant (endosulfane, benzo[a]pyrène et nickel) sur plusieurs générations augmente la sensibilité des individus, avec notamment une augmentation de la mortalité et une réduction de la croissance et de la reproduction. Ces effets pourraient être dus aux effets de l'exposition du contaminant de la descendance pendant l'ovogenèse et le développement embryonnaire. En effet, **Abe et al. (2001)** suggèrent une exposition directe des embryons dans la poche incubatrice de mères de daphnies, après exposition à des contaminants, tels que des dérivés d'aniline. Cette hypothèse

repose sur la base que les daphnies échangent activement des fluides entre l'eau environnante et la chambre incubatrice dans le but d'assurer la demande en oxygène des embryons en cours de développement (**Kobayashi et al., 1987**). Ainsi on peut supposer des altérations importantes des individus pendant leur développement embryonnaire supposant à un niveau d'organisation supérieur des conséquences irrémédiables.

**Sánchez et al. (1999)** étudient les effets d'une exposition parentale à un pesticide, le diazinon, sur la descendance de *D. magna* transférée en milieu non contaminé. Il s'avère que la reproduction de la descendance est plus élevée que chez les parents exposés au diazinon. Une augmentation de la reproduction a aussi été mise en évidence par **Caffrey et Keating (1997)** sur cinq générations de *Daphnia pulex* précédemment exposé à une période de carence de zinc qui retournent en milieu contrôle. Ces résultats montrent que le transfert en milieu non contaminé de descendants issus de parents mis en situation de stress ont une capacité à se rétablir, révélant que la toxicité est peu ou pas transmise à la descendance et que les effets ne sont pas irrémédiables.

Ces études multigénérationnelles ne sont pas ou sont insuffisamment prises en considération dans l'évaluation du risque écologique, bien que les réponses des organismes puissent être modifiées au travers des générations, ce qui est susceptible de changer les réponses au niveau populationnel (**Klerks et Weiss, 1987**).

## Chapitre 4. Modélisation des effets d'un contaminant de l'individu à la population

### 4.1. Généralités

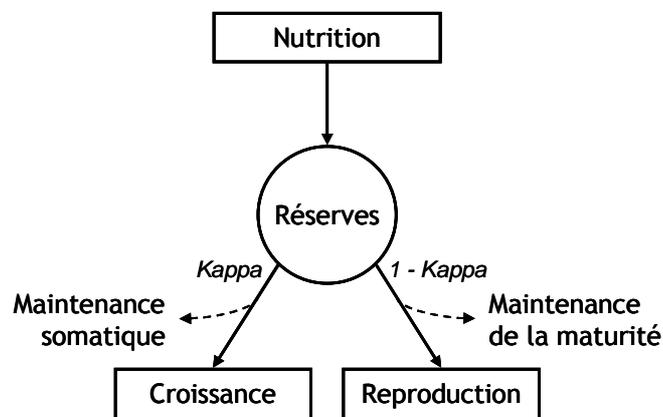
L'évaluation du risque écologique lié à la présence ou aux rejets de contaminants dans l'environnement, requiert une quantification de leur toxicité sur les écosystèmes. D'un point de vue écologique, les niveaux d'organisation les plus pertinents sont les populations et les communautés (Forbes et Calow, 1999). Des essais en mésocosmes permettent d'étudier les effets de contaminants à ces niveaux d'organisation. Ces essais sont réalisés le plus souvent à l'extérieur avec des dispositifs expérimentaux de taille importante, visant à travailler dans des conditions les plus proches du milieu naturel. La réalisation de telles études est généralement compliquée à mettre en œuvre, coûteuse et complexe à interpréter. Des essais en microcosmes de laboratoire (système clos ou semi-clos de volumes inférieurs à 20 litres d'eau,ensemencés par au moins trois classes de plancton : bactérioplancton, phytoplancton et zooplancton), conçus pour simuler des caractéristiques fonctionnelles particulières, peuvent être un bon compromis, en terme de coût et de pertinence écologique entre les tests monospécifiques et les mésocosmes. Néanmoins, avec ce type d'approche, des problèmes d'espace persistent pour les espèces macroscopiques. Des limitations existent pour les espèces qui ont des cycles de vie longs et dont la production du nombre de descendants est faible. De plus, ce sont parfois des systèmes instables et leur réplication peut être problématique (**Brandt *et al.*, 2004**). Par conséquent, l'analyse de l'intensité des effets de contaminants est généralement menée au travers d'expériences réalisées en laboratoire en condition contrôlées, à des niveaux individuel (*e.g.* physiologie et traits d'histoire de vie) et sub-individuel (*e.g.* moléculaire, cellulaire ou histologique), l'évaluation de leurs conséquences écologiques étant appréhendée au travers de la modélisation. De ce point de vue, l'utilisation de modèles de budget énergétique est un outil puissant par rapport aux estimations traditionnelles de concentrations d'effet basées sur des critères individuels considérés séparément. En décrivant les flux d'énergie au sein d'un organisme en absence et/ou présence de contaminant, ils établissent le lien entre les traits physiologiques et les traits d'histoire de vie des individus et permettent d'estimer les conséquences sur la croissance et la reproduction, paramètres fondamentaux en

dynamique de population. Couplés aux matrices de Leslie, ils offrent la possibilité d'intégrer tous les effets toxiques mesurés expérimentalement à l'échelle de l'individu dans des critères démographiques, assurant la prise en compte de leurs interactions à un niveau d'organisation et une échelle de temps écologiquement pertinents, en comparaison aux tests de toxicité basés sur le court terme.

#### 4.2. Modèles de budget énergétique

Dans les modèles de production nette, type Scope For Growth (cf. §3.1.2.), la reproduction et la croissance sont prédites à partir de la différence entre l'assimilation et la respiration. Or la croissance et la reproduction sont deux processus qui demandent de l'énergie pour leur maintenance (Kooijman, 2000; Nisbet *et al.*, 2000). Vanoverbeke (2008) propose d'ajouter au SFG un terme correctif, proportionnel à l'assimilation, et donc à la reproduction et à la croissance. Néanmoins, les modèles d'assimilation nette sont plus pertinents du point de vue mécaniste. Ainsi, Kooijman (1993) proposent la théorie DEB (Dynamic Energy Budget) décrivant les flux d'énergie au sein d'un organisme. Dans cette approche, la reproduction et la croissance sont déterminées directement à partir de l'assimilation et elles intègrent les coûts des processus de production de croissance et reproduction, indépendamment de l'énergie consommée au travers de la respiration. Cette théorie a l'avantage supplémentaire de décrire quantitativement, par des modèles mathématiques mécanistes, les grandes fonctions biologiques des organismes (nutrition, assimilation, croissance, reproduction, maintenance et vieillissement).

La Figure 8 présente schématiquement les flux d'énergie dans un organisme.



**Figure 8 :** représentation schématique de la répartition d'énergie dans la théorie DEB (Kooijman, 2000)

L'énergie issue de la nourriture est assimilée avec un taux proportionnel à la surface du tube digestif. Le modèle suppose que l'énergie assimilée entre dans un pool de réserves. La théorie DEB repose ensuite sur l'existence d'une loi *Kappa* qui répartit l'énergie, stockée en réserves, de la manière suivante : une portion *Kappa* est affectée à la croissance et à la maintenance somatique, alors que la fraction restante ( $1 - Kappa$ ) est affectée soit à la maturation des juvéniles soit à la reproduction et à la maintenance de la maturité pour les adultes. Le rapport d'énergie allouée à la croissance et à la reproduction est constant. Une large variété de formulations des modèles DEB a été développée, variant des modèles génériques à des modèles incluant plus de détails biologiques et pouvant être spécifiques à un taxon (Kooijman, 1993; van Haren et Kooijman, 1993; Kooijman et Bedaux 1996; Nisbet *et al.*, 1996; Lika et Nisbet, 2000; Nisbet *et al.*, 2000). Parmi ces modèles, Kooijman et Bedaux (1996) proposent une version modifiée des équations DEB en présence de substances toxiques, connue sous le nom de DEBtox (Dynamic Energy Budget in toxicology).

#### 4.2.1. Modèle toxico-cinétique

Les modèles DEBtox permettent de coupler cinétiques de contamination et effets (Kooijman et Bedaux, 1996). Pour relier la concentration dans le milieu d'exposition et la concentration interne dans l'organisme, un modèle cinétique à un compartiment est utilisé. Le taux d'accumulation du toxique est proportionnel à la concentration externe et le taux d'élimination est proportionnel à la concentration interne du contaminant. Le modèle prend en compte la dilution de la concentration du toxique par la croissance des individus. Ainsi la relation entre toxique et effet sur l'organisme est dépendante non seulement de la quantité de composé toxique à l'intérieur de l'organisme, mais aussi de la croissance en taille de l'individu, selon l'équation:

$$\frac{dC_{\text{int}}}{dt} = C_{\text{ext}} \times \frac{k_1}{\ell} - C_{\text{int}} \times \left( \frac{k_2}{\ell} + \frac{d}{dt} \ln \ell^3 \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

où  $C_{\text{int}}(t)$  est la concentration interne du toxique,  $C_{\text{ext}}(t)$  la concentration dans le milieu d'exposition,  $\ell$  est la taille normalisée par la taille maximale  $L_{\text{max}}$  au temps  $t$ ,  $k_1$  et  $k_2$  les taux d'accumulation et d'élimination du contaminant par l'organisme, respectivement.

La concentration interne peut être normalisée par le facteur de bioconcentration  $\frac{k_1}{k_2}$ , ce qui permet d'obtenir l'équation suivante :

$$\frac{dc_{\text{int}}}{dt} = \frac{k_2 c_{\text{ext}}}{\ell} - c_{\text{int}} \left( \frac{k_2}{\ell} + \frac{d}{dt} \ln \ell^3 \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{avec } C_{\text{int}} = \frac{k_1}{k_2} c_{\text{int}}$$

#### 4.2.2. Modèles d'effets sur la croissance et la reproduction

Pour décrire l'effet de contaminant sur la croissance et la reproduction, **Kooijman et Bedaux (1996)** considèrent la fonction de stress  $\sigma$  telle que :

$$\begin{cases} \sigma(c) = 0 & \text{si } c < \text{NEC} \\ \sigma(c) = b \cdot (c - \text{NEC}) & \text{si } c \geq \text{NEC} \end{cases}$$

où  $c$  est la concentration interne (ou externe si on fait l'hypothèse d'une cinétique rapide),  $b$  le coefficient d'effet et NEC (No Effect Concentration) est la concentration sans effet. Ce paramètre correspond à la plus forte concentration n'ayant pas d'effet sur l'organisme étudié, quel que soit le temps durant le bioessai.

**Kooijman et Bedaux (1996)** proposent 5 modes d'actions possibles du toxique pour expliquer les effets sur la reproduction, deux modèles d'effet directs, où seule la reproduction est affectée, et trois modèles d'action indirects, où la croissance et la reproduction sont simultanément affectées. Concernant les effets directs possibles, soit le toxique provoque une mortalité pendant l'ovogenèse (*Modèle Hasard*), soit le coût énergétique pour la production d'œufs est augmenté (*Modèle des Coûts*). Pour ce qui est des effets indirects sur la reproduction, les effets proviennent de coûts de croissance supplémentaires (*Modèle de Croissance*), d'une entrée d'énergie réduite (*Modèle d'Assimilation*) ou de coûts dans la maintenance additionnels (*Modèle de Maintenance*).

Les équations proposées par **Kooijman et Bedaux (1996)**, ont été re-dérivées par **Billoir et al. (2008)**. Le récapitulatif des équations décrivant les différents modes d'action sur la croissance et la reproduction est présenté dans le Tableau 4.

Modèles d'effets	Croissance	Eq. ( )	Reproduction	Eq. ( )
Assimilation	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma \frac{f+g}{f(1-\sigma(c))+g} (f(1-\sigma(c))-\ell)$	3	$R(\ell) = \frac{R_M}{1-\ell_p^3} \left( (1-\sigma(c))\ell^2 \frac{g+\ell}{g+f-\sigma(c)} - \ell_p^3 \right)$	4
Croissance	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma \frac{f+g}{f+g(1+\sigma(c))} (f-\ell)$	5	$R(\ell) = \frac{R_M}{1-\ell_p^3} \left( f\ell^2 \left( \frac{g(1+\sigma(c))+\ell}{g(1+\sigma(c))+f} \right) - \ell_p^3 \right)$	6
Maintenance	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma(f-\ell(1+\sigma(c)))$	7	$R(\ell) = \frac{R_M}{1-\ell_p^3} (1+\sigma(c)) \left( f\ell^2 \left( \frac{g(1+\sigma(c))^{-1}+\ell}{g+f} \right) - \ell_p^3 \right)$	8
Coûts	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma(f-\ell)$	9	$R(\ell) = \frac{R_M}{1-\ell_p^3} \left( f\ell^2 \frac{g+\ell}{g+f} - \ell_p^3 \right) (1+\sigma(c))^{-1}$	10
Hasard	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma(f-\ell)$	11	$R(\ell) = \frac{R_M}{1-\ell_p^3} \left( f\ell^2 \left( \frac{g+\ell}{g+f} \right) - \ell_p^3 \right) e^{-\sigma(c)}$	12

**Tableau 4 :** récapitulatif des équations des différents modes d'action d'un contaminant sur la croissance et la reproduction d'après Billoir et al. (2008) où  $f$  est la réponse nutritive fonctionnelle,  $g$  est le taux d'investissement d'énergie,  $\ell$  est la taille normalisée par la taille maximale  $L_{max}$ ,  $\ell_p$  est la valeur de  $\ell$  à la puberté,  $\gamma$  est le taux de croissance,  $R$  est le taux de reproduction journalier d'une daphnie de taille  $\ell$ ,  $R_M$  est le taux de reproduction maximal et  $c$  est la concentration externe ou la concentration interne calculée selon le modèle toxicocinétique décrite dans cette partie § 4.2.1.

D'après Kooijman et Bedaux (1996), l'action du cadmium sur la reproduction des daphnies serait directe : les équations des modèles de *Hasard* et *Coût* s'ajusteraient relativement bien avec les données expérimentales, les modèles d'effets indirects étant écartés à cause d'une absence d'effet sur le délai de maturité sexuelle. Ces auteurs ont aussi étudié l'action du phénol sur la reproduction de *D. magna*, via des modèles avec effets indirects sur la croissance, la maintenance et l'assimilation, les effets directs étant exclus sur la base d'un retard induit par le phénol au début de la reproduction. Ainsi, les trois modèles avec effets indirects s'ajusteraient relativement bien aux valeurs expérimentales. Les auteurs sont tout de même confrontés au choix du mode d'action le plus approprié pour expliquer les effets occasionnés par les toxiques.

#### 4.2.3. Apport des modèles DEBtox dans l'évaluation du risque pour l'environnement

Un des objectifs majeurs en écotoxicologie est de fournir une estimation de valeurs de référence, tels que des NOEC (No Observed Effect Concentration) et EC<sub>x</sub> (concentration entraînant *x*% effet). L'estimation de NOEC pour un polluant est généralement réalisée sur un seul critère d'effet (mortalité, croissance ou reproduction), sans modèle, uniquement à partir de tests d'hypothèses sur les valeurs. En contraste à la NOEC, les EC<sub>x</sub> sont déterminés par interpolation de courbes dose-réponse, mais les modèles utilisés ne reposent généralement pas sur des hypothèses biologiques réalistes, remettant ainsi en cause leur pertinence. L'utilisation statistique de NOEC a été sévèrement critiquée par un certain nombre d'auteurs, à la fois pour des motifs pratiques et théoriques. **Chapman *et al.* (1996)** font une synthèse de ces critiques et concluent que l'utilisation de NOEC dans la législation est inappropriée. Au contraire, l'approche DEBtox permet d'estimer une concentration sans effet, NEC, pour les effets toxiques sur l'organisme testé. La NEC prend en compte simultanément les effets sur la survie, la croissance et la reproduction. Elle est indépendante des conditions d'exposition (temps et concentration) en contraste aux NOEC et EC<sub>x</sub> qui dépendent de la durée des tests.

En conclusion de ce paragraphe, l'utilisation de modèles DEBtox présente de nombreux avantages. Premièrement, ils permettent d'analyser simultanément les effets de différents processus comme la survie, la croissance et la reproduction. Deuxièmement, avec ce type d'approche, les modèles sont des fonctions continues du temps et de la concentration d'exposition. Donc, théoriquement, les NEC ne dépendent pas de la durée du test, contrairement aux NOEC et EC<sub>x</sub>. Cela fournit plus d'informations pertinentes, car indépendantes des conditions des tests, pour l'évaluation du risque écologique (**Péry *et al.*, 2002 ; Billoir *et al.*, 2008**). Troisièmement, l'approche DEBtox fournit des informations sur les modes d'actions de contaminants.

### 4.3. Extrapolation des effets au niveau populationnel

La dynamique des populations se caractérise par l'étude des tailles de populations au cours du temps. Elle est dépendante de nombreux paramètres, tels que les taux de natalité et les taux de mortalité, eux-mêmes soumis à d'autres facteurs, ce qui en fait une étude relativement complexe.

#### 4.3.1. Modèles démographiques

De nombreux modèles mathématiques ont été proposés pour décrire l'accroissement des populations. Quelques-uns sont cités à titre d'exemple (Tableau 5).

Modèles et références	Equations	Caractéristiques principales
Modèle d'Euler (1760)	$1 = s \sum_{t=0}^{\infty} S_t n_t e^{-rt}$ <p>r : taux d'accroissement de la population ;            S<sub>t</sub> : probabilité de survie ;            n<sub>t</sub> : efficacité de reproduction ;            s : sex-ratio</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessite la construction de tables de survie-fécondité</li> <li>- ne prend pas en compte les phénomènes densité-dépendants</li> <li>- intègre des variables qui ont chacune leur variance, rarement prise en compte</li> </ul>
Modèle malthusien Malthus (1789)	$\frac{dN(t)}{dt} = r.N(t)$ <p>N : nombre d'individus ;            r : taux de croissance de la population</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- néglige les variations d'âge, de taille, de périodicité de la natalité et mortalité, les phénomènes de densité-dépendance</li> <li>- suppose que les taux de reproduction sont identiques pour tous les individus de la population</li> </ul>
Modèle logistique Verhulst (1840)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left( 1 - \frac{N(t)}{K} \right)$ <p>N : nombre d'individus,            r : taux de croissance de la population            K : capacité limite du milieu, c'est-à-dire la taille limite que peut atteindre la population</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- suppose que les taux de reproduction sont identiques pour tous les individus de la population</li> </ul>

**Tableau 5** : récapitulatif de modèles mathématiques utilisés pour étudier la croissance d'une population

Le modèle malthusien suppose une croissance exponentielle. Le fait que la population augmente de manière exponentielle n'est pas biologiquement satisfaisant, car même si une population arrive dans un environnement contenant toutes les ressources nécessaires, ce qui n'est le cas que pour les espèces invasives, une population ne peut augmenter exponentiellement jusqu'à l'infini. Des phénomènes d'autorégulation vont se mettre en place. Ces phénomènes sont pris en compte dans le modèle de Verhulst, avec l'intégration de  $K$  dans le modèle, correspondant au nombre d'individus maximal que le milieu peut accueillir en tenant compte de l'espace et des ressources.

Enfin, bien que **Forbes et Calow (1999)** concluent que le taux de croissance de la population soit un meilleur critère d'effet aux réponses de polluants que les effets sur les traits d'histoire de vie et que ce critère soit une mesure pertinente au niveau écologique, ces différents modèles, cités ci-dessus, sont appliqués à des populations non structurées en âge. Or en dynamique de population, la plupart des paramètres (taux de reproduction, taux de survie) dépendent de l'âge des individus. Il est alors nécessaire de construire des modèles de population structurées en âge.

#### 4.3.2. Les modèles matriciels

Une alternative aux équations analytiques précédentes est d'utiliser des modèles matriciels (**Leslie, 1945**). Ces modèles ont prouvé leur efficacité premièrement en incluant une structure interne dans les populations (**Caswell, 2001**) et deuxièmement en décrivant les effets de contaminants sur la dynamique des populations (**Caswell, 1996**). Cette approche permet de modéliser la dynamique de populations structurées en classes d'âge en fonction de leur cycle de vie. Dans ce type de modèle, les taux de survie et les taux de fécondité sont âge-spécifiques, et ils permettent, pour chaque classe d'âge  $i$ , de calculer sa contribution à la future classe d'âge 1 et l'effectif de la classe d'âge  $i+1$  au pas de temps  $t+1$ . La population évolue de la façon suivante :

$$N(t+1) = A \times N(t)$$

où  $N(t)$  est un vecteur colonne contenant les effectifs des  $m$  classes d'âge de la population au temps  $t$ , et  $A$  est une matrice carrée (de taille  $m \times m$ ), appelée matrice de Leslie:

$$A = \begin{bmatrix} F_1 & F_2 & \dots & F_{m-1} & F_m \\ S_1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & S_{m-1} & 0 \end{bmatrix}$$

Elle contient sur sa première ligne les taux de fécondité de chaque classe d'âge (de  $F_1$  à  $F_m$ ), et sur la sous-diagonale les  $m-1$  probabilités de survie (de  $S_1$  à  $S_{m-1}$ ), tous les autres termes de la matrice étant nuls.

Le théorème de Perron-Frobenius permet de déterminer la valeur propre dominante de  $A$ , appelée  $\lambda$ , correspondant au taux asymptotique d'accroissement de la population. Ce paramètre, de dimension  $t^{-1}$ , représente le facteur par lequel la population est multipliée à chaque pas de temps.

La dynamique de la population dans son ensemble et de chaque classe d'âge en particulier est une dynamique malthusienne où le taux de croissance  $r$  est égal à  $\ln(\lambda)$ .

#### 4.4. Influence des différents critères d'effets individuels sur la dynamique de population

Le modèle matriciel décrit au 4.3.2. est appliqué par **Stark *et al.* (2004)** au cas de 7 espèces d'arthropodes exposées à un stress en laboratoire pour analyser l'impact de différents effets sur les traits d'histoire de vie sur la dynamique de population. En imposant 50% de mortalité ou 50% de réduction de reproduction, ou les deux à la fois, ils comparent les retards de croissance de population de ces espèces d'invertébrés. Les résultats des simulations montrent qu'un même niveau du facteur de stress appliqué aux critères individuels induit un impact sur la dynamique de population qui diffère entre les espèces testées en fonction de leur stratégie d'histoire de vie. Cette observation contredit clairement l'hypothèse selon laquelle un niveau d'effet donné est comparable d'une espèce à l'autre et montre l'importance de prendre en compte des caractéristiques d'histoire de vie propres à chaque espèce dans la dynamique de population.

Dans le domaine de la radioprotection, **Alonzo *et al.* (2008b)** aboutissent à une conclusion similaire en examinant le retard de croissance de population de vers de terre, *Eisenia fetida*, exposés à une irradiation gamma externe et de daphnies, *Daphnia magna*, exposées à une irradiation alpha interne. L'impact sur la croissance de population d'un même niveau d'effet diffère au sein des espèces selon le critère affecté :

- *E. fetida* et *D. magna* sont plus sensibles à un retard de reproduction qu'à tout autre effet.
- *D. magna* est plus sensible à une réduction de fécondité qu'à une réduction de la survie tandis qu' *E. fetida* présente une même sensibilité pour ces deux critères.

De plus, pour un effet équivalent touchant le même critère individuel, l'impact sur la croissance de population diffère entre *E. fetida*, espèce à croissance relativement lente et *D. magna*, espèce à croissance comparativement plus rapide.

De plus, chez des pucerons exposés à un insecticide, le Margosan-O, **Stark et Wennergren (1995)** mettent en évidence l'importance de prendre en compte la sensibilité des différents stades de vie. Ainsi, les populations exposées au stade juvénile montrent des taux de croissance beaucoup plus faibles que les populations exposées au stade adulte. Parce que les différents stades ou âges d'une espèce peuvent avoir des sensibilités différentes, il est essentiel que ces stades critiques soient considérés pour estimer la susceptibilité d'une population à un toxique.

La dynamique de population peut être affectée au travers de nombreux effets mesurés (mortalité, fécondité, âge de la maturité, retards de ponte, taille à la naissance, exposition pendant le développement embryonnaire, *etc...*). Se restreindre à évaluer les conséquences d'une exposition chronique à un polluant, en se focalisant uniquement sur le dénombrement des individus comme critère d'effet sur la population ne va pas permettre d'appréhender les conséquences du stress toxique sur la biomasse ou encore la structure en taille. En effet, la population ne représentera pas la même masse totale selon qu'elle sera composée d'individus sains de grande taille ou d'individus stressés de taille réduite. Il est donc indispensable de prendre en compte les perturbations des fonctions physiologiques en présence de polluants. Cette complexité dans les études de population souligne la nécessité d'élargir nos perspectives sur l'importance écologique de différents critères d'effets observés au niveau individuel.

#### 4.5. Prise en compte de modèles DEBtox en dynamique de population

La prise en compte des modèles DEBtox dans des modèles de dynamiques de population permet de faire des comparaisons des conséquences au niveau populationnel de plusieurs hypothèses sur les modes d'action du contaminant au niveau individuel et, les taux de croissance de la population peuvent être obtenus de façon continue dans le temps et en fonction de la concentration d'exposition. A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux changements d'échelle en utilisant une telle combinaison de modèles DEBtox et de modèles de population (**Jager et al., 2004; Lopes et al., 2005 ; Klok et al., 2007; Ducrot et al., 2007 ; Billoir et al., 2007**).

**Lopes et al. (2005)** combinent un modèle DEBtox avec un modèle de population matricielle chez *Chironomus riparius*, mais ils considèrent seulement les effets létaux du pesticide et ne considèrent pas les modes d'action du contaminant. En 2007, **Billoir et al.** considèrent non seulement les effets létaux mais aussi les effets sub-létaux sur la croissance et la reproduction de *Daphnia magna* après exposition au cadmium et intègrent ces effets au niveau populationnel en utilisant des modèles matriciels. Cette combinaison de modèles permet ainsi de déterminer des valeurs de  $\lambda$  très similaires pour les cinq modèles d'effets testés en présence de cadmium. En dessous de la NEC pour la reproduction, déterminée aux alentours de  $4.2-4.5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ , le contaminant affecte seulement la survie des individus. Au-dessus de cette NEC reproduction, le taux asymptotique de croissance de la population chute, car le toxique affecte aussi la reproduction. Pour des concentrations de cadmium beaucoup plus élevées, les modèles de coût énergétique pour la production d'œufs (*Modèle des Coûts*) et de coûts supplémentaires pour la croissance (*Modèle de Croissance*) expliquent les effets au niveau populationnel, ce qui est en accord avec les résultats de **Kooijman et Bedaux (1996)**.

De tels modèles peuvent donc être de grande utilité dans la rédaction de "guidelines" pour l'évaluation du risque environnemental, même si d'autres mécanismes tels que les phénomènes de densité-dépendance, la température ou encore la prédation, doivent être pris en compte pour extrapoler les critères d'effet du laboratoire au niveau de la population, dans un contexte écologique réaliste.

#### 4.6. Apport des études multigénérationnelles en dynamique de population

Différentes études portent sur les effets d'expositions multigénérationnelles, néanmoins les implications en dynamique de population ne sont que très rarement examinées. De plus, les études de dynamique de population reposent très rarement sur les données d'exposition multigénérationnelle et les modèles impliquent l'hypothèse sous-jacente que les effets observés au niveau individuel sur une génération sont représentatifs de toutes les générations subséquentes exposées.

Pourtant, **Alonzo *et al.* (2008b)** montrent que les effets sur la dynamique de population sont fortement contrastés entre des simulations faites à partir de données originaires d'expositions sur une seule génération et des données issues d'expériences multigénérationnelles. Pour atteindre 1 million d'individus par exemple, le retard de croissance de population par rapport au témoin, établi sur les données d'une seule génération, est de 1 à 2 jours sur la gamme de débits dose étudiée (0.3 à 15 mGy.hr<sup>-1</sup>). Ce retard augmente de 3 à 8 jours en prenant en compte les données issues d'une exposition sur trois générations, suggérant une combinaison d'effets directs sur la physiologie des organismes et d'effets maternels, impliquant une réduction de la fitness des descendants après exposition de la génération parentale.

De plus, **Salice *et al.* (2009)** montrent, chez un gastéropode d'eau douce, *Biomphalaria glabrata*, exposé au cadmium, que les effets observés sur la première génération sont du même ordre que ceux retrouvés dans d'autres études, en revanche les réponses des générations suivantes divergent fortement d'une dynamique de population classique réalisée sur les données de la première génération.

Ces premiers résultats mettent en avant le fait que les effets d'exposition à un contaminant sur une ou plusieurs générations n'ont pas les mêmes conséquences sur une dynamique de population et que les tests de toxicité classiques, réalisés sur une seule génération, peuvent sous-estimer ou surestimer la toxicité de polluants retrouvée dans l'environnement.

## Objectifs de l'étude

Comme nous venons de le voir, l'uranium est naturellement présent dans l'environnement. Néanmoins sa distribution, dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, peut être influencée par les activités anthropiques, conduisant ainsi à des élévations localement importantes dans certaines zones géographiques. Parmi les nombreuses espèces représentatives des écosystèmes aquatiques d'eau douce utilisées pour étudier les effets de contaminants, nous avons sélectionné *Daphnia magna* qui est un modèle biologique très répandu dans la littérature, dont la morphologie, la biologie et le cycle de vie sont relativement bien connus.

De récentes études (**Zeman *et al.*, 2008 ; Zeman, 2008**) ayant révélé que l'exposition à l'uranium chez *D. magna* entraînait des réductions significatives des taux d'ingestion et des altérations de la paroi du tube digestif, il sera intéressant d'examiner si en plus de ces effets, l'uranium peut affecter l'acquisition de l'énergie au travers de réductions de l'assimilation du carbone de la nourriture.

L'approche DEBtox permet de faire des estimations sur les données mesurées en laboratoire, indépendamment des conditions d'exposition. De ce fait, les prédictions de survie, croissance et reproduction peuvent être réalisées sur une gamme complète de concentrations en contaminant. L'utilisation de modèles DEBtox permet de caractériser la réponse d'un individu soumis à un facteur de stress *via* les paramètres de toxicité, comme la NEC correspondant au seuil de concentration à partir duquel un effet est observé sur l'ensemble des processus, et le coefficient d'intensité, *b*. Par la suite, le recours à des modèles DEBtox permettra d'intégrer les effets observés à la fois sur la physiologie et l'histoire de vie de *Daphnia magna* et d'examiner si une réduction de la nutrition peut à elle seule expliquer les effets observés sur la croissance et la reproduction.

Les résultats établis par **Zeman *et al.* (2008)** ont révélé une réduction significative de la masse des œufs, produits par des femelles de *D. magna* exposée à l'uranium. Ces résultats suggèrent donc une augmentation potentielle de la sévérité des effets de l'uranium dans les générations suivantes. De plus, le cas d'exposition multigénérationnelle est rarement pris en compte dans l'évaluation du risque pour l'environnement. Or l'exposition à un contaminant

sur plusieurs générations peut faire apparaître des phénomènes de résistance ou un affaiblissement de la progéniture. De plus, les effets observés sur une première génération sont généralement différents des effets observés sur les générations suivantes. Par conséquent, il sera intéressant d'étudier les effets de l'uranium sur les traits physiologiques et les traits d'histoire de vie sur trois générations successives de *D. magna*.

Mais, l'exposition à des contaminants sur plusieurs générations implique forcément une exposition des individus pendant leur ovogénèse et/ou développement embryonnaire.

De ce fait, les conséquences d'une exposition à l'uranium pendant le développement embryonnaire sur la descendance de *D. magna* seront étudiées.

Dans l'environnement, les expositions aux contaminants peuvent aussi être transitoires, soumettant les individus à un stress passager. Nous chercherons donc à savoir, si les effets de l'uranium sont réversibles chez *D. magna*, après exposition parentale puis transfert en milieu non contaminé.

Parmi les méthodes d'évaluation concernant les risques liés aux contaminants, l'OCDE a mis en place des tests d'écotoxicité, comme le test reproduction 21 jours chez *Daphnia sp.* Au travers des directives, il est fortement recommandé de ne pas utiliser les individus nés de premières pontes pour réaliser ce test. Néanmoins, ce sont des organismes de plus petite taille et donc potentiellement plus sensibles à la toxicité des polluants. Face aux recommandations de l'OCDE concernant les tests de toxicité sur *Daphnia sp* et la sensibilité des individus issus de premières pontes exposés à l'uranium n'ayant jamais été prise en compte, nous examinerons par la suite les effets d'une exposition chronique à l'uranium sur des daphnies nées d'une première ponte.

Pour finir, le cas d'exposition multigénérationnelle et la sensibilité des individus sont très rarement pris en considération dans des dynamiques de population, mais sont cependant susceptibles de changer les réponses au niveau populationnel. De ce fait, les effets de l'uranium quantifiés au niveau de l'individu seront extrapolés à la population, niveau d'organisation plus réaliste d'un point de vue écologique.

Les deux prochaines parties de ce manuscrit sont dédiées à la présentation des expérimentations mises en œuvre au laboratoire, ainsi que des résultats obtenus sur l'individu et des modélisations faites aux niveaux individuel et populationnel, dans le but d'apporter des réponses à ces différentes questions.

## **PARTIE B. EFFETS DE L'URANIUM SUR L'INDIVIDU**

### **EXPERIMENTATION ET DISCUSSION**

## Rappels des objectifs

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les effets toxiques de l'uranium sur une espèce représentative des écosystèmes aquatiques d'eau douce. Suite à la recherche bibliographique et aux questions qu'elle a soulevé, trois expérimentations ont été conduites dans le cadre de ce travail.

Dans un premier temps, et en accord avec les recommandations faites dans les tests d'écotoxicité par l'OCDE, les effets d'une exposition à l'uranium sur trois générations successives, commencées avec des néonates nés de B5, ont été étudiés.

Dans un deuxième temps, la sensibilité à l'uranium de daphnies nées de B1 a été analysée sur deux générations successives.

Et pour finir, dans le but d'expliquer les différences de sensibilité qui pourraient exister entre deux générations successivement exposées, les conséquences d'une exposition à l'uranium uniquement pendant le développement embryonnaire des daphnies ont été examinées.

## Chapitre 1. Matériels et Méthodes

### 1.1. Conditions d'élevage de *Daphnia magna* au laboratoire

*D. magna* Straus (clone A, INERIS, France) est maintenue en phase de reproduction parthénogénétique conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE (OCDE, 2008) depuis plusieurs années au laboratoire. L'élevage est réalisé dans des bouteilles de Pyrex® de 2 litres couvertes de leur bouchon mais non fermées, à une densité d'un organisme pour 50 mL. Les bouteilles sont maintenues dans un incubateur climatisé assurant ainsi des conditions stables et optimales ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , éclairement de  $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photopériode 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité, Figure 9). Chaque bouteille contient au démarrage 45 à 50 néonates. Au bout de 4 jours, le nombre de juvéniles est réduit à 40 par bouteilles. Les bouteilles sont gardées jusqu'à l'âge de 5 à 6 semaines.



**Figure 9** : élevage de daphnies dans l'incubateur

Les bouteilles sont triées deux fois par semaine, pour garder une densité d'individus optimale, grâce à deux tamis superposés permettant de récupérer séparément les mères (tamis de  $1\,000 \mu\text{m}$ ) et les néonates (tamis de  $180 \mu\text{m}$ ). Les mères sont replacées dans les bouteilles et les néonates sont soit éliminés, soit utilisés pour lancer les tests ou de nouvelles bouteilles d'élevage.

Les daphnies sont nourries avec des algues, *Chlamydomonas reinhardtii*, cultivées au laboratoire, selon un protocole décrit en annexe 1. La ration quotidienne pour une daphnie est

de 100  $\mu\text{gC}$ , soit 80 000 cellules. $\text{mL}^{-1}$  (sur la base d'un contenu en carbone de 25  $\text{pgC.cellule}^{-1}$  de *C. reinhardtii*). Pour cela, les algues sont centrifugées à 2 500 rpm pendant 15 min avant d'être remises en suspension dans le milieu d'élevage, après élimination du milieu de croissance des algues.

## 1.2. Composition des milieux artificiels

L'élevage de daphnies est maintenu, en permanence, dans deux eaux de composition artificielle différente : le milieu M4 (Elendt et Bias, 1990), et le milieu M4-pH7, modifié selon Zeman *et al.* (2008).

### 1.2.1. Milieu M4

Le milieu M4 (Elendt et Bias, 1990) est le milieu préconisé dans les normes OCDE pour la réalisation des essais chroniques. Son utilisation permet de répondre aux exigences des organismes vis-à-vis des paramètres de l'eau soit un pH voisin de 8, un apport d'oligo-éléments et de vitamines. La composition de ce milieu est reportée dans le tableau suivant :

Eléments	Ca	Mg	Na	K	Cl	SO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>	HCO <sub>3</sub>
M4 (mg.L <sup>-1</sup> )	80	12	20	3.2	140	49	0.2	0.2	0.47
Eléments	NH <sub>4</sub>	SiO <sub>3</sub>	B	Mn	Li	Rb	Sr	Br	Mo
M4 (mg.L <sup>-1</sup> )	8.9.10 <sup>-5</sup>	2.7	0.5	0.1	0.05	0.05	0.05	0.012	0.029
Eléments	Cu	Zn	Co	I	Se	V	Fe	EDTA C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	
M4 (mg.L <sup>-1</sup> )	0.0062	0.0032	0.0025	0.0025	9.10 <sup>-4</sup>	2.5.10 <sup>-4</sup>	0.4	3.9	
Eléments	Thiamine C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS,H		B <sub>12</sub> C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> N <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P		Biotine C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S				
M4 (mg.L <sup>-1</sup> )	0.047		9.6.10 <sup>-4</sup>		7.5.10 <sup>-4</sup>				

**Tableau 6 :** composition du milieu M4 (Elendt et Bias, 1990)

Le mode de préparation de ce milieu est décrit en annexe 2.

### 1.2.2. Milieu M4-pH7

Le milieu M4-pH7, modifié selon **Zeman et al. (2008)**, est utilisé pour exposer les organismes à l'uranium. Il permet d'augmenter la biodisponibilité de l'uranium tout en restant compatible avec les conditions vitales des daphnies. La composition du milieu M4 a été corrigée au niveau de la concentration en Cl ( $170.4 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le milieu M4-pH7 vs  $145 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le milieu M4), et au niveau des  $\text{NaHCO}_3$  apportés ( $42.05 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le milieu M4-pH7 vs  $64.8 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le milieu M4) pour avoir un pH égal à 7.

### 1.3. Exposition à l'uranium

L'uranium appauvri utilisé pour toutes les expériences a été obtenu par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) sous forme de sels de nitrate d'uranyle hexahydraté ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ). Une solution stock a été fabriquée à une concentration de  $1 \text{ gU.L}^{-1}$  en milieu acidifié (0.2%  $\text{HNO}_3$ ). La composition isotopique de cette solution a été déterminée après dosage par ICP-MS :  $^{238}\text{U}$  (99.79%),  $^{235}\text{U}$  (0.202%),  $^{234}\text{U}$  (0.00069%) et  $^{236}\text{U}$  (0.0036%). Les concentrations testées sont : 0, 10, 25 et  $75 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ . Cette gamme de concentrations a été choisie en-deçà du seuil de toxicité déterminé dans les mêmes conditions d'expositions par **Zeman et al. (2008)**, à savoir, une  $\text{CE}_{50}$  de  $91 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$  pour la reproduction à 21 jours chez *Daphnia magna*.

L'ajout d'uranium dans le milieu d'exposition apportant lui-même des ions  $\text{NO}_3^-$ , des ajouts de  $\text{NO}_3^-$  ont été réalisés pour atteindre une concentration en nitrate de  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  dans toutes les conditions d'exposition, valeur de référence retrouvée dans le milieu témoin (Tableau 1).

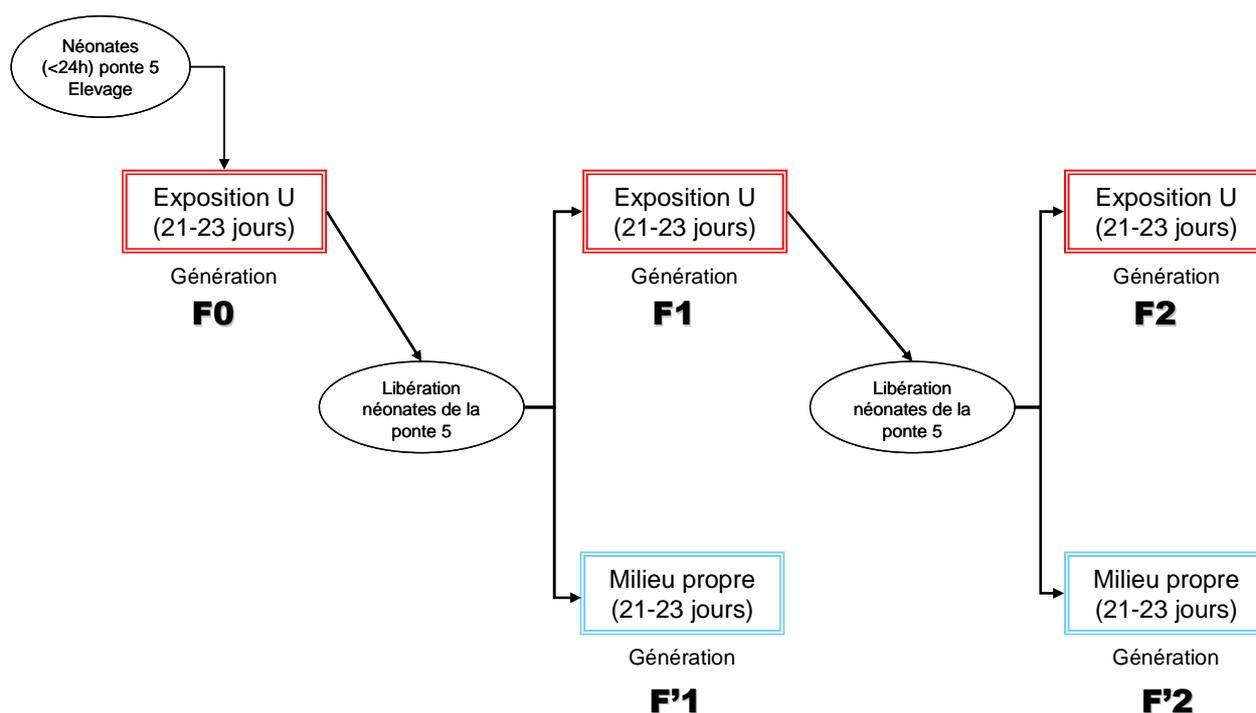
Pour toutes les expériences, nous avons respecté une densité de 1 individu pour 50 mL de milieu d'exposition (contaminé et témoin). Tous les jours, les milieux d'exposition ont été renouvelés afin d'avoir une concentration en uranium relativement constante tout au long des expériences. Après renouvellement des milieux, les daphnies sont nourries avec *Chlamydomonas reinhardtii*, préparée de la même façon que pour les daphnies de l'élevage, à raison d'une ration journalière de  $100 \text{ } \mu\text{gC.daphnie}^{-1}$ .

#### 1.4. Plans expérimentaux mis en œuvre

Quelle que soit l'expérience décrite ci-dessous, les mesures de croissance somatique en taille et en masse, de la masse des œufs et des taux de nutrition et respiration se sont faites à des temps clés du cycle de vie de la daphnie, à savoir sur trois pontes, quelques heures après que les œufs soient fraîchement déposés dans la poche incubatrice. Tout d'abord la ponte 1 (7-8 jours, en condition témoin) a été sélectionnée. Il s'agit d'une période où la daphnie investit beaucoup de son énergie dans la croissance. La ponte 3 (13-14 jours, en condition témoin) constitue le temps fort suivant. Il s'agit d'un stade où la daphnie a quasiment atteint sa taille maximale et commence à investir plus d'énergie dans la reproduction. Et pour finir la ponte 5 (19/21 jours, en condition témoin) a été choisie. A ce stade, la daphnie ne grandit plus, elle investit la quasi-totalité de son énergie dans la reproduction, lorsque les conditions le permettent.

##### 1.4.1. Etude d'une exposition à l'uranium sur 3 générations successives débutées avec des néonates issus de ponte 5 (B5)

Cette étude a été réalisée à trois concentrations d'uranium : 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , plus une condition témoin. L'exposition commence avec des néonates issus d'une ponte 5 de daphnies de l'élevage (Figure 10), en accord avec des recommandations de l'OCDE (**OCDE, 2004 et 2008**). Ces individus sont suivis pendant 21-23 jours (génération F0), jusqu'à l'éclosion des néonates de la 5<sup>ème</sup> ponte. Une fraction des néonates est utilisée pour commencer la génération suivante, exposés dans les mêmes conditions que les parents (génération F1 et F2). Une autre fraction est replacée en milieu non contaminé pour évaluer la capacité des néonates à se rétablir après une exposition parentale (génération F'1 et F'2).



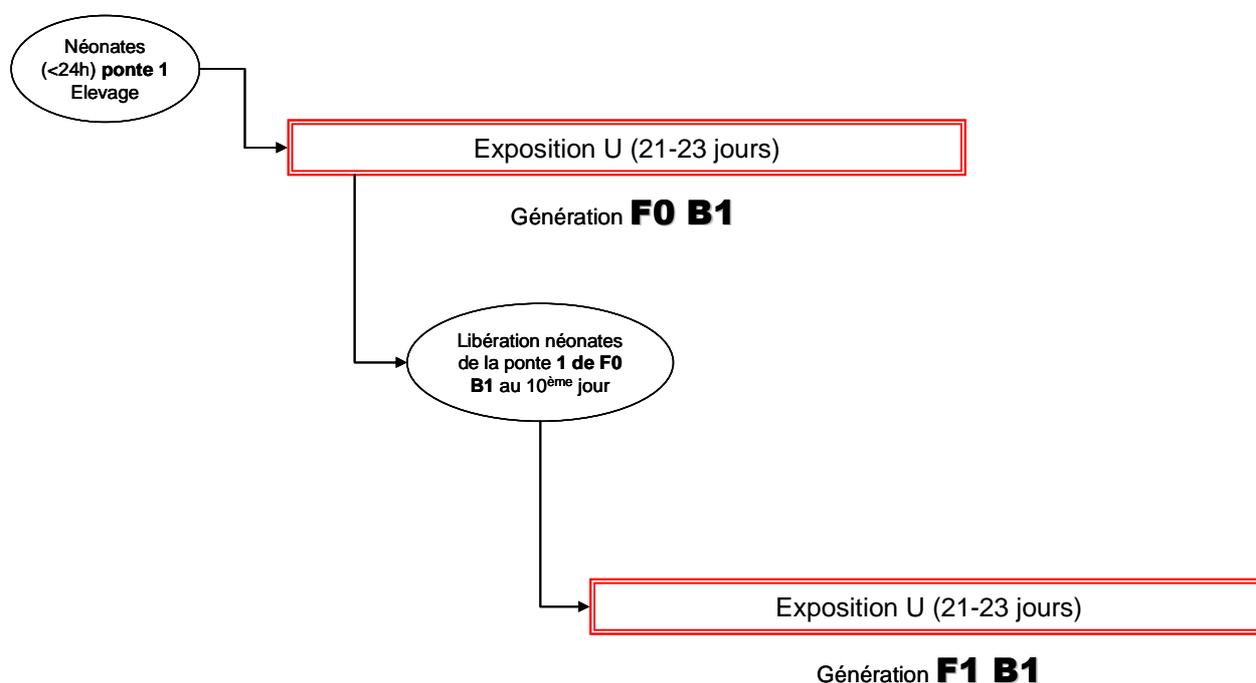
**Figure 10 :** schéma du plan expérimental de l'exposition à l'uranium (0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ) sur 3 générations successive débutées avec des néonates issus de ponton 5 chez *Daphnia magna*

Concernant, les générations exposées à l'uranium (F0, F1 et F2), chaque traitement est composé de 6 unités expérimentales d'un litre (en polycarbonate pour limiter l'adsorption de l'uranium sur les parois), contenant chacune 20 individus. Trois unités expérimentales sont utilisées pour le suivi quotidien de la survie et la production des néonates pendant les 23 jours. Les trois unités expérimentales restantes sont utilisées pour mesurer la respiration, la croissance somatique en taille et en masse, la bioaccumulation en uranium dans le corps des daphnies et dans les œufs. Ces mesures sont réalisées sur des daphnies ayant fraîchement déposé les pontons 1, 3 et 5. Les taux d'ingestion et d'assimilation ont été mesurés lorsque les daphnies déposent les pontons 1 et 5.

Concernant le retour des générations F'1 et F'2 en milieu non contaminé, chaque traitement est composé de 5 unités expérimentales de 500 mL en polycarbonate, contenant 10 néonates, issus de parents exposés. Trois bouteilles sont utilisées pour le suivi quotidien de la survie et de la production des descendants, pendant 23 jours. Les deux bouteilles restantes servent à mesurer la croissance somatique en taille et en masse des individus, ainsi que la fécondité et la masse des œufs fraîchement déposés aux pontons 1, 3 et 5.

#### 1.4.2. Etude d'une exposition à l'uranium sur 2 générations successives débutées avec des néonates issus de ponte 1 (B1)

Des néonates issus d'une première ponte de mères non contaminées (origine élevage) ont été exposés à 2 concentrations d'uranium : 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , plus une condition témoin, pendant 21-23 jours. La deuxième génération est commencée à partir des descendants issus de la ponte B1 des individus contaminés, exposés dans les mêmes conditions que leurs parents (Figure 11).



**Figure 11 :** schéma du plan expérimental de l'étude d'une exposition à l'uranium sur 2 générations de *Daphnia magna* successives, débutées avec des néonates issus de ponte 1, exposées à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$

Au fur et à mesure des expérimentations, les volumes des unités expérimentales ont été revus à la baisse pour limiter les rejets d'effluents radioactifs, tout en respectant la densité des animaux recommandée par l'OCDE (OCDE 2004 et 2008). Par conséquent, pour chaque concentration d'exposition, 5 unités expérimentales de 500 mL (en polycarbonate), contenant chacune 10 individus sont utilisées. Trois unités expérimentales sont utilisées pour le suivi quotidien de la survie et la production des néonates pendant les 22 jours d'exposition. Les deux unités expérimentales restantes sont utilisées pour mesurer la croissance somatique en

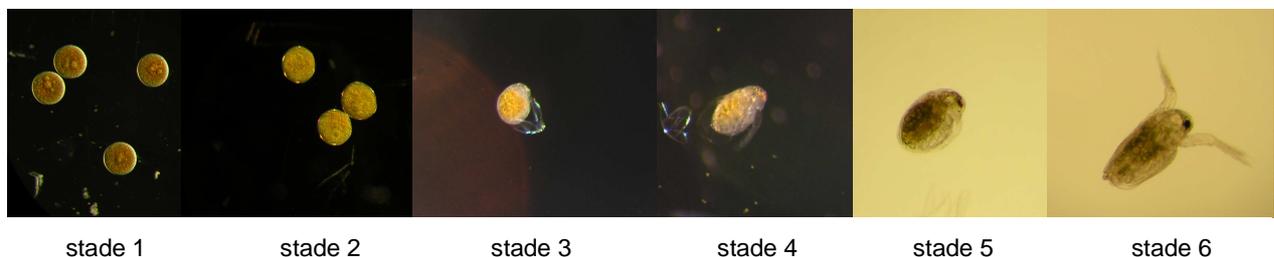
taille et en masse et la bioaccumulation en uranium dans le corps des daphnies et dans les œufs.

#### 1.4.3. Etude des conséquences d'une exposition à l'uranium au cours de l'embryogénèse

De nouvelles pontes B5 ayant été fraîchement déposées dans la poche incubatrice de leurs mères en condition témoin, sont exposées à deux concentrations d'uranium : 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant tout l'instar 5 (âge des mères : 20-23 jours). Un suivi de la bioaccumulation en uranium, de la masse et de la taille des embryons, ainsi que des mères, est réalisé tout au long de l'instar 5 et aussi au début de l'instar 6, jour d'éclosion des néonates (24<sup>ème</sup> jour).

Les prélèvements au cours de l'instar 5 sont réalisés à intervalles de temps de 24 heures. Ces prélèvements correspondent aux différents stades embryonnaires décrits par **Kast-Hutcheson et al. (2001)** (Figure 12) :

- le stade 1 (~0-15 heures) correspond, après le dépôt dans la poche incubatrice des œufs, à des embryons parfaitement sphériques;
- le stade 2 (~15-25 heures) est l'étape d'organisation et de différenciation cellulaire. L'embryon devient asymétrique ;
- le stade 3 (~25-35 heures), correspond à l'étape de maturation embryonnaire précoce, avec une différenciation de la capsule de la tête ;
- le stade 4 (~35-45 heures) est l'étape de maturation embryonnaire moyenne avec l'apparition de la seconde paire d'antennes, ainsi que de la pigmentation des yeux ;

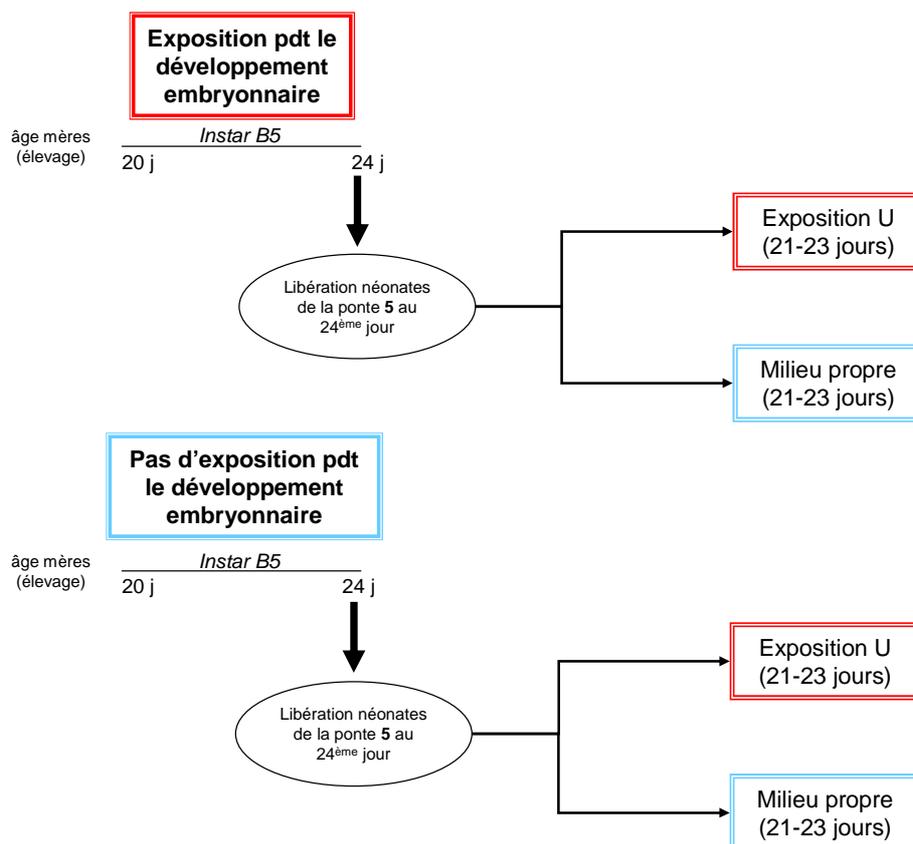


**Figure 12 :** observations sous loupe binoculaire des différents stades de développement embryonnaire jusqu'au stade néonate chez *Daphnia magna*, en condition témoin, d'après Kast-Hutcheson et al. (2001).

- le stade 5 (~ 45-50 heures) correspond à la maturation embryonnaire tardive avec notamment l'extension de la seconde paire d'antennes qui servira après l'éclosion à la nage ;

- le stade 6 (~50 heures) correspond à des juvéniles complètement développés et libérés dans le milieu.

Le jour de l'éclosion, les néonates, ayant été exposés à l'uranium pendant leur développement embryonnaire, sont soit transférés dans un milieu propre, soit maintenus aux mêmes concentrations d'exposition qu'avant leur éclosion, à savoir 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Parallèlement, des néonates, de ponte 5, issus de parents non exposés (origine élevage) sont exposés à 0 ; 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (Figure 13). Ces individus sont suivis pendant 21-23 jours, avec des prélèvements aux pontes 1, 3 et 5.



**Figure 13 :** schéma du plan expérimental de l'étude des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* après exposition au cours de l'embryogénèse à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  puis transfert en milieu propre ou en milieu contaminé des néonates à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ .

## **1.5. Critères d'effets mesurés**

### 1.5.1. Survie

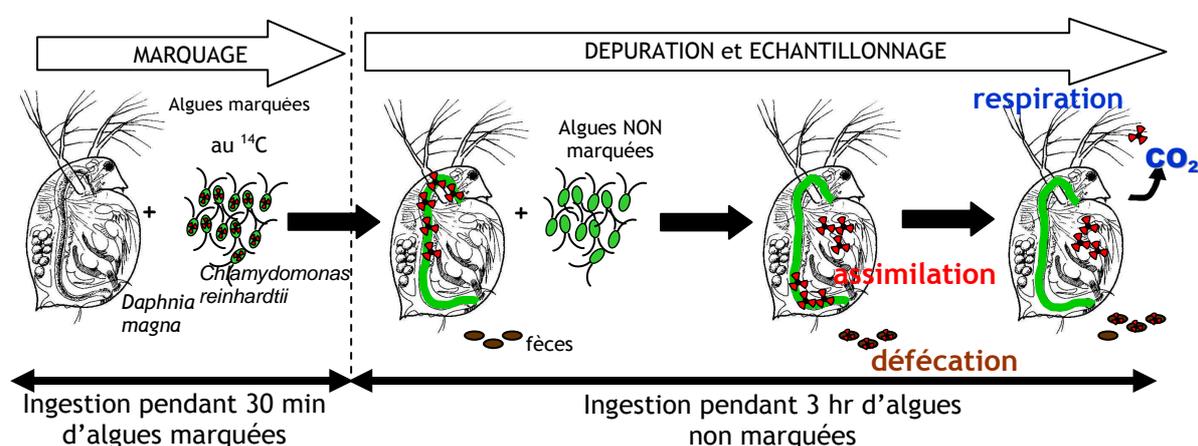
La survie est évaluée pendant toute la durée des tests, en comptant tous les jours le nombre de daphnies survivantes.

### 1.5.2. Reproduction

L'âge de dépôt de la ponte, ainsi que l'âge de la libération des néonates sont déterminés. Le nombre d'œufs et de néonates, ainsi que leur masse sont aussi mesurés. Les données de fécondité sont exprimées en nombre cumulé de descendants par femelle au cours du temps.

## 1.5.3. Taux d'ingestion et d'assimilation

Les taux d'ingestion et d'assimilation ont été mesurés au cours de l'expérience examinant les effets de l'exposition à l'uranium sur 3 générations successives, commencées avec des néonates issus de B5. Les fèces de *Daphnia* se désintègrent rapidement dans le milieu, elles ne peuvent donc pas être collectées aisément. Il est ainsi impossible d'estimer l'assimilation comme la différence entre l'ingestion et la défécation (Lampert, 1977). L'utilisation d'une technique de marquage-traçage de la nourriture au  $^{14}\text{C}$ , selon le protocole de Peters (1984) et Lampert (1987), nous a semblé une bonne méthode pour déterminer l'ingestion et la quantité de carbone assimilée. Son principe est représenté en Figure 14.



**Figure 14 :** schéma simplifié du processus de mesure de l'ingestion et de l'assimilation chez *Daphnia magna*

Des algues, du genre *Chlamydomonas reinhardtii*, en phase de croissance exponentielle, sont marquées en incubant 300 mL de culture avec une solution de bicarbonate de sodium ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ) dans un erlenmeyer fermé, agité à 100 rpm, pendant 2 jours. Les concentrations de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  radioactif proposées dans la littérature pour marquer les algues, équivalentes à  $10\,000\text{ Bq.mL}^{-1}$  (Porter *et al.*, 1982 ; Bailleul *et al.*, 2005 ; Nielsen et Olsen, 1989 ; Lampert et Bohrer, 1984) ont été testées lors du développement de la technique. Le calcul, à l'aide du logiciel EDEN-v2.2 (procédure de calcul §1.5.7.), des débits de dose radiologiques délivrés aux daphnies par le  $^{14}\text{C}$  assimilé aboutissait à des valeurs supérieures à  $2\text{ mGy.hr}^{-1}$ . Une division par 10 de la concentration de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , soit environ  $900\text{ Bq.mL}^{-1}$ , a donc été réalisée par la suite pour ramener les débits de dose à  $120\text{ }\mu\text{Gy.hr}^{-1}$ .

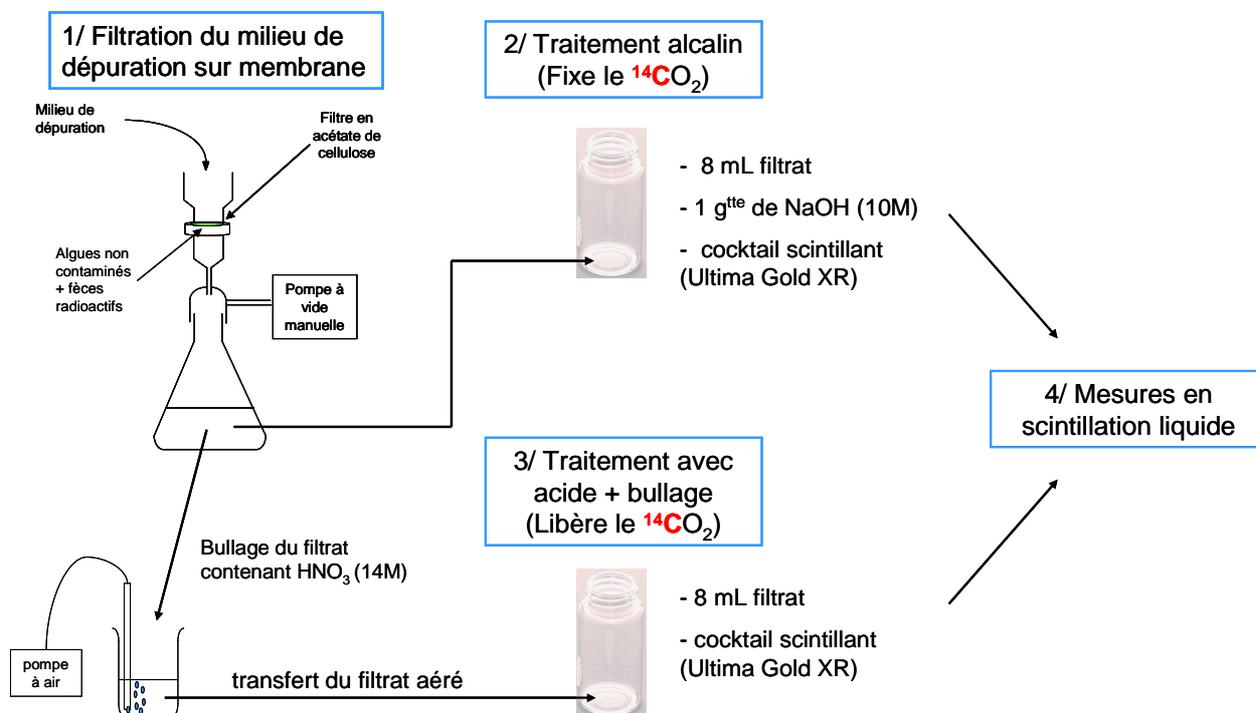
Les algues marquées sont ensuite rincées par centrifugation (1 500 rpm, 15 min) et élimination du surnageant. Le culot est remis en suspension dans du milieu M4-pH7 propre. Cette étape est réalisée trois fois. La concentration des algues est ajustée à une densité de 80 000 cellules.mL<sup>-1</sup> (densité cellulaire correspondant à un apport de 100 µgC.daphnie<sup>-1</sup>, sur la base de 25 pgC.cellule<sup>-1</sup>). Dans le but de déterminer la radioactivité contenue dans les algues, des échantillons de 5 mL, dont la densité cellulaire a été mesurée au Coulter Counter, sont prélevés et filtrés sur des membranes (0.2 µm) en acétate de cellulose.

Une expérience préliminaire a montré que la variabilité des mesures se stabilisait à partir de 5 individus. Par conséquent, 5 daphnies sont transférées par unité expérimentale. Pour chaque condition d'exposition, 6 unités expérimentales de 70 mL sont utilisées. Ces unités sont ensuite placées sur une roue à plancton (1 rpm), pour s'affranchir de la sédimentation des algues qui constituerait un biais aux mesures.

Pendant 30 minutes, les daphnies vont se nourrir de ces algues radiomarquées. Ce temps relativement court a été choisi pour éviter les pertes de matériel radioactif par défécation, car d'après **Peters (1984)** le temps de passage de la nourriture dans le tube digestif chez *Daphnia magna* varie entre 25 et 50 minutes. Les daphnies sont rincées et une partie de ces individus est collectée pour mesurer les taux d'ingestion. Les daphnies restantes sont transférées dans des unités expérimentales contenant du milieu M4-pH7 et des algues non radiomarquées. Ces unités sont placées sur la roue à plancton. Au bout de 3 heures d'incubation, les daphnies sont rincées et servent à mesurer les taux d'assimilation.

Pendant les 3 heures d'incubation avec les algues non marquées, une fraction de la nourriture nouvellement assimilée est rapidement métabolisée et se retrouve sous forme de dioxyde de carbone marqué dans le milieu ( $^{14}\text{CO}_2$ ). Cette fraction doit être prise en compte et mesurée dans des échantillons de milieu filtré. Le protocole de quantification est présenté en Figure 15. Le milieu de dépuration est filtré et 8 mL de filtrat sont transférés dans des tubes de scintillation contenant 1 goutte de NaOH (10M), permettant de fixer le  $^{14}\text{CO}_2$  par formation de carbonate de sodium. Huit autres mL de filtrat sont acidifiés avec une goutte de  $\text{HNO}_3$  concentré et aérés pendant 10 minutes par un bullage vigoureux. Douze mL de cocktail scintillant sont ajoutés dans les 2 types d'échantillon avant analyse en scintillation liquide. La différence de radioactivité entre le traitement acidifié et le traitement alcalin est attribuée au  $^{14}\text{CO}_2$  (Bohrer et Lampert, 1988).

Une quantification de la défécation en matériel radioactif des daphnies est réalisée en récupérant les filtres. Ces filtres subissent le même traitement que les filtres ayant servi à quantifier la radioactivité dans les algues.



**Figure 15** : schéma représentatif du protocole de quantification des pertes en  $^{14}\text{C}$  dues à la respiration des daphnies

Les échantillons de daphnies et les membranes, en acétate de cellulose, sur lesquelles se trouvent les algues radiomarquées sont placés dans des tubes à scintillation contenant 1 mL de solubilisateur de tissu (Soluène 350, PerkinElmer, Boston, USA) et incubés toute une nuit à 55°C. Après solubilisation, 19 mL de cocktail scintillant (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, USA) sont ajoutés et la radioactivité du carbone 14 est mesurée avec un compteur en scintillation liquide (Quantulus 1220, Wallac-PerkinElmer, Finland) avec une limite de détection de 30 mBq.

Le taux d'ingestion ( $\mu\text{gC}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{daphnie}^{-1}$ ) est calculé selon l'équation suivante :

$$I = \frac{A1_{\text{daphnie}}}{A_{\text{algue}} \times \Delta t}$$

où  $A1_{\text{daphnie}}$  est l'activité des daphnies ( $\text{Bq}\cdot\text{daphnie}^{-1}$ ) après  $\Delta t = 0.5\text{h}$ ,  $A_{\text{algue}}$  est l'activité spécifique des algues ( $\text{Bq}\cdot\mu\text{g}^{-1}\text{C}$ ).

Le taux d'assimilation ( $\mu\text{gC}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{daphnie}^{-1}$ ) est calculé selon l'équation suivante :

$$A = \frac{A2_{\text{daphnie}} + A_{\text{CO}_2}}{A_{\text{algue}} \times \Delta t}$$

où  $A2_{\text{daphnie}}$  est l'activité dans les daphnies ( $\text{Bq}\cdot\text{daphnie}^{-1}$ ) après 3 heures d'incubation,  $A_{\text{CO}_2}$  est l'activité en dioxyde de carbone respiré ( $\text{Bq}\cdot\text{daphnie}^{-1}$ ) après 3 heures,  $A_{\text{algue}}$  l'activité spécifique contenue dans les algues ( $\text{Bq}\cdot\mu\text{g}^{-1}\text{C}$ ) et  $\Delta t = 0.5\text{ h}$ .

L'efficacité d'assimilation est calculée comme le rapport :

$$AE = \frac{A}{I}$$

#### 1.5.4. Taux de respiration

Les taux de respiration ont été mesurés au cours de l'étude des effets de l'uranium sur 3 générations successives de daphnies. Au moment du dépôt des pontes 1, 3 et 5, trois daphnies par condition sont placées individuellement dans des chambres de respiration (Unisense S/A, Arhus, Danemark) contenant 1 mL de milieu d'exposition, maintenues dans un bain marie de 20°C.



**Figure 16:** chambre de respiration de 1 mL et électrode à oxygène

Le suivi des concentrations en oxygène dissous dans les chambres est réalisé sur 40-60 minutes, à l'aide d'électrodes à oxygène de type Clarke miniaturisées (Figure 16), connectées à un pico-ampèremètre, (Unisense S/A, Arhus, Danemark). Une calibration du signal électrique est réalisée en utilisant un milieu saturé en oxygène dissous (100% d'O<sub>2</sub>) obtenu par bullage rigoureux et solution exempte d'oxygène (ascorbate de sodium 0.1 M dans un milieu NaOH à 0.1 M, 0% d'O<sub>2</sub>).

Le signal mesuré, correspondant au pourcentage de saturation, est converti en concentration d'oxygène en utilisant la concentration d'oxygène à l'équilibre dans l'eau de 282.3 μmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (20°C, 1 atm). Le taux de consommation d'oxygène est calculé comme :

$$R = \frac{[O_2]_0 \times (1 - \exp^{-k \cdot \Delta t}) \times V}{\Delta t}$$

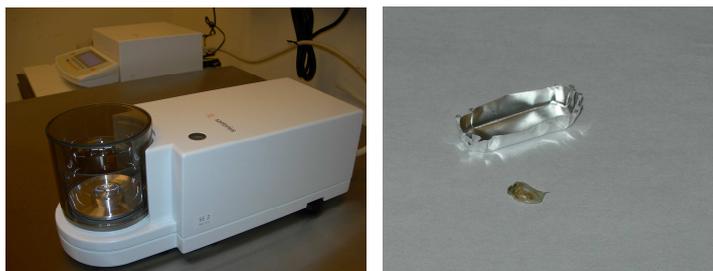
où [O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> est la concentration d'oxygène dissous (μmol.L<sup>-1</sup>) mesurée à t = 0, V le volume (L) de milieu de la chambre de respiration et k le coefficient de consommation (h<sup>-1</sup>) obtenu en ajustant un modèle exponentiel aux concentrations d'oxygène mesurées :

$$[O_2] = [O_2]_0 \times \exp^{-k \cdot t}$$

#### 1.5.5. Croissance somatique en masse et en taille

La masse sèche et la taille des néonates (au commencement de chaque génération) et des adultes (au moment des pontes 1, 3 et 5) sont mesurées dans chaque condition d'exposition. Cinq réplicats composés de 5 à 8 néonates ou d'un adulte (incluant ceux utilisés pour mesurer la respiration) sont rincés avec de l'eau ultra-pure (eau UHQ) et la taille est mesurée depuis l'apex de tête jusqu'à l'épine caudale sous loupe binoculaire équipée d'une règle micrométrique. Les œufs sont ensuite délicatement disséqués de la chambre incubatrice

des femelles et comptés. Les néonates, les adultes et les pontes disséquées sont transférés dans des coupelles en aluminium pré-pesées (Figure 17). Les échantillons sont séchés pendant 24 h à 55°C, puis refroidis dans un dessiccateur et pesés immédiatement à l'aide d'une ultra-microbalance de type SE2 Sartorius (Göttingen, Germany) avec une précision de 0.1 µg (Figure 17).



**Figure 17 :** *ultra-microbalance (Sartorius AG, Göttingen, Germany) et coupelle en aluminium avec son échantillon séché*

#### 1.5.6. Bioaccumulation

La bioaccumulation en uranium a aussi été mesurée dans toutes les expériences. Elle permet de rendre compte de l'entrée de l'uranium dans les individus, d'un éventuel transfert de l'uranium à la progéniture mais aussi de caractériser l'intensité des effets de l'exposition des daphnies.

Les échantillons de daphnies, œufs et néonates, dont les masses sèches ont été préalablement mesurées, sont minéralisés sur bain de sable à 90°C après ajout successif d'1 mL d'HNO<sub>3</sub> (69%) et d'1 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Les échantillons minéralisés sont repris dans 10 mL d'HNO<sub>3</sub> ultra-pur (2%). Des dilutions sont réalisées avant analyse par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, 7500 Cx, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) avec une limite de détection d'environ 0.11 ng <sup>238</sup>U.L<sup>-1</sup>.

Les facteurs de bioaccumulation (BAF) observés ont été calculés comme le rapport :

$$\text{BAF} = \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{\text{eau}}}$$

où  $C_{\text{organisme}}$  est la concentration en uranium bioaccumulée dans l'organisme ( $\mu\text{gU.kg}^{-1}$  de poids frais, calculé en supposant que la masse sèche de la daphnie représente 10% de la masse fraîche) et  $C_{\text{eau}}$  la concentration en uranium du milieu d'exposition ( $\mu\text{gU.kg}^{-1}$ ).

Les facteurs de bioaccumulation théorique ont été déterminés à partir des constantes d'accumulation ( $k_1$ ) et d'élimination ( $k_2$ ) issus du modèle toxico-cinétique (cf. § 1.7.5.).

### 1.5.7. Calculs des débits de dose

Au cours de ces travaux les doses ont été estimées avec le logiciel EDEN (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, EDEN 2.0, **Beaugelin-Sellier *et al.*, 2006**) conçu pour le calcul de la dose radiologique reçue par les espèces non humaines exposées à une substance radioactive. Les estimations des débits de dose reçus par les daphnies suite à l'exposition à l'uranium sont basées sur (1) la géométrie des organismes ramenée à une forme ellipsoïdale définie par la longueur de ses trois axes, (2) la description du système organisme-milieu d'exposition (composition du milieu extérieur ; volume interne et composition élémentaire de l'organisme) et (3) les doses par unité de concentration (DCC en  $\text{Gy.h}^{-1}.\text{Bq}^{-1}.\text{mL}$ ), calculés pour chacun des isotopes dans les différents compartiments d'exposition et pour les trois principaux types de rayonnement considérés. Concernant nos expériences, l'ensemble des isotopes de l'uranium mesurés par ICP-MS et de ses premiers descendants jusqu'au  $^{231}\text{Th}$  ont été pris en compte pour le calcul des débits de dose interne et externe.

L'activité volumique de l'uranium dans l'organisme ( $\text{Bq.mL}^{-1}$ ) est calculée à partir de la concentration en uranium mesurée ( $\text{ngU.g}^{-1}$  de poids frais en supposant que le poids sec d'une daphnie représente 10% du poids frais) ramenée au volume de la daphnie, multipliée par l'activité spécifique de l'uranium égale à  $1.43.10^4 \text{ Bq.g}^{-1} \text{ U}$ . L'activité de l'uranium dans le milieu d'exposition est calculée de la même façon avec la concentration maximale en uranium retrouvée dans le milieu.

Les résultats de DDC sont résumés dans le Tableau 7, pour le milieu d'exposition et dans les tissus de la daphnie en fonction de la taille des individus allant de 1 à 5 mm.

Taille daphnie (mm)	DCC (mGy.h <sup>-1</sup> .Bq <sup>-1</sup> .mL <sup>-1</sup> )	
	Tissus	Milieu extérieur
1.0	2.64.10 <sup>-2</sup>	1.36.10 <sup>-3</sup>
2.0	2.70.10 <sup>-2</sup>	6.84.10 <sup>-4</sup>
3.0	2.72.10 <sup>-2</sup>	4.61.10 <sup>-4</sup>
4.0	2.73.10 <sup>-2</sup>	3.46.10 <sup>-4</sup>
5.0	2.74.10 <sup>-2</sup>	2.77.10 <sup>-4</sup>

**Tableau 7** : coefficients de conversion (DCC) pour l'uranium appauvri dans les tissus de daphnie et dans le milieu extérieur, calculés en fonction de la taille des daphnies (mm) et utilisés pour convertir les activités volume spécifiques (Bq.mL<sup>-1</sup>) en débits de dose délivrés aux daphnies (mGy.h<sup>-1</sup>)

Les débits de dose (DR, mGy.h<sup>-1</sup>) délivrés sont ainsi calculés comme :

$$DR = \sum DCC_i \times [\text{activité}]_i$$

où DCC<sub>i</sub> (mGy.h<sup>-1</sup>.Bq.mL<sup>-1</sup>) sont les coefficients de conversion de dose et [activité]<sub>i</sub> est l'activité volume-spécifique (Bq.mL<sup>-1</sup>) dans les deux types de compartiments, à savoir les tissus et le milieu extérieur.

#### 1.6. Suivi des conditions des milieux d'exposition

Chaque jour, le pH de chaque condition d'exposition, y compris la condition contrôle, a été vérifié et si nécessaire ajusté avant le renouvellement des milieux.

Des échantillons de milieux d'exposition et témoin sont prélevés tous les jours au moment du renouvellement des milieux et tous les 3-4 jours après 24 heures d'exposition pour quantifier les pertes en uranium dans les unités expérimentales.

L'uranium et les cations, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup>, ont été dosés par ICP-AES (Spectrométrie d'Emission Atomique à Source Plasma à Couplage Inductif, Optima 4300 DV, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) avec une limite de détection de 10 µgU.L<sup>-1</sup> et de 0.5 mg.L<sup>-1</sup> pour les cations.

Les anions majeurs, à savoir  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{F}^-$  et  $\text{Br}^-$  ont été dosés par chromatographie ionique (ISC 3000, Dionex) avec une limite de détection de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  pour tous les ions dosés.

Dans les milieux d'exposition de chaque expérimentation, graphiquement, les suivis des cations et anions majeurs n'ont pas révélé de grands écarts par rapport à la composition du milieu artificiel en condition témoin.

Le suivi des concentrations en uranium dans les milieux d'exposition a montré des pertes moyennes en uranium après 24 heures variant entre 20 et 36% selon les conditions d'exposition (Tableau 8). Le renouvellement quotidien des milieux d'exposition a permis de maintenir les concentrations d'exposition relativement proches des concentrations nominales (avec un écart maximal de  $-27\%$  pour la condition d'exposition  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la génération F0). Par la suite, l'ensemble des résultats sera représentée en faisant référence aux concentrations d'exposition nominales.

Expériences	Concentrations nominales ( $\mu\text{gU.L}^{-1}$ )	Concentrations moyennes mesurées à $t_0$ ( $\mu\text{gU.L}^{-1}$ )		Concentrations moyennes mesurées à $t_{24h}$ ( $\mu\text{gU.L}^{-1}$ )		% de pertes en uranium	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type		
Exposition à l'uranium sur 3 générations successives débutées avec des néonates issus de B5	Génération F0 (23 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.		
		10	n.d.	n.d.	n.d.		
		25	18,20	4,26	12,40	0,55	32
		75	66,75	3,60	49,39	4,40	26
	Génération F1 (23 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		25	23,87	2,10	15,39	3,62	36
		75	77,25	3,70	52,81	13,90	32
	Génération F2 (23 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
	25	19,96	3,91	15,67	3,07	21	
Exposition à l'uranium sur 2 générations successives débutées avec des néonates issus de B1	Génération F0 B1 (22 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.		
		25	23,1	2,9	18,1	3,8	22
		75	72,1	10,4	56,2	12,6	22
	Génération F1 B1 (22 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		25	21,8	3,6	14,2	3,5	35
		75	70,3	8,4	50,0	12,8	29
Effets de l'uranium au cours de l'embryogénèse	Instar B5 et début instar B6 (5 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.		
		25	25,9	2,1	18,7	0,3	28
		75	77,4	6,2	55,3	2,7	29
Effets de l'uranium après exposition au cours de l'embryogénèse	(22 jours)	0	n.d.	n.d.	n.d.		
		25	21,05	3,11	14,16	3,49	33
		75	68,91	7,73	49,97	12,84	27

**Tableau 8 :** synthèse des concentrations d'exposition nominales et mesurées en uranium dans le milieu, pour chaque expérience

## 1.7. Ajustements réalisés sur les différents critères d'effets mesurés

### 1.7.1. Reproduction

La masse des œufs ( $\mu\text{g}$ ) est exprimée en fonction de la taille des mères (mm), selon l'équation :

$$W_t = \beta \times L_t + \omega \quad (\text{Eq. 13})$$

où,  $\beta$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-1}$ ) et  $\omega$  ( $\mu\text{g}$ ) sont la pente et l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire, et  $L_t$  la taille de l'individu au temps t.

### 1.7.2. Taux d'ingestion et d'assimilation

Les données d'ingestion ( $\mu\text{gC} \cdot \text{daphnie}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ ) ont été ajustées en fonction de la taille ( $L_t$ ) au carré des individus (**Kooijman, 2000**) :

$$I_t = \alpha \cdot L_t^2 \quad (\text{Eq. 14})$$

où  $L_t$  est la taille de l'individu (mm) au temps t, et  $\alpha$  le taux d'ingestion surfacique ( $\mu\text{gC} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1}$ ).

Les données d'assimilation ont, elles aussi, été ajustées en fonction de la surface des individus (**Kooijman, 2000**), selon l'équation :

$$A_t = \mu \times L_t^2 \quad (\text{Eq. 15})$$

où  $L_t$  est la taille de l'individu (mm) au temps t, et  $\mu$  le taux d'assimilation surface spécifique ( $\mu\text{gC} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1}$ ). On retrouve  $\frac{\mu}{\alpha}$  qui est l'efficacité d'assimilation.

### 1.7.3. Taux de respiration

Les coûts pour la maintenance peuvent être décomposés en fractions proportionnelles au volume et à la surface des individus (**Kooijman, 2000**). Par conséquent, les données de respiration ont été ajustées selon l'équation :

$$R_t = r_1 \times L_t^2 + r_2 \times L_t^3 \quad (\text{Eq. 16})$$

avec  $L_t$ , la taille au temps  $t$ ,  $r_1$  le taux de respiration surface spécifique ( $\mu\text{gO}_2 \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) et  $r_2$  le taux de respiration volume spécifique ( $\mu\text{gO}_2 \cdot \text{mm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

### 1.7.4. Croissance somatique

Les valeurs de taille ont été ajustées selon l'équation de von Bertalanffy (1960), selon l'équation :

$$L_t = L_{\max} - (L_{\max} - L_b) \times \exp^{-\gamma \cdot t} \quad (\text{Eq. 17})$$

où  $L_{\max}$  est la taille maximale (mm),  $L_b$  la taille à la naissance (mm) et  $\gamma$  le taux de croissance de Von Bertalanffy ( $\text{j}^{-1}$ ).

La daphnie est un organisme isomorphe tout au long de son cycle de vie, ce qui signifie que le rapport entre son volume et sa masse est constante tout au long de son développement. Par conséquent, la masse des organismes ( $M_t$ ) reste proportionnel au cube de leur longueur :

$$M_t = \delta \times L_t^3 \quad (\text{Eq. 18})$$

où  $\delta$  est le coefficient de forme ( $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ ) et  $L_t$  la taille de l'individu au temps  $t$ .

### 1.7.5. Concentration en uranium dans le corps des daphnies

Les valeurs de bioaccumulation ont été ajustées avec un modèle toxico-cinétique à un compartiment, prenant en compte la dilution de la concentration en uranium par la croissance des individus (**Kooijman et Bedaux, 1996**), selon l'équation 1 décrite dans la partie A (§ 4.2.1.) :

$$\frac{d}{dt} C_t = C_{\text{ext}} \times \frac{k_1}{L_t} - C_t \times \left( \frac{k_2}{L_t} + \frac{d}{dt} \ln L_t^3 \right) \quad (\text{Eq. 19})$$

où  $C_{\text{ext}}$  est la concentration externe en uranium ( $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ),  $k_1$  le taux d'accumulation ( $\text{j}^{-1}$ ) et  $k_2$  le taux d'élimination ( $\text{j}^{-1}$ ) en uranium.

La concentration d'uranium accumulée dans l'organisme ( $\text{ngU.}\mu\text{L}^{-1}$ ) est calculée selon l'équation:

$$C_t = \frac{Q_t}{V_t}$$

avec  $Q_t$ , la quantité d'uranium mesurée par daphnie ( $\text{ngU.daphnie}^{-1}$ ),  $V_t = \frac{4}{3}\pi \times (xyz)$ , le volume de la daphnie estimé ( $\mu\text{L}$ ), où  $x$ ,  $y$  et  $z$  sont les demi-axes respectifs de la longueur, largeur et épaisseur d'une daphnie. Chez *D. magna*, **Alonzo et al., (2008a)** a déterminé  $x = \frac{L_t}{2}$  ;  $y = 0.6x$  et  $z = 0.4 x$ , permettant de simplifier l'équation précédente en  $V_t = 0.04\pi \times L_t^3$ .

## 1.8. Analyses statistiques

L'analyse des effets de l'uranium sur les traits physiologiques (taux d'ingestion, taux d'assimilation et taux de respiration) et les traits d'histoire de vie (taille, masse sèche des mères et des œufs) des daphnies est un problème de comparaison de courbes. En effet, les grandeurs d'intérêt ont des dynamiques liées à des grandeurs quantitatives (âge/taille) dont il faut s'affranchir pour déceler l'influence des niveaux d'un facteur qualitatif décrivant les conditions d'exposition.

Les effets de l'uranium ont donc été testés par ajustement (une courbe par traitement) et de tests d'identité de courbes. Les relations utilisées et décrites dans le paragraphe

précédent sont conformes à la théorie DEB (**Kooijman, 2000**). La solution de l'équation différentielle pour la bioaccumulation  $Q_t$  a été résolue algébriquement avec le logiciel Mathematica 6 (Wolfram Research Inc., Champaign, USA). Les analyses statistiques ont été conduites avec le logiciel R (R Development Core Team, 2006). Dans un premier temps, les modèles linéaires et le modèle non-linéaire de Von Bertalanffy ont été ajustés aux données, pour chaque condition d'exposition, avec les routines *lm* et *gnls* en suivant la méthode des moindres carrés ordinaires. Les hypothèses de normalité des résidus et d'homogénéité des résidus ont été évaluées. Six tests différents ont été appliqués pour appréhender la normalité des résidus : Shapiro-Wilk, Lilliefors, Anderson-Darling, Cramer-von Mises, Shapiro-Francia et Jarque-Bera. On a considéré les résidus normaux, si avec au moins un test, l'hypothèse  $H_0$  est vérifiée ( $p$ -value  $> 0.05$ ). L'homogénéité des résidus a été vérifiée avec les tests de Levene, Bartlett et Filgner-Killeen. Quand l'homogénéité des résidus a été rejetée, l'emploi de la matrice de variance-covariance des résidus, corrigée par la méthode "sandwich" (**Zeileis, 2006**) a autorisé à faire des tests d'hypothèses.

Pour finir, l'existence d'effet de l'uranium sur ces courbes a été analysée selon des tests de comparaison multiples. Il s'agit de comparer les courbes deux à deux et de décider si au moins une différence est significative avec un risque global  $\alpha$ . Les différentes méthodes existantes consistent à corriger le risque attribué à chacun des tests (en le diminuant), afin d'assurer un risque global maximum  $\alpha$ . La procédure séquentielle de **Holm (1979)** a été retenue car elle est la plus puissante. Elle rejette le maximum de tests tout en attribuant des risques faibles pour les tests ayant des  $p$ -values faibles.

Lorsque les courbes n'ont pas pu être ajustées, une comparaison des traitements sur la base de leur effet moyen a été réalisée par analyse de la variance. C'est le cas de certaines données de bioaccumulation qui n'ont pas pu être ajustées à cause de données insuffisantes pour identifier les paramètres de croissance.

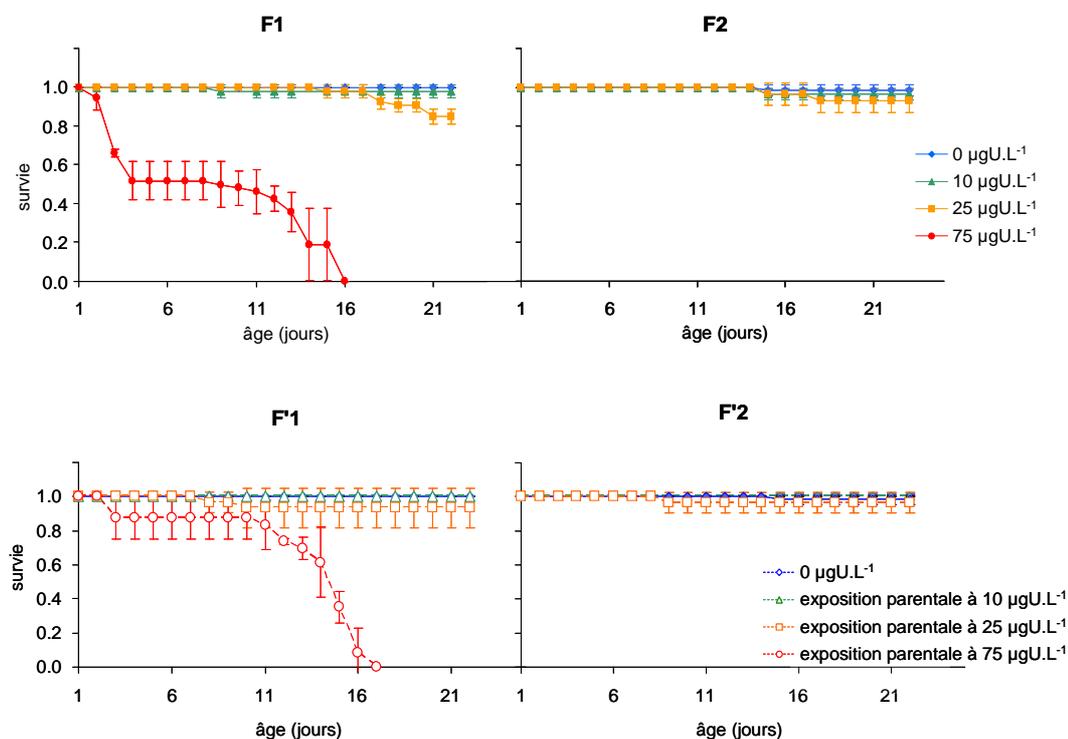
## Chapitre 2. Etude des effets d'une exposition à l'uranium sur 3 générations successives

Les objectifs de cette expérimentation sont d'examiner (1) si l'exposition chronique à l'uranium affecte l'assimilation du carbone de la nourriture chez *D. magna*, (2) si la toxicité de l'uranium diffère au travers des générations successivement exposées, (3) si les descendants issus de parents exposés à l'uranium sont capables de se rétablir dans un milieu non contaminé. Suivant les recommandations de l'OCDE, (*i.e.* ne pas utiliser des néonates de premières pontes pour réaliser les tests), toutes les générations sont débutées avec des néonates issus de ponte 5, supposés représentatifs.

Cette étude fait l'objet d'une publication dans la revue *Aquatic Toxicology* (**Massarin et al., 2010**), présentée en Annexe 3.

## 2.1. Survie

La survie dans la première génération (F0) n'est pas affectée par l'exposition à l'uranium, quelle que soit la concentration d'exposition.



**Figure 78 :** *survie des daphnies dans les générations F1 et F2 exposées à 0, 10, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> et dans les générations (F'1 et F'2) transférées en milieu non contaminé (n=3 avec 20 individus par réplicat en conditions exposées et 10 individus en milieu non contaminé)*

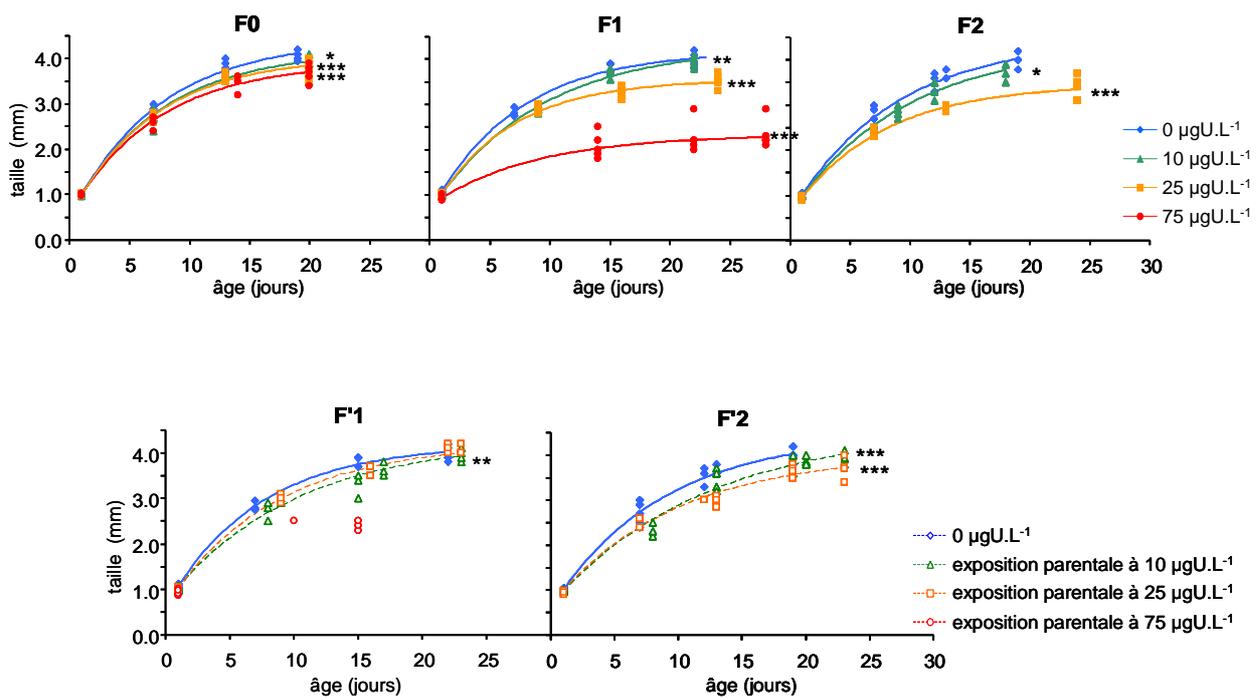
Dans les générations F1 et F2, les daphnies exposées à 10 µgU.L<sup>-1</sup> montrent une très faible mortalité qui n'excède pas 3% après 22 jours d'exposition (Figure 18). Il en est de même pour les individus issus de parents exposés à 10 µgU.L<sup>-1</sup> qui retournent en milieu non contaminé (générations F'1 et F'2).

Une faible mortalité est observée dans F1 après 15 jours d'exposition à 25 µgU.L<sup>-1</sup>, elle est de 15% après 22 jours d'exposition. Des mortalités de 3 et 7%, à 22 jours, sont observées dans F'1 et F'2 où les descendants sont issus d'une exposition parentale à 25 µgU.L<sup>-1</sup>.

Ces faibles mortalités contrastent fortement avec celles observées pour la condition 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . En effet, dans F1, une mortalité de 52% est observée après 4 jours d'exposition et passe à 100% après 16 jours d'exposition. Pour ce qui est des individus qui sont transférés en milieu non contaminé (F'1), les résultats montrent une extinction des individus après 17 jours (Figure 18).

## 2.2. Croissance somatique en taille

L'exposition à l'uranium induit une réduction de la taille des daphnies avec la concentration d'exposition et au travers des générations (Figure 19 et Tableau 9). Les ajustements du modèle de Von Bertalanffy révèlent une réduction significative de la taille maximale dès 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Bien qu'assez faible, 6% par rapport à la condition témoin dans F0, cette réduction est statistiquement significative dans toutes les générations.



**Figure 19 :** taille (mm) des daphnies en fonction de l'âge dans les trois générations successives exposées à 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{g U L}^{-1}$  (F0, F1 et F2) et dans les générations (F'1 et F'2) transférées en milieu non contaminé ( $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Génération	[U] $\mu\text{gU.L}^{-1}$	Taille				Masse sèche		Masse sèche des œufs			Ingestion de carbone		Assimilation de carbone		Consommation d'O <sub>2</sub>		
		$L_b$ mm	$L_{max}$ mm	$\gamma_j^{-1}$	$p$	$\delta$ $\mu\text{g.mm}^{-3}$	$p$	$\beta$ $\mu\text{g.mm}^{-1}$	$\omega$ $\mu\text{g}$	$p$	$\alpha$ $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{mm}^{-2}$	$p$	$\mu$ $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{mm}^{-2}$	$p$	$r_1$ $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{mm}^{-2}$	$r_2$ $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{mm}^{-3}$	$p$
F0	0	0.99	4.42	0.13		3.92		3.03	-3.57		0.20		0.21		0.033	0.035	
	10	0.99	4.18	0.14	*	4.27		3.88	-5.75		0.17		0.19		0.104	0.025	
	25	0.99	4.05	0.14	***	3.06	***	3.05	-3.75		0.19		0.14	**	0.125	0.016	
	75	1.00	3.92	0.14	***	3.04	***	2.01	-0.91		0.08	***	0.04	***	0.120	-0.008	
F1	0	1.07	4.20	0.14		4.85		2.76	-1.37		0.32		0.26		0.219	-0.008	
	10	1.02	4.30	0.11	**	4.10	***	1.44	3.02		0.23	***	0.16	***	0.443	-0.071	
	25	1.01	3.55	0.16	***	3.78	***	2.11	-0.03		0.21	***	0.16		0.231	-0.034	
	75	0.93	2.34	0.12	***	3.61	**	3.32	-3.41								
F2	0	1.02	4.45	0.12		4.63		2.29	-0.68		0.37		0.31		0.146	0.011	
	10	0.99	4.34	0.11	*	4.84		1.63	1.25		0.27	***	0.20	***	0.121	0.349	
	25	0.96	3.46	0.13	***	4.45		1.83	0.92		0.18	***	0.14	***	0.591	-0.122	
F'1 (exposition parentale)	10	1.04	4.28	0.10	**	5.34		4.43	-6.65								
	25	1.01	4.22	0.12		4.57		2.39	-0.72								
	75		échec <sup>†</sup>			3.28											
F'2 (exposition parentale)	10	0.96	4.60	0.08	***	5.27	**	2.91	-2.47								
	25	0.98	4.03	0.10	***	5.56	**	3.02	-3.05								

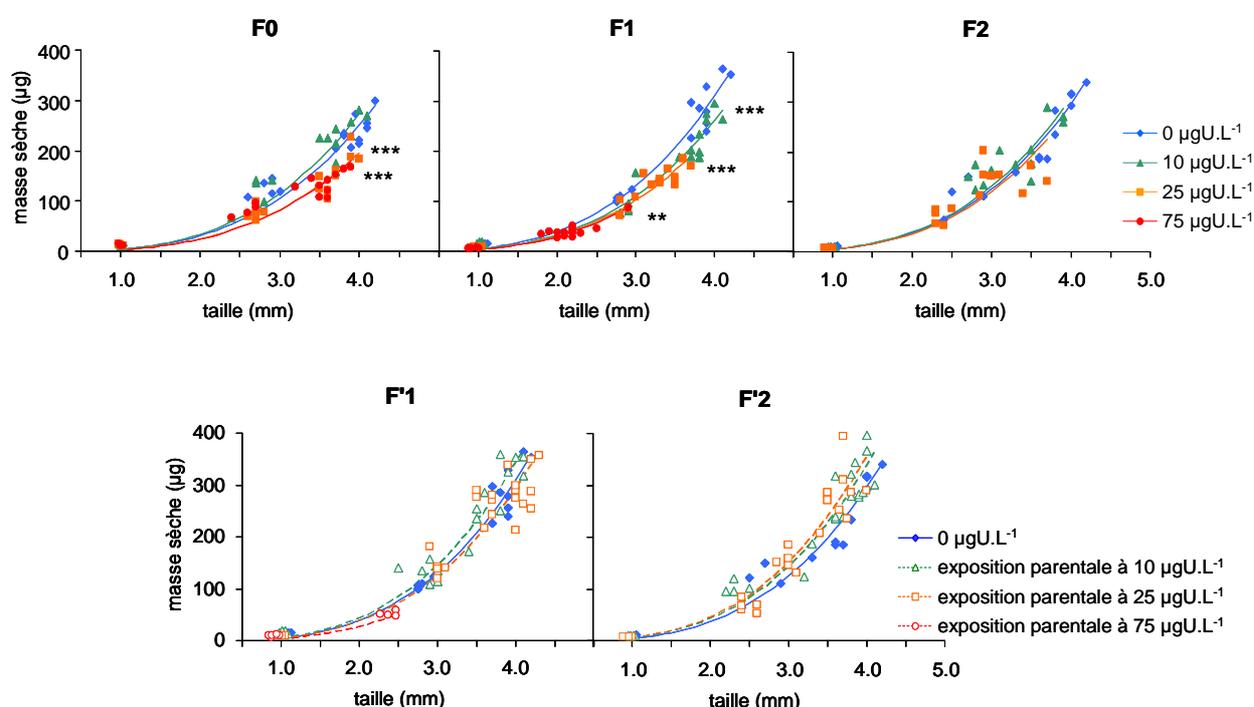
**Tableau 9 :** paramètres de croissance (taille et masse sèche), ingestion, assimilation, respiration et masse sèche des œufs estimés pour les différentes conditions d'exposition (0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ) pour les trois générations successives (F0, F1 et F2) et pour les générations qui retournent en milieu non contaminé (F'1 et F'2) (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). <sup>†</sup> Echec de l'ajustement avec le modèle *gnls* sous R.

La croissance en taille est beaucoup plus affectée à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , avec des longueurs maximales réduites de 9%, 16% et 23% comparées aux conditions contrôles dans F0, F1 et F2. A  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$ ,  $L_{max}$  est réduite de 11% dans F0 et de 44% dans F1, par rapport aux conditions témoins (Figure 19 et Tableau 9).

Dans les générations de descendants transférées en milieu non contaminé, la taille est significativement réduite après une exposition parentale à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F'1 et après une exposition parentale  $\geq 10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F'2 (Figure 19 et Tableau 9).

### 2.3. Croissance somatique en masse

La masse somatique est fortement affectée par l'uranium dans F0 et F1 (Figure 20 et Tableau 9). Cet effet est principalement le résultat d'une réduction de la taille avec les concentrations croissantes en uranium. Néanmoins, les ajustements de masse en fonction des tailles montrent des différences significatives, par rapport aux conditions témoins, dans F0, à partir de  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  et à partir de  $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 (Figure 20 et Tableau 9), suggérant un effet direct de l'uranium sur la masse des daphnies. Ainsi, à taille égale, la masse sèche des



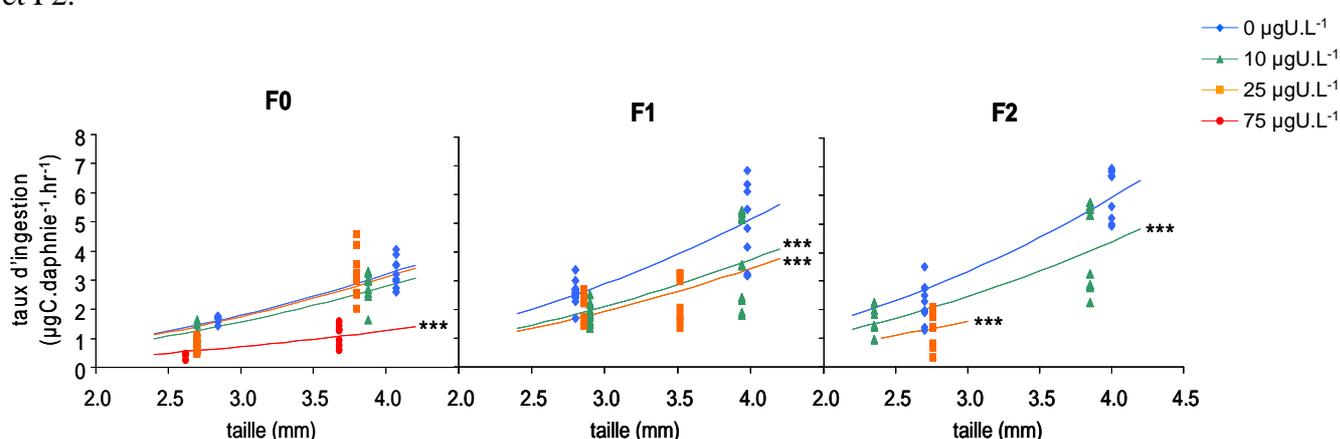
**Figure 20 :** masse sèche individuelle ( $\mu\text{g}$ ) des daphnies en fonction de la taille (mm) dans les trois générations successives exposées à 0, 10, 25 et  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0, F1 et F2) et dans les générations (F'1 et F'2) transférées en milieu non contaminé (\*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

daphnies est réduite d'environ 22% pour les conditions 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F0 et F1 et de 16% à 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1. Aucune différence significative n'est mise en évidence dans F2.

Dans les générations de descendants transférés en milieu non contaminé, des masses plus importantes à taille égale sont observées après une exposition parentale à 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F'1 et à 10 et 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F'2, par rapport à des individus témoins. Ces différences ne sont toutefois pas statistiquement significatives (Figure 20 et Tableau 9).

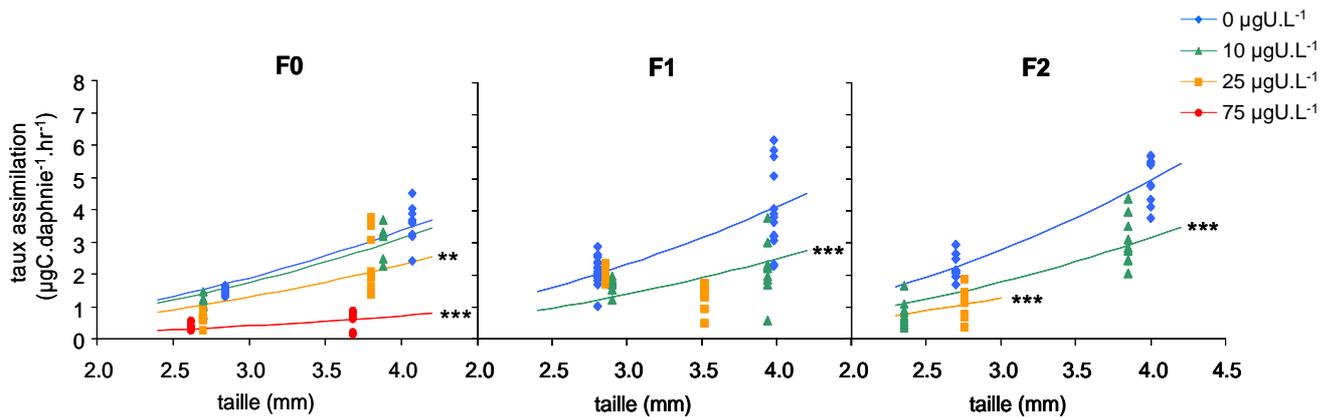
## 2.4. Taux d'ingestion et d'assimilation

Du fait d'une mortalité importante, suivie d'une extinction des individus exposés à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , aucune mesure d'ingestion et d'assimilation n'a été réalisée à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 et F2.



**Figure 21 :** *taux d'ingestion des daphnies ( $\mu\text{gC.daphnie}^{-1}.\text{hr}^{-1}$ ) en fonction de la taille (mm) dans les 3 générations successives exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0,F1 et F2) ( $n = 10$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )*

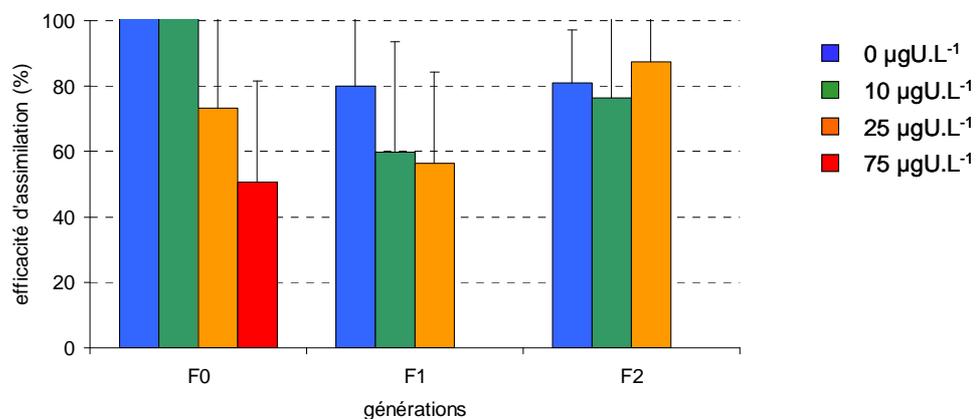
Les ajustements montrent une réduction importante des taux d'ingestion, résultant en majeure partie d'une réduction de la taille des individus (Figure 21 et Tableau 9). Néanmoins, les différences significatives mises en évidence par les ajustements à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F0 et à partir de 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 et F2 montrent un effet direct de l'uranium sur les taux d'ingestion, indépendamment de la taille des daphnies.



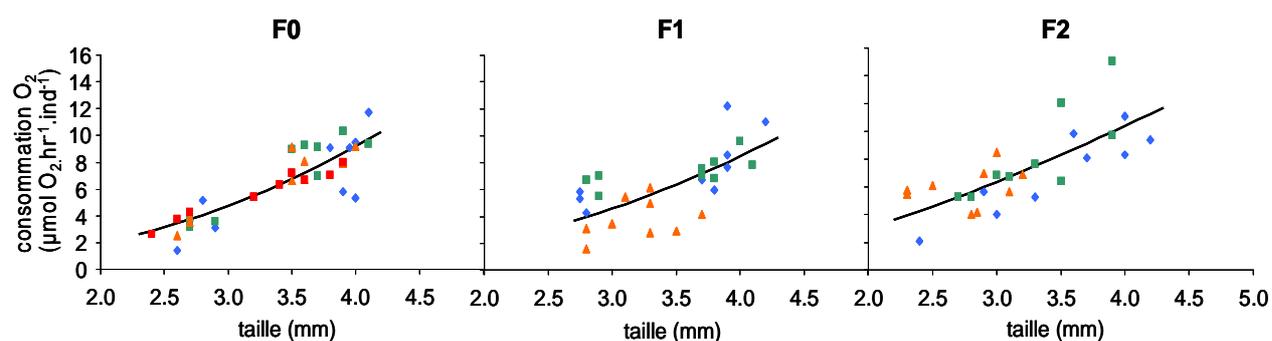
**Figure 22 :** *taux d'assimilation des daphnies ( $\mu\text{gC.daphnie}^{-1}.\text{hr}^{-1}$ ) en fonction de la taille (mm) dans les 3 générations successives exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0,F1 et F2) ( $n = 10$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )*

Les taux d'assimilation suivent les mêmes tendances que les taux d'ingestion. Les réductions d'assimilation avec la concentration d'uranium et au travers des générations, s'expliquent à la fois par un effet indirect *via* une réduction de la taille et un effet direct de l'uranium. En effet, à partir de 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F0 et dès 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 et F2 les ajustements sur les taux d'assimilation révèlent des différences significatives par rapport aux conditions témoins indépendamment de la taille des daphnies (Figure 22 et Tableau 9).

Par rapport aux contrôles, les efficacités d'assimilation montrent des réductions de 26 et 43% à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  respectivement dans F0 et de 21 et 24% à 10 et 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1, après 22 jours d'exposition (Figure 23).



**Figure 23 :** *efficacité d'assimilation (%) dans les trois générations successives exposées à 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0, F1 et F2) ( $n = 10$ , moyenne et écart type)*



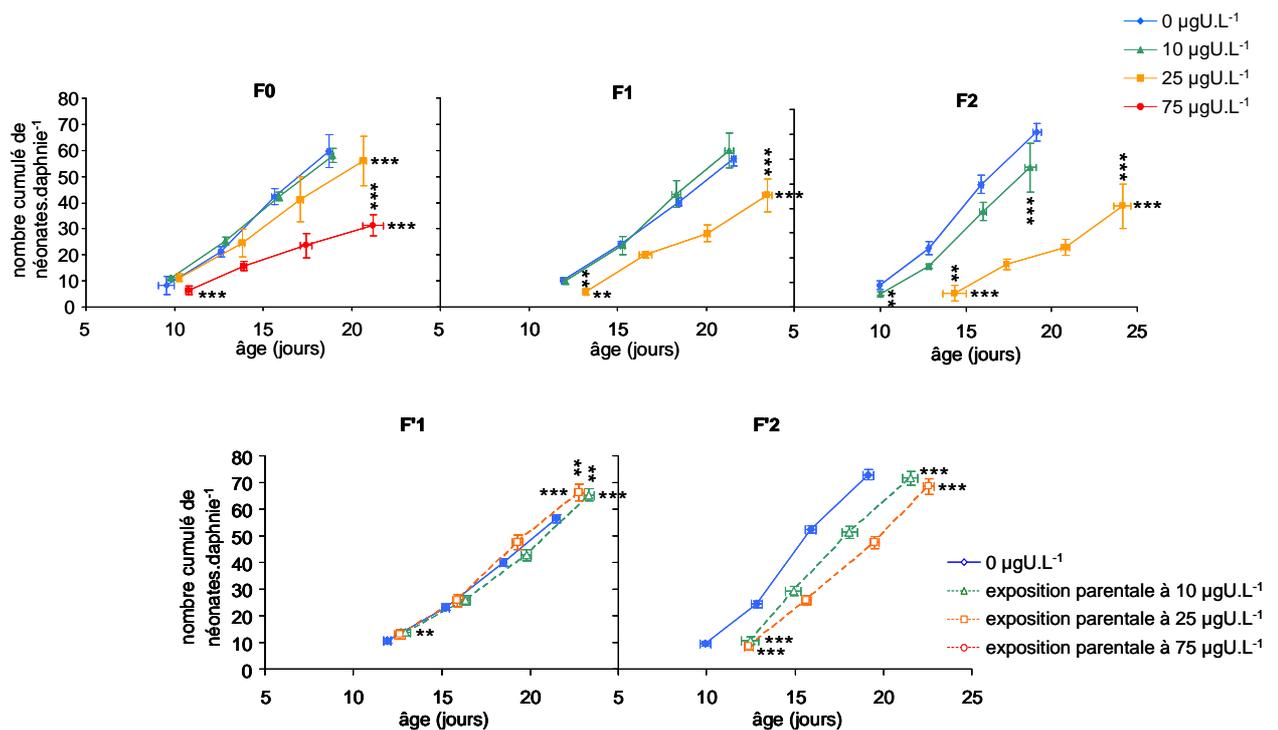
**Figure 24 :** *taux de consommation d'oxygène des daphnies ( $\mu\text{molO}_2\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$ ) en fonction de la taille (mm) dans les 3 générations successives exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et  $75\ \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  (F0,F1 et F2) ( $n = 3$  pour B1, B3 et B5, \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )*

Les relations ajustées pour les daphnies exposées ne diffèrent pas significativement des conditions contrôles, quelle que soit la génération (Tableau 9), d'où un ajustement commun pour toutes les conditions d'exposition d'une même génération (Figure 24). Par conséquent, les réductions des taux de respiration observées avec la concentration d'uranium sont principalement le résultat d'une réduction de la taille des daphnies.

## 2.6. Reproduction

L'exposition à l'uranium induit des perturbations dans la reproduction avec des retards de ponte, des diminutions de fécondité et des réductions dans la masse investie dans les œufs.

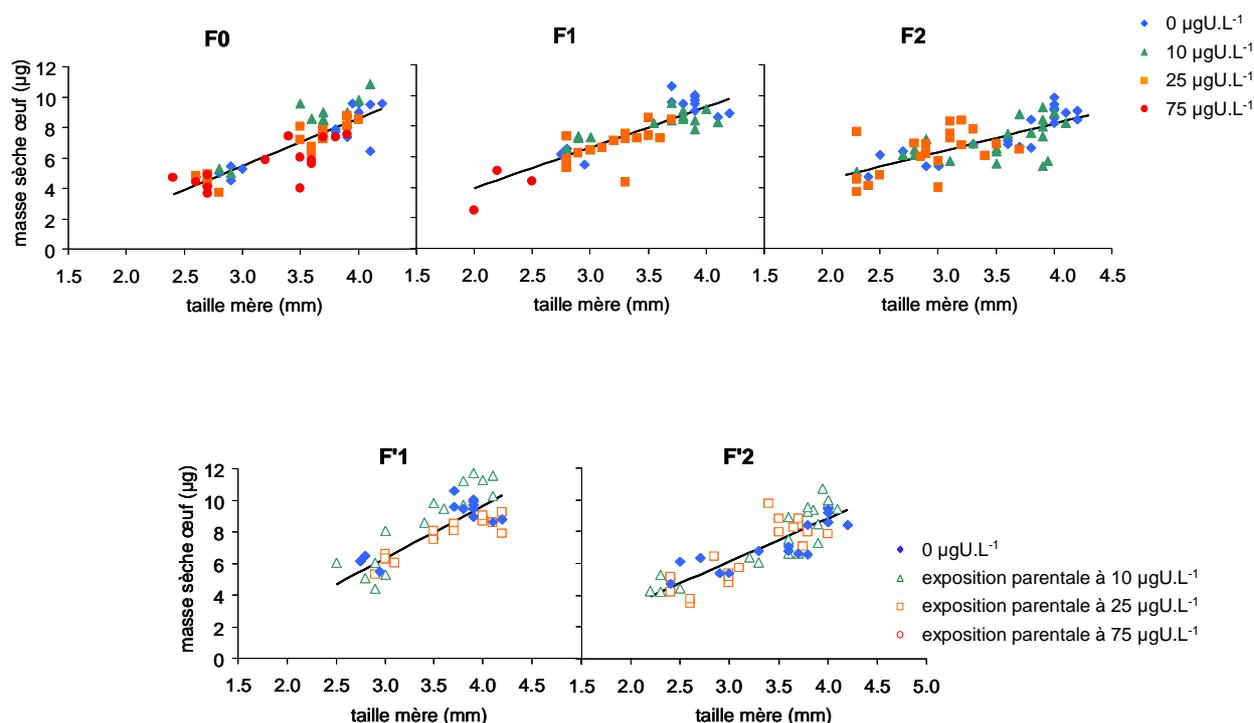
A  $10\ \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$ , aucun effet n'est observé sur le délai de libération des pontes et de la fécondité dans les générations F0 et F1 tandis qu'une réduction significative de la fécondité cumulée de 20% apparaît dans la F2 (Figure 25). Pour les individus de F0 de la condition  $25\ \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$ , le retard de ponte varie de 0.7 à 1.9 jours au dépôt des pontes 1 et 4, respectivement (Figure 25). Ce retard de ponte, pour cette condition d'exposition, augmente au travers des générations atteignant 1.9 et 5 jours au dépôt des pontes 1 et 4, dans F2. En parallèle, la fécondité à  $25\ \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  diminue au travers des générations, avec une réduction de 21 et 52% à l'éclosion des néonates de la ponte 4, dans F1 et F2, respectivement. Les individus exposés à  $75\ \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  présentent, dans F0, un retard dans la libération des pontes, allant de 1.3 à 2.5 jours, au dépôt des pontes 1 et 4 respectivement. La fécondité cumulée est



**Figure 25 :** nombre cumulé de néonates produits par daphnie sur les 4 premières pontes en fonction de l'âge dans les 3 générations successives exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0,F1 et F2) et dans les générations (F'1 et F'2) transférées en milieu non contaminé ( $n = 3$ , avec 20 individus par réplicats en conditions exposées et 10 individus en milieu non contaminé, \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ , astérisque horizontal dans le cas d'une différence significative du temps de libération des néonates par rapport aux témoins, astérisque vertical pour une différence significative de fécondité par rapport aux témoins)

réduite de 48% par rapport à la condition témoin. Il est à noter que les daphnies exposées à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 ne se reproduisent quasiment pas, et que les quelques néonates produits ne sont pas viables.

Le retour en milieu non contaminé des descendants améliorent la reproduction, seulement après une exposition parentale à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F'1 (Figure 25). Cette amélioration concerne principalement la fécondité avec une production de néonates de 28% supérieure aux daphnies témoins entre F'1 et F1. Le retard de ponte dans F'1 et F'2, à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , reste du même ordre que dans les générations exposées.

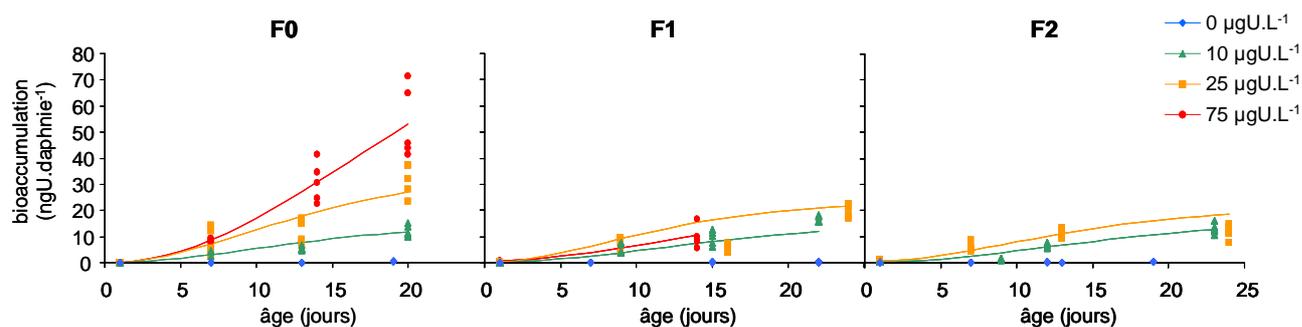


**Figure 26 :** masse sèche d'un œuf en fonction de la taille des daphnies dans les 3 générations successives exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0, F1 et F2) et dans les générations (F'1 et F'2) transférées en milieu non contaminé ( $n = 5$  pour B1, B3 et B5, \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Concernant la masse investie dans les œufs, les résultats montrent que celle-ci augmente linéairement avec la longueur des mères (Figure 26). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les conditions d'exposition (Tableau 9), d'où des ajustements communs entre les conditions pour chaque génération. Par conséquent, la diminution de masse investie dans les œufs, observée entre les conditions d'exposition, est uniquement le résultat d'une diminution de la taille des mères avec la concentration d'uranium.

## 2.7. Bioaccumulation et débits de dose

Les mesures de bioaccumulation réalisées dans les œufs fraîchement pondus (*i.e.* quelques heures après leur dépôt dans la poche incubatrice), révèlent des quantités en uranium inférieures aux limites de quantification de l'ICP-MS quels que soient la concentration, le temps d'exposition et la génération.



**Figure 27 :** bioaccumulation de l'uranium dans le corps des daphnies (ngU.daphnie<sup>-1</sup>) en fonction de l'âge dans les 3 générations successives, exposées aux concentrations d'uranium de 0, 10, 25 et 75 µg U L<sup>-1</sup> (F0,F1 et F2, n=5)

Les quantités d'uranium, mesurées dans le corps des daphnies et ajustées selon le modèle biocinétique, augmentent avec l'âge et les concentrations d'exposition (Figure 27). Des teneurs moyennes maximales de  $17 \pm 1$  ;  $32 \pm 6$  et  $54 \pm 13$  ngU.daphnie<sup>-1</sup>, ont été mesurées après 20 jours d'exposition à 10, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>, toutes générations confondues. Aucune différence de quantité d'uranium bioaccumulée dans le corps des daphnies n'est observée dans la génération F1 entre les conditions 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>. Ce résultat s'explique par les importantes réductions de taille à cette condition. Les ajustements permettent de déterminer une constante d'accumulation,  $k_1 = 0.223 \text{ j}^{-1}$  et une constante d'élimination,  $k_2 = 1.327 \text{ j}^{-1}$ , pour des concentrations en uranium  $\leq 25 \text{ µgU.L}^{-1}$  et  $k_1 = 0.043 \text{ j}^{-1}$  et  $k_2 = 0.126 \text{ j}^{-1}$  à 75 µgU.L<sup>-1</sup>, indépendamment des générations.

Les facteurs de bioaccumulation, calculés à partir des teneurs en uranium mesurées varient de 417 à 870 L.kg<sup>-1</sup> de poids frais de daphnie à 25 µgU.L<sup>-1</sup> et de 348 à 658 L.kg<sup>-1</sup> de poids frais de daphnie à 75 µgU.L<sup>-1</sup>. Cependant, ces valeurs ne sont pas déterminées dans des conditions à l'équilibre. Les facteurs de bioaccumulation à l'équilibre, prédits à partir des constantes d'accumulation et d'élimination du modèle biocinétique, atteignent 690 et 1410 L.kg<sup>-1</sup> de poids frais de daphnie, pour des concentrations en uranium  $\leq 25 \text{ µg.L}^{-1}$  et de 75 µg.L<sup>-1</sup>, respectivement.

Les valeurs de bioaccumulation, exprimées en ngU.daphnie<sup>-1</sup>, ont été converties en ngU.mg<sup>-1</sup> de poids frais, permettant ainsi d'obtenir des débits de dose maximaux de 5, 12 et 20 µGy.hr<sup>-1</sup>, à 10, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>.

## 2.8. Discussion

### 2.8.1. Aspects techniques de la quantification de l'assimilation chez *D. magna*

Les mesures des taux d'ingestion et d'assimilation absolus ( $\mu\text{gC}\cdot\text{individu}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), montrent clairement que la variabilité individuelle est importante. Toutefois, en amont des mesures, une phase d'optimisation de la technique a été réalisée pour minimiser cette variabilité.

Une hypothèse pouvant expliquer cette variabilité serait que les individus sont stressés (**Rigler, 1971**) ou plus voraces en début d'expérimentation. En effet, **Lampert (1977)** propose une acclimatation des daphnies aux conditions expérimentales avant les mesures d'assimilation. Nous avons voulu savoir si une phase d'adaptation des daphnies aux conditions de mesures était nécessaire. Pour cela, avant de quantifier les taux d'assimilation, les daphnies ont été nourries avec des algues non radioactives sur une période de 1 h ou 2 h 30. Les résultats ont révélé une augmentation de la variabilité de la mesure d'assimilation avec l'augmentation des temps de la phase de pré-ingestion d'algues non marquées en début d'expérience, suggérant que les daphnies pouvaient avoir un comportement différent après 2 h 30 d'ingestion d'algues non contaminées. Par la suite, nous avons fait le choix de ne pas adapter les daphnies avec des algues non marquées avant la mesure d'assimilation.

Un autre aspect à prendre en compte dans cette technique de mesure, et qui pourrait expliquer cette variabilité observée, est le temps de marquage des algues car une hétérogénéité du marquage de la nourriture peut entraîner des déterminations incorrectes du taux d'assimilation. Pour tester l'homogénéité du marquage des algues, **Lampert (1977)** incubent des algues avec  $^{14}\text{C}$  sur différents temps d'exposition, de 2 à 48 heures. De grandes différences d'activité spécifique sont mises en évidence pour des algues marquées sur de courtes périodes (2 et 16 heures), en comparaison à un marquage sur 48 heures. Dans nos expériences, nous avons donc fait le choix d'incuber nos algues sur 48 heures, permettant ainsi d'avoir une activité spécifique des algues assez élevée et homogène. De plus, les algues sélectionnées pour ces expériences étaient âgées de  $4 \pm 1$  jours, c'est-à-dire en pleine phase de croissance exponentielle, évitant ainsi de potentiels effets inhibitoires de la sénescence de la nourriture sur les taux de filtration des daphnies.

Un autre problème à considérer est qu'une partie du carbone marqué et assimilé est rapidement métabolisé et se retrouve sous forme de dioxyde de carbone marqué dans le milieu. Il s'agit d'une composante non négligeable à prendre en compte dans la détermination

des taux d'assimilation. En effet, les résultats de **Lampert et Gabriel (1984)** révèlent que plus de 20% de la fraction de carbone assimilée peut être excrétée sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$  dans le milieu après 3 heures d'incubation des daphnies avec des algues marquées. Ce pourcentage de carbone assimilé perdu au travers de la respiration est dépendant du temps de l'expérience, de la température, de la taille des organismes et de la concentration de nourritures (**Lampert, 1977**). **Lampert et Gabriel (1984)** montrent que les pertes de traceur peuvent déjà avoir lieu 20 minutes après le début de l'exposition de *D. magna* exposée à des algues du genre *Scenedesmus acutus* marqué au  $^{14}\text{C}$ . Mais, **Peters (1984)** détermine un temps de passage de la nourriture dans le tube de digestif de *D. magna* de 25 à 50 minutes selon l'espèce de l'algue, sa concentration dans le milieu et la masse de la daphnie. Nous avons donc fait le choix d'exposer les daphnies pendant 30 minutes avec des algues marquées et de mesurer les pertes en  $^{14}\text{C}$ , une fois les daphnies transférées dans le milieu contenant les algues non marquées, dans le but de maximiser la proportion de carbone assimilé par les individus tout en minimisant les pertes dues à la respiration. D'autres travaux, tels que ceux de **Yu et Wang (2002)**, **Baillieul et al. (2005)** exposent les daphnies aux algues marquées à des temps  $\geq 30$  minutes. Un autre biais à la mesure du  $^{14}\text{C}$  présent dans le milieu est dû à la respiration des algues. Dans les expérimentations où la mesure de l'assimilation est faite sur des individus exposés continuellement à des algues marquées au  $^{14}\text{C}$ , la détermination du  $^{14}\text{CO}_2$  libéré par les algues est calculé à partir de bouteilles contrôles, ne contenant pas de daphnie. Dans nos expériences, le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans le milieu a été quantifié après transfert des daphnies dans le milieu contenant les algues non marquées, nous permettant ainsi de nous affranchir des pertes en  $^{14}\text{C}$  dues aux algues. L'activité bactérienne pourrait aussi influencer la quantité de dioxyde de carbone dans le milieu, mais les résultats de **Lampert (1977)** indiquent que les bactéries ne jouent pas de rôle dans la production de  $^{14}\text{CO}_2$ .

Une dernière remarque sur l'assimilation concerne la présentation des résultats. De nombreuses études présentent leurs résultats au travers des efficacités d'assimilation. Nos résultats montrent des écarts types relativement importants. L'efficacité d'assimilation étant calculé comme le ratio de deux valeurs expérimentales, la variance de la moyenne se trouve être largement amplifiée. De ce fait, les valeurs d'assimilation sont indéniablement très variables (par exemple de 8 à 100% - **Conover (1964)** ; **Peters (1972)**). Par conséquent, l'assimilation doit être plutôt représentée comme un taux et non comme un ratio (**Peters, 1984**).

### 2.8.2. Chimiotoxicité vs radiotoxicité de l'uranium

Les particules alpha sont atténuées par le milieu d'exposition et ne transfèrent donc leur énergie que sur une très courte distance. De plus, elles ne passent pas au travers de l'exosquelette des organismes aquatiques (**Whicker et Schultz, 1982**). Le risque radiologique dû à l'exposition externe est donc minimal et seules les concentrations en uranium accumulées dans le corps des organismes constituent un danger radiologique. Dans cette expérience, les débits de dose calculés à partir des concentrations moyennes maximales en uranium mesurées dans le corps des daphnies et des concentrations d'exposition, varient de 5 à 20  $\mu\text{Gy}\cdot\text{hr}^{-1}$ , toutes générations confondues. Ces valeurs de débits de dose sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans l'étude de **Zeman et al. (2008)** dans laquelle *Daphnia magna* est exposée à une gamme de concentrations en uranium de 0 à 100  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant 21 jours. Une exposition de *D. magna* à un émetteur alpha ( $^{241}\text{Am}$ ), doté d'une activité spécifique élevée, induit à des débits de dose 15 fois supérieurs (300  $\mu\text{Gy}\cdot\text{hr}^{-1}$ ), des effets moins importants que ceux reportés dans notre étude. Les résultats révèlent une faible réduction de la croissance et de la fécondité après exposition sur plusieurs générations (**Alonzo et al., 2008a**), et aucun effet sur les taux d'ingestion (**Alonzo et al., 2006**). Par comparaison, les fortes réductions de la croissance somatique, des taux d'assimilation et de la fécondité ou encore les retards dans la libération des pontes, induits chez la daphnie par l'exposition à l'uranium sont majoritairement attribuables à sa toxicité chimique. Ceci confirme que la chimiotoxicité de l'uranium appauvri est beaucoup plus importante en comparaison à sa radiotoxicité, ce qui est en accord avec les résultats de **Miller et al. (2002)**, **Sheppard et al. (2005)** et **Mathews et al. (2009)**.

### 2.8.3. Effets de l'uranium sur le budget énergétique de *D. magna*

#### 2.8.3.1. Toxicité de l'uranium pour la nutrition

L'adaptation de la technique de radiomarquage-traçage de la nourriture au  $^{14}\text{C}$  (**Peters, 1984 ; Lampert, 1987**) a permis de mettre en évidence que l'uranium perturbe les processus clé d'acquisition de l'énergie. Les expériences révèlent des diminutions importantes des taux d'ingestion et d'assimilation du carbone de la nourriture, en présence d'uranium. Ces résultats s'expliquent par des réductions de la taille des individus exposés à l'uranium mais aussi par

un effet direct de l'uranium sur l'ingestion et l'assimilation de la daphnie. Le pourcentage d'effet sur l'assimilation quantifié à l'aide de la technique au  $^{14}\text{C}$  demeure relatif et s'avère beaucoup plus important que celui déterminé à l'aide du modèle DEBtox aux données de croissance et de reproduction, et qui sera étudié plus en détails dans la partie C.

Les travaux de **Zeman (2008)** confortent notre hypothèse d'une inhibition de l'assimilation par l'uranium chez *D. magna*. En effet, les observations de microscopie optique montrent des dommages dans la structure de l'épithélium intestinal de daphnies exposées. Les dommages observés sont une réduction du nombre de cellules de la paroi intestinale et l'apparition de nombreuses vacuoles à  $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . En plus de ces effets, une désorganisation de la structure et la disparition des microvillosités sont observées à  $100 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , suggérant par conséquent que l'uranium affecte les processus d'assimilation par le biais d'altérations importantes de la structure du tube digestif de la daphnie en présence d'uranium.

La toxicité chimique de l'uranium est liée à sa nature de métal lourd. Il semble donc intéressant de comparer les effets observés sur les taux de nutrition avec ceux induits par d'autres métaux. Certains travaux suggèrent que seule l'ingestion de *D. magna* est affectée par une exposition aux métaux. **Bodar et al. (1988)** montrent que les taux d'ingestion sont réduits de 40% par rapport aux témoins après 14 jours d'exposition au cadmium, alors que les effets sur l'assimilation sont minimes. Ces auteurs concluent que les processus de digestion et d'absorption de la nourriture par les cellules de l'épithélium intestinal ne sont pas affectés après l'exposition au cadmium ( $1$  et  $5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ ). L'étude de **Gulati et al. (1988)** contredit les résultats de **Bodar et al. (1988)**. En effet, ces auteurs étudient les effets à court terme d'une exposition au cadmium sur les taux d'assimilation de communautés zooplanctoniques. Il ressort de cette étude d'importantes diminutions des taux d'assimilation et des efficacités d'assimilation, après 48 heures d'exposition au cadmium, chez le genre *Daphnia* suggérant que l'absorption de nourriture digérée pourrait être inhibée par l'action du cadmium sur l'épithélium de la paroi du tube digestif. Ces résultats complémentaires à l'étude de **Bodar et al. (1988)**, s'expliqueraient par l'utilisation d'une gamme de concentration en cadmium beaucoup plus élevée, variant de  $10$  à  $100 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ .

L'étude de **Gulati et al. (1988)** suggère qu'une perturbation de l'activité des enzymes digestives est en cause dans l'inhibition de l'assimilation par le cadmium. De plus, il a été mis en évidence que les activités de la trypsine, de l'estérase et de la  $\beta$ -galactosidase, trois

enzymes participant respectivement à la digestion des protéines, des lipides et des carbohydrates, sont inhibées chez *D. magna* exposée sur de courtes périodes (50 min à 6 heures) à des concentrations en cadmium de 0.28 à 2.56 mg.L<sup>-1</sup> (De Coen et Janssen, 1998). A de plus faibles concentrations d'exposition (0.8 à 570 µgCd.L<sup>-1</sup>), les activités de la β-galactosidase et la trypsine, sont réduites pour des temps d'exposition de 48 heures (De Coen et Janssen, 1997). De telles mesures n'ont pas été réalisées dans notre étude, il serait intéressant d'examiner si une perturbation des activités des enzymes serait en cause dans l'effet de l'uranium sur l'ensemble du processus digestif nécessaire à l'acquisition d'énergie.

L'ensemble de ces effets (altérations importantes de la structure de la paroi du tube digestif et inhibitions potentielles des activités enzymatiques) pourraient expliquer les réductions des taux d'assimilation mesurées par méthode radiotraçante.

### 2.8.3.2. Toxicité de l'uranium pour la maintenance

Les perturbations de la nutrition observées dans nos expériences n'excluent pas la possibilité que l'uranium, puisse aussi induire une augmentation des coûts de maintenance. Néanmoins, nos mesures montrent que les taux de consommation d'oxygène taille-spécifique ne sont pas significativement altérés par l'exposition à l'uranium par rapport aux conditions témoins, suggérant par conséquent que la croissance des daphnies est principalement affectée par des réductions d'activité de nutrition.

De la même manière, Baillieul *et al.* (2005) montrent, chez *D. magna* exposées à différentes concentrations de nourriture ou de cadmium, que l'énergie réellement disponible pour la croissance et la reproduction, estimée au travers du Scope For Growth, est principalement déterminée par l'énergie assimilée, tandis que la respiration montre peu de différences entre les conditions testées. De façon plus générale, d'autres études montrent que la présence d'un stress affecte beaucoup plus les processus d'acquisition d'énergie que la consommation d'énergie (e.g. *Gammarus pulex* exposés au zinc, au 3,4-dichloroaniline et à deux gaz dissous, oxygène et ammoniac: Maltby *et al.*, 1990 ; *Daphnia magna* exposées au cadmium et au 3,4-dichloroaniline: Baird *et al.*, 1990; Barber *et al.*, 1990 ; *Dreissena polymorpha* exposées à des variations de quantité et qualité de la nourriture et à un gradient de pollution d'un ruisseau fortement impacté par les eaux usées de ville: Schneider *et al.*, 1998 ; Smolders *et al.*, 2002).

### 2.8.3.3. Conséquences des perturbations du budget énergétique

L'exposition à l'uranium réduit significativement l'assimilation du carbone de la nourriture. Parallèlement, nos résultats expérimentaux mettent en évidence des réductions de la croissance somatique pour toutes les conditions d'exposition indépendamment de la génération considérée. Des effets significatifs sur la reproduction sont aussi observés soit en terme de réduction de la fécondité, ou de réduction de la masse investie dans les œufs ou encore d'augmentation dans le temps de libération des néonates.

Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui montrent que l'exposition à des contaminants affectent les activités de nutrition en réduisant la proportion d'énergie allouée à la croissance et à la reproduction (**Baird et al., 1990 ; Knops et al., 2001 ; Barata et al., 2004 ; Reynaldi et al., 2006**). Ces résultats sont aussi en accord avec les prédictions des théories de production nette et DEB (**Nisbet et al., 2000 ; Kooijman, 2000**), dans le cas d'une acquisition d'énergie réduite, due à une ressource nutritive faible ou à une exposition à un contaminant. Une stratégie mise en place sous l'effet d'une faible disponibilité de la nourriture, et qui pourrait expliquer nos résultats, repose sur la réallocation des ressources énergétiques de manière à favoriser la survie des daphnies au détriment de la reproduction (**Smolders et al., 2005**).

### 2.8.4. Effets d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium chez *D. magna*

L'examen de la toxicité de l'uranium sur trois générations successives de *D. magna* met en évidence une augmentation de la sévérité des effets sur la survie, la nutrition, la croissance somatique et la reproduction au travers des générations exposées.

#### 2.8.4.1. Effets d'une exposition multigénérationnelle sur la survie

Concernant la survie, les résultats ont montré une forte mortalité des individus dans la deuxième génération exposée à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$ .

**Sánchez et al. (2000)** a montré de la même manière que la mortalité était beaucoup plus importante dans la deuxième génération exposée à des concentrations en diazinon sur 21 jours d'exposition, en comparaison à la génération parentale, suggérant que les descendants étaient beaucoup plus sensibles que les parents à cet insecticide organophosphoré. Plusieurs auteurs (**Allan et Daniels, 1982 ; Ingersoll et Winner, 1982**) ont suggéré que la survie était

un critère moins variable que la reproduction dans les tests de toxicité chronique et par conséquent un bon indicateur de la toxicité.

#### 2.8.4.2. Effets d'une exposition multigénérationnelle sur la croissance

Les résultats de nos expériences montrent des réductions de taille avec l'augmentation des concentrations d'exposition et au travers des générations exposées.

**Münzinger (1990)** montre une réduction de la taille des daphnies au travers de 7 générations successives exposées à des concentrations  $\geq 80 \mu\text{g.L}^{-1}$  de nickel. **Pane et al. (2004)** exposent une génération parentale à des concentrations croissantes de nickel et les résultats montrent que la croissance somatique des descendants est réduite de 20% par rapport à la condition témoin. Les auteurs soulignent l'importance de conduire des expérimentations sur plusieurs générations pour évaluer la toxicité des métaux. **Sánchez et al. (2000)** montrent des réductions significatives de la taille moyenne à 21 jours des daphnies de la génération parentale et de la génération de descendants exposées au diazinon.

#### 2.8.4.3. Effets d'une exposition multigénérationnelle sur la reproduction

Concernant la reproduction, nous avons mis en évidence des retards dans la libération des pontes, des réductions significatives du nombre de néonates produits par femelle et des réductions de la masse investie dans les œufs avec les concentrations en uranium et au travers des générations.

**Sánchez et al. (2004)** montrent un retard dans la libération de la première ponte de la deuxième génération exposée à des concentrations croissantes en molinate. **Alonzo et al. (2008a)** observent que l'exposition à l' $^{241}\text{Am}$ , à un débit de dose de  $15 \text{ mGy.hr}^{-1}$ , retarde le début de la reproduction de 3 jours dans les deuxième et troisième générations exposées, chez *D. magna*. **Cleuvers et al. (1997)** suggèrent que le retard de reproduction serait une stratégie assurant la naissance de la descendance une fois les mauvaises conditions environnementales passées. Une autre hypothèse pouvant expliquer les retards de ponte serait que plus de temps est nécessaire pour fabriquer des œufs de taille plus importante présentant une meilleure capacité à survivre dans des conditions de stress (**Ebert, 1993**). Une dernière explication, plus plausible dans notre cas, est que les daphnies ont besoin d'atteindre une taille minimale pour commencer la reproduction (**McCauley et al., 1990 ; Ebert, 1992**). Par conséquent, tout retard de croissance des juvéniles, dû à une limitation de la nourriture, à un stress toxique ou

encore à des œufs de masse plus petit induit un retard de maturation de la descendance et de la première reproduction (**Porter et al., 1983 ; Ebert, 1991 ; Reynaldi et al., 2006**). D'autres études ont rapporté une augmentation de l'âge de la reproduction chez *D. magna* exposée sur de courtes périodes à un insecticide, le fenvalerate (**Reynaldi et Liess, 2005, Pieters et al., 2005 ; Reynaldi et al., 2006**), comme chez d'autres espèces telles que *Gammarus pulex* (**Cold et Forbes, 2004**) ou encore chez un insecte, *Limnephilus lunatus* (**Liess et Schulz, 1996**).

Les réductions de fécondité, s'intensifiant avec les concentrations en uranium et au travers des générations, sont en accord avec l'observation d'une reproduction réduite dans la seconde génération de daphnies exposée à un effluent industriel, contenant des niveaux élevés de chlorure et cadmium (**Bervoets et al., 1996**), à un pesticide comme le molinate (**Sánchez et al., 2004**), à un insecticide tel que le tétradifon (**Villaroel et al., 2000**) ou encore à un xénobiotique estrogénique (**Baldwin et al., 1995**). Mais d'autres études examinant la toxicité de métaux indiquent des résultats différents. Par exemple, **Bossuyt et Janssen (2003)** montrent que l'acclimatation à de faibles niveaux de cuivre n'a pas d'effet sur la reproduction et le taux de croissance intrinsèque de *D. magna*. Dans les expériences de **Tsui et Wang (2005)**, l'exposition maternelle de daphnies au mercure confère un niveau de tolérance aux concentrations aiguës dans la descendance sans modifier les performances reproductives.

#### 2.8.4.4. Affaiblissement de la progéniture lors d'une exposition multigénérationnelle

Les deuxième et troisième générations de daphnies exposées à l'uranium montrent donc une plus grande sensibilité aux effets létaux et sub-létaux suggérant un affaiblissement de la descendance au travers des générations exposées. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait que les individus sont exposés à l'uranium dès leur développement dans la poche incubatrice des mères.

Cet affaiblissement pourrait aussi être à rapprocher de la réduction de la masse des œufs induite par l'uranium, comme conséquence de la plus petite taille des mères. D'autres études montrent qu'en condition de faibles ressources nutritives, bien qu'une diminution du nombre de descendants produits par daphnie ait lieu, l'investissement par descendant augmente (**Bradley et al., 1991 ; Sibly et Calow, 1985**). Cette stratégie de réduire la taille des pontes et d'augmenter la masse des œufs, dans des milieux où la ressource nutritive est faible ou bien lorsque la densité d'individus est élevée, augmente la probabilité de survie des

néonates (**Gliwicz et Guisande, 1992 ; Guisande, 1993 ; Cleuvers *et al.*, 1997 ; Tessier *et al.*, 1983 ; Tessier et Consolatti 1989 ; Burns 1995**). Une telle stratégie n'est pas mise en place dans le cas d'une réduction de l'assimilation induite par l'exposition à l'uranium.

Nos résultats montrent l'absence de développement de phénomènes d'adaptation ou de tolérance, mais une augmentation de la toxicité de l'uranium sur trois générations. De la même manière, **Pane *et al.* (2004)**, montrent une augmentation de la sensibilité de *D. magna* après une exposition au nickel. D'autres études révèlent l'apparition de tolérance après exposition sur plusieurs générations au cadmium (**LeBlanc, 1982 ; Bodar *et al.*, 1990 ; Guan et Wang, 2006 ; Muysen et Janssen, 2004**), au cuivre (**LeBlanc, 1982 ; Bossuyt et Janssen, 2003**), au mercure (**Tsui et wang, 2005**) et à différents pesticides tels que le fenoxycarb, le tetradifon et le molinate (**Hosmer *et al.*, 1998 ; Sánchez *et al.*, 1999 ; Villarroel *et al.*, 2000 ; Sánchez *et al.*, 2004**). Ces développements de tolérance se traduisent par une meilleure survie en réponse à des concentrations aiguës de contaminants, ou une plus forte longévité, ou encore une augmentation de la fécondité au travers des générations exposées. L'étude de **Guan et Wang (2006)** révèle une réponse biphasique à la tolérance au cadmium où *D. magna* augmente ses performances reproductives à un niveau maximal jusqu'à la 4<sup>ème</sup> génération. Par la suite, le développement de cette tolérance n'est pas maintenu et les animaux deviennent plus sensibles dans les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> générations. Notre exposition multigénérationnelle s'est déroulée au maximum sur trois générations. Il serait intéressant d'étudier si les daphnies sont capables de s'adapter à l'uranium sur un plus long terme et à partir de combien de générations le développement d'une tolérance serait observée.

Dans nos expériences, l'absence de production de métallothionéines, capables de séquestrer l'uranium, pourrait expliquer l'affaiblissement des daphnies. En effet, **Tsui et wang (2005)** montrent que des daphnies pré-exposées à des concentrations sub-létales de mercure seraient significativement plus tolérantes à la toxicité aiguë du mercure que des daphnies contrôles. Et, cette augmentation de la tolérance serait attribuable à une proportion plus élevée de mercure piégé par des métallothionéines. Toutefois, l'état actuel de nos connaissances ne nous permet pas d'étayer cette hypothèse.

### 2.8.5. Effets d'un transfert en milieu non contaminé après exposition à l'uranium

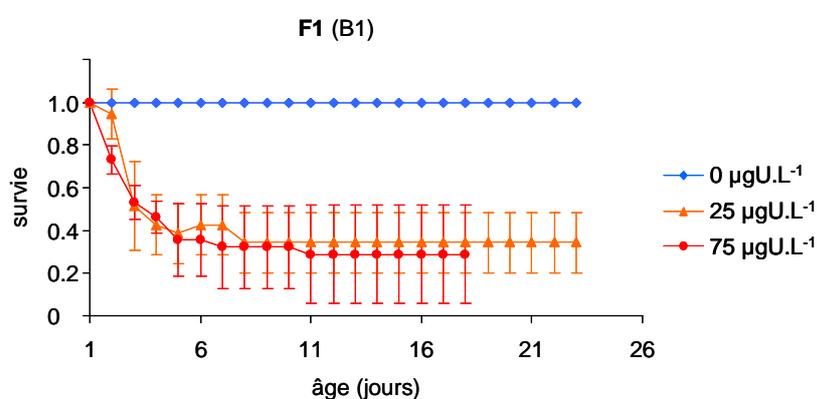
Dans l'environnement, les conditions d'exposition à des contaminants sont susceptibles de changer. Il a donc été intéressant d'examiner la capacité des organismes à se rétablir après une exposition à l'uranium. Notre étude a montré que la progéniture replacée dans un milieu non contaminé après une exposition parentale de 23 jours à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  ne survit pas, suggérant que les effets sont irréversibles à cette concentration. Une amélioration de la survie et la reproduction n'est observée dans la descendance replacée en milieu propre (en comparaison à celle exposée à la même concentration que les parents) qu'après une exposition parentale à des concentrations inférieures ou égales à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . **Sánchez et al. (1999)** montrent que la descendance issue de parents exposés au diazinon, transférée en milieu non contaminé présente une fécondité plus élevée que leur mère exposée à ce pesticide.

Dans nos expériences, les daphnies qui retournent en milieu propre après une exposition parentale à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant 23 jours montrent, à taille égale, une masse plus importante que les témoins. Ce phénomène est difficile à interpréter mais suggère la mise en place d'un processus, tel qu'un stockage d'énergie supplémentaire pour compenser les effets de la toxicité de l'uranium. Ce stockage supplémentaire perdurerait dans la descendance, malgré le retour en milieu non contaminé.

## **Chapitre 4. Etude de la sensibilité à l'uranium de daphnies issues d'une ponte B1**

L'évaluation de la toxicité de l'uranium dans le cas d'une exposition multigénérationnelle a été réalisée sur des individus issus de 5<sup>ème</sup> ponte (B5). Or dans l'environnement, toutes les pontes sont susceptibles d'être exposées à l'uranium. La sensibilité de la première ponte (B1) est rarement examinée bien que les néonates, de masse plus faible, sont potentiellement plus sensibles à une exposition à l'uranium. L'objectif de cette expérimentation est d'examiner (1) si la sensibilité d'individus issus de ponte B1 exposés à l'uranium est différente d'individus issus de ponte B5, et (2) si la toxicité de l'uranium diffère au travers des générations commencées avec des individus de ponte B5.

### 3.1. Survie

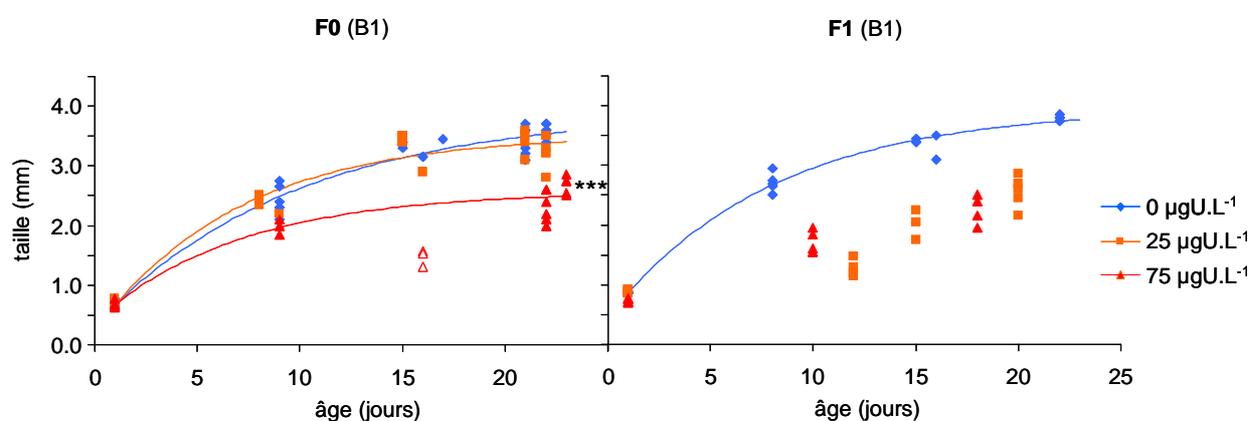


**Figure 28 :** *survie des daphnies de la génération F1(B1), commencée avec des néonates issus de la ponte B1 des individus de la génération F0(B1) exposées à 0, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> (n =3, avec 10 individus par réplicat)*

Les résultats montrent que la survie de la génération F0 débutée avec des néonates issus d'une ponte B1 n'est pas affectée par l'exposition à 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>. En revanche, la survie de la génération F1 est fortement affectée par l'uranium (Figure 28). La mortalité observée est de 82% après 18 jours à 75 µgU.L<sup>-1</sup> et de 77% après 23 jours à 25 µgU.L<sup>-1</sup>.

### 3.2. Croissance somatique en taille

L'exposition à l'uranium induit une réduction de la croissance des daphnies avec la concentration d'uranium et au travers des générations (Figure 29 et Tableau 10). Une réduction significative de 34% de la taille maximale est observée à 75 µgU.L<sup>-1</sup> dans F0. Les résultats montrent que la taille est beaucoup plus affectée chez les individus de la génération F1 exposés dans les mêmes conditions que leurs parents. Les mesures ne permettent pas de réaliser des ajustements selon l'équation de Von Bertalanffy, sous R. Les tailles moyennes sont de 2.5 ± 0.3 mm après 20 jours à 25 µgU.L<sup>-1</sup> et de 2.2 ± 0.3 mm après 18 jours à 75 µgU.L<sup>-1</sup>.

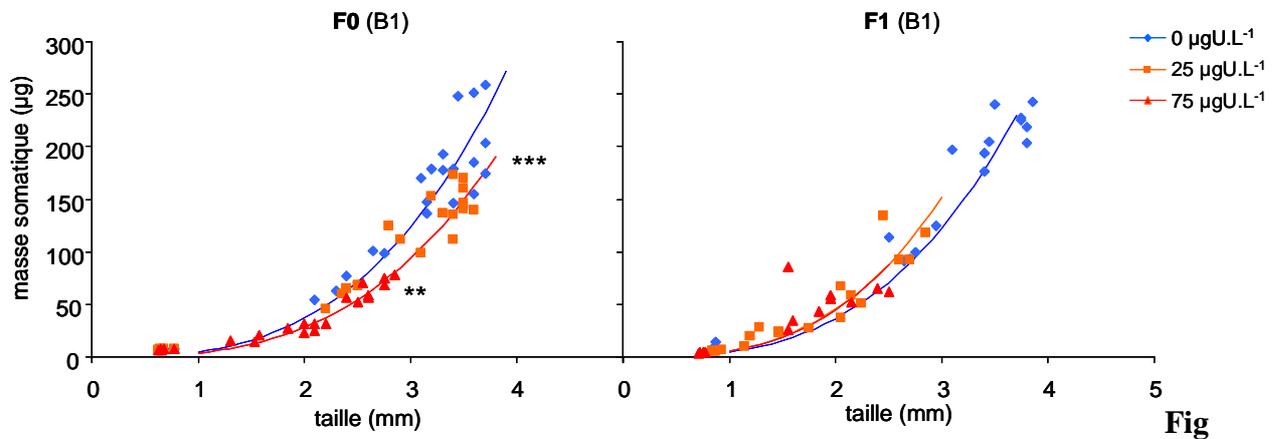


**Figure 29 :** taille (mm) des daphnies en fonction de l'âge dans deux générations successives, F0(B1) et F1(B1), débutées avec des néonates issus d'une ponte B1, et exposées à 0, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> ( $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Génération	[U] µgU.L <sup>-1</sup>	Taille				Masse sèche		Masse sèche des œufs		
		$L_b$ mm	$L_{max}$ mm	$\gamma$ j <sup>-1</sup>	$p$	$\delta$ µg.mm <sup>-3</sup>	$p$	$\beta$ µg.mm <sup>-1</sup>	$\omega$ µg	$p$
F0(B1)	0	0.67	3.92	0.10		4.57		3.44	-3.16	
	25	0.67	3.53	0.14		3.86	***	1.64	1.54	**
	75	0.68	2.58	0.14	***	3.48	**	-0.44	5.42	***
F1(B1)	0	0.87	3.97	0.12		4.53		3.42	-3.13	
	25		échec <sup>†</sup>			5.63		3.76	-3.47	
	75		échec <sup>†</sup>			5.58		3.80	-4.19	

**Tableau 10.** paramètres de croissance (taille et masse sèche) et masse sèche des œufs estimés pour les différentes conditions d'exposition (0, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>) pour les deux générations successives commencées avec des néonates B1 (F0(B1) et F1(B1)) (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). <sup>†</sup> Echec de l'ajustement avec le modèle *gnls* sous R.

### 3.3. Croissance somatique en masse

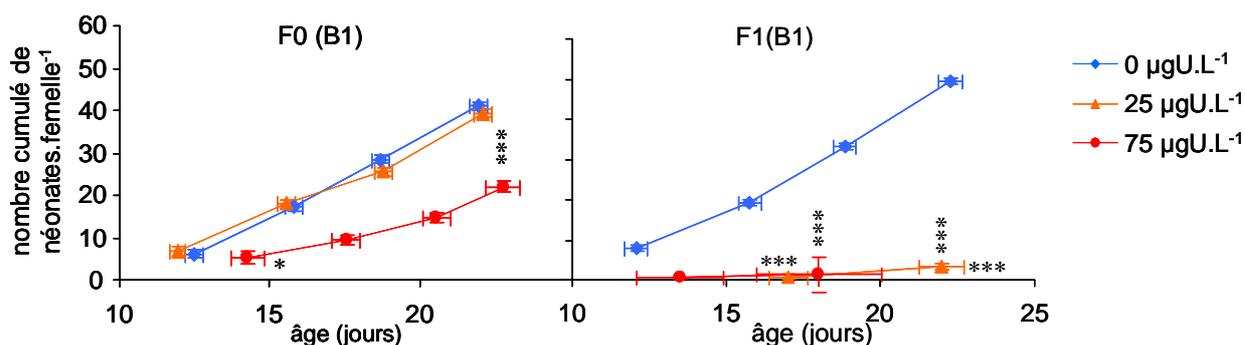


**Figure 30 :** masse somatique ( $\mu\text{g}$ ) des daphnies en fonction de la taille (mm) dans deux générations successives, débutées avec des néonates issus d'une ponte B1, et exposées à 0, 25 et 75  $\mu\text{g U L}^{-1}$  (F0(B1) et F1(B1);  $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ ))

Les ajustements de masse en fonction de la taille des individus montrent des réductions significatives de la masse volumique dans la première génération (F0) exposée à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  par rapport aux témoins, reflétant un effet direct de l'uranium sur la masse somatique (Figure 30 et Tableau 10). Dans la génération F1, les ajustements ne révèlent pas de différence significative. Les réductions de masse observées à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  par rapport aux témoins sont principalement le résultat d'une réduction de la taille induite par l'uranium.

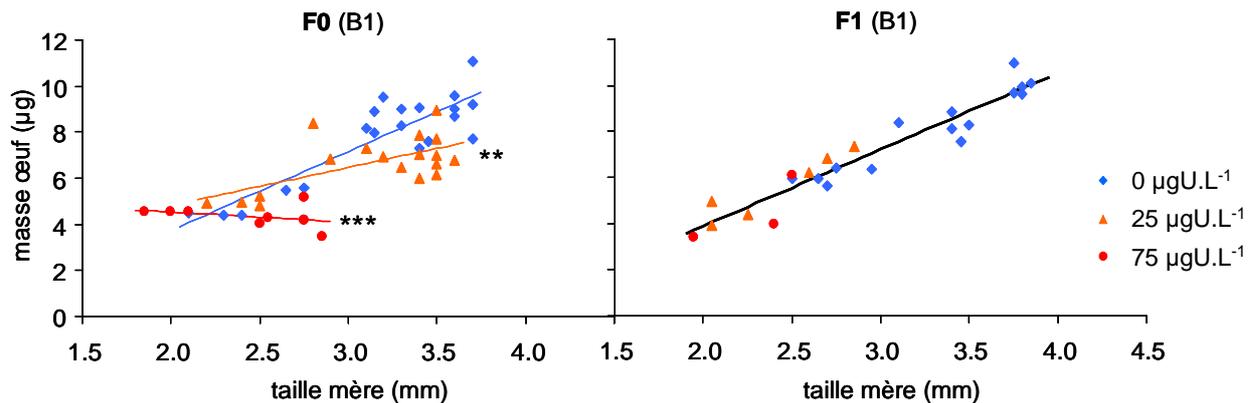
### 3.4. Reproduction

Dans les générations F0 et F1 débutées avec des néonates issus de ponte B1, l'exposition à l'uranium induit des retards de ponte, des réductions de fécondité et des réductions dans la masse investie dans les œufs.



**Figure 31** : nombre cumulé de néonates produits par daphnie sur les 4 premières pontes en fonction de l'âge dans 2 générations successives, débutées avec des néonates issus d'une ponte B1, et exposées à 0, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> (F0(B1) et F1(B1)) ; n = 3, avec 10 individus par réplicat, \*\*\* p < 0.001 ; \*\* p < 0.01 et \* p < 0.05, astérisque horizontal dans le cas d'une différence significative du temps de libération des néonates par rapport aux témoins, astérisque vertical pour une différence significative de fécondité par rapport aux témoins)

Dans F0, la reproduction ne montre aucun retard ni aucune réduction de fécondité à 25 µgU.L<sup>-1</sup> (Figure 31). A 75 µgU.L<sup>-1</sup>, un retard de reproduction d'environ 1.8 jours est observé par rapport à la condition témoin pour les 3 premières pontes. Ce retard est néanmoins quasiment rattrapé à la production de la 4<sup>ème</sup> ponte. Une forte réduction de la fécondité, de plus de 45%, est mise en évidence à partir de la deuxième ponte. La fécondité des individus appartenant à la génération F1 est très fortement affectée par l'uranium. En effet, les daphnies exposées ne se reproduisent quasiment plus, le nombre maximal de néonates produits atteignant 5 néonates par femelle après 22 jours à 25 µgU.L<sup>-1</sup> et après 18 jours à 75 µgU.L<sup>-1</sup> (contre 50 néonates par femelle chez les individus non exposés).

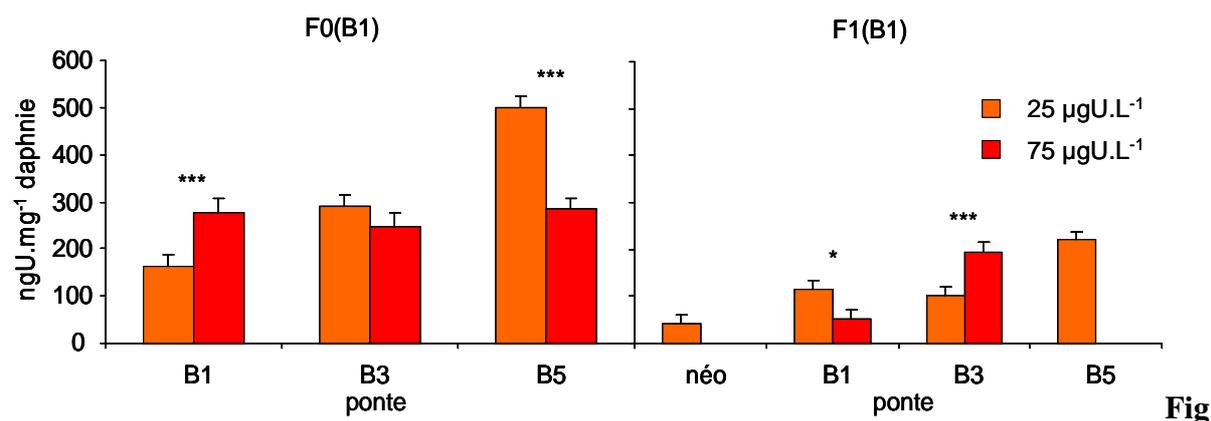


**Figure 32 :** masse sèche d'un œuf en fonction de la longueur des daphnies dans 2 générations successives, débutées avec des néonates issus d'une première ponte, et exposées à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (F0(B1) et F1(B1));  $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Dans la génération F0, les ajustements de la masse sèche investie par œuf en fonction de la taille des mères montrent des différences significatives entre les daphnies témoins et exposées (Figure 32 et Tableau 10). Les réductions de masse sèche des œufs observées à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  ne sont donc pas uniquement dues à la réduction de la taille des mères, mais sont aussi la conséquence d'un effet direct de l'uranium. En revanche dans F1, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les ajustements, la réduction de la taille des mères expliquant à elle seule la masse plus faible investie dans les œufs en présence d'uranium.

### 3.5. Bioaccumulation et débits de dose

Le modèle biocinétique requiert des valeurs de paramètres de croissance ( $L_b$ ,  $L_{max}$  et  $\gamma$ ). Compte tenu du fait que les ajustements de la taille n'ont pas pu être réalisés avec le logiciel R sur les données de la génération F1, nous avons choisi de présenter les résultats de bioaccumulation (en  $\text{ngU.mg}^{-1}$  daphnie) sous la forme d'histogramme (Figure 33).



**Figure 33 :** bioaccumulation de l'uranium dans le corps des daphnies ( $\text{ngU.daphnie}^{-1}$ ) à différents âges (au moment de la libération des pontes B1, B3 et B5, au stade néonate) dans les générations F0(B1) et F1(B1) débutées avec des néonates issus de première ponte, et exposées à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ;  $n = 5$ , barre d'erreur = SE, \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Dans la génération F0, les concentrations en uranium mesurées dans le corps des daphnies augmentent avec l'âge. Des concentrations maximales de  $500 \pm 23$  et  $284 \pm 90$   $\text{ng U.mg}^{-1}$  de daphnie, sont ainsi observées après 23 jours d'exposition à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , respectivement. Il est à noter que les valeurs de bioaccumulation mesurées sont presque 3 fois plus élevées aux pontes B3 et B5 que dans l'expérience précédente commencée avec des néonates issus d'une ponte 5. Dans la génération F1 exposée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , les concentrations en uranium mesurées ( $221 \pm 41$   $\text{ngU.mg}^{-1}$  de daphnie) sont plus de 50% plus faibles que celles rapportées dans la génération F0. Cette différence est liée à la taille beaucoup plus faible des daphnies de la génération F1 à cette concentration.

La conversion des valeurs moyennes de bioaccumulation, exprimées en  $\text{ngU.mg}^{-1}$  de poids frais de daphnie, aboutit à des valeurs de débits de dose à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , respectivement de 20.9 et 11.8  $\mu\text{Gy.hr}^{-1}$  dans la génération (F0) et de 9.2 et 8.1  $\mu\text{Gy.hr}^{-1}$  dans la génération F1.

### 3.6. Discussion

Les recommandations de l'OCDE (2004, 2008) sur les tests d'immobilisation immédiate et de reproduction de *Daphnia* sp. (Essais n° 202 et n° 211) pour étudier la toxicité de substances chimiques requièrent de faire les expérimentations avec des néonates issus au minimum de la troisième ponte. Notre étude confirme, avec des daphnies issues de ponte B1, que l'exposition à l'uranium affecte très fortement la survie, la croissance et la reproduction. Ces effets augmentent entre la première et la deuxième génération de manière beaucoup plus importante que chez des daphnies issues de ponte B5.

Ainsi, la survie dans la première génération n'est pas affectée par l'uranium quelle que soit la ponte (B1 ou B5) dont sont issues les daphnies. Les résultats obtenus dans la deuxième génération montrent que la survie des descendants issus d'une 1<sup>ère</sup> ponte est beaucoup plus sensible à l'uranium que celle des individus issus d'une 5<sup>ème</sup> ponte. Une forte mortalité des individus nés de B1 est ainsi observée dès les premiers jours d'exposition à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , alors qu'une forte mortalité des daphnies issues de B5 n'est visible qu'à la concentration de 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Peu d'études se sont intéressées à la sensibilité des individus issus de premières pontes. **Sánchez et al. (2000)** étudient les effets d'une exposition parentale au diazinon sur les descendants en fonction de la ponte dont ils sont issus. Les résultats montrent que les individus issus de la ponte B1 survivent plus longtemps à des concentrations de diazinon que les individus issus de la ponte B3. Une autre étude révèle que la survie de la descendance issue de pontes B1 et B3 exposée au molinate est plus élevée que celle de la génération parentale (**Sánchez et al., 2004**). D'après **Balwin et al. (1995)**, les organismes néonataux, issus d'une exposition parentale, seraient capables de développer une capacité à métaboliser les xénobiotiques, dans le cas d'une exposition à un estrogène. L'exposition à un pesticide entraînerait ce même mécanisme de défense. Ces résultats contrastent donc avec ceux obtenus lors de l'exposition à l'uranium.

Notre étude montre que la croissance somatique en taille des daphnies issues de ponte B1 est significativement réduite à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la première génération et dès 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la deuxième génération. De plus, les effets de l'uranium sur la croissance s'avèrent beaucoup plus sévères chez les individus issus de B1 que chez ceux issus de B5, aussi bien dans la génération F0 à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  que dans la génération F1 à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Le fait que les néonates B1 présentent une taille et une masse nettement plus petites à leur éclosion en

comparaison à des néonates B5 pourrait être en cause dans la différence de sensibilité. En comparant les  $CL_{50}$  à 48h, **Enserink *et al.* (1990)** montrent que des néonates de petite taille sont trois fois plus sensibles à une exposition au cadmium que ceux de taille plus grande. La détoxification implique des mécanismes coûteux en énergie. Dès lors, les auteurs considèrent que les individus de grande taille, dont les réserves énergétiques sont plus importantes, seraient plus aptes à faire face à un stress que les individus plus petits dotés d'un contenu énergétique plus faible. De la même manière, les individus nés d'œufs de petite masse, suite à l'exposition parentale à l' $^{241}\text{Am}$  ou à une irradiation gamma externe, survivaient moins longtemps à une période prolongée de jeûne, en comparaison aux témoins (**Alonzo *et al.*, 2006 ; Gilbin *et al.*, 2008**).

La reproduction suit la même tendance que la croissance somatique avec une réduction de fécondité observée à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la première génération et à 25 et  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la deuxième génération. L'intensité de l'effet confirme la plus forte sensibilité des daphnies issues de la ponte B1 par comparaison à celles issues de la ponte B5. L'exposition à l'uranium réduit significativement la masse investie dans les œufs, ce qui pourrait constituer un bon indicateur d'une forte réduction de la viabilité de la descendance, reflété dans la forte mortalité observée dans la génération suivante.

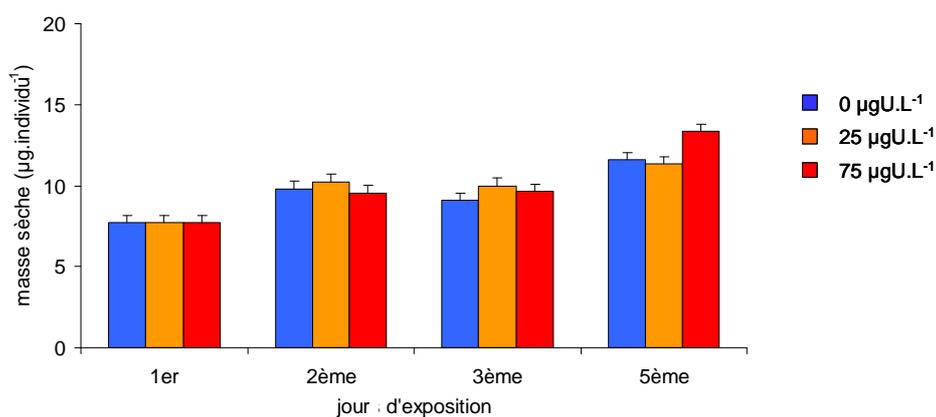
## Chapitre 4. Etude des conséquences d'une exposition à l'uranium au cours de l'embryogénèse

Les deux études multigénérationnelles précédentes ont montré, quel que soit le critère mesuré, une aggravation des effets de l'uranium au travers des générations. Les mesures de bioaccumulation dans les œufs fraîchement pondus ont montré des quantités en d'uranium inférieures aux limites de détection de l'ICP-MS suggérant l'absence d'un transfert maternel (Chapitre 2. Etude d'une exposition à l'uranium sur 3 générations successives). L'exposition des embryons pendant les 3 jours de développement dans la poche incubatrice des mères pourrait être en cause dans la différence de sensibilité entre les générations, et tout particulièrement dans la faiblesse relative des effets dans la génération F0, exposée à partir de l'éclosion des œufs. L'objectif de cette expérimentation est d'examiner (1) si l'exposition à l'uranium pendant la phase de développement des embryons entraîne des effets plus sévères par rapport à ceux observés chez des individus exposés à partir du stade néonate ; (2) si ces effets sont réversibles lorsque les individus sont transférés en milieu non contaminé au stade néonate et (3) si les effets de l'exposition embryonnaire expliquent à eux seuls la différence observée entre les générations F0 et F1 (résultats présentés dans le chapitre 2). Ce dernier point sera abordé en discussion en comparant les résultats de ces deux expériences.

Pour répondre à ces questions, les œufs sont exposés pendant leur développement embryonnaire dans la poche incubatrice des mères à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  et les néonates fraîchement éclos sont maintenus à la même concentration d'exposition ou replacés dans du milieu non contaminé. En parallèle, des individus sont exposés à partir du stade néonate aux mêmes concentrations d'exposition.

#### 4.1 Masse sèche des œufs au cours de l'instar B5

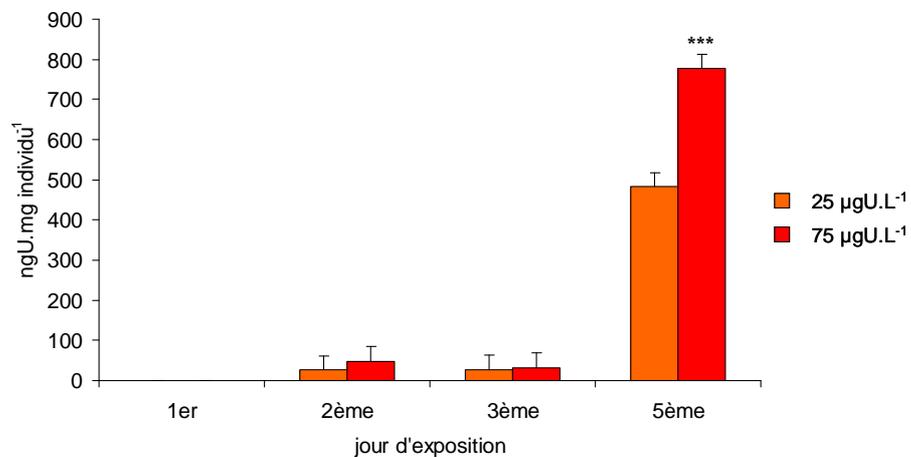
Le développement des embryons dans la poche incubatrice des mères, au cours de l'instar B5, a duré 4 jours (au lieu de 3 jours, théoriquement), quelle que soit la concentration d'exposition. Du fait d'un nombre d'individus limités, des prélèvements supplémentaires au 4<sup>ème</sup> jour d'exposition n'ont pas été possibles. La libération des néonates correspond au 5<sup>ème</sup> jour d'exposition.



**Figure 34** : suivi quotidien de la masse sèche des œufs ( $\mu\text{g}\cdot\text{individu}^{-1}$ ) de la ponte à l'éclosion et des néonates à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n = 5$ , barre d'erreur = SE, \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

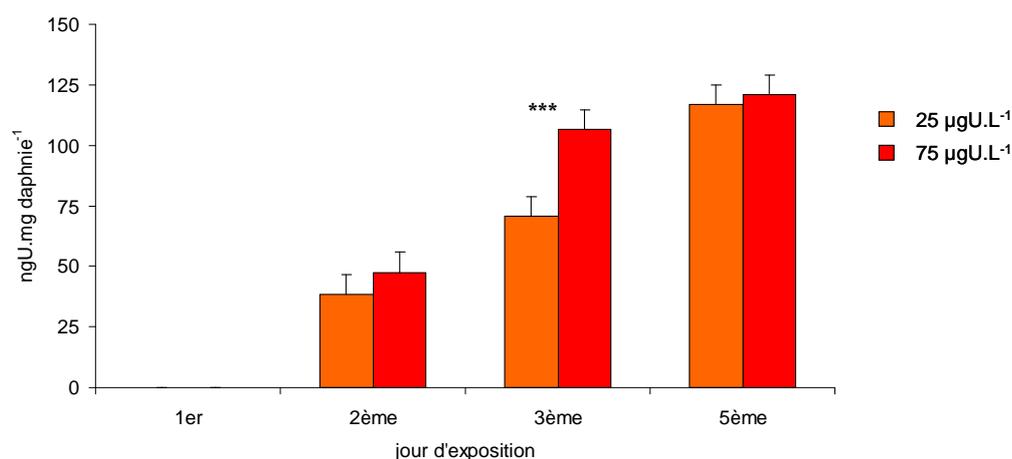
La masse sèche des œufs ne varie pas au cours de l'instar B5 (Figure 34). En revanche, lorsque les néonates éclosent et commencent à se nourrir, une augmentation de masse est observée, de 9.1, 10.0 et 9.6  $\mu\text{g}\cdot\text{oeuf}^{-1}$  à 11.6, 11.3 et 13.3  $\mu\text{g}\cdot\text{néonate}^{-1}$  respectivement à 0, 25 et 75  $\mu\text{g U L}^{-1}$ .

#### 4.2. Bioaccumulation d'uranium au cours de l'instar B5



**Figure 35 :** suivi quotidien de la bioaccumulation d'uranium dans les œufs (ngU.individu<sup>-1</sup>) de la ponte à l'éclosion des néonates à 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> (n = 5, barre d'erreur = SE, \*\*\* p < 0.001 ; \*\* p < 0.01 et \* p < 0.05)

Les mesures d'uranium aux 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jours d'exposition montrent une bioaccumulation faible dans les œufs contenus dans la poche incubatrice des mères exposées à 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>. En comparaison, les quantités d'uranium mesurées dans les néonates fraîchement éclos (5<sup>ème</sup> jour d'exposition) sont environ 18 fois plus grandes (Figure 35). De plus, elles diffèrent significativement entre les concentrations de 25 µgU.L<sup>-1</sup> et 75 µgU.L<sup>-1</sup>.

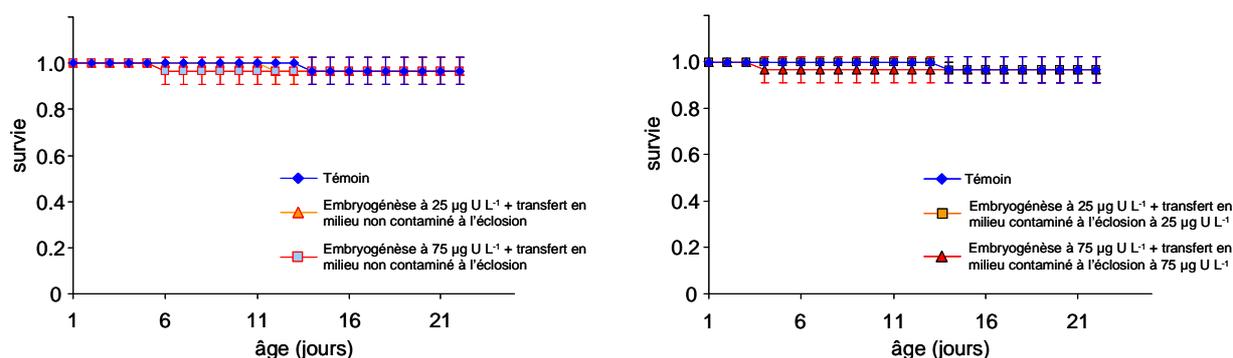


**Figure 36 :** suivi quotidien de la bioaccumulation d'uranium dans le corps des daphnies ( $\text{ngU.mg}^{-1}$  daphnie) exposées durant l'instar B5 à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  ( $n = 5$ , barre d'erreur = SE, \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Les concentrations d'uranium mesurées dans les daphnies exposées au cours de l'instar B5 augmentent avec le temps d'exposition (Figure 36). La différence entre les deux concentrations n'est significative qu'au 3<sup>ème</sup> jour d'exposition. Après 5 jours d'exposition, les valeurs moyennes avoisinent  $120 \text{ ngU.mg}^{-1}$  quelle que soit la concentration considérée (Figure 36). Il est intéressant de noter que les valeurs de bioaccumulation mesurées dans les daphnies sont, après seulement 5 jours d'exposition, du même ordre de grandeur que celles retrouvées après 13 jours d'exposition ( $100.3 \pm 23.4 \text{ ngU.mg}^{-1}$  de daphnie à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans la F0). Ces résultats suggèrent que les cinétiques de bioaccumulation de l'uranium sont rapides et principalement limitées par la croissance des individus lors d'une exposition débutant au stade néonate.

Les valeurs de bioaccumulation permettent de déterminer des débits de dose dans le corps des daphnies de  $15.9$  et de  $19.7 \mu\text{Gy.hr}^{-1}$  au 2<sup>ème</sup> jour d'exposition et de  $48.3$  et  $50.0 \mu\text{Gy.hr}^{-1}$  après 5 jours d'exposition aux concentrations d'uranium de  $25$  et  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , respectivement.

### 4.3. Conséquences pour la survie

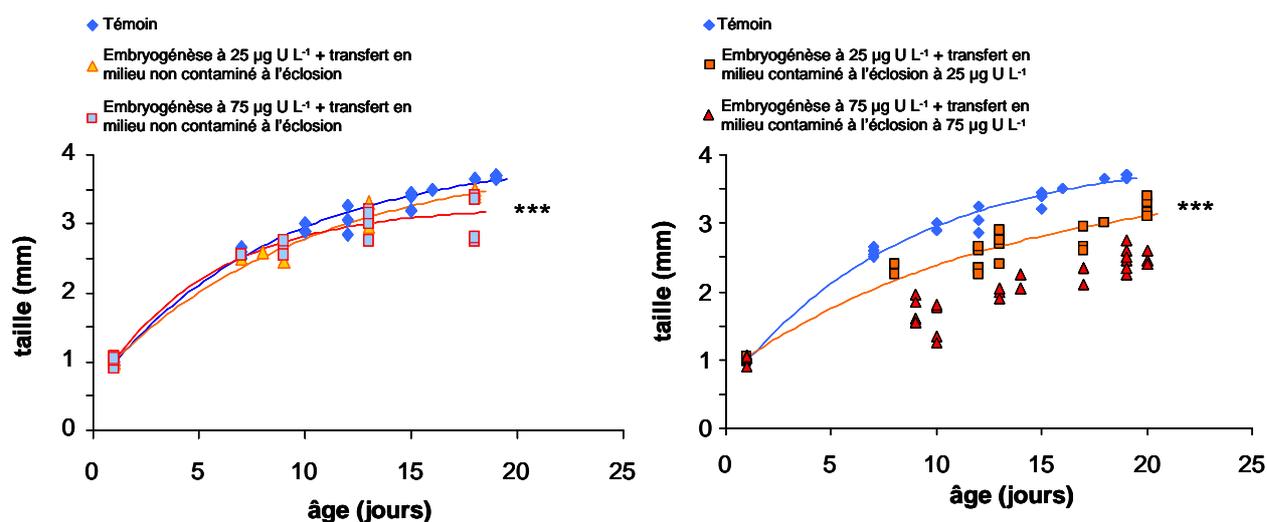


**Figure 37 :** *survie des daphnies après exposition pendant l'embryogénèse à 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> puis transfert en milieu non contaminé ou contaminé des néonates (n=3, avec 10 individus par réplikat)*

Une faible mortalité est observée chez les daphnies exposées pendant l'embryogénèse puis transférées en milieu non contaminé, avec une survie de 97% après 12 jours à 25 µgU.L<sup>-1</sup> et 97% après 6 jours à 75 µgU.L<sup>-1</sup> (Figure 37). La différence observée entre les traitements et le témoin n'est cependant pas significative. Des résultats similaires sont observés lorsque les néonates sont transférés après leur éclosion dans le même milieu d'exposition que leurs parents, suggérant que l'exposition à l'uranium pendant le développement embryonnaire n'a pas d'effet sur la survie des individus. Des résultats sur la survie comparables sont observés dans le cas d'une exposition à l'uranium à partir du stade néonate.

### 4.4. Conséquences pour la croissance somatique en taille

Les ajustements du modèle de Von Bertalanffy révèlent une réduction significative de taille pour les individus exposés à 75 µgU.L<sup>-1</sup> pendant le développement embryonnaire puis transférés en milieu non contaminé au moment de l'éclosion, avec une  $L_{max}$  réduite de 18% par rapport à la condition témoin (Figure 38 et Tableau 11).



**Figure 38 :** taille (mm) des daphnies en fonction de l'âge après exposition pendant l'embryogénèse à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  puis transfert en milieu non contaminé ou contaminé des néonates ( $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

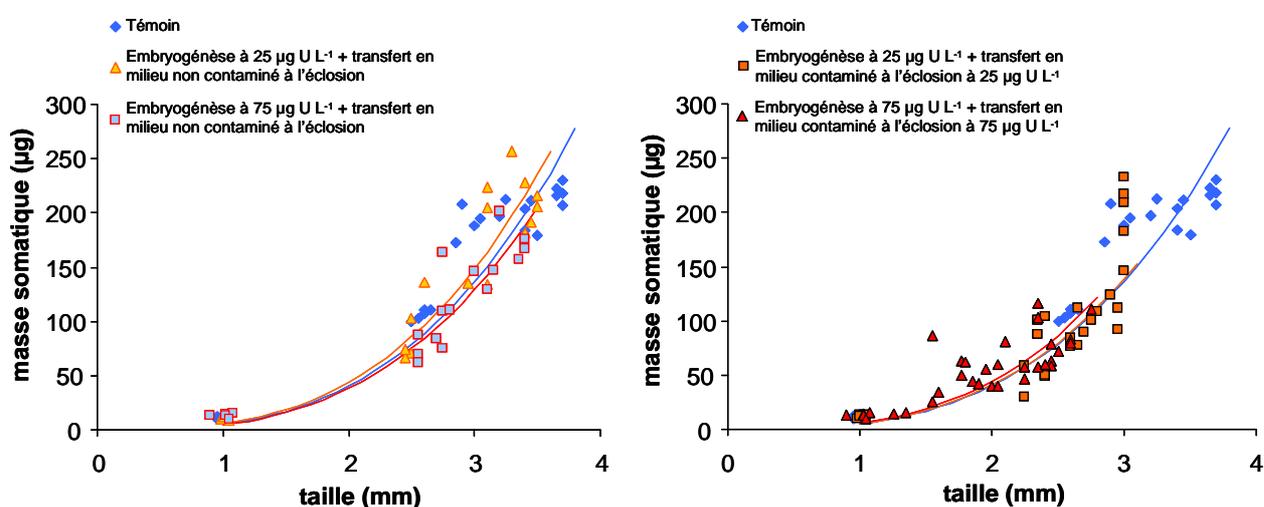
Condition	[U]	Taille				Masse sèche		Masse sèche des œufs		
	$\mu\text{gU.L}^{-1}$	$L_b$ mm	$L_{max}$ mm	$\gamma$ $\text{j}^{-1}$	$p$	$\delta$ $\mu\text{g.mm}^{-3}$	$p$	$\beta$ $\mu\text{g.mm}^{-1}$	$\omega$ $\mu\text{g}$	$p$
TEMOIN	0	0.97	3.98	0.12		5.06		3.76	-3.86	
Exposition pendant l'embryogénèse Transfert en milieu NON contaminé	25	1.02	3.98	0.10		5.50		3.32	-2.64	
	75	1.02	3.26	0.18	***	4.79		3.22	-2.07	
Exposition pendant l'embryogénèse Transfert en milieu contaminé	25	1.03	3.73	0.08	***	5.12		2.35	0.40	
	75		échec <sup>†</sup>			5.55		1.95	0.36	
NON Exposition pendant l'embryogénèse Transfert en milieu contaminé	25	0.97	3.49	0.16	***	4.26	**	3.76	-1.62	
	75	0.98	3.09	0.15	***	4.03	**	2.22	-0.04	

**Tableau 11 :** paramètres ajustés sur la croissance et la masse sèche des œufs pour les individus exposés ou non pendant l'embryogénèse à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  puis transfert en milieu non contaminé ou contaminé des néonates (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). <sup>†</sup> Echec de l'ajustement avec le modèle *gnls* sous R.

Dans le cas d'une exposition à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant et après l'embryogénèse, la taille est significative diminuée par rapport au témoin (Tableau 11). Vis-à-vis des individus exposés seulement depuis le stade néonate, la réduction de taille n'est pas significativement différente. Les données acquises sur les individus maintenus à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant et après l'embryogénèse ne permettent pas d'ajuster le modèle de Von Bertalanffy, mais une taille moyenne de  $2.48 \pm 0.09 \text{ mm}$  à 20 jours est mesurée. En comparaison aux individus exposés à partir de l'éclosion à la même concentration, la taille est réduite de 20% (Tableau 11).

#### 4.5. Conséquences pour la croissance en masse

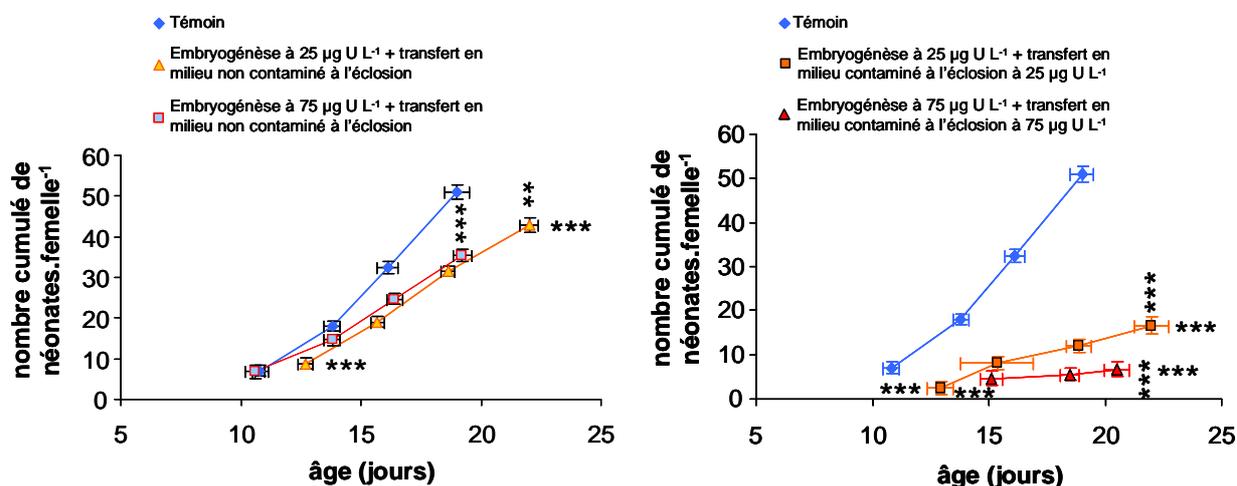
Chez les individus exposés pendant l'embryogénèse puis transférés en milieu contaminé ou en milieu propre, l'ajustement de la masse en fonction de la taille ne met en évidence aucune différence significative entre les conditions (Figure 39). Par conséquent, les réductions de masse somatique observées sont uniquement dues aux réductions de taille induites par l'uranium. Ces résultats contrastent vis-à-vis de ceux obtenus chez les individus exposés uniquement à partir de stade néonate à 25 et  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  où des différences significatives ont été mises en évidence (Tableau 11).



**Figure 39 :** masse somatique sèche individuelle ( $\mu\text{g}$ ) des daphnies en fonction de la taille après exposition pendant l'embryogénèse à 25 et  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  puis transfert en milieu non contaminé ou contaminé des néonates ( $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

#### 4.6. Conséquences pour la reproduction

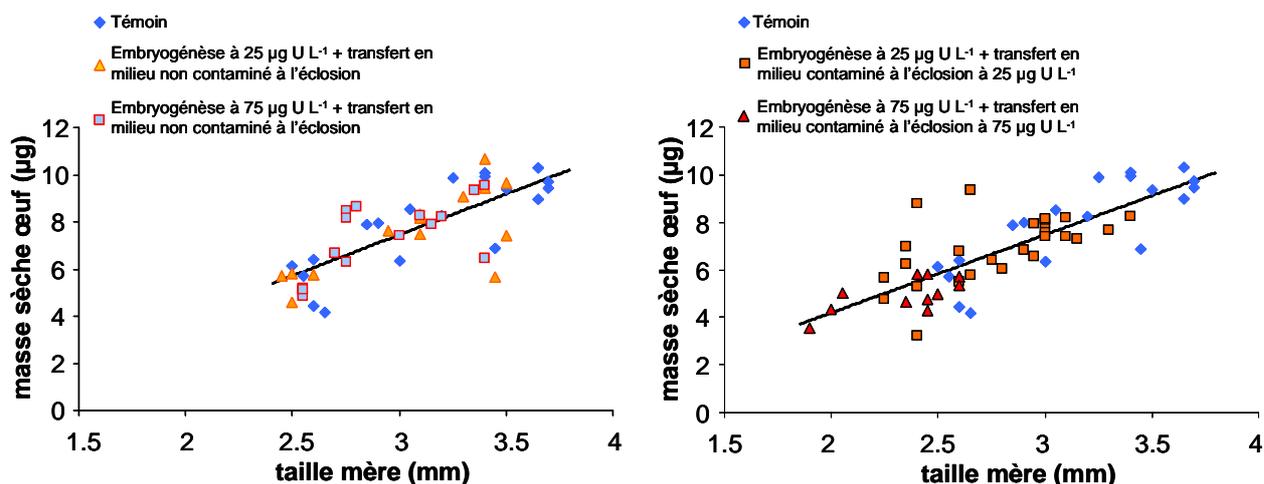
Le suivi de la fécondité jusqu'à la 4<sup>ème</sup> ponte aboutit à un nombre cumulé de 51 néonates par femelle en condition témoin. Sur une période de temps comparable (19 jours), des réductions de 30% du nombre de néonates produits sont observées pour les daphnies exposées pendant l'embryogénèse puis transférées en milieu non contaminé, à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Celle-ci résulte d'un retard de 1.9 à 2.8 jours (entre la première et la quatrième ponte) à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  et à une réduction de fécondité sans retard dans les pontes à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , par rapport à la condition témoin (Figure 40).



**Figure 40 :** nombre cumulé de néonates produits par daphnie sur les 4 premières pontes en fonction de l'âge ( $n = 3$ , avec 10 individus par réplicat) après exposition à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant l'embryogénèse puis maintien dans les mêmes conditions ou transfert en milieu non contaminé au moment de l'éclosion (\*\*\*)  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ , astérisque horizontal dans le cas d'une différence significative du temps de libération des néonates par rapport aux témoins, astérisque vertical pour une différence significative de fécondité par rapport aux témoins)

Chez les daphnies exposées pendant l'embryogénèse et maintenues dans les mêmes conditions après l'éclosion, la réduction du nombre de néonates produits sur 19 jours atteint 77% et 87% respectivement à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , par rapport aux daphnies contrôles. Ces réductions sont dues à une fécondité très affectée et à des retards de ponte de 2 à 3 jours à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  aux dépôts des pontes B1 et B4 et de plus de 4 jours à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  au dépôt de B1.

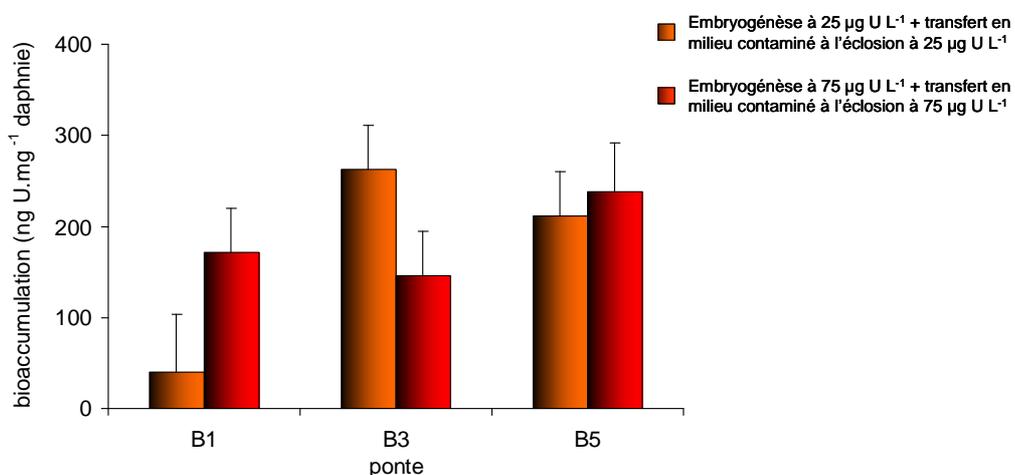
Ce type d'exposition a des effets beaucoup plus importants sur la fécondité en comparaison à une exposition à l'uranium débutée au stade néonate, pour laquelle, des réductions significatives de la fécondité de 54 et 60% sont observées à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , sans retard dans le dépôt des pontes.



**Figure 41 :** *masse sèche d'un œuf en fonction de la taille des daphnies (n = 5) après exposition à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  pendant l'embryogénèse puis maintien dans les mêmes conditions ou transfert en milieu non contaminé au moment de l'éclosion (\*\*\*)  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )*

Les résultats montrent que la masse investie dans les œufs augmente linéairement avec la taille des mères (Figure 41). Aucune différence significative entre les ajustements n'est observée quelle que soit la condition d'exposition. L'effet de l'uranium sur la masse des œufs est donc lié à la réduction de la taille des daphnies. Des résultats similaires sont obtenus dans le cas d'une exposition à l'uranium débutée au stade néonate (Tableau 11).

## 4.7. Bioaccumulation et débits de dose



**Figure 42 :** bioaccumulation en uranium dans le corps des daphnies ( $\text{ngU.mg}^{-1}$  daphnie), exposées pendant l'embryogénèse et maintenues à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  au moment des pontes B1, B3 et B5 (moyenne  $\pm$  ES,  $n = 5$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ )

Comme précédemment, nous avons choisi de présenter les résultats de bioaccumulation en  $\text{ngU.mg}^{-1}$  daphnie, sous la forme d'histogramme (Figure 42) puisque l'ajustement de la croissance de Von Bertalanffy a échoué pour certaines conditions d'exposition. Les quantités d'uranium mesurées dans le corps des daphnies augmentent avec l'âge et les concentrations d'exposition pour B1 et B5. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux conditions d'exposition. Des teneurs moyennes de 212 et 238  $\text{ngU.mg}^{-1}$  de daphnie, ont été mesurées après 20 jours d'exposition (pontage B5) 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Ces valeurs de bioaccumulation permettent de calculer des débits de doses moyens maximaux à 20 jours de 87,5 et 98,3  $\mu\text{Gy.hr}^{-1}$ , après exposition pendant l'embryogénèse et maintien à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , respectivement.

#### 4.8. Discussion

Les quantités d'uranium mesurées dans les œufs après 1 ou 2 jours d'exposition demeurent faibles. Ces résultats sont à rapprocher des observations de Zeman (2008) qui n'a montré aucune malformation des œufs disséqués et placés à  $0.4 \text{ mgU.L}^{-1}$ . Zeman (2008) suggère que la présence d'une membrane peu perméable enveloppant les œufs conférerait une protection pendant une grande partie de leur développement par rapport aux néonates. Les dosages en uranium dans les individus après 3 jours de développement dans la poche incubatrice des mères (embryons au stade E+2) exposées à 25 et  $75 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ , ont révélé la présence de quantités d'uranium de 27 et  $33 \text{ ngU.mg}^{-1}$  d'embryon, respectivement. Ces quantités représentent environ 30% des quantités d'uranium retrouvées dans le corps des mères au même temps de prélèvement. De la même manière, **Hall et al. (1982)** détectent la présence de nickel dans les œufs de mères de daphnies, exposées quelques heures à  $250 \text{ } \mu\text{gNi.L}^{-1}$ . Cette accumulation ou cette adsorption est due à des échanges entre la poche incubatrice des daphnies et le milieu extérieur, ce qui remet en cause l'idée que la poche incubatrice des daphnies puisse être indépendante des conditions externes (**Fox, 1948**). Les travaux de **Kobayashi et al. (1987)** montrent que l'oxygène doit être présent à des teneurs  $\geq 6 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$  dans la poche incubatrice pour assurer un taux élevé d'éclosion des œufs. Ces résultats impliquent que les daphnies échangent activement des fluides entre la poche incubatrice et le milieu environnant pour satisfaire la demande en oxygène des embryons. Par ce processus, les embryons peuvent être exposés à un certain nombre de contaminants dont l'uranium.

Chez les daphnies exposées à l'uranium pendant l'embryogénèse et transférées dans un milieu non contaminé, les résultats montrent une réduction de la taille pour les individus exposés à  $75 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$  et une diminution de la fécondité des individus ayant été exposés à 25 et  $75 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ . Ces effets sont en accord avec l'irréversibilité des effets dans F1 à la plus forte concentration mais contrastent avec la réversibilité observée à  $25 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$  (chapitre 2). La différence pourrait être liée au fait que la génération F0 était exposée dès l'ovogénèse, ce qui rend possible l'occurrence de processus compensatoires transférés aux descendants.

Cette expérience rend également possible une comparaison des effets de l'uranium entre des individus exposés depuis l'embryogénèse et des individus exposés au stade néonate. L'issue de cette comparaison doit permettre d'évaluer si l'aggravation des effets observés

entre F0 et F1 est uniquement due aux effets occasionnés pendant le développement embryonnaire des individus. Les résultats ont donc montré que le maintien des néonates à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  après l'exposition à l'uranium pendant l'embryogénèse entraîne une croissance somatique et une reproduction très fortement réduites aux deux concentrations. Ces effets sont en accord avec ceux mis en évidence dans la génération F1, au niveau de la croissance, tandis que la reproduction est beaucoup plus affectée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  qu'attendu d'après la génération F1 (chapitre 2). Ainsi, l'exposition pendant l'embryogénèse pourrait, au moins partiellement, expliquer l'aggravation des effets sur la croissance observée entre les générations F0 (exposée seulement à partir du stade néonate fraîchement éclos) et F1 (exposée pendant l'embryogénèse, lors de l'incubation des œufs de F0). Cependant, la différence observée au niveau de la reproduction suggère une influence chez les descendants de l'exposition subie pendant l'ovogénèse, l'embryogénèse et après l'éclosion des individus. Dans le cas du bromure de sodium et 3,4 dichloroaniline, **Baird et al. (1991)** démontrent que l'exposition d'embryons de *Daphnia magna* à ces deux toxiques pendant leur phase de développement dans la poche incubatrice entraîne une augmentation significative de la mortalité des juvéniles après transfert en milieu non contaminé.

L'exposition à l'uranium pendant le développement embryonnaire suivi d'un transfert des néonates en milieu propre ou contaminé n'affecte pas la survie. De ce point de vue, les daphnies présentent des caractéristiques plus proches des générations F0 que des générations F1 exposées à l'uranium. La mortalité des individus exposés s'accroît brutalement dans la deuxième génération (à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  chez des daphnies issues de ponte B5), l'augmentation des effets sur la survie ne pouvant donc pas être attribuée à l'exposition embryonnaire.

## CONCLUSIONS DE LA PARTIE B

### Effets de l'uranium sur l'individu

Les résultats expérimentaux ont mis en évidence que l'uranium affecte l'assimilation du carbone contenu dans la nourriture, chez *Daphnia magna*, avec de graves conséquences sur la croissance somatique et la reproduction.

De plus, les effets toxiques de l'uranium s'aggravent au travers des générations, quel que soit le numéro de ponte (B1 ou B5) utilisé pour commencer les générations. Des perturbations importantes de la croissance et des taux de nutrition sont visibles dès  $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  à partir de la deuxième génération exposée.

La progéniture présente une capacité à se restaurer dans un milieu non contaminé lorsque les individus sont issus de parents exposés à l'uranium à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , mais pas à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . Cette capacité pourrait toutefois être dépendante de processus compensatoires, intervenant au plus tard au cours de l'ovogénèse, assurant une meilleure capacité à faire face au stress toxique. Ces processus auraient pu faire défaut chez les individus exposés à partir de l'embryogénèse.

Les effets toxiques de l'uranium dans le cas d'une exposition pendant l'embryogénèse et après l'éclosion des néonates pourraient expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction observés entre la première et la deuxième génération. Néanmoins, la même conclusion ne peut être tirée concernant la survie, dont la réduction dans la deuxième génération ne semble pas résulter de l'exposition pendant l'embryogénèse.

La survie, la croissance et la reproduction des individus issus d'une 1<sup>ère</sup> ponte sont beaucoup plus sensibles à l'uranium que celles des individus issus d'une 5<sup>ème</sup> ponte. Ces effets sont particulièrement visibles sur la deuxième génération exposée.

L'ensemble de l'étude expérimentale menée au niveau de l'individu a montré l'intérêt crucial (i) d'étudier la toxicité des polluants tels que l'uranium au cours d'expositions

multigénérationnelles, *(ii)* d'identifier les stades critiques, tels que les embryons dans le cas de l'uranium, dont l'exposition entraîne des effets beaucoup plus sévères sur la croissance et la reproduction, mais pas sur la survie et *(iii)* d'identifier des cohortes plus sensibles à la toxicité, telles que les individus issus de première ponte dans le cas de l'uranium. Les conséquences de ces différents points au niveau de la population demeurent à examiner.

**PARTIE C. EFFETS DE L'URANIUM DE L'INDIVIDU  
A LA POPULATION**

**MODELISATION ET DISCUSSION**

## Chapitre 1. Application du DEBtox au cas de l'uranium

Pour étudier les modes d'action possibles de l'uranium sur *Daphnia magna*, les modèles DEBtox ont été appliqués aux données expérimentales des trois générations : F0, F1 et F2, commencées avec des néonates B5. Comme annoncé dans la synthèse bibliographique, les modèles DEBtox n'avaient jamais été appliqués au cas d'une exposition multigénérationnelle auparavant. En revanche, dans notre étude, l'approche DEBtox n'est pas appliquée aux jeux de données des générations commencées avec des néonates B1 car ils ont été seulement acquis à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , ce qui représente une gamme de concentration insuffisante pour paramétrer le modèle.

### 1.1. Choix des hypothèses

Dans le modèle DEBtox proposé par **Kooijman et Bedeaux (1996)**, une fois la concentration seuil dépassée (NEC), le niveau du stress toxique (b) est supposé être dépendant de la concentration interne. Néanmoins, certains cas ont mis en évidence que les effets de toxiques peuvent aussi bien être liés à la concentration externe qu'à la concentration interne. Dans la situation particulière où la fonction digestive est affectée, les effets peuvent ainsi apparaître aussitôt que les contaminants ont été ingérés. A l'issue de nos expérimentations, l'uranium s'est avéré fortement réduire le taux d'assimilation des daphnies. De plus, des observations par microscopie optique ont mis en évidence de graves dommages de la paroi du tube digestif des daphnies, en présence d'uranium. On peut donc s'attendre à une induction rapide des effets, dès le contact de l'épithélium intestinal avec l'uranium ingéré. L'ajustement du DEBtox aux données est, par conséquent, réalisé en considérant le modèle avec et sans module cinétique.

Sur la base de nos observations, seuls les modèles d'effets indirects sont valables car l'uranium s'avère fortement réduire la croissance somatique, en réduisant à la fois le taux de croissance de Von Bertalanffy et la taille maximale. Dans l'approche DEBtox, trois modes d'action sont proposés pour expliquer les effets sur la croissance avec effets indirects sur la reproduction. Parmi ces modes d'action, un effet de l'uranium sur les coûts énergétiques pour la croissance est peu probable car il prédit qu'une même taille maximale est atteinte quelle que soit la concentration d'exposition, ce qui n'a été observé dans aucune génération testée

lors de nos expérimentations. Les deux modes d'action conduisant à une taille maximale réduite sont liés, soit à l'augmentation des coûts pour la maintenance, soit à la réduction du taux d'assimilation. Dans ces modes d'action, l'effet sur la croissance et la reproduction est respectivement obtenu selon les équations 7 et 8 ou 3 et 4 du tableau 4 présenté dans la partie A § 4.2.2. (Billoir *et al.*, 2008). Le taux d'investissement d'énergie  $g$  est égal à 1 chez la daphnie en condition optimale. De plus, les daphnies étaient en conditions nutritives *ad libitum* lors des expérimentations, ce qui permet de fixer la réponse nutritive fonctionnelle  $f$  à 1.

## 1.2. Ajustements

Les équations ajustées sont donc :

Effet de l'uranium sur les coûts de maintenance	
Croissance	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma(1 - \ell(1 + \sigma(c)))$ (Eq. 7)
Reproduction	$R(\ell) = \frac{R_{\max}}{1 - \ell_p^3}(1 + \sigma(c)) \left( \ell^2 \frac{(1 + \sigma(c))^{-1} + \ell}{2} - \ell_p^3 \right)$ (Eq. 8)

Effet de l'uranium sur l'assimilation	
Croissance	$\frac{d\ell}{dt} = \gamma \frac{2}{2 - \sigma(c)} (1 - \sigma(c)) - \ell$ (Eq. 3)
Reproduction	$R(\ell) = \frac{R_{\max}}{1 - \ell_p^3} \left( (1 - \sigma(c)) \ell^2 \left( \frac{1 + \ell}{2 - \sigma(c)} \right) - \ell_p^3 \right)$ (Eq. 4)

où  $\ell$  est la taille normalisée par la taille maximale  $\ell_{\max}$ ,  $\ell_p$  est la valeur de  $\ell$  à la puberté (mm),  $\gamma$  est le taux de croissance ( $j^{-1}$ ),  $R$  est le taux de reproduction journalier d'une daphnie de taille  $\ell$  (nombre de descendants.femelle $^{-1}$ ),  $R_{\max}$  est le taux de reproduction maximale (nombre maximal de descendants.femelle $^{-1}$ ) et  $c$  est la concentration externe ou la concentration interne ( $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ) calculée selon le modèle toxico-cinétique (partie A, §4.2.1.).

Dans un premier temps, les paramètres qui ne dépendent pas de la toxicité, à savoir  $\ell_0$  (valeur de  $\ell$  à l'éclosion),  $\ell_p$ ,  $\ell_{\max}$ ,  $\gamma$  et  $R_{\max}$  sont estimés en condition témoin pour chaque génération. Ensuite, les paramètres de toxicité (NEC,  $b$  et  $k_c$ ) sont estimés à partir des

données, sur chaque génération, pour toute la gamme de concentration en uranium. Les ajustements sont réalisés en utilisant la méthode des moindres carrés. Pour chaque groupe de traitement (concentration et temps d'exposition), la moyenne des carrés des écarts des critères d'effet  $i$  ( $mce_i$ ),  $i$  étant la croissance ou la reproduction, est calculée comme la différence entre les valeurs simulées et observées selon l'équation :

$$mce_i = \sum_{t=1}^{n_t} \frac{\sum_j (sim_{i,t} - obs_{i,t,j})^2}{\sigma^2 obs_{i,t}} \times \frac{1}{n_t}$$

où  $sim_{i,t}$  et  $obs_{i,t,j}$  sont les données simulées et observées à un temps  $t$ , pour le critère d'effet  $i$  et pour le test  $j$  et  $\sigma^2 obs_{i,t}$  la variance des données observées au temps  $t$  pour le critère d'effet  $i$ . Comme le nombre d'observations pour la croissance et la reproduction  $n$ 'est pas le même, la somme des carrés est divisée par le nombre total d'observations ( $n_t$ ).

Comme la reproduction est une fonction en "escalier" (les daphnies se reproduisent tous les 3 jours, avec une forte synchronisation entre les organismes), le poids relatif de la reproduction dans la moyenne globale des carrés des écarts (MCE) est supérieur à celui de la croissance. Pour éviter la surpondération de la reproduction, la moyenne des carrés des écarts des critères d'effet  $i$  ( $mce_i$ ) est divisée par la moyenne totale des carrés des écarts des critères d'effet  $i$  ( $mce_{i,tot}$ ), selon l'équation :

$$MCE = \sum_i \frac{mce_i}{mce_{i,tot}} \quad \text{avec} \quad mce_{i,tot} = \sum_{t=1}^{n_t} \frac{\sum_j (obs_{i,t,j} - \overline{obs_i})^2}{\sigma^2 obs_{i,t}} \times \frac{1}{n_t}$$

où  $\overline{obs_i}$  est la moyenne des données observées sur tous les temps.

Cette normalisation permet d'ajuster simultanément la croissance et la reproduction. La reproduction étant liée de près à la croissance avec des paramètres communs dans le modèle, il est préférable de ne pas traiter séparément chaque paramètre (**Jager *et al.*, 2004**). Les intervalles de confiance sont déterminés en utilisant la méthode Bootstrap. Pour cela, les données de chaque concentration et temps d'exposition sont simulées en faisant des tirages aléatoires avec remise dans les observations et le set de données est analysé comme décrit précédemment. Cette procédure est réalisée 10 000 fois. L'estimation des paramètres et des intervalles de confiance ont été réalisés sous R.

### 1.3 Résultats

Les valeurs des paramètres et leur intervalle de confiance pour la condition témoin de chaque génération sont présentés dans le tableau 12.

Paramètre	F0	F1	F2
$\ell_0$	1.0009 [0.9868-1.0163]	1.0745 [1.0428-1.1044]	1.0213 [0.9820-1.0480]
$\ell_p$	0.5856 [0.4960-0.6698]	0.6715 [0.5911-0.7399]	0.5259 [0.4143-0.6277]
$\ell_{\max}$	4.4238 [4.2336-4.6448]	4.2160 [4.0148-4.4403]	4.3721 [4.0982-4.8299]
$\gamma$	0.1346 [0.1139-0.1577]	0.1365 [0.1177-0.1598]	0.1233 [0.0902-0.1603]
$R_{\max}$	82.4822 [58.0080-110.8413]	73.2009 [56.8788-93.9370]	98.4032 [72.4545-150.1754]

**Tableau 12 :** *paramètres estimés en condition contrôle pour les 3 générations successives (F0, F1 et F2).*

Les paramètres estimés en condition contrôle sont très similaires entre les 3 générations (Tableau 12). Les paramètres de reproduction, à savoir, la taille à la puberté  $\ell_p$  et le taux de reproduction maximale  $R_{\max}$  montrent une plus grande variabilité entre les générations que les paramètres de croissance, mais les intervalles de confiance pour ces paramètres sont relativement grands. Les paramètres estimés en condition témoin pour la croissance et la reproduction sont utilisés dans les analyses des données de toxicité de chaque génération.

Le tableau 13 présente les paramètres de toxicité estimés sur les données de croissance et de reproduction pour les trois générations (F0, F1 et F2), en fonction du mode d'action et de l'utilisation ou non du module cinétique.

Modèle	NEC ( $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$ )	b ( $\mu\text{gU}^{-1}\cdot\text{L}$ )	$k_c$ ( $\text{j}^{-1}$ )	MCE
<b>Avec module cinétique</b>				
Assimilation				
F0	0.1919 [0.0000-16.8031]	0.0654 [0.0002-0.0057]	0.0055 [0.1118-547.2185]	0.0761 [0.0025-1.0696]
F1	7.7693 [0.5779-16.0819]	0.0068 [0.0062-0.0207]	3.4731 [0.0619-623.7027]	0.0285 [0.0109-0.1569]
F2	2.3211 [0.0000-10.5406]	0.0137 [0.0098-0.0230]	124.8934 [0.6353-694.0270]	0.0416 [0.0072-0.1685]
Maintenance				
F0	5.9260 [0.0000-181875]	0.0056 [0.0005-0.0076]	0.3932 [0.1874-578.3780]	0.0794 [0.0025-1.0214]
F1	12.4677 [3.3070-18.1218]	0.0141 [0.0100-0.0270]	2.8254 [0.0976-631.6547]	0.0280 [0.0106-0.1301]
F2	8.9505 [0.0000-11.8097]	0.0334 [0.0143-0.0556]	622.8934 [2.7446-712.0915]	0.0438 [0.0071-0.1848]
<b>Sans module cinétique</b>				
Assimilation				
F0	9.3701 [0.0000-25.0000]	0.0027 [0.0006-0.0036]	/	0.0810 [0.0027-1.0856]
F1	8.2133 [1.2988-15.8916]	0.0068 [0.0059-0.002]	/	0.0286 [0.0118-0.1403]
F2	2.3181 [0.0000-8.2914]	0.0137 [0.0103-0.0212]	/	0.0415 [0.0079-0.2259]
Maintenance				
F0	9.3795 [0.0000-24.9371]	0.0046 [0.0009-0.0064]	/	0.0816 [0.0029-1.0613]
F1	13.2301 [4.5095-18.6871]	0.0142 [0.0060-0.0180]	/	0.0281 [0.0120-0.1569]
F2	4.3497 [0.0000-8.2924]	0.0292 [0.0164-0.0531]	/	0.0631 [0.0086-0.2203]

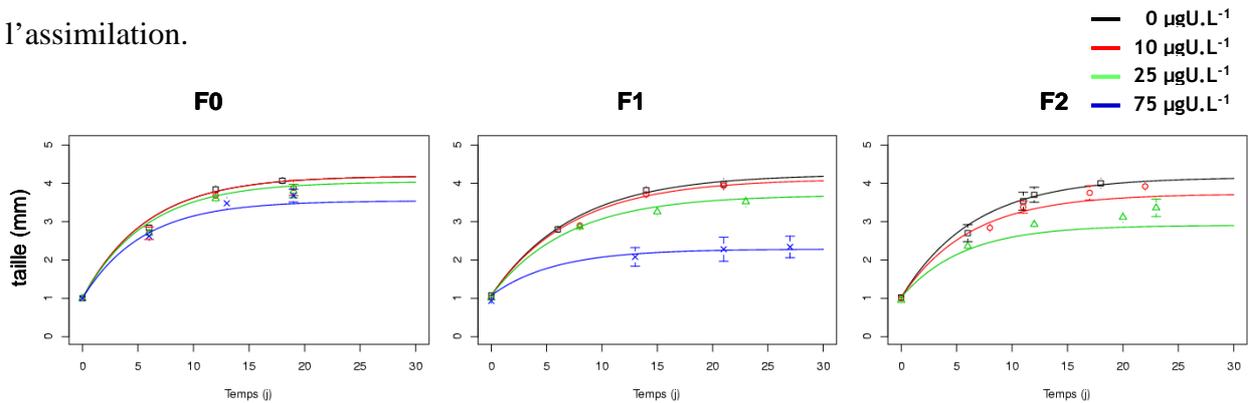
**Tableau 13** : paramètres de toxicité estimés pour les 3 générations successives exposées à l'uranium (F0, F1 et F2), en fonction des deux modes d'action possibles et avec ou sans le module cinétique. MCE correspond à la moyenne des carrés des écarts entre les données observées et les modèles.

Pour les deux générations F0 et F1, il y a peu de différence entre les modes d'action sur les paramètres. En revanche, pour la troisième génération, les MCE pour les 2 modèles sont plus petits lorsque l'uranium a un effet sur l'assimilation en comparaison à un effet sur la maintenance.

Pour ce qui est de l'utilisation du module cinétique, il y a peu de différences entre les paramètres des modèles en prenant en compte le module cinétique ou pas. De plus, pour les générations F1 et F2, les taux d'élimination déterminés,  $k_e$ , correspondent à des cinétiques très rapides. Par conséquent, au pas de temps d'un jour correspondant aux observations expérimentales, le module cinétique n'apporte pas d'informations supplémentaires. L'effet de l'uranium peut dès lors être considéré comme immédiat (*i.e.* maximal dès le premier jour d'exposition) et être corrélé aux concentrations externes en uranium. Cela renforce donc l'hypothèse d'un effet de l'uranium agissant localement au niveau de la paroi du tube digestif, et donc sur le processus d'assimilation. *A contrario*, les effets sur la maintenance sont des effets systémiques qui impliquent une toxicité liée à la concentration interne en uranium. De plus, l'augmentation prédite des coûts de maintenance devraient se refléter au travers de taux de respiration beaucoup plus élevés que ceux mesurés en présence d'uranium.

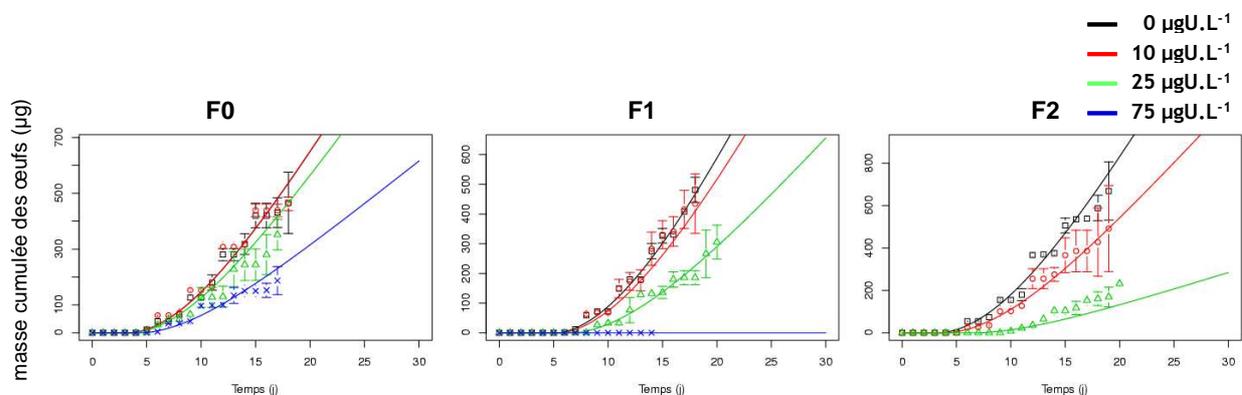
En supposant un effet sur l'assimilation, directement corrélé à la concentration externe en uranium, les valeurs de NEC diminuent et les valeurs du coefficient d'effet,  $b$ , augmentent au travers des générations reflétant l'hypothèse d'une augmentation de la toxicité de l'uranium au travers des générations. Les intervalles de confiance sont [0.0000 ; 25.0000], [1.2988 ; 15.8916] et [0.0000 ; 8.2914]  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  pour les valeurs de NEC, et [0.0006 ; 0.0036], [0.0059 ; 0.0082] et [0.0103 ; 0.0212]  $\mu\text{g}^{-1}.\text{L}$  pour les valeurs de  $b$ , pour les générations F0, F1 et F2 respectivement. Ces résultats montrent que l'augmentation de la sévérité des effets d'une génération à la suivante est essentiellement liée à une augmentation significative dans le coefficient d'intensité d'effet, une fois la NEC dépassée.

Les figures suivantes présentent les ajustements sur les données avec le modèle de croissance (Figure 43) et le modèle de reproduction (Figure 44) avec effets de l'uranium sur l'assimilation.



**Figure 43 :** ajustements des données de croissance en taille avec le modèle de croissance avec effets de l'uranium sur l'assimilation sur les trois générations successives exposées à 0, 10, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> (F0, F1 et F2)

D'un point de vue graphique, le modèle de croissance avec effets de l'uranium sur l'assimilation s'ajuste relativement bien aux données observées à l'exception d'une croissance légèrement sous estimée à 25 µgU.L dans la F2 (Figure 43).



**Figure 44 :** ajustements des données de reproduction avec le modèle de reproduction avec effets de l'uranium sur l'assimilation sur les trois générations successives exposées à 0, 10, 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup> (F0, F1 et F2)

De la même manière, le modèle de reproduction avec effet de l'uranium sur l'assimilation sous estime les données de masse cumulée des œufs à 25 µgU.L<sup>-1</sup> dans F2, tandis qu'il les surestime pour cette même concentration d'exposition dans F0 (Figure 44). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'effet de l'uranium sur l'assimilation suffit à lui seul pour expliquer les effets observés sur la croissance et la reproduction.

## 1.4. Discussion

### 1.4.1. Mode d'action de l'uranium chez *Daphnia magna*

Un toxique qui affecte la croissance de l'individu entraînera automatiquement des perturbations sur la reproduction, car la taille d'un organisme détermine les taux de nutrition et par conséquent l'énergie disponible pour la reproduction. Par conséquent, cette relation étroite entre croissance et reproduction implique que ces deux critères d'effets ne peuvent pas être traités indépendamment. De ce fait, les données de croissance et de reproduction ont été ajustées simultanément. L'ajustement est réalisé selon le critère des moindres carrés, qui ne permet que dans certains cas de discriminer un mode d'action de l'uranium plutôt qu'un autre sur la base du modèle qui minimise la MCE (moyenne des carrés des écarts entre les données observées et le modèle). La situation observée avec l'uranium est intéressante : les MCE ne permettent pas de choisir entre un mode d'action de l'uranium sur la maintenance ou sur l'assimilation dans les deux premières générations. Sur la troisième génération, les MCE déterminées, plus faibles sous l'hypothèse d'un effet de l'uranium sur l'assimilation, restent relativement proches de celles obtenues sous l'hypothèse d'un effet sur la maintenance. Ce sont donc les résultats issus de nos expérimentations et de travaux de **Zeman (2008)** qui confortent le choix du mode d'action, à savoir : (i) les réductions significatives des taux d'assimilation en présence d'uranium mesurées par méthode radiotraçante ; (ii) les dommages importants des cellules intestinales de la paroi du tube digestif en présence d'uranium observés au microscope optique ; (iii) l'absence d'effet de l'uranium sur le taux respiratoire taille spécifique. Néanmoins, les mesures physiologiques et les ajustements DEBtox fournissent des informations complémentaires, le modèle montrant qu'une réduction de l'assimilation induite par l'uranium est suffisante pour expliquer l'ensemble des effets observés sur la croissance et la reproduction.

De la même manière, la sélection du mode d'action du cadmium chez *Daphnia magna* peut être discuté. Les résultats de **Kooijman et Bedaux (1996)** révèlent une diminution de la fécondité de *D. magna* en présence de cadmium mais l'absence d'effet sur le temps de maturité sexuelle. De ce fait, les modèles d'effets indirects sur la reproduction sont écartés. Par conséquent, le mode d'action qui expliquerait les réductions de fécondité serait dû à un effet direct du contaminant sur la reproduction, soit au travers d'une mortalité des individus

pendant l'ovogenèse (*Modèle Hasard*), soit d'une augmentation des coûts énergétiques pour la production d'œufs (*Modèle des Coûts*). A partir des résultats des ajustements selon les moindres carrés, les auteurs concluent que ces deux modes d'action pourraient expliquer les effets observés sur la reproduction. Or en présence de cadmium, **Baillieul et al. (2005)** montrent des réductions significatives de la taille et de la masse des daphnies et, donc une taille de puberté retardée (**Mc Cauley et al., 1990 ; Ebert, 1992**). Par conséquent, les résultats expérimentaux et la sélection du mode d'action du cadmium chez *Daphnia magna* peuvent être remis en cause. De plus, plusieurs études (**Gulati et al., 1988 ; Allen et al., 1995 ; Barata et Baird, 2000; Baillieul et al., 2005**) révèlent que le cadmium affecte l'acquisition d'énergie au travers d'une réduction de l'assimilation chez *D. magna*. En appui de ces résultats expérimentaux, **Billoir et al. (2007)** qui étudient les effets du cadmium chez *D. magna*, font le choix de ne pas sélectionner un mode d'action plutôt qu'un autre, après analyses des ajustements fournis par le DEBtox. Les auteurs décident de continuer leurs analyses au niveau de la population avec les cinq modes d'action, permettant ainsi de faire une comparaison entre eux au niveau de la population. Ainsi, pour des concentrations  $\leq 7.5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ , les valeurs du taux de croissance asymptotique de la population sont similaires quel que soit le mode d'action. Passé ce seuil, le modèle avec effet du cadmium sur l'assimilation induit une diminution plus importante sur le taux de croissance de la population en comparaison aux autres modes d'action.

#### 1.4.2. Cinétique et transfert de l'uranium chez *Daphnia magna*

D'après les travaux de **Kooijman et Bedaux (1996)** le taux d'élimination  $k_e$  peut déterminer trois vitesses de cinétiques d'un polluant : quand  $k_e$  tend vers l'infini, la cinétique du toxique dans l'organisme est rapide, quand  $k_e$  tend vers zéro, la cinétique du toxique est très lente et pour des valeurs intermédiaires de  $k_e$ , la cinétique du toxique est normale. D'après nos résultats présentés dans cette partie (§1.3.), les taux d'élimination de l'uranium des générations F1 et F2 correspondent à des cinétiques rapides ( $k_e > 18 \text{ j}^{-1}$ ), suggérant un effet immédiat à l'échelle de la journée, ce qui est un argument fort en faveur de l'hypothèse de dommages opérés au niveau de la paroi du tube digestif des daphnies par l'uranium ingéré. Ces éléments nous permettent de ne pas considérer le module cinétique dans nos simulations car il n'apporte pas d'informations supplémentaires et de corrélérer le stress toxique à la concentration externe, ce qui apporte une simplification non négligeable du modèle. Il serait

néanmoins intéressant d'examiner si à d'autres niveaux de nourriture, les valeurs estimées des constantes cinétiques ne seraient pas influencées par la réponse ingestive.

De la même manière, **Péry *et al.* (2003a)** ajustent des modèles avec effets du cuivre sur les coûts de la croissance et sur l'ingestion du quatrième instar de *Chironomus riparius* et ils observent des taux d'élimination qui tendent vers l'infini, suggérant des cinétiques rapides d'élimination. D'après l'étude de **Billoir *et al.* (2008)** concernant la toxicité du cuivre et du zinc sur *D. magna*, les analyses statistiques montrent clairement que les données de reproduction ne sont pas suffisantes pour estimer le taux d'élimination d'un toxique. Cependant, les données de survie peuvent aussi être décrites par des modèles impliquant le taux d'élimination. Par conséquent, l'utilisation en même temps des données de survie et de reproduction pourrait potentiellement nous aider à estimer le  $k_e$ , mais cela implique des ajustements simultanés.

Les concentrations de polluants sont rarement mesurées dans les organismes. Elles permettraient, pourtant, d'avoir une estimation de la constante d'élimination. A partir des mesures de bioaccumulation d'uranium présentées dans la partie B (§ 2.7), nous avons déterminé des constantes d'élimination égales à  $1.327 \text{ j}^{-1}$  pour des concentrations  $\leq 25 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$  et de  $0.126 \text{ j}^{-1}$  à  $75 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ , toutes générations confondues. Ces valeurs se rapprochent des valeurs de  $k_e$  prédites par les modèles DEBtox dans la première génération (F0), mais elles sont très largement inférieures à celles prédites dans les deuxième et troisième générations (F1 et F2). De telles différences suggèrent que l'accumulation de l'uranium chez la daphnie ne suit pas une relation de proportionnalité entre la quantité d'uranium totale bioaccumulée (dont la cinétique lente est observée dans nos expériences) et la fraction biologiquement active induisant le stress toxique (dont la cinétique rapide est prédite dans les ajustements DEBtox). En outre, l'utilisation d'un modèle toxico-cinétique simple comme le modèle linéaire à un compartiment, pour décrire la bioaccumulation de l'uranium, représenterait une vision trop simpliste du fonctionnement d'un organisme tel que la daphnie. S'il a l'avantage d'être communément employé dans la plupart des approches de modélisation des effets et de disposer de méthodes classiques d'estimation des paramètres (**Ashauer *et al.*, 2006**), ce modèle considère uniquement la bioaccumulation des polluants dans les tissus internes et suppose une croissance continue des organismes. *Daphnia magna*, qui appartient à l'embranchement des arthropodes, est caractérisé par une croissance discontinue et une physiologie marquée par le cycle de mue. Cette particularité a été examinée dans une étude récente (**Bouafif, 2010**). La bioaccumulation d'uranium chez la daphnie présente ainsi des teneurs élevées au cours des intermues. A cause d'un rayon ionique proche de celui du

calcium, l'uranium dans sa forme libre ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) s'échangerait avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Cooley et Klaverkamp, 2000). Cette affinité avec les sites de fixation du calcium de la cuticule pourrait expliquer les teneurs transitoires de l'uranium chez la daphnie. Néanmoins, les mesures de bioaccumulation dans la cuticule n'ont pas suffi à expliquer les valeurs transitoires observées. L'implication de la masse des gonades n'est pas confirmée par les mesures dans les œufs fraîchement pondus. L'ensemble des résultats de cette étude suggère donc une bioaccumulation en uranium importante dans les tissus internes chez *D. magna* au cours du cycle de mue.

#### 1.4.3. Vers la détermination d'une concentration seuil sans effet au niveau individuel

L'approche classique en écotoxicologie consiste soit à déterminer des NOEC (No Observed Effect Concentration) en utilisant des tests d'hypothèses, soit à prédire des  $\text{EC}_x$  ( $x\%$  Effect concentration) en interpolant des courbes dose-réponse. Cependant, les NOEC et  $\text{EC}_x$  dépendent des caractéristiques des bioessais, comme les critères d'effets mesurés ou encore la durée d'exposition. Par conséquent, ils ne peuvent pas être facilement extrapolés, ni comparés entre espèces ou contaminants. Les modèles DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996), en décrivant la manière dont l'individu alloue son énergie à la survie, la croissance et la reproduction en présence de contaminant, permettent de lier les perturbations de la physiologie et leurs conséquences sur l'histoire de vie. Son application permet de déterminer le seuil de concentration (NEC) à partir duquel le fonctionnement de l'organisme est perturbé et ce, en tenant compte simultanément des effets sur l'ensemble des processus clés. La valeur obtenue est indépendante des concentrations testées et des temps d'exposition. De ce fait, une comparaison entre NEC et NOEC n'est pas possible.

Nos valeurs de NEC avec effet de l'uranium sur l'assimilation sont de 9.37, 8.21 et 2.32  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans le cas où les ajustements sont faits sur une, deux et trois générations. Jusqu'à présent, les modèles DEBtox n'avaient jamais été appliqué à des données issues de tests de toxicité multigénérationnels. Nos résultats confirment une augmentation de la sensibilité des daphnies d'une génération à la suivante. Il serait intéressant de prendre en compte l'exposition des individus à l'uranium pendant l'embryogénèse dans les modèles DEBtox. En effet, nos résultats expérimentaux ont montré qu'une exposition à l'uranium des daphnies pendant leur développement embryonnaire expliquerait partiellement l'aggravation des effets au travers des générations.

## Chapitre 2. Extrapolation des effets de l'uranium de l'individu à la population

Ce chapitre est dédié à l'extrapolation des effets toxiques de l'uranium du niveau individuel où ils sont mesurés au laboratoire, au niveau de la population, plus pertinent du point de vue écologique. Ce changement d'échelle repose sur des modèles de populations de type matrice de Leslie. Dans un premier temps, il vise à extrapoler directement les données de survie et de reproduction observées dans les conditions particulières testées lors des expérimentations. Dans un second temps, l'utilisation d'un modèle DEBtox au niveau individuel va permettre d'extrapoler les effets au niveau populationnel aux valeurs intermédiaires de la gamme de concentrations en uranium.

### 2.1. Choix du modèle de dynamique de population

Les différents modèles démographiques ont été présentés dans la synthèse bibliographique (Partie A). Parmi eux, les modèles de populations matriciels type Leslie se sont avérés être des outils puissants (Caswell, 2001) et ont été récemment appliqués en écotoxicologie au cas de la daphnie (Billoir *et al.*, 2007, Duchet *et al.*, 2010, Bøhn *et al.*, 2010) pour déduire différents critères d'effet démographiques, tels que le taux de croissance de la population et la distribution en âge asymptotiques (c'est-à-dire en conditions constantes quand la structure en classes est stabilisée, Caswell, 2001). Ces modèles supposent que la population est constituée de plusieurs classes d'âges différentes. Les classes peuvent être de véritables stades biologiques, comme les instars pour les arthropodes ou être choisies arbitrairement, par exemple en fonction de la masse des individus. A intervalles de temps discrets, les effectifs de chacune des classes d'âges évoluent de façon indépendante et sont calculés à partir de leurs taux de survie et de fécondité respectifs. En comparaison, les modèles logistiques et malthusiens supposent que les taux de reproduction sont identiques pour tous les individus de la population, ce qui n'est pas réaliste d'un point de vue biologique chez la daphnie.

## 2.2. Fonctionnement des modèles matriciels de population

### 2.2.1. Hypothèses des modèles

Nos modèles matriciels de population reposent sur trois hypothèses :

- le système est fermé, sans migration, ni de phénomène densité-dépendant ;
- à l'instant  $t$ , la population est représentée par un vecteur  $N(t)$  structuré en générations et cohortes de nombre variable selon le scénario d'étude considéré (population multigénérationnelle ou non, avec ou sans différence de sensibilité entre les pontes B1 et B5) et de 22 classes d'âge chacune ;
- la population varie de façon discrète au cours d'intervalle de temps de 1 jour.

En introduisant  $A$  la matrice de transition, aussi appelée matrice de Leslie, la dynamique de population peut s'écrire sous une forme très simple :

$$N(t+1) = A \times N(t)$$

où  $N(t)$  et  $N(t+1)$  sont les vecteurs d'effectifs aux temps  $t$  et  $t+1$ .

La dynamique de population, en régime asymptotique, peut être décrite à partir de la plus grande valeur propre de la matrice  $A$ ,  $\lambda$  et qui correspond au taux de croissance asymptotique de la population.

$\lambda > 1$  signifie que la population va croître sur le long terme.

$\lambda = 1$  signifie que la population va se stabiliser sur le long terme.

$\lambda < 1$  signifie que la population va décroître sur le long terme, ce qui est synonyme d'extinction de la population.

### 2.2.2. Scenarii d'études et origine des données

L'extrapolation, à partir des données observées sur les daphnies exposées à 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , au niveau populationnel est menée selon trois cas d'étude considérant les effets toxiques sur une génération (F0, *scénario 1*), sur deux générations (F0-F1, *scénario 2*) ou sur trois générations (F0-F1-F2, *scénario 3*). Quelle que soit la génération, les expérimentations sont effectuées avec des individus issus de ponte B5. Au travers des simulations, nous faisons l'hypothèse que les daphnies nées des autres pontes ont une sensibilité analogue à la ponte B5. Cette hypothèse est également sous-jacente dans les tests écotoxicologiques standards, qui recommandent l'étude de la toxicité sur des daphnies issues de ponte 3 au minimum.

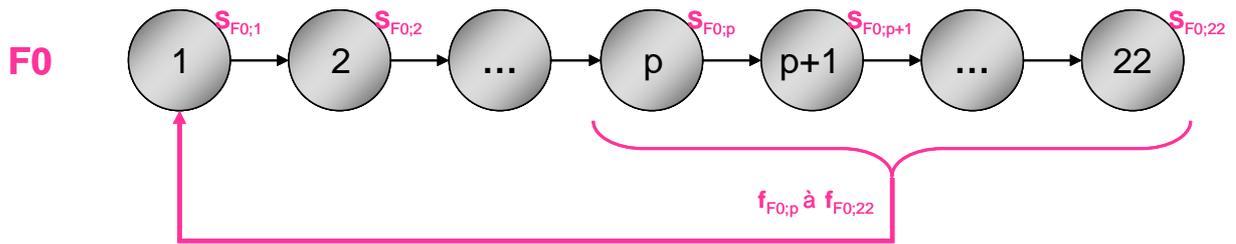
Cette hypothèse est néanmoins réfutée par nos résultats expérimentaux qui mettent en évidence une plus grande sensibilité des individus issus de la première ponte exposés à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Dans un second temps, une modélisation tenant compte de la différence de sensibilité observée entre les pontes est conduite en introduisant deux cohortes (de sensibilité respectivement équivalente aux individus issus de B1 et de B5) dans chaque génération. Les simulations correspondantes sont menées sur une génération (F0 *scenarii 4a* et *4b*) ou deux générations (F0-F1 *scenarii 5a* et *5b*), les cohortes étant notées F0(B1), F0(B5), F1(B1) et F1(B5). Les *scenarii 4a* et *5a* supposent que les individus issus de ponte B2 ont une sensibilité équivalente à celle des cohortes issues de B5, et dans les *scenarii 4b* et *5b*, que les individus issus de ponte B2 ont une sensibilité équivalente à celle des cohortes issues de B1. Dans tous les cas, les pontes B3 et B4 sont supposées être équivalentes en sensibilité à la ponte B5.

La comparaison des prédictions des simulations des *scenarii 2, 5a* et *5b* va permettre d'estimer l'impact sur la dynamique de population d'une distinction entre la sensibilité des différentes pontes.

2.3. Construction des matrices de population

- **Scénario 1** : exposition sur une génération (F0, sans distinction de sensibilité entre B1 et B5)

A ce scénario correspond le cycle de vie schématisé dans la figure 45.



**Figure 45** : schéma représentatif du cycle de vie de *Daphnia magna* sur une génération (F0), où  $f_{F0;i}$  et  $S_{F0;i}$  sont les taux de fécondité et survies âge-spécifiques et  $p$  la première classe d'âge où les néonates éclosent

La population est représentée par un vecteur  $N(t)$  de 22 classes d'âge. La matrice de Leslie  $A$ , de 22 par 22, prend la forme :

$$A = \begin{bmatrix}
 0 & 0 & 0 & f_{F0;p} & f_{F0;p+1} & \dots & f_{F0;21} & f_{F0;22} \\
 S_{F0;1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & S_{F0;2} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & S_{F0;p} & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F0;p+1} & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F0;21} & S_{F0;22}
 \end{bmatrix}
 \quad
 N(t) = \begin{bmatrix}
 n_1(t) \\
 n_2(t) \\
 \dots \\
 n_p(t) \\
 n_{p+1}(t) \\
 \dots \\
 n_{21}(t) \\
 n_{22}(t)
 \end{bmatrix}
 \quad
 \begin{aligned}
 N(t+1) &= A \times N(t) \\
 \Leftrightarrow \begin{cases}
 n_{i+1}(t+1) = S_{F0;i} \times n_i(t) \\
 n_1(t+1) = \sum_{i=p}^{22} f_{F0;i} \times n_i(t)
 \end{cases}
 \end{aligned}$$

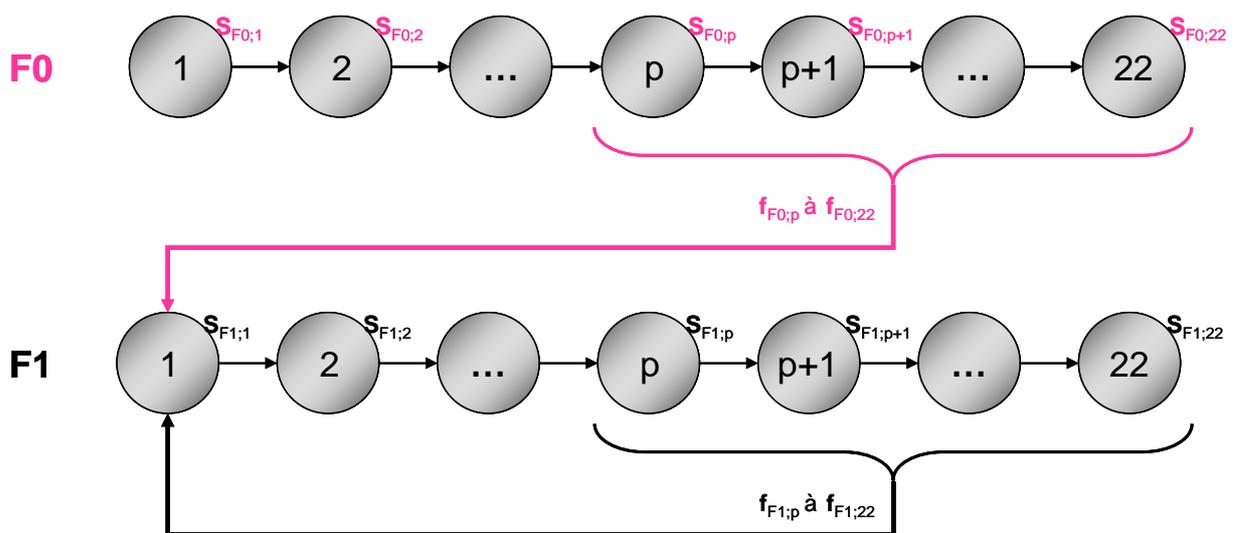
où  $f_{F0;i}$  et  $S_{F0;i}$  sont les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  et  $p$  est l'âge de la première classe où les néonates sont libérés.

La première ligne de la matrice de transition  $A$  contient les taux de fécondité  $f_{F0;i}$  de chaque classe d'âge  $i$ , en considérant que les daphnies commencent à libérer des néonates à partir de la classe d'âge  $p$ . Pour tout  $i < p$ , ces coefficients de fécondité sont nuls. Sur la sous-

diagonale de la matrice se trouvent les taux de survie  $S_{F_0,i}$  de la classe d'âge  $i$  à la classe d'âge  $i+1$ . Au cours d'un pas de temps :

- le nombre d'individus de la classe d'âge  $i+1$  à l'instant  $t+1$  est calculé à partir du nombre d'individus de la classe d'âge  $i$  à l'instant  $t$  et du taux de survie  $S_{F_0,i}$  ;
- on considère que tous les individus de la classe d'âge 22 meurent après s'être reproduit. Pour ce faire, une valeur quasi-nulle ( $10^{-6}$ ) est assignée à la probabilité de survie  $S_{F_0,22}$  ;
- le nombre de néonates libérés par chaque classe d'âge  $i \geq p$ , calculés à partir du taux de fécondité  $f_{F_0,i}$  et du nombre d'individus de la classe d'âge  $i$  contribue à l'effectif de la classe d'âge 1 au temps  $t+1$ .

- **Scénario 2** : exposition sur deux générations (F0 et F1, sans distinction de sensibilité entre B1 et B5)



**Figure 46** : schéma représentatif du cycle de vie de *Daphnia magna* sur deux générations (F0 et F1) où  $f_{G,i}$  et  $S_{G,i}$  sont les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  dans la génération  $G$  et  $p$  la première classe d'âge où les néonates éclosent

La population est représentée par un vecteur  $N(t)$  de 44 classes d'âge réparties dans deux générations (Figure 46). Dans ce scénario, les néonates produits par l'ensemble des classes d'âge  $i \geq p$  des générations F0 et F1 contribuent à l'effectif de la classe d'âge 1 de la génération F1 au pas de temps suivant.

La matrice de Leslie  $A$ , de 44 par 44, prend la forme :

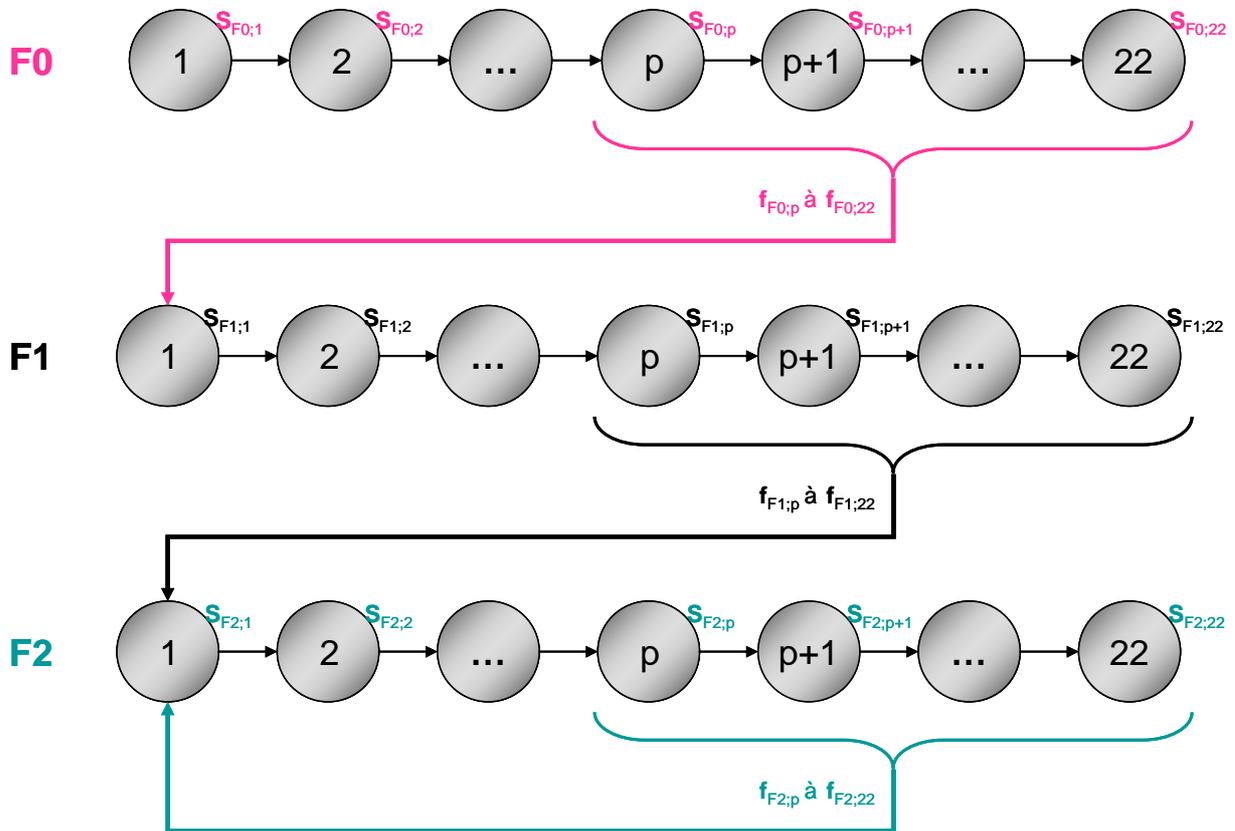
$$\begin{array}{c}
 \left[ \begin{array}{cccccccc|cccccccc}
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 S_{F0,1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & S_{F0,2} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & S_{F0,p} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F0,p+1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F0,21} & S_{F0,22} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \hline
 0 & 0 & 0 & f_{F0,p} & f_{F0,p+1} & \dots & f_{F0,21} & f_{F0,22} & 0 & 0 & 0 & f_{F1,p} & f_{F1,p+1} & \dots & f_{F1,21} & f_{F1,22} \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F1,1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F1,2} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F1,p} & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F1,p+1} & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{F1,21} & S_{F1,22}
 \end{array} \right]
 \begin{array}{c}
 N(t) = \\
 \left[ \begin{array}{c}
 n_{F0,1}(t) \\
 n_{F0,2}(t) \\
 \dots \\
 n_{F0,p}(t) \\
 n_{F0,p+1}(t) \\
 \dots \\
 n_{F0,21}(t) \\
 n_{F0,22}(t) \\
 \hline
 n_{F1,1}(t) \\
 n_{F1,2}(t) \\
 \dots \\
 n_{F1,p}(t) \\
 n_{F1,p+1}(t) \\
 \dots \\
 n_{F1,21}(t) \\
 n_{F1,22}(t)
 \end{array} \right]
 \end{array}
 \end{array}$$

$$\begin{aligned}
 N(t+1) &= A \times N(t) \\
 \Leftrightarrow \begin{cases} n_{G,i+1}(t+1) = S_{G,i} \times n_{G,i}(t) \\ n_{F1,1}(t+1) = \sum_{i=p}^{22} f_{F0,i} \times n_{F0,i}(t) + \sum_{i=p}^{22} f_{F1,i} \times n_{F1,i}(t) \end{cases}
 \end{aligned}$$

où  $n_{G,i}$ ,  $f_{G,i}$  et  $S_{G,i}$  sont l'effectif et les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  dans la génération  $G$ .

- **Scénario 3** : exposition sur trois générations (F0, F1 et F2 sans distinction de sensibilité entre B1 et B5)

La population est représentée par un vecteur  $N(t)$  de 66 classes d'âge, réparties sur trois générations.

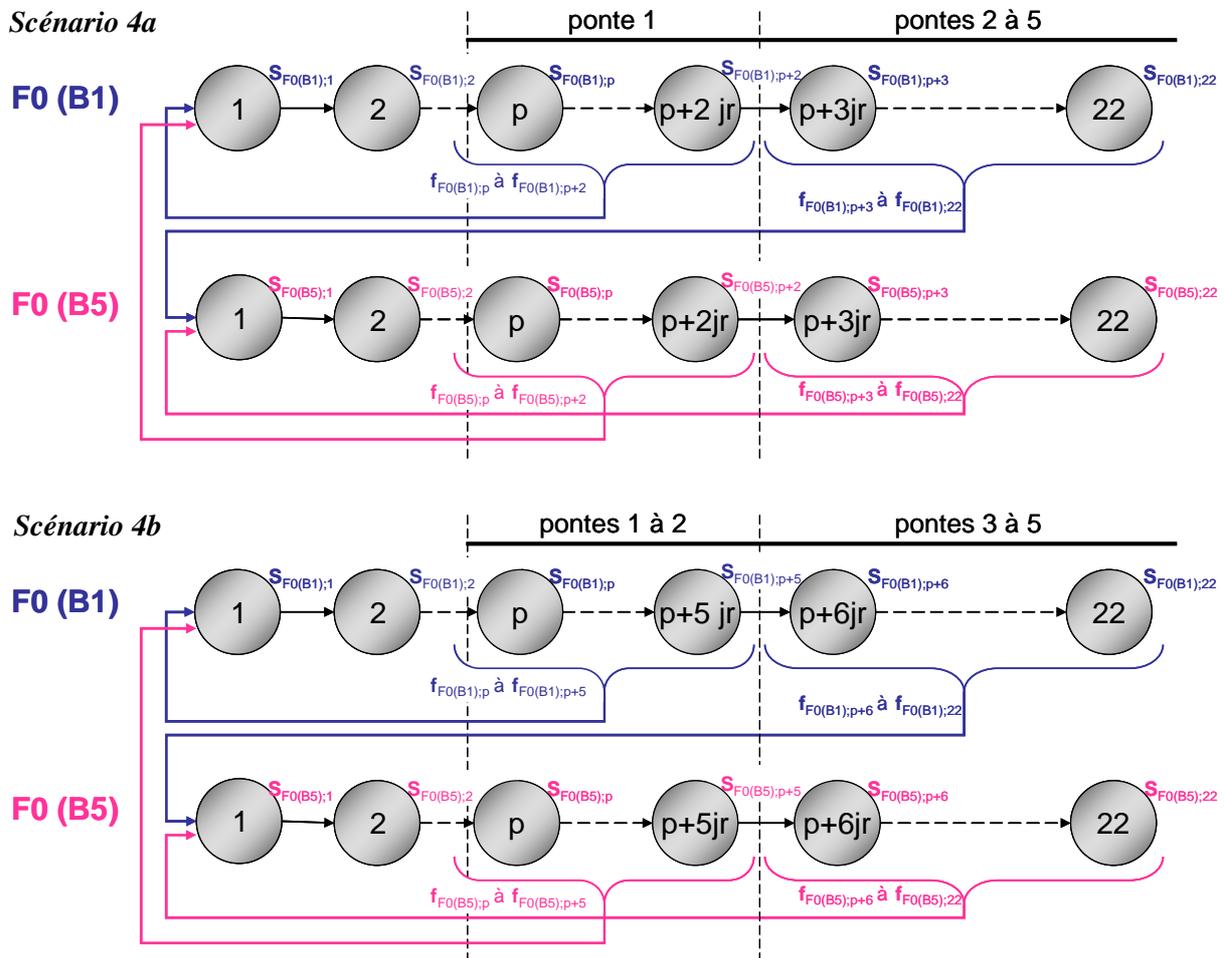


**Figure 47** : schéma représentatif du cycle de vie de *Daphnia magna* structurée en 3 générations (F0, F1 et F2) où  $f_{G,i}$  et  $s_{G,i}$  sont les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  dans la génération  $G$  et  $p$  la première classe d'âge où les néonates éclosent

Dans ce cas d'étude à trois générations, les néonates produits par les classes d'âge  $i \geq p$  de la génération F0 contribuent à l'effectif de la classe d'âge 1 de la génération F1 au pas de temps suivant tandis que les néonates des générations F1 et F2 contribuent à l'effectif de la classe d'âge 1 de la génération F2 (Figure 47).



tous les 3 jours, en rythme avec leur cycle de mue. La libération des pontes 1 et 2 correspond donc respectivement aux classes d'âge  $p$  à  $p+2$  et  $p+3$  à  $p+5$ ,  $p$  étant la première classe d'âge où des néonates sont libérés.



**Figure 48 :** schéma représentatif du cycle de vie de *Daphnia magna* structurée en 1 génération ( $F_0$ ) divisée en 2 cohortes  $F_0(B1)$  et  $F_0(B5)$  où  $f_{F_0(B);i}$  et  $S_{F_0(B);i}$  sont les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  dans chaque cohorte  $F_0(B)$ . Les individus nés des pontes 2 présentent une sensibilité à l'uranium : scénario 4a) identique à  $F_0(B1)$  ou scénario 4b) identique à  $F_0(B5)$

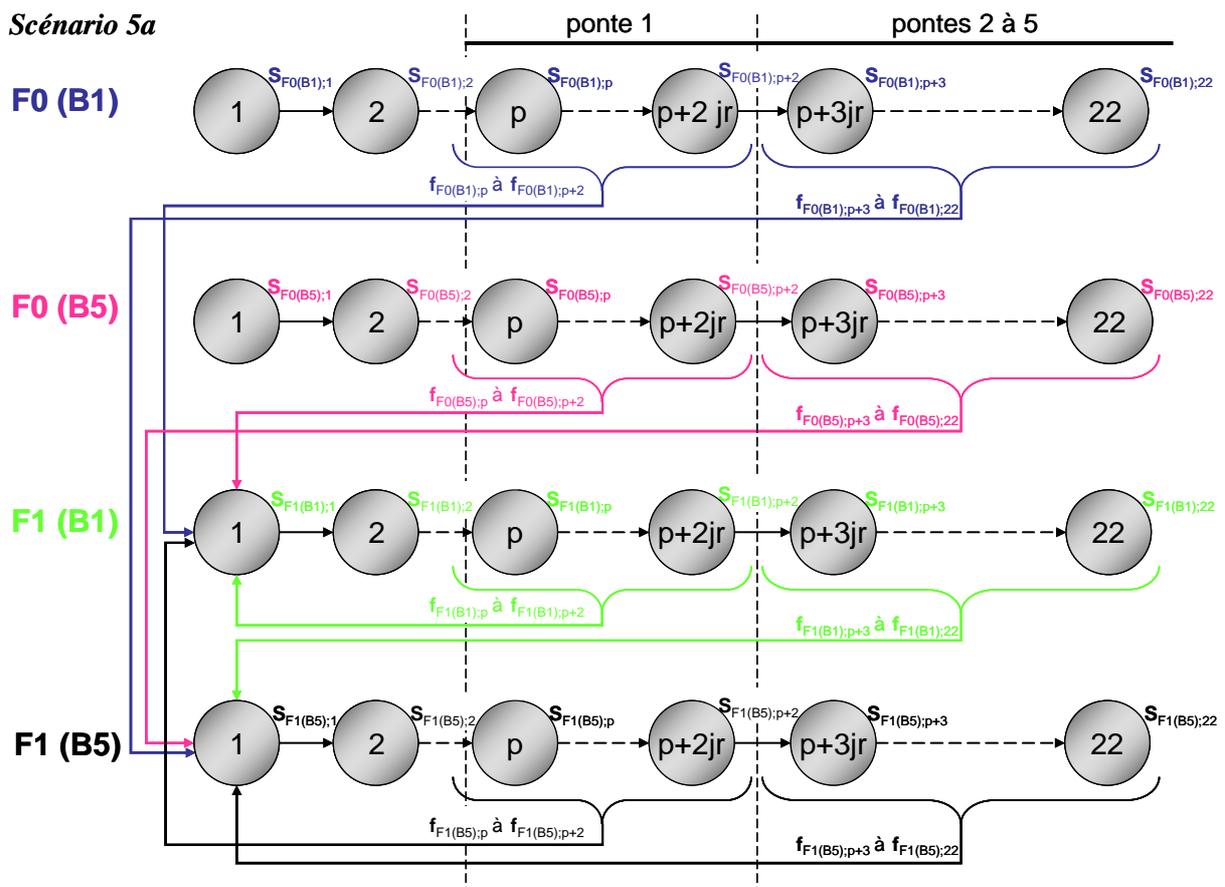
Ainsi :

- dans le **scénario 4a**, les néonates issus de la ponte 1 ( $p \leq i \leq p+2$ ) vont contribuer à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte B1, les néonates des classes d'âge  $i \geq p+3$  à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte B5 ;

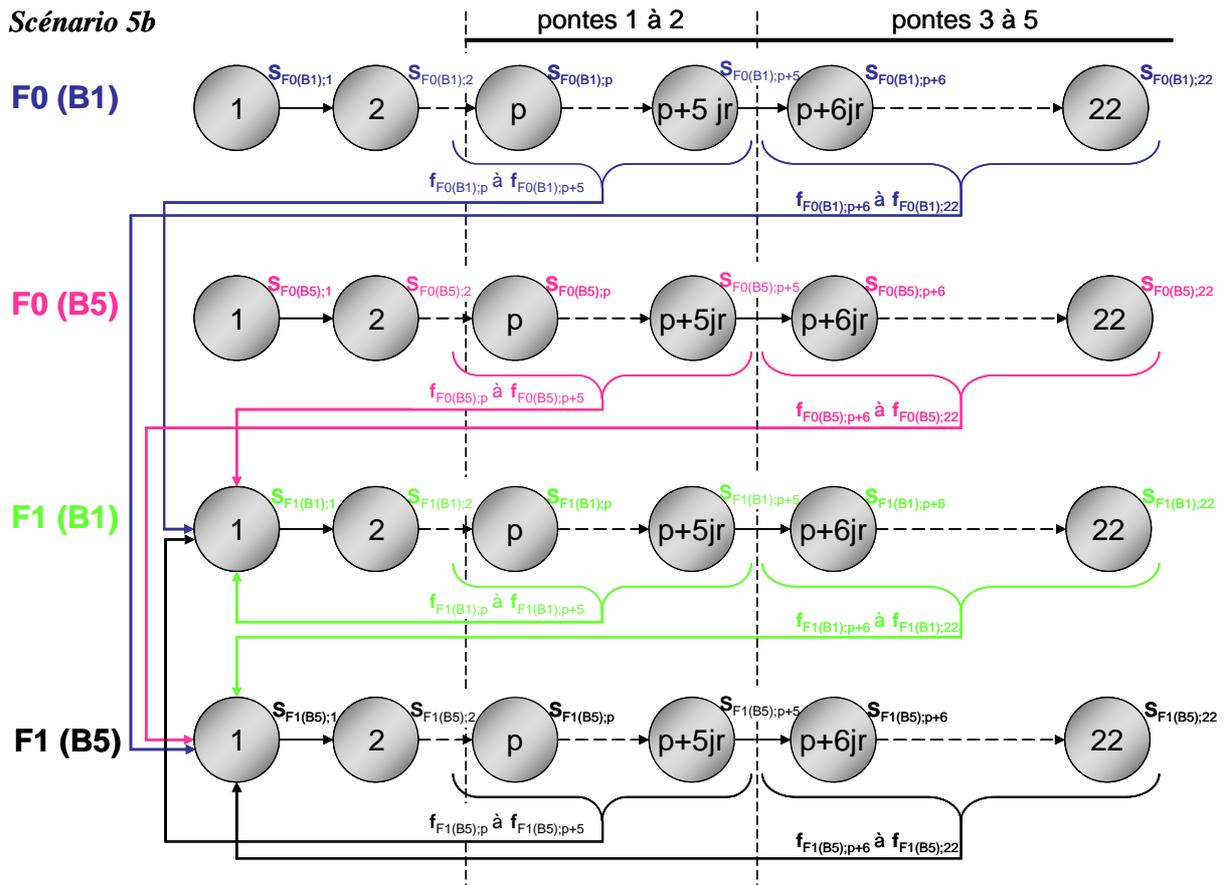


- *Scenarii 5a et 5b* : exposition sur 2 générations (F0 et F1) avec prise en compte des cohortes (B1 et B5) où les individus issus de la ponte B2 ont une sensibilité équivalente à celle des cohortes issues de B1 ou B5

Ces cas d'étude correspondent à la version à deux générations du jeu de *scenarii 4a et 4b*. La population est structurée en 88 classes d'âge réparties sur les 2 générations F0 et F1 comportant chacune 2 cohortes, l'ensemble étant noté F0(B1), F0(B5), F1(B1) et F1(B5).



**Scénario 5b**



**Figure 49 :** schéma représentatif du cycle de vie de *Daphnia magna* structurée en 2 générations ( $G=F0$  ou  $F1$ ) divisées en 2 cohortes chacune  $G(B1)$  et  $G(B5)$  où  $f_{G(B);i}$  et  $S_{G(B);i}$  sont les taux de fécondité et survie de la classe d'âge  $i$  dans chaque cohorte  $G(B)$ . Les individus nés des pontes 2 présentent une sensibilité à l'uranium : **scénario 5a)** identique à  $G(B1)$  ou **scénario 5b)** identique à  $G(B5)$

Dans le **scénario 5a**, les néonates issus des classes d'âge  $i$  compris entre  $p$  et  $p+2$  (pontes 1) contribuent, quelle que soit la cohorte de la mère, à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte  $F1(B1)$ , tandis que les néonates des classes d'âge  $i \geq p+3$  contribuent à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte  $F1(B5)$ . Dans le **scénario 5b**, les néonates issus des classes d'âge  $i$  compris entre  $p$  et  $p+5$  (pontes 1 et 2) contribuent, de la même manière, à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte  $F1(B1)$ , tandis que les néonates des classes d'âge  $i \geq p+6$  sont alloués à l'effectif de la classe d'âge 1 de la cohorte  $F1(B5)$  (Figure 49).

Les matrices de transition A sont de dimension 88 x 88, de forme suivante:

**Scénario 5a**

$$A = \begin{array}{|c|c|c|c|} \hline S_{F0(B1)} & 0 & 0 & 0 \\ \hline 0 & S_{F0(B5)} & 0 & 0 \\ \hline R_{F0(B1); p \text{ à } p+2} & R_{F0(B5); p \text{ à } p+2} & S_{F1(B1)} + R_{F1(B1); p \text{ à } p+2} & R_{F1(B5); p \text{ à } p+2} \\ \hline R_{F0(B1); p+3 \text{ à } 22} & R_{F0(B5); p+3 \text{ à } 22} & R_{F1(B1); p+3 \text{ à } 22} & S_{F1(B5)} + R_{F1(B5); p+3 \text{ à } 22} \\ \hline \end{array}$$

**Scénario 5b**

$$A = \begin{array}{|c|c|c|c|} \hline S_{F0(B1)} & 0 & 0 & 0 \\ \hline 0 & S_{F0(B5)} & 0 & 0 \\ \hline R_{F0(B1); p \text{ à } p+5} & R_{F0(B5); p \text{ à } p+5} & S_{F1(B1)} + R_{F1(B1); p \text{ à } p+5} & R_{F1(B5); p \text{ à } p+5} \\ \hline R_{F0(B1); p+6 \text{ à } 22} & R_{F0(B5); p+6 \text{ à } 22} & R_{F1(B1); p+6 \text{ à } 22} & S_{F1(B5)} + R_{F1(B5); p+6 \text{ à } 22} \\ \hline \end{array}$$

où chaque sous-matrice de A est une matrice 22 x 22 telle que :



$$R_{G(B); p+6 \text{ à } 22} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & f_{G(B); p+6} & \dots & f_{G(B); 21} & f_{G(B); 22} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

## 2.4. Estimation de l'intervalle d'incertitude du lambda, par Bootstrap, sur les données observées

Dans tous les cas d'études, la distribution du lambda est déterminée en utilisant une méthode de Bootstrap, qui consiste à ré-échantillonner les observations. Pour les 2 types de données expérimentales mesurées (survie et fécondité), à chaque concentration et temps d'exposition, on réalise 3 tirages aléatoires, avec remises, parmi les 3 répliqués de nos observations. La construction des matrices de Leslie est réalisée à chaque concentration testée à partir de la moyenne quotidienne de ces tirages. Cette procédure est réalisée 5 000 fois, permettant ainsi d'obtenir une distribution des 5 000 valeurs de lambda dans chaque scénario et à chaque condition d'exposition.

## 2.5. Implémentation du DEBtox dans la dynamique de population

L'extrapolation des effets de l'uranium de l'individu à la population est également réalisée sur la base des sorties du modèle DEBtox estimé suivant les données issues des 3 générations (F0, F1 et F2 commencées avec des néonates B5) exposées aux conditions de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . L'approche DEBtox permet des prédictions sur la survie et la reproduction pour toute concentration en uranium comprise entre 0 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  intégrées ensuite dans les matrices de Leslie dans les *scenarii 1, 2 et 3*.

L'approche DEBtox n'est pas appliquée aux scenarii 4 et 5, les jeux de données des générations commencées avec des néonates B1 ayant été seulement acquis à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , ce qui représente une gamme de concentration insuffisante pour paramétrer le modèle.

### 2.5.1. Hypothèses d'application du DEBtox

Nous nous appuyons sur les conclusions des ajustements du DEBtox réalisés précédemment dans le chapitre 1 de cette partie à savoir que:

- la cinétique rapide de l'uranium dans les tissus de la daphnie permet de corréler la fonction de stress directement à la concentration externe, nous permettant ainsi de nous affranchir du modèle cinétique à compartiment ;
- parmi les différents mécanismes d'action possibles, l'inhibition de l'assimilation par l'uranium est privilégiée pour décrire les effets sur la croissance et la reproduction des daphnies.

### 2.5.2. Effet de l'uranium sur la survie

Pour décrire l'effet direct de l'uranium sur la survie des daphnies, nous considérons une fonction de stress  $\sigma_S$  telle que :

$$\begin{cases} \sigma_S(c_{\text{ext}}) = 0 & \text{si } c_{\text{ext}} < \text{NEC}_S \\ \sigma_S(c_{\text{ext}}) = b_S \cdot (c_{\text{ext}} - \text{NEC}_S) & \text{si } c_{\text{ext}} \geq \text{NEC}_S \end{cases}$$

où  $c_{\text{ext}}$  est la concentration externe en uranium,  $\text{NEC}_S$  est la concentration sans effet sur la survie et  $b_S$  le coefficient d'effet, estimés pour chaque génération. Par simplicité et homogénéité avec la fonction de stress appliquée à l'assimilation, on choisit d'exprimer  $\sigma_S$  en fonction de la concentration externe.

La fonction  $\sigma_S$  est appliquée aux taux de survie  $S_{G,i}$  des classes d'âge  $i$  de la génération  $G$ , de sorte que :

$$S_{G,i}(c_{\text{ext}}) = 1 - m(1 + \sigma_S(c_{\text{ext}}))$$

où  $m$  (compris entre 0 et 1) est le taux de mortalité du témoin (pour toute concentration d'uranium  $c_{\text{ext}} \leq \text{NEC}_S$ ).

### 2.5.3. Estimation de lambda et de son intervalle d'incertitude par Bootstrap

A partir des valeurs observées de taille, de reproduction et de survie, des tirages aléatoires avec remise en nombre équivalent au nombre de réplicats sont réalisés pour chaque concentration et temps d'exposition. Ceux-ci permettent de recréer 5 000 jeux de données par génération sur chacun desquels les paramètres du DEBtox sont ajustés. Les ajustements sont

effectués selon le critère des moindres carrés après pondération par la variance des données observées et le nombre d'observations pour donner le même poids aux données de taille et de reproduction dans le calcul de la somme des carrés des écarts. Pour chaque set de données, les paramètres  $\ell_p$ ,  $\ell_0$ ,  $\ell_{\max}$ ,  $\gamma$  et  $R_{\max}$  sont estimés à partir des valeurs de taille et reproduction des daphnies non exposées, puis les paramètres de la fonction de stress de l'assimilation  $b_A$ ,  $NEC_A$  à partir des valeurs mesurées chez les daphnies exposées. Les paramètres de la fonction de survie ( $m$ ,  $b_S$ ,  $NEC_S$ ) sont ajustés en même temps sur les valeurs issues des contrôles et daphnies exposées.

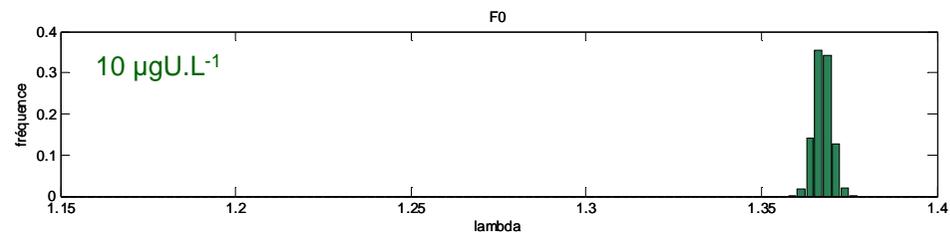
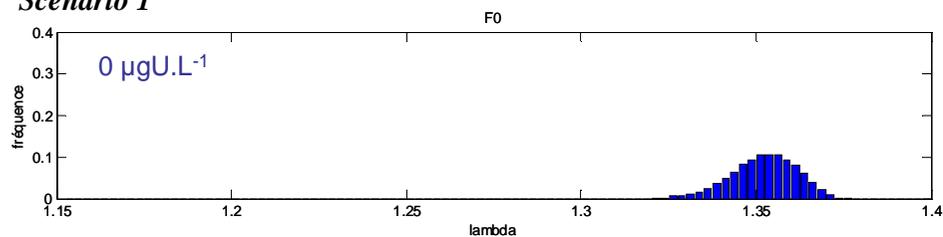
A partir de la distribution conjointe des paramètres ajustés, on alimente les matrices de Leslie des *scenarii 1, 2 et 3* avec les prédictions de reproduction et survie de chaque génération à toute concentration d'uranium comprise 0 à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (avec un incrément de 1  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ). Dans chaque scénario et à chaque concentration d'uranium, on obtient ainsi 5 000 valeurs du taux de croissance asymptotique dont on tire la moyenne et les valeurs correspondantes aux 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> percentiles, ainsi que la probabilité d'extinction de la population correspondant à la proportion des valeurs de  $\lambda$  inférieures à 1.

## 2.6. Résultats

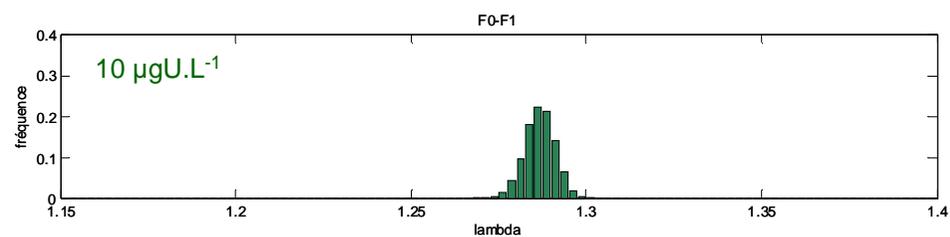
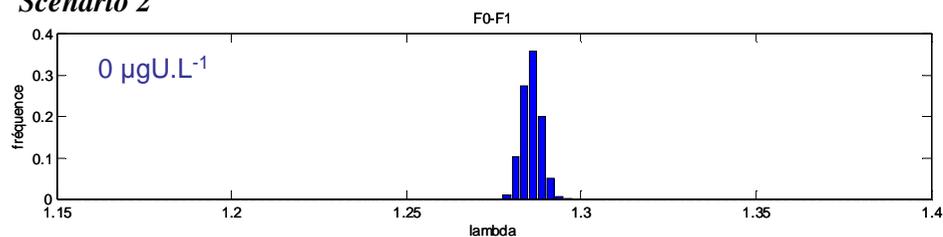
### 2.6.1. Dynamique de population dans le cas d'une exposition à l'uranium sur 1, 2 ou 3 générations successives (sans distinction de la sensibilité entre les individus B1 et B5)

Pour chaque condition d'exposition et chaque scénario d'étude, le taux de croissance asymptotique de la population est supérieur à 1, suggérant un accroissement des populations sur le long terme (Figures 50 et 51, Tableau 14).

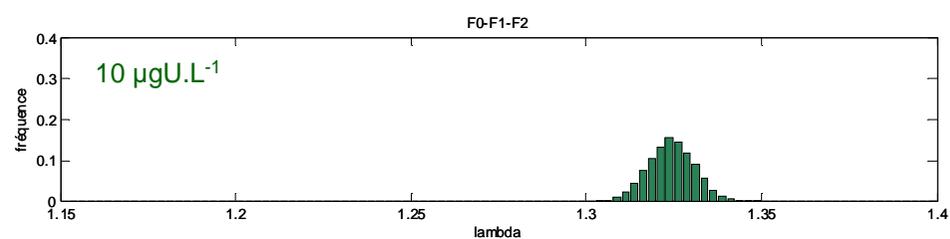
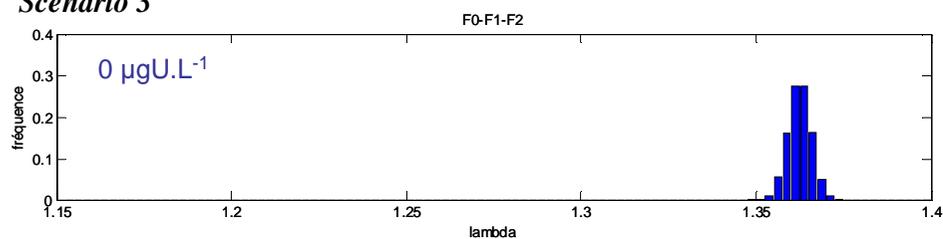
**Scénario 1**



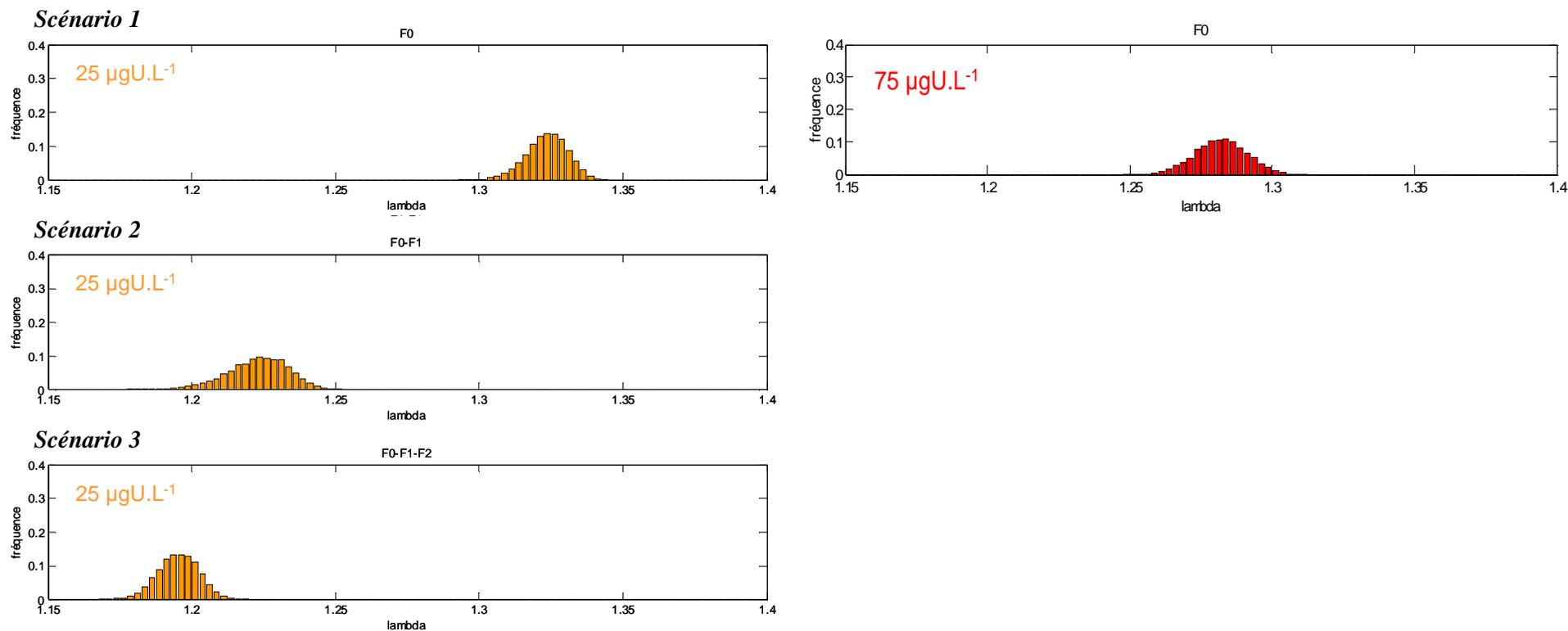
**Scénario 2**



**Scénario 3**



**Figure 50 :** distribution du taux de croissance asymptotique de la population ( $\lambda$ ) lors d'une exposition à l'uranium sur une, deux ou trois générations (scenarii 1, 2 et 3), à 0 et 10  $\mu\text{gU.L}^{-1}$



**Figure 51 :** distribution du taux de croissance asymptotique de la population ( $\lambda$ ) lors d'une exposition à l'uranium sur une, deux ou trois générations (scenarii 1, 2 et 3) à 25 et 75 µgU.L<sup>-1</sup>

	condition d'exposition	moyenne	intervalle de confiance à 95%		seuil de rejet
<b>Scénario 1</b> (F0)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3524	1.3331	1.3678	
	10 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3675	1.3629	1.3722	0.9594
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3235	1.3089	1.3368	0.0068
	75 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2820	1.2630	1.2998	0
<b>Scénario 2</b> (F0-F1)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2858	1.2809	1.2911	
	10 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2867	1.2780	1.2947	0.5744
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2230	1.1998	1.2407	0
<b>Scénario 3</b> (F0-F1-F2)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3625	1.3558	1.3688	
	10 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3242	1.3118	1.3362	0
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.1953	1.1811	1.2090	0

**Tableau 14 :** récapitulatif des moyennes, intervalles de confiance à 95% et seuil de rejet du test unilatéral des taux de croissance asymptotique de la population dans le cas d'une exposition à l'uranium à 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  sur une, deux ou trois générations successives (scenarii 1, 2 et 3) sans distinction de sensibilité entre individus B1 et B5

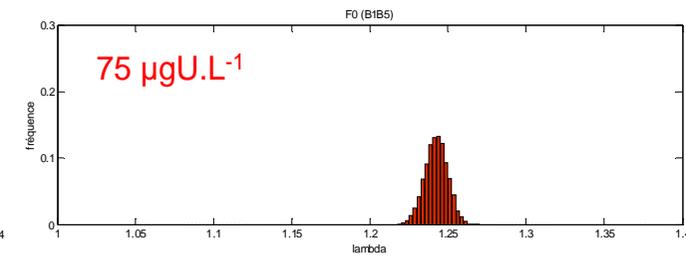
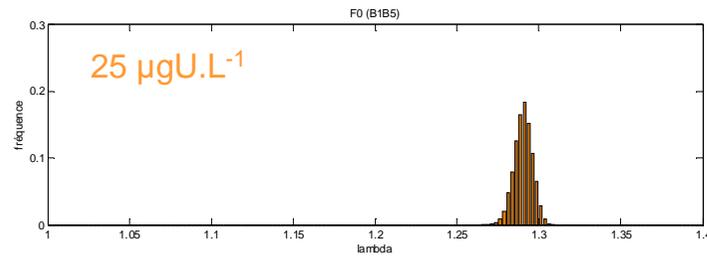
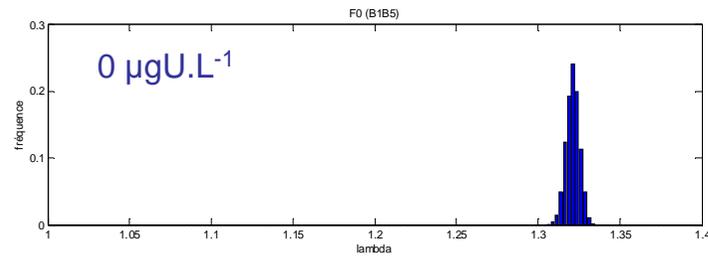
Dans le **scénario 1** (exposition sur une génération, F0), en absence d'uranium, le taux de croissance asymptotique de la population est de  $1.35 \text{ j}^{-1}$ . Ce taux diminue pour des concentrations en uranium supérieures à  $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  et il devient significativement différent de la condition témoin à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$ . Dans le **scénario 2** (exposition sur 2 générations, F0 et F1), le taux de croissance de la population est de  $1.28 \text{ j}^{-1}$  en condition témoin. Cette réduction du taux de croissance de la population, chez les témoins, entre les **scenarii 1 et 2** s'explique par un retard de reproduction observé dans la génération F1. En effet, dans la génération F1, les daphnies libèrent leurs premiers néonates à 12 jours en moyenne contre 9.6 jours dans la génération F0. Cette réduction de croissance de la population est rattrapée lorsque l'on considère la croissance de la population dans le **scénario 3** (exposition sur trois générations, F0, F1 et F2),  $\lambda$  étant égal à  $1.36 \text{ j}^{-1}$ .

L'extrapolation des effets observés au niveau individuel au niveau de la population en utilisant des matrices de Leslie à partir des données observées montrent une réduction du taux de croissance asymptotique de la population, significative à des concentrations de plus en plus faibles avec l'augmentation du nombre de générations considérées. Ainsi, dans le **scénario 2** un retard du taux de croissance asymptotique de la population, significativement différent de la condition témoin, est observé pour une concentration d'exposition de  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$ , tandis que celui-ci devient significatif dès  $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans le **scénario 3** (exposition sur 3 générations).

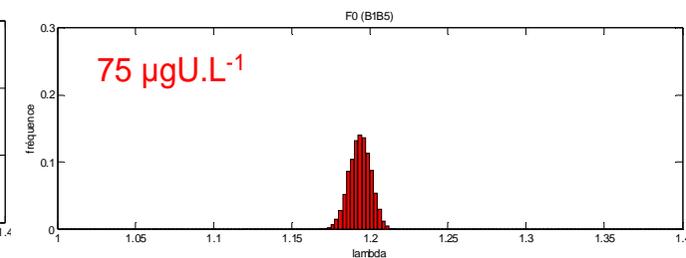
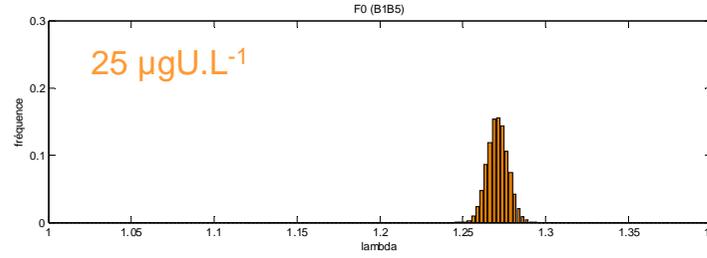
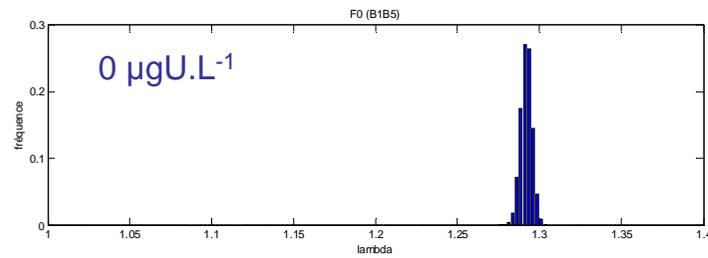
### 2.6.2. Dynamique de population dans le cas d'une exposition à l'uranium sur 1 ou 2 générations successives, avec distinction de la sensibilité entre individus B1 et B5

La prise en compte de la sensibilité des cohortes issues de B1 dans la dynamique de population met en évidence une réduction plus importante du taux de croissance asymptotique avec la concentration en uranium et au travers des générations (Figure 52 et Tableau 15), par rapport au cas où la sensibilité de tous les individus est considérée identique à celle de B5.

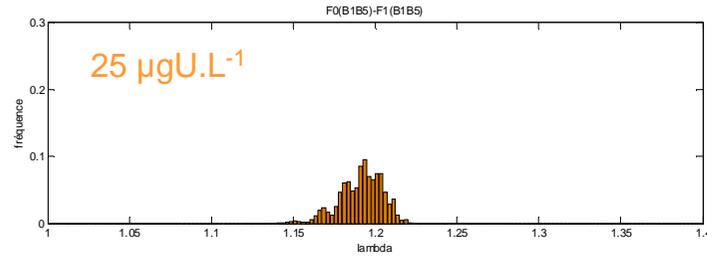
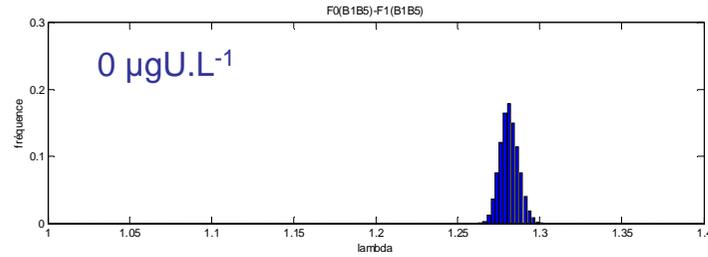
Scénario 4a



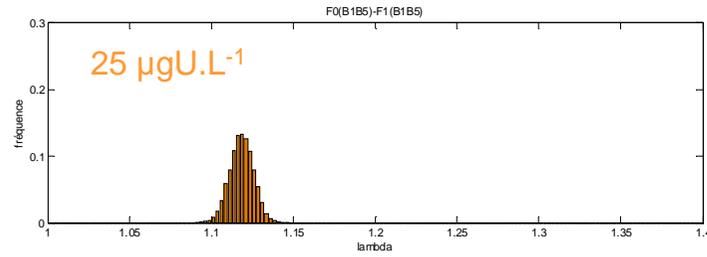
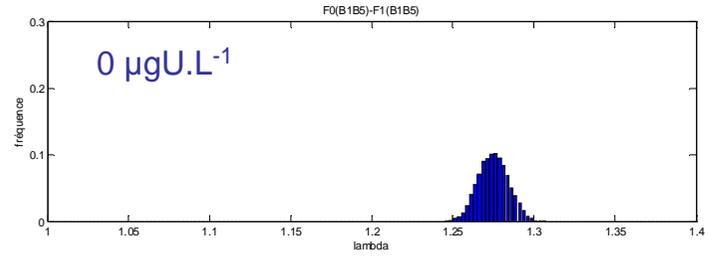
Scénario 4b



Scénario 5a



Scénario 5b



**Figure 52 :** distribution du taux de croissance asymptotique de la population lors d'une exposition à l'uranium sur une ou deux générations (scenarii 4 et 5) à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  où les individus issus de la ponte B2 ont une sensibilité équivalente à celle des cohortes issues de B5 (scenarii 4a et 5a) ou B1 (scenarii 4b et 5b)

	condition d'exposition	moyenne	intervalle de confiance à 95%		seuil de rejet
<b>Scénario 4a</b> (F0, B2=B5)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.3211	1.3129	1.3291	
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2904	1.2787	1.3006	0
	75 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2423	1.2279	1.2564	0
<b>Scénario 4b</b> (F0, B2=B1)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2921	1.2852	1.2986	
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2707	1.2587	1.2833	0.0022
	75 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.1938	1.1804	1.2068	0
<b>Scénario 5a</b> (F0-F1, B2=B5)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2815	1.2711	1.2934	
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.1916	1.1642	1.2126	0
<b>Scénario 5b</b> (F0-F1, B2=B1)	0 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.2750	1.2577	1.2935	
	25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$	1.1187	1.1037	1.1329	0

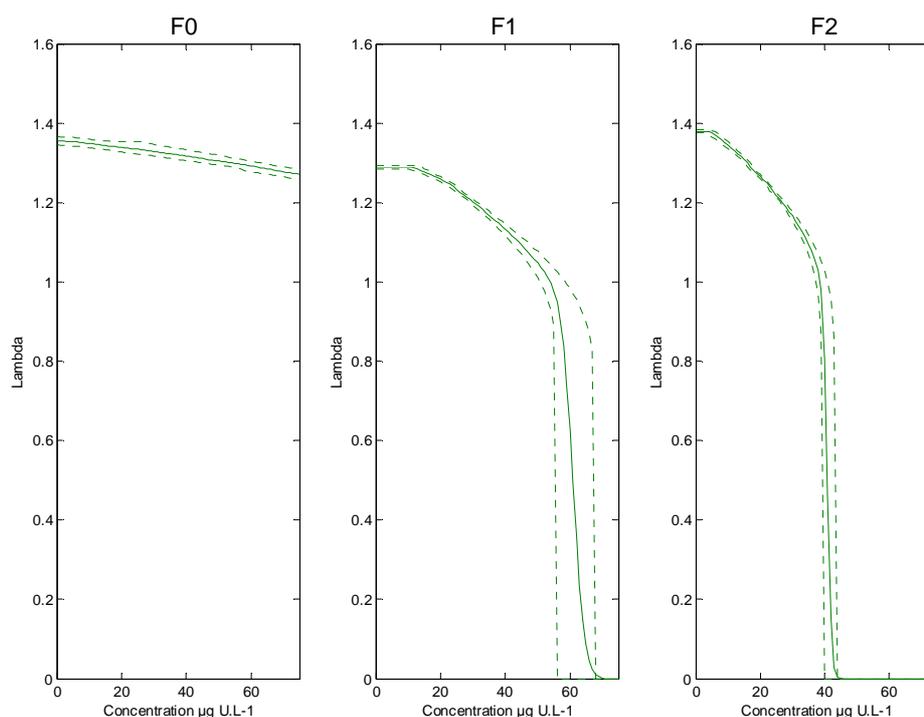
**Tableau 15 :** récapitulatif des moyennes, intervalles de confiance à 95% et seuil de rejet du test unilatéral des taux de croissance asymptotique de la population dans le cas d'une exposition à l'uranium à 0, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  sur 1 ou 2 générations (scenarii 4 et 5), où les individus issus de la ponte B2 ont une sensibilité équivalente à celle des cohortes issues de B5 (scenarii 4a et 5a) ou B1 (scenarii 4b et 5b)

Lorsque l'on considère une exposition à l'uranium sur une génération (scenarii 4a et 4b), le fait de considérer la sensibilité des daphnies nées de B2 comme équivalente à celles des individus B1 ou B5, induit une différence significative du taux de croissance asymptotique de la population à 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Les valeurs prédites sont logiquement plus ou moins faibles selon que l'on attribue aux individus B2 une sensibilité égale à celle des daphnies issues de B1 ou à celle issues de B5 ( $\lambda = 1.19 \text{ j}^{-1}$  contre  $1.24 \text{ j}^{-1}$  à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ). Quand on considère une exposition à l'uranium sur deux générations (scenarii 5a et 5b), l'attribution aux individus B2 d'une sensibilité égale à celle des daphnies issues de B1 induit une réduction significative du taux de croissance asymptotique de la population à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  ( $\lambda = 1.12 \text{ j}^{-1}$ ) par rapport à celui déterminé sous l'hypothèse que les individus B2 ont une sensibilité similaires aux individus B5 ( $\lambda = 1.19 \text{ j}^{-1}$ ). Ce taux de croissance asymptotique de la population égal à  $1.12 \text{ j}^{-1}$  est le plus faible de toutes les conditions d'exposition de tous les scenarii. Les valeurs de lambda n'ont pas été déterminées à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans le cas de simulations sur deux générations, du fait d'une extinction des individus dans la deuxième génération.

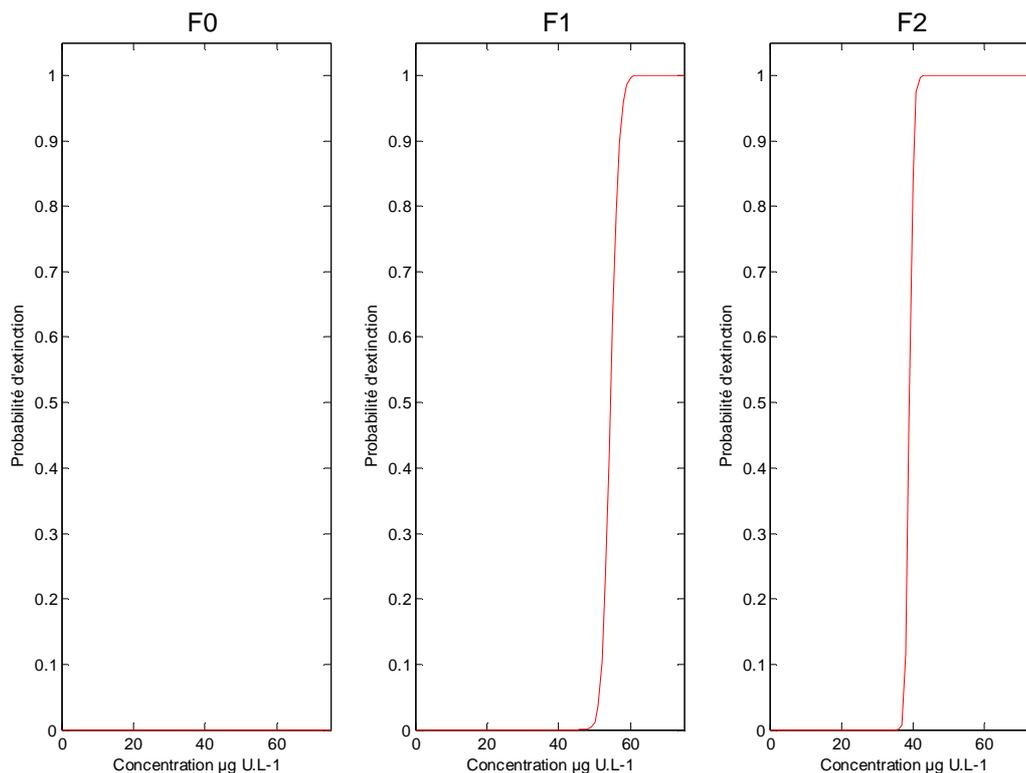
Ces différents cas d'étude montrent l'importance de prendre en compte les individus les plus sensibles et l'exposition à un contaminant sur plusieurs générations dans les dynamiques de population chez *Daphnia magna*.

### 2.6.3. Etude de la dynamique de population en combinant modèles DEBtox et modèles matriciels

L'intégration des modèles DEBtox dans la dynamique de population, en prenant en compte la sensibilité des daphnies nées de pontes B5 comme représentative de toutes les pontes, permet de déterminer l'évolution du taux de croissance asymptotique de la population sur un continuum de concentrations en uranium, de 0 à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , avec un pas de concentration de 1  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (Figure 53). Les résultats montrent que la valeur du lambda décroît avec la concentration en uranium, la décroissance s'accroissant au travers des générations. Ainsi, celle-ci varie de 1.36  $\text{j}^{-1}$  à 1.27  $\text{j}^{-1}$  dans la génération F0, de 1.29  $\text{j}^{-1}$  à 0  $\text{j}^{-1}$  dans F1 et de 1.38  $\text{j}^{-1}$  à 0  $\text{j}^{-1}$  dans la génération F2.



**Figure 53 :** évolution du taux moyen de croissance asymptotique de la population et de son intervalle de confiance à 95% sur les trois générations de *Daphnia magna* (F0, F1 et F2) en fonction de la concentration d'exposition en uranium, avec effets de l'uranium sur l'assimilation et la mortalité



**Figure 54 :** Probabilité d'extinction de la population sur les trois générations de *Daphnia magna* (F0, F1 et F2) en fonction de la concentration d'exposition en uranium, avec effets de l'uranium sur l'assimilation et la mortalité

Dans la génération F0, la population survit quelle que soit la concentration d'exposition en uranium sur la gamme testée. Dans la génération F1 en revanche, l'extinction de la population ( $\lambda < 1$ ) a lieu à des concentrations en uranium variant de 51 à 59  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  (Figure 54). A partir de 62  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , la population meurt instantanément ( $\lambda = 0$ ). Dans la troisième génération (F2), l'extinction de la population survient à des concentrations en uranium comprises entre 39 et 41  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  et la mort instantanée de la population a lieu à partir de 44  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ .

## 2.7. Discussion

### 2.7.1. Apport de l'étude des effets au niveau populationnel

Les modèles de dynamique de population ont l'avantage d'intégrer les effets létaux et sub-létaux de contaminants observés au niveau individuel (**Forbes et Calow, 1999; Caswell, 2001**). **Forbes et Calow (1999)** et **Stark et al. (1997)** montrent que le taux d'accroissement de la population intégrant les réponses individuelles d'un toxique au niveau de la population est un meilleur critère d'effet écotoxicologique des réponses de population en comparaison à un critère d'effet au niveau individuel.

Dans le cas d'une exposition à l'uranium chez *D. magna*, les critères affectés sont multiples. A titre d'exemple, une mortalité de 15 et 3% est observée à 25 µgU.L<sup>-1</sup> dans les deuxième (F1) et troisième générations (F2). Concernant la reproduction des daphnies à cette même concentration d'exposition, des retards dans la libération de la première ponte de 0.7, 1.9 et 5 jours sont constatés dans F0, F1 et F2, tandis que la fécondité est réduite de 25 et 42% dans F1 et F2. Si les expérimentations permettent de déterminer quel trait de l'individu est le plus sensible au toxique, il est toutefois difficile de savoir dans quelle mesure il contribue le plus à la réponse de la population et ce, plus particulièrement sur plusieurs générations. Des analyses de sensibilité permettent de déterminer la contribution relative de chaque paramètre au taux de croissance de la population. Ainsi, **Billoir et al. (2007)** montrent que les taux de survie de *D. magna* exposée au cadmium ont un effet modéré sur le taux de croissance asymptotique de la population tandis que le taux de fécondité contribue fortement à la variation du taux de croissance de la population pour des concentrations en cadmium supérieures à la NEC pour la reproduction. **Alonzo et al. (2008b)** montrent qu'une réduction de fécondité et un retard de reproduction ont plus d'effet sur la croissance de la population qu'une augmentation de la mortalité chez la daphnie exposée à 1<sup>241</sup>Am. Ces études confirment donc que l'impact d'un stress au niveau de la population dépend, en condition chronique, du trait d'histoire de vie qui est affecté, ce qui remet en cause la validité du trait individuel le plus sensible comme seul critère de protection d'une espèce vis-à-vis d'un toxique.

### 2.7.2. L'apport des études multigénérationnelles dans l'extrapolation des effets au niveau populationnel

Bien que de nombreuses études recourent à la modélisation pour extrapoler les effets de contaminants de l'individu à la population, il y a très peu d'exemples où ces extrapolations reposent sur des données d'effets obtenues lors d'expositions continues sur plusieurs générations. Pourtant les expositions dans l'environnement peuvent excéder la longévité des individus, ce qui implique que plusieurs générations successives sont soumises à la contamination. La plupart des études multigénérationnelles se limitent à étudier les altérations de profils génétiques ou le développement de phénomènes d'acclimatation ou adaptation (Vandegheuchte *et al.*, 2010 ; Muysen et Janssen, 2004 ; Postma et Davids, 1995). Or ces processus sont susceptibles de modifier les réponses au niveau de la population (Klerks et Weiss, 1987), ce qui n'est jamais évalué. En effet, certaines populations d'espèces répondent à des pressions de sélection en augmentant leur résistance aux contaminants. D'autres au contraire montrent une sensibilité accrue au fil des générations. Ainsi, les études multigénérationnelles appréhendent une échelle de temps beaucoup plus pertinente vis-à-vis des réponses à long terme de populations devant faire face à un stress (Janssen *et al.*, 2000) et devraient étayer toute prise de décisions concernant les niveaux acceptables de contaminants assurant la protection des écosystèmes.

Nos simulations montrent une augmentation de la toxicité de l'uranium au travers des générations, au niveau de la population. En effet, le taux de croissance asymptotique de la population est significativement réduit à  $75 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pour la première génération (F0), et à partir de 25 et  $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pour les deuxième (F1) et troisième générations (F2), respectivement. Cette réduction du taux de croissance asymptotique pour des concentrations en uranium de plus en plus faibles est le résultat d'une aggravation des effets de l'uranium sur les traits physiologiques, la survie, la croissance et la reproduction. De la même manière, Alonzo *et al.* (2008b) utilisent des matrices de Leslie pour modéliser la croissance de la population de *D. magna* exposée à l' $^{241}\text{Am}$ . Les auteurs mettent en évidence une augmentation du retard de croissance de la population pour atteindre 1 million d'individus dans le cas de simulation sur trois générations en comparaison à des simulations sur une génération. Ces résultats soulignent donc l'importance de reconnaître que les conséquences au niveau de la population sur le long terme ne peuvent être prédites par les effets observés sur la première génération.

### 2.7.3. L'intégration des modèles de budget énergétique dans des dynamiques de population

Connaître le mode d'action d'un contaminant est crucial en écotoxicologie pour améliorer notre connaissance des effets de polluants sur les écosystèmes et pour construire des outils pertinents à appliquer dans l'évaluation du risque écologique de toxiques et de sites pollués (**Escher et Hermens, 2002**). En couplant les modèles DEBtox aux matrices de Leslie, nous avons eu la possibilité de lier les effets de l'uranium sur la survie, la croissance et la reproduction à la dynamique de population. De plus, cette combinaison permet de déterminer le taux de croissance de la population aux valeurs intermédiaires de la gamme de concentrations en uranium.

L'approche nous a ainsi permis d'évaluer, avec son intervalle d'incertitude, la concentration en uranium à laquelle l'extinction de la population a lieu lorsque les valeurs prédites de  $\lambda$  deviennent inférieures à 1. L'extinction n'intervient pas dans la génération F0, mais elle est prédite pour des concentrations en uranium comprises entre 51 et 59  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  et entre 39 et 41  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ , dans F1 et F2 respectivement. Ces résultats reflètent une nouvelle fois l'aggravation de la toxicité de l'uranium au travers des générations.

**Billoir et al. (2009)** utilisent les données d'effet de cyanobactéries sur le cladocère *Moina micrura* (**Ferrão-Filho et Azevedo, 2003**). Ces derniers déterminent, à partir des valeurs expérimentales un taux de croissance de la population de  $1.043 \text{ j}^{-1}$  pour une concentration d'exposition en cyanobactéries de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de carbone organique. Mais, la combinaison des modèles DEBtox et matrice de Leslie employée par **Billoir et al. (2009)** aboutit à des prédictions plus pessimistes. En effet, celles-ci indiquent une extinction de la population à cette même concentration d'exposition en utilisant les modèles de maintenance et d'assimilation. Ces auteurs suggèrent que l'interprétation de données acquises à une concentration d'exposition déterminée pourrait être moins fiable que les prédictions de l'approche DEBtox, qui prend en compte toutes les concentrations d'expositions simultanément. De plus, d'après les auteurs le choix du mode d'action influence fortement la concentration au-delà de laquelle la population est susceptible de s'éteindre, le seuil de concentration variant de  $0.75$  à  $1.2 \text{ mg.L}^{-1}$  de carbone organique selon le mécanisme d'action considéré. Le recours à l'inférence Bayésienne s'avère, cependant, indispensable pour ajuster simultanément l'ensemble des paramètres du modèle et des conditions d'exposition (y compris le contrôle). Dans notre étude, l'estimation des paramètres de croissance et de

reproduction a été réalisé avant celui des paramètres toxicocinétiques, ce qui conduit à considérer la situation témoin et les conditions d'exposition séparément.

#### 2.7.4. L'importance de la sensibilité des individus dans des dynamiques de population

La sensibilité des individus étant variable selon les stades de développement (**Ingersoll et al., 1995**), les contaminants vont avoir des effets différents en fonction du stade de vie de l'organisme, suggérant que la réponse de la population peut être différente avec la structure en âge de la population (**Emlen et Springman, 2007**). Dans ce contexte, les modèles matriciels sont en effet particulièrement pertinents car la structure de la population peut être découpée en classe d'âge où les taux vitaux (survie et fécondité) sont spécifiques à chaque classe d'âge.

Au travers de nos simulations, nous avons montré l'importance de faire une distinction entre les individus nés de premières pontes des autres pontes plus âgées. En effet, l'introduction de cohortes de sensibilité équivalentes aux individus nés de B1 et de B5 dans les dynamiques de population révèle une réduction du taux de croissance asymptotique de la population. Dans le cas de simulations sur une génération (F0), une diminution de 2.5% du  $\lambda$  est observée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  lorsque l'on considère la sensibilité des individus nés de B2 identique aux daphnies issues de B5 (**scénario 4a**), par rapport au cas où la sensibilité de tous les individus est analogue à celle de B5 (**scénario 1**). Ces effets sont beaucoup plus importants lorsque les individus de B2 sont supposés avoir une sensibilité égale à celle des individus de B1. De fait, une diminution de 4% du taux de croissance asymptotique de la population est observée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  en comparant les  $\lambda$  déterminés dans les **scenarii 4b et 2**. De plus, les taux de croissance asymptotique de la population sont beaucoup plus impactés dans le cas de simulations sur deux générations (F0-F1). Ainsi, une réduction de 2.6% est observée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans le cas où les individus de la ponte B2 ont une sensibilité équivalente à B5 (**scénario 5a**) en comparaison au cas où la sensibilité de tous les individus est considérée identique à celle de B5 (**scénario 2**). En confrontant les  $\lambda$  calculés dans le **scénario 5b** (sensibilité B2 = B1) et le **scénario 2** une diminution de 8.5% du taux de croissance asymptotique de la population est observée à 25  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ .

Nos résultats montrent donc l'importance de considérer les individus de premières pontes, plus sensibles à un toxique comme l'uranium, dans les dynamiques de population d'une espèce comme *Daphnia magna*.

Différentes études ont mis en évidence que la survie des stades juvéniles d'espèces est le critère auquel la population est la plus sensible. C'est le cas dans la population du gastropode *Valvata piscinalis* exposé au zinc (Ducrot *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres gastropodes exposés au cadmium comme *Potamopyrgus antipodarum* (Jensen *et al.*, 2001) et *Biomphalaria glabrata* (Salice *et al.*, 2003) suggérant que le taux de survie des juvéniles pourrait être un paramètre clé pour comprendre la réponse de ces populations aux contaminants.

La probabilité d'extinction, prédite en utilisant les modèles DEBtox, n'a pas été déterminée aux dynamiques de population où une distinction de sensibilité entre les individus nés de premières pontes des autres pontes plus âgées est prise en compte. Toutefois, une réduction de 8.5% du taux de croissance de la population (cas d'une exposition à  $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  sur deux générations où les individus B2 ont une sensibilité analogue aux individus B1) entraînerait l'extinction des populations à des concentrations plus faibles en uranium, comprises entre 43 et  $48 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pour F1 et 34 et  $37 \mu\text{gU.L}^{-1}$  pour F2.

## CONCLUSIONS DE LA PARTIE C

### De l'individu à la population

L'intégration des données de croissance et de reproduction, acquises expérimentalement dans le cadre de l'exposition à l'uranium sur trois générations successives de *Daphnia magna*, dans des modèles DEBtox confirme qu'une inhibition de l'assimilation peut à elle seule expliquer l'ensemble des effets induits par l'uranium.

D'après nos ajustements, les taux d'élimination de l'uranium correspondent à des cinétiques rapides, suggérant un effet immédiat de l'uranium ingéré au contact de la paroi du tube digestif des daphnies.

La comparaison des constantes d'élimination de l'uranium prédites par les simulations DEBtox et des constantes d'élimination déterminées à partir des données de bioaccumulation montre que la fraction biologiquement active de l'uranium n'est pas proportionnelle à l'uranium total bioaccumulé. De plus, la cinétique d'accumulation de l'uranium chez la daphnie n'est pas aussi simple que supposée dans la théorie DEBtox qui utilise un modèle toxico-cinétique simple, à un compartiment.

Indépendante du temps d'exposition, commune à différents processus biologiques et ne correspondant pas forcément à une des concentrations testées, la NEC est une alternative à la détermination de concentrations sans effet. Nos valeurs moyennes de NEC de 9.37, 8.21 et 2.31  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  et de  $b$  de 0.0027, à 0.0068 et 0.0137  $\mu\text{gU}^{-1}\cdot\text{L}$  estimées, respectivement, pour les générations F0, F1 et F2, reflètent l'augmentation de la toxicité de l'uranium au travers des générations.

Au niveau populationnel, les simulations montrent une augmentation de la sévérité des effets de l'uranium au travers des générations, avec des taux de croissance asymptotique de la population significativement réduits à 75  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  dans F0, à 25  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  dans F1 et dès 10  $\mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  dans F2. Ces résultats soulignent que les effets potentiels au niveau de la population prédits pour des expositions à long terme ne sont pas nécessairement prédits par les effets observés sur la première génération.

La prise en compte des données acquises sur des daphnies issues des premières pontes montre l'importance de considérer les individus les plus sensibles dans des dynamiques de population.

Les traits d'histoire de vie ayant une sensibilité différente à un contaminant, la réponse de la population face à un stress n'est pas forcément un reflet des effets du toxique sur le paramètre le plus sensible. Il est nécessaire de savoir dans quelle mesure chaque critère individuel contribue au taux de croissance de la population.

La combinaison des modèles DEBtox et des matrices de Leslie montre la réduction du taux de croissance de la population pour des concentrations en uranium variant de 0 à 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Avec l'aggravation des effets de l'uranium au travers des générations, l'extinction de la population a lieu à partir de la deuxième génération à une concentration de 51  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  et dans la troisième génération à une concentration de 39  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ .

Sous l'effet d'un stress toxique, des facteurs tels que :

- le trait d'histoire de vie qui contribue le plus au taux de croissance asymptotique de la population ;
  - l'aggravation des effets au travers des générations ;
  - la prise en considération des individus les plus sensibles
- jouent des rôles importants dans la détermination de la réponse des populations. Néanmoins, tous ces effets peuvent être intégrés dans un unique paramètre, le taux de croissance de la population, qui est le critère d'effet le plus robuste dans l'évaluation du risque écologique.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Ce projet de recherche visait à apporter de nouvelles connaissances relatives à la toxicité de l'uranium appauvri sur une espèce représentative des écosystèmes aquatiques d'eau douce, *Daphnia magna*. La démarche a consisté à mettre en évidence sous différentes conditions expérimentales d'exposition à l'uranium, des perturbations de l'histoire de vie et de la physiologie de l'individu. Les effets observés ont ensuite été intégrés dans un modèle de budget énergétique DEBtox. Enfin, les altérations de la survie et de la reproduction de l'individu ont été extrapolées à l'aide de modèles matriciels à l'échelle de la population, niveau d'organisation plus pertinent d'un point de vue écologique.

## **1. Conclusions sur les effets de l'uranium chez *Daphnia magna***

### **1.2. Au niveau de l'individu**

Nos mesures physiologiques (réductions significatives des taux d'assimilation du carbone et absence d'effet de l'uranium sur les taux respiratoires taille spécifique) viennent confirmer les observations par microscopie optique (dommages importants des cellules de la paroi du tube digestif). Ces éléments nous ont permis d'identifier le mode d'action de l'uranium chez *D. magna*. L'uranium affecte donc l'acquisition d'énergie au travers de perturbations de l'assimilation de la nourriture. Les ajustements DEBtox ont montré qu'une réduction de la nutrition est suffisante pour expliquer l'ensemble des effets observés sur la croissance et la reproduction des daphnies.

L'exposition des daphnies sur trois générations successives a révélé une augmentation de la sévérité des effets de l'uranium sur la nutrition, la survie, la croissance somatique et la reproduction au travers des générations exposées. Bien que *D. magna* soit capable de développer une résistance face à une exposition à certains métaux ou pesticides, nos résultats révèlent que les daphnies ne peuvent pas s'adapter à la présence d'uranium sur trois générations. Ces conclusions montrent la nécessité de conduire des tests multigénérationnels pour l'évaluation du risque écologique et suggèrent que la toxicité chronique de l'uranium évaluée sur une génération de daphnies (tests 21 jours) sous-estime largement le risque encouru sur un plus long terme. Nos résultats ont aussi montré que la progéniture née de

mères exposées en continu à des concentrations en uranium  $\leq 25 \mu\text{gU.L}^{-1}$  a une capacité à se restaurer dans un milieu non contaminé.

L'exposition des œufs à l'uranium pendant l'embryogénèse pourrait expliquer partiellement l'augmentation de l'intensité des effets mise en évidence au niveau de la croissance somatique et de la reproduction entre les générations F0 et F1 exposées dans les mêmes conditions. Toutefois, elle n'explique pas l'aggravation de la mortalité observée dans la deuxième génération. Alors que les mesures de bioaccumulation ont montré que les ovaires agissent comme une barrière contre un transfert maternel d'uranium, ces conclusions suggèrent que la poche incubatrice n'est pas totalement imperméable à l'uranium pour les œufs pondus, du fait d'échanges avec le milieu environnant.

Nos résultats ont enfin mis en évidence que les individus de la ponte B1 étaient beaucoup plus sensibles à la toxicité de l'uranium que les individus issus de la ponte B5. De même, les effets sont beaucoup plus sévères dans la deuxième génération que dans la première génération et ce, aussi bien sur la survie, la croissance que sur la reproduction. Ces observations remettent en cause la pertinence écologique des recommandations de l'OCDE, qui imposent de ne pas utiliser les néonates de premières pontes pour les tests d'écotoxicité chez *Daphnia*.

## 1.2. Au niveau de la population

L'application de nos données de survie et de fécondité aux modèles matriciels a permis de quantifier les conséquences de l'augmentation de la toxicité de l'uranium au travers des générations, à l'échelle de la population. L'approche souligne le fait que l'impact au niveau de la population ne peut pas nécessairement être prédit par les effets observés sur la première génération. De plus, la prise en considération des individus issus des premières pontes a révélé l'influence des individus les plus sensibles sur le taux de croissance asymptotique de la population. Ces résultats montrent l'importance de ne pas négliger les individus les plus sensibles dans la détermination de valeurs de référence pour la protection de l'environnement.

La combinaison des modèles DEBtox et des matrices de Leslie a permis de faire un lien entre les perturbations des fonctions physiologiques et les conséquences sur la dynamique de population. Elle prédit une réduction du taux de croissance asymptotique de la population

dans la première génération, et l'extinction de la population pour des concentrations d'uranium de  $51 \mu\text{gU.L}^{-1}$  et de  $39 \mu\text{gU.L}^{-1}$  dans les deuxième et troisième générations, respectivement.

## 2. Perspectives de recherche

Des mesures d'activités d'enzymes digestives telles que la cellulase, l'amylase, la  $\beta$ -galactosidase, la trypsine et l'estérase pourraient apporter des informations complémentaires sur les cibles de l'uranium à l'origine de la diminution d'assimilation de la nourriture chez *D. magna*.

Les effets de l'uranium ont été étudiés dans des conditions de nourriture *ad libitum*, correspondant à un taux d'ingestion de la nourriture maximale. Dans l'environnement, les organismes sont pourtant constamment soumis aux variations de l'abondance de la nourriture, facteur environnemental rarement pris en compte, bien qu'il joue un rôle prépondérant dans la capacité des individus à faire face à un stress toxique. Afin de gagner en réalisme écologique, cette variabilité pourrait être incluse dans les équations du DEBtox au travers du paramètre  $f$  qui a été fixé à 1 dans nos ajustements. L'uranium agissant au niveau de la nutrition, il serait intéressant d'étudier expérimentalement les effets de l'uranium combinés à des variations du niveau de nourriture, afin d'examiner au préalable si la toxicité de l'uranium est influencée par la réponse ingestive de *D. magna*.

Faute de données suffisantes, le modèle DEBtox n'a pas pu être ajusté aux générations commencées avec des néonates B1 plus sensibles. Il serait intéressant de compléter le jeu de données dans le but de paramétrer le DEBtox sur les individus les plus fragiles de *D. magna*.

L'application du DEBtox à d'autres radionucléides, dont la toxicité radiologique prédomine sur la toxicité chimique, apporterait des connaissances supplémentaires et serait un outil puissant pour l'évaluation du risque écologique lié à la présence ou au rejet de substances radioactives.

Dans notre étude, les simulations en régime asymptotique ont été réalisées en considérant une exposition continue des daphnies. Dans l'environnement, les rejets de

contaminants peuvent être épisodiques. C'est le cas lors de l'accident de l'usine de Socatri du Tricastin (**Gagnaire *et al.*, accepté**) où le pic de concentration d'uranium dans la Gaffière, a été mesuré 6 heures après le déversement. Deux jours après le début de l'accident, la totalité de l'uranium déversé avait disparu de la rivière. Pour être plus réaliste, il serait intéressant de d'étudier le régime transitoire de la dynamique de population lors d'un tel événement.

Dans le cas de *Daphnia* exposée à l'uranium, l'utilisation de l'inférence Bayésienne permettrait d'ajuster simultanément l'ensemble des paramètres du modèle DEBtox en tenant compte de l'ensemble des conditions d'exposition (y compris le contrôle) afin de déterminer l'incertitude sur les paramètres en vue d'une extrapolation robuste des effets toxiques de l'individu à la population.

Une partie des travaux présentés dans ce mémoire a fait l'objet de publications ou de communications :

- **Publications**

**Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L. et al. (2010)** *Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of Daphnia magna over three successive generations.* Aquatic Toxicology. **99**(3): p. 309-319.

**Massarin S., Beaudouin R., Zeman F. et al. (en préparation)** Biology-based modelling to assess mode of action and effects of uranium on *Daphnia magna* in a multi-generation study. Environmental Science and Technology.

**Billoir E., Biron P.A., Massarin S. et al. (en préparation)** A population model to extrapolate uranium effects observed in *Daphnia magna* over three successive generations.

- **Communications orales**

**Massarin S., Alonzo F., Dutilleul M. et al. (2009)** Effects of multigenerational uranium exposure on life history and energy budget of *Daphnia magna*. 14<sup>th</sup> International Symposium on Toxicity Assessment. (Metz, France)

**Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L. et al. (2010)** Effets d'une exposition chronique à l'uranium sur les traits d'histoire de vie et la physiologie de *Daphnia magna* sur trois générations successives. Colloque Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée. (Versailles, France)

**Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L. et al. (2010)** Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC Europe 20<sup>th</sup> Annual Meeting. (Séville, Espagne)

- **Communications affichées**

**Massarin S., Alonzo F., Gilbin R. et al. (2008)** Effects of feeding conditions on physiological processes and energy budget of *Daphnia magna* exposed to radionuclides. SETAC Europe 18<sup>th</sup> Annual Meeting. (Varsovie, Pologne)

**Dutilleul M., Massarin S., Alonzo F. et al. (2009)** Modeling the effects of uranium on the physiological processes, energy budget and population dynamics of *Daphnia magna*. DEB Symposium. (Brest, France)

**Massarin S., Alonzo F., Dutilleul M. et al. (2009)** Effects of multigenerational uranium exposure on life history and energy budget of *Daphnia magna*. SETAC Europe 19<sup>th</sup> Annual Meeting. (Göteborg, Suède)

**Alonzo F., Massarin S., Billoir E., et al. (2010)** Modelling individual and population dynamics of *Daphnia magna* exposed to uranium. SETAC Europe 20<sup>th</sup> Annual Meeting. (Séville, Espagne)

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**A**

---

**Abe T., Saito H., Niikura Y. et al. (2001)** Embryonic development assay with *Daphnia magna* : application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45, p. 487-495.

**Ahsanullah M. et Williams A.R. (1989)** Kinetics of uranium uptake by the crab *Pachygrapsus laevimanus* and the zebra *Austrocochlea constricta*. *Marine Biology*, 101, p. 323-327.

**Aigueperse J., Bouvier C., Chambrette V. et al. (2001)** Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Fontenay aux Roses, Institut de Protection et de Sûreté Nucléaires, p. 25.

**Allan J.D. et Daniels R.E. (1982)** Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. *Marine Biology*, 66(2), p. 179-184.

**Allen Y., Calow P., Baird D.J. (1995)** A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, p. 1625-1630.

**Alonzo F., Gilbin R., Bourrachot S. et al. (2006)** Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 80(3), p. 228-236.

**Alonzo F., Gilbin R., Zeman F. A. et al. (2008a)** Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 87(3), p. 146-156.

**Alonzo F., Hertel-Aas T., Gilek M. et al. (2008b)** Modelling the propagation of effects of chronic exposure to ionising radiation from individuals to populations. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99(9), p. 1464-1473.

**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, p. 207-213.

**ANZECC and ARMCANZ (2001)** Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. National water quality management strategy paper n°4, Australian and New Zealand and Conservation council and Agriculture and Resource management council of Australia and New Zealand, Canberra.

**Ashauer R., Boxall A., Brown C. (2006)** Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**(7), p. 1899-1912.

**ASTM, American Society for Testing and Materials (2004)** Standard guide for conducting *Daphnia magna* Life Cycle Toxicity Tests, p.1193-1197.

**ATSDR (1999)** Toxicology profile for uranium. U.S. Department of Health and Human Services Atlanta, GA.

## **B**

---

**Baillieul M., Smolders R., Blust R. (2005)** The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Strauss. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **140**(3-4), p. 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. *Functional Ecology*, **4**(3), p. 399-407.

**Baird D.J., Barber I., Soares A.M.V.M. et al. (1991)** An early life stage test with *Daphnia magna* Straus: An alternative to the 21-day Chronic Test? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **22**, p. 1-7.

**Baldwin W.S., Milam D.L., Leblanc G.A. (1995)** Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**(6), p. 945-952.

**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. *Aquatic Toxicology*, **42**(2), p. 115-137.

**Barata C. et Baird D.J. (2000)** Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **48**, p.195-209.

**Barata C., Porte C. Baird D.J. (2004)** Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates. A review. *Ecotoxicology*, **13**, p. 511-517.

**Barber I., Baird D.J., Calow P. (1990)** Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects. *Functional Ecology*, **4**, p. 409-414.

**Barillet S., Adam C., Palluel O., et al. (2007)** Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**(3): p. 497-505.

**Barry M.J. (1996)** Effects of an organochlorine pesticide on different levels of biological organization in *Daphnia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **34**, p. 239-251.

**Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J. et al. (2006)** Modeling radiological dose in non-human species: Principles, computerization, and application. *Health Physics*, **90**(5), p. 485-493.

**Beaugelin-Seiller K., Garnier-Laplace J., Gilbin R. (2009)** Vers la proposition d'une norme de qualité environnementale pour l'uranium en eau douce, Rapport DEI/SECURE/2009-015, 80p.

**Beklemishev C.W. (1962)** Superfluous feeding of marine herbivorous zooplankton. Rapport et Procès Verbaux des Réunions: Conseil Permanent International Pour l'Exploitation de la Mer, **153**, p.108-113.

**Bem H. et Bou-Rabee F. (2004)** Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment International*, **30**, p.123-134.

**Bervoets L., Baillieul M., Blust R. et al. (1996)** Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environmental Pollution*, **91**(3), p. 333-341.

**Billoir E., Péry A.R.R., Charles S. (2007)** Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, **203**(3-4), p. 204-214.

**Billoir E., Delignette-Muller M.L., Péry A.R.R. et al. (2008)** Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of Theoretical Biology*, **254**, p. 55-64.

**Billoir E., Ferrão-Filho A., Delignette-Muller M. et al. (2009)** DEBtox theory and matrix population models as helpful tools in understanding the interaction between toxic cyanobacteria and zooplankton. *Journal of Theoretical Biology*, **258**, p. 380-388.

**Bodar C.W.M., Van der Sluis I., Voogt P.A. et al. (1988)** Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: Possible implications for reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, **90**(2), p. 341-346.

**Bodar C.W.M., Van der Sluis I., Van Montfort J.C.P. et al. (1990)** Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **16**(1), p. 33-40.

**Bøhn T., Traavik T., Primicerio R. (2010)** Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic *Bt*-maize. *Ecotoxicology*, **19**, p. 419-430.

**Bohrer R.N. et Lampert W. (1988)** Simultaneous measurement of the effect of food concentration on assimilation and respiration in *Daphnia magna* Straus. *Functional Ecology*, **2**(4), p. 463-471.

**Bossuyt B.T.A et Janssen C.R. (2003)** Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **136**, p. 253-264.

**Bouaffif C. (2010)** Influence de la croissance par mue sur le budget énergétique et la bioaccumulation d'un radionucléide chez *Daphnia magna*. Mémoire de Master II Recherche, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II, pp. 35.

**Boudreau L., Guay I. (2002)** Effets de l'uranium sur la vie aquatique et détermination de critères de qualité de surface. Québec, Québec, Ministère de l'environnement.

**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.

**Bourrachot S., Simon O., Gilbin R. (2008)** The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, **90**(1), p. 29-36.

**Bourrachot S. (2009)** Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zebra (*Danio rerio*). Impact sur les stades de vie. Thèse IRSN. N°ISRN/IRSN-2009/119. Université de Provence, Aix Marseille I.

**Bradley M.C., Baird D.J., Calow P. (1991)** Mechanisms of energy allocation to reproduction in the cladoceran *Daphnia magna* Strauss. *Biological Journal of the Linnean Society*, **44**, p. 325-333.

**Brandt K.K., Jørgensen N.O.G., Nielsen T.H. et al. (2004)** Microbial community-level toxicity of linear alkybenzene sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, p. 229-242.

**Burns C.W. (1995)** Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia*, **101**(2), p. 234-244.

**Bywater J.F., Banaczkowski R., Bailey M. (1991)** Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**(11), p. 1449-1458.

---

## C

---

**Caffrey P.B., Keating K.I. (1997)**, Results of zinc deprivation in daphnid culture. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(3), p. 572-575.

**Calow P. and Sibly R.M. (1990)** A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology*, **4**(3), p. 283-288.

**Calow, P. (1991)** Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, **100**(1-2), p. 3-6.

**Caswell H. (1996)** Demography meets ecotoxicology: Untangling the population level effects of toxic substances. In MC Newmann, CH Jagoe (Eds), *Ecotoxicology: A hierarchical treatment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

**Caswell H. (2001)** *Matrix Population Models. Construction, Analysis, and Interpretation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2nd Edition.

**Chapman P.M., Caldwell R.S., Chapman P.F. (1996)** A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, p. 77-79.

**Charles A.L., Markich S. J., Stauber J. L. et al. (2002)** The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology*, **60**(1-2), p. 61-73.

**Chassard-Bouchaud C. (1988)** Metabolism and cytotoxicity of uranium in *Mytilus* sp.: a structural, ultrastructural and microanalytical study., *Oceanis*, **14**(1), p. 167-195.

**CIPR (1991)** Recommendations of the International Commission on Radiobiological Protection, ICRP Publication n°60, Annals of the ICPR 21, 1-3.

**Cleuvers, M., Goser B., Ratte H.-T. (1997)** Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: Change in reproduction from quantity to quality. *Oecologia*, **110**(3), p. 337-345.

**Clulow F.V., Davé N.K., Lim T.P. et al. (1998)** Radionuclides (lead-210, polonium-210, thorium-230, and -232) and thorium and uranium in water, sediments, and fish from lakes near the city of Elliot Lake, Ontario, Canada, *Environmental Pollution*, **99**, p. 199-213.

**Clutter R.I. et Theilacker G.H. (1971)** Ecological efficiency of a pelagic mysid shrimp; estimates from growth, energy budget, and mortality studies, *Fishery Bulletin*, **69**, p. 93-115.

**Coggle J.E., Lambert B.E., Moores S.R. (1986)** Radiation effects in the lung. *Environmental Health Perspectives*, **70**, p. 261-291.

**Cold A. et Forbes V.E. (2004)** Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology*, **67**(3), p. 287-299.

**Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., et al. (2001)** Comportement de l'uranium dans l'environnement. L'uranium de l'environnement à l'Homme/ed. Collection IPSN : Les Ulis, p.187-212.

**Conover R.J. (1964)** Food relations and nutrition zooplankton. Proc. Symp. Expt. Mar. Ecol., Occ. Pub. No 2. Kingston: Graduate School of Oceanography, Univ. of Rhode Island.

**Cooley H.M. et Klaverkamp J.F. (2000)** Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, **48**(4), p. 477-494.

**Cooper J.R., Stradling G. N., Smith H. et al. (1982)** The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *International Journal of Radiation Biology*, **41**(4), p. 421-433.

**Coors A., Hammers-Wirtz M., Ratte H.T. (2004)** Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. *Chemosphere*, **56**(4), p. 395-404.

---

**D**

---

**De Coen W.M. et Janssen C.R. (1997)** The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere*, **35**(5), p. 1053-1067.

**De Coen W.M. et C.R. Janssen (1998)** The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing - I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia*, **367**(1-3), p. 199-209.

**Delignette-Muller M.L. (1995)** Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Laboratoire de Biométrie-Génétique et Biologie des Populations, Lyon, Université Claude Bernard Lyon I.

**Dension F. (2004)** Uranium (VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve, Université de Provence Aix-Marseille I, 338p.

**De Schamphelaere K.A.C. et Janssen C.R. (2002)** A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, et pH. *Environmental Sciences and Technology*, **36**, p. 48-54.

**Diamond G.L. (1989)** Biological consequences of exposure to soluble forms of natural uranium. *Radiation Protection Dosimetry*, **26**(1-4), p.23-33.

**Dias V., Vasseur C., Bonzom J.M. (2008)** Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere*, **71**(3): p. 574-581.

**Duchet C., Coutellec M.A., Franquet E., (2010)** Population-level effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* : comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions. *Ecotoxicology*, 19(7), p. 1224-1237.

**Ducrot V., Péry A.R.R., Mons R. et al. (2007)** Dynamic energy budgets as a basis to model population-level effects of zinc-spiked sediments in the gastropod *Valvata piscinalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 1774-1783.

**Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J. et al. (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, Editions Tec et Doc, Lavoisier 2008, p.273-294.

## E

---

**Ebbs S.D., Brady D.J., Kochian L.V. (1998)** Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *Journal of Experimental Botany*, 49(324), p. 1183-1190.

**Ebert D. (1991)** The effect of size at birth, maturation threshold and genetic differences on the life-history of *Daphnia magna*. *Oecologia*, 86(2), p. 243-250.

**Ebert D. (1992)** A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, 37(4), p. 878-881.

**Ebert D. (1993)** The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: The influence of genetic, environmental and maternal effects, *Archiv für Hydrobiologie*, 90, p.453-473.

**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/entrez/query.fcgi?db=Books>

**Elendt, B.P. et 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**(9), p. 1157-1167.

**Emlen J.M. et Springman K.R. (2007)** Developing methods to assess and predict the population level effects of environmental contaminants. *Integrated environmental assessment and management*, **3**(2), p. 157-165.

**Enserink L., Luttmer W., Maas-Diepeveen H. (1990)** Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, **17**(1), p. 15-26.

**Enserink L., De La Haye M., Maas H. (1993)** Reproduction strategy of *Daphnia magna* : implications for chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, **25**, p.111-124.

**Enserink E.L., Kerkhofs M.J., Baltus C.A. et al. (1995)** Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; Evidence for a trade-off mechanism. *Functional Ecology*, **9**(2), p. 175-185.

**Environnement Canada (2003)** Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain). Loi du Gouvernement du Canada sur la protection de l'environnement (1999), liste des substances d'intérêt prioritaire – Rapport d'évaluation.

**Environnement Canada (2008)** Canadian water quality guidelines for uranium : Scientific supporting document (draft).

**ERICA (2004)** Environmental Risk from Ionising Contaminants: Assessment and Management, Technical annex.

**ERICA (2006)** Derivation of Predicted-No-Effect-Dose-Rate Values for Ecosystems (and their Sub-Organisational Levels) exposed to radioactive substances. Deliverable 5. ERICA, European Commission, Sixth Framework, Contract FI6R-CT-2004-508847, pp. 88. Available from : <http://www.ERICA-project.org/>

**Escher B.I., Hermens J.L.M. (2002)** Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science and Technology*, 36(20), p. 4201-4217.

## **F**

---

**FASSET (2003)** Radiation Effects on Plants and Animals. FASSET Project Contract FIGE-CT-2000-00102. Woodhead D., Zinger I./Eds., Deliverable 4, p. 196. Available from: <http://www.ERICA-project.org/>

**Ferrão-Filho A. et Azevedo S. (2003)** Effects of unicellular and colonial forms of *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on two tropical cladocerans. *Aquatic Ecology*, 37, p. 23-35.

**Forbes V.E., Calow P. (1999)** Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology ? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, p. 1544-1556.

**Fox H.M. (1948)** The haemoglobin of *Daphnia*. Proc. R. Soc. Lond. Ser B., 135, p. 195-212.

**Franklin N.M, Stauber J.L., Markish S.J. et al. (2000)** pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology*, 48, p. 275-289.

**Fraser J., Parkin D.T., Verspoor E. (1978)** Tolerance to lead in the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Research*, 12(8), p. 637-641.

**Friday G.P. (2005)** Ecological screening values for surface water, sediment and soil. 2005 update. Rapport n°WSRC-TR-2004-00227 Savannah River Laboratory, Aiken (USA).

**Friedrich J. (2009)** Uranium contamination of the Aral Sea. *Journal of Marine Systems*, 76(3): p. 322-335.

---

**G**

---

**Gagnaire B., Boyer P., Bonzom J.M. et al. (2011)** Transfer modelling and toxicity evaluation of the effluent from an Installation of Cleansing and Uranium Recovery using a battery of bioassays. *Ecotoxicology*, 20(1), p.187-201.

**Geller W. (1975)** Die Nahrungsaufnahme Von *Daphnia pulex* in Abhängigkeit von der Futterkonzentration, der Temperatur, der Körpergröße und dem Hungerzustand der Tiere. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 48, p.47-107.

**Genet M. (1996)** The discovery of uranic rays: A short step for Henri Becquerel but a giant step for science. *Radiochimica Acta*, 70/71, p. 3-12.

**Gilbin R., Alonzo F., Garnier-Laplace J. (2008)** Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99(1), p. 134-145.

**Glazier D.S. (1998)** Does body storage act as a food-availability cue for adaptive adjustment of egg size and number in *Daphnia magna*? *Freshwater Biology*, 40(1), p. 87-92.

**Gliwicz Z.M. et Guisande C. (1992)** Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia*, 91(4), p. 463-467.

**Guan R. et Wang W.X. (2006)** Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 141(2), p. 343-352.

**Guisande C. (1993)** Reproductive strategy as population density varies in *Daphnia magna* (Cladocera). *Freshwater Biology*, 29(3), p. 463-467.

**Gulati R.D., Bodar C.W.M., Schuurmans A.L.G. et al. (1988)** Effects of cadmium exposure on feeding of freshwater planktonic crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 90(2), p.335-340.

**Greene B., Henzl, M. T., Hosea J. M. et al. (1986)** Elimination of bicarbonate interference in the binding of U(VI) in mill-waters to freeze-dried *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(5), p. 764-767.

**Gueniot B., Munier-Lamy C. et Berthelin J. (1988a)** Geochemical behavior of uranium in soils, part I. Influence of pedogenetic processes on the distribution of uranium in aerated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, **31**(1): 21-37.

**Gueniot B., Munier-Lamy C. et Berthelin J. (1988b)** Geochemical behavior of uranium in soils, part II. Distribution of uranium in hydromorphic soils and soil sequences. Applications for surficial prospecting. *Journal of Geochemical Exploration*, **31**(1): 39-55.

**Gulati R.D., Bodar C.W.M., Schuurmans A.L.G. et al. (1988)** Effects of cadmium exposure on feeding of freshwater planktonic crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, **90**(2), p.335-340.

## **H**

---

**Hall T.M. (1982)** Free ionic nickel accumulation and localization in the freshwater zooplankter, *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, **27**, p. 718-727.

**Hanazato T. (1998)** Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, **36**, p. 1903-1909.

**Harris E.H. (1989)** The *Chlamydomonas* Sourcebook : A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, Inc., San Diego.

**Hart D.R., McKee P.M., Burt A.J. et al. (1986)** Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbort, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research*, **12** (3), p. 206-220.

**Hogan A.C., van Dam R.A., Markish S.J., et al. (2005)** Chronic toxicity of uranium to a tropical green alga (*Chlorella* sp.) in natural waters and the influence of dissolved organic carbon. *Aquatic Toxicology*, **75**, p. 343-353.

**Holm S. (1979)** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, p. 65-70.

**Hosmer A.J., Warren L.W., Ward T.J. (1998)** Chronic toxicity of pulse-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**(9), p. 1860-1866.

**Hyne R.V., Rippon G.D., Ellender G. (1992)** pH-Dependent uranium toxicity to freshwater hydra. *The Science of the Total Environment*, **125**, p.159-173.

## I

---

**IAEA (1992)** Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current protection standard, AIEA Technical Report N°332.

**Ingersoll, C.G. et Winner R.W. (1982)** Effect on *Daphnia pulex* (de Geer) of daily pulse exposures to copper or cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **1**(4), p. 321-327.

**Ingersoll C.G., Ankley G.T., Benoit D.A. et al. (1995)** Toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**(11), p. 1885-1894.

**ISO, International Organisation for Standardization (1996)** Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crutacea), NF EN ISO 6341.

## J

---

**Jager T., Crommentuijn T., Van Gestel C.A.M et al. (2004)** Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. *Environmental Science and Technology*, **38**, p. 2894-2900.

**Janssen C.R., De Schamphelaere K., Heijerick D. et al. (2000)** Uncertainties in the environmental risk assessment of metals. *Human and Ecological Risk Assessment* (HERA), **6**(6), p. 1003-1018.

**Jensen A., Forbes V.E., Parker E.D. (2001)** Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects on individuals to the population level. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, p. 2503-2513.

## **K**

---

**Kast-Hutcheson K., Rider C.V., LeBlanc G.A. (2001)** The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(3), p. 502-509.

**Klerks P.L., Weis J.S. (1987)** Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution*, **45**(3), p. 173-205.

**Klok C., Holmstrup M., Damgaard C. (2007)** Extending a combined dynamic energy budget matrix population model with a bayesian approach to assess variation in the intrinsic rate of population increase. An example in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**(11), p. 2383-2388.

**Knops M., Altenburger R., Segner H. (2001)** Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxicology*, **53**(2), p. 79-90.

**Kobayashi M., Hayakawa F., Ninomiya M. (1987)** Hatchability and hemoglobin of *Daphnia magna* embryo. *Physiological Zoology*, **60**, p. 507-512.

**Kooijman, S. A. L. M. (1993)** Dynamic energy budgets in biological systems, theory and applications in ecotoxicology. Cambridge.

**Kooijman, S.A.L.M. and Bedaux J.J.M. (1996)** Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Research*, **30**(7), p. 1711-1723.

**Kooijman S.A.L.M. (2000)** Dynamic energy and mass budgets in biological systems. 2nd Ed.

**Kooijman S.A.L.M. (2001)** Quantitative aspects of metabolic organization: a discussion of concepts. *Phil. Trans. Roy. Soc. B.*, 356, p. 331-349.

**Kuhne W.W., Caldwell C. A., Gould W. R. et al. (2002)** Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyaella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(10), p. 2198-2203.

**Kurtio P., Auvinen A., Salonen L. et al. (2002)** Renal effects of uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, **110**(4): 337-342.

**Kurtio P., Komulainen H., Leino A. et al. (2005)** Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, **113**(1): 68-72.

## L

---

**Labrot F., Narbonne J.F., Ville P. et al. (1999)** Acute Toxicity, Toxicokinetics, and Tissue Target of Lead and Uranium in the Clam *Corbicula fluminea* and the Worm *Eisenia fetida* : Comparison with the Fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36**, p. 167-178.

**Lagauzère S., Terrail R., Bonzom J.M. (2009)** Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, p. 527-537.

**Lampert W. (1977)** Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* as related to environmental conditions. I. Methodological problems of the use of  $^{14}\text{C}$  for the measurement of carbon assimilation. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, **48**, p. 108-137.

**Lampert W. et Bohrer R. (1984)** Effect of food availability on the respiratory quotient of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78(A)**, p. 221-223.

**Lampert W. et Gabriel W. (1984)** Tracer kinetics in *Daphnia*: An improved two-compartment model and experimental test. *Arch. Hydrobiol.*, **100**, p. 1-20.

**Lampert W. (1987)** Feeding and nutrition in *Daphnia*. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, "Dott. Marco De Marchi", Pallanza, **45**, p. 143-192.

**Langmuir D. (1978)** Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **42(6 PART A)**: p. 547-569.

**La Touche Y.D., Willis D.L., Dawydiak O.I. (1987)** Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Physics*, **53(2)**, p. 147-162.

**Leach L.J., Maynard E.A., Hodge H.C. et al. (1970)** A five-year inhalation study with natural uranium dioxide ( $\text{UO}_2$ ) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Physics*, **18(6)**, p. 599-612.

**LeBlanc G.A. (1982)** Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological*, **27(4)**, p. 309-322.

**Leggett R.W. (1989)** The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Physics*, **57(3)**, p.365-383.

**Leggett R.W. (1994)** Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Physics*, **67(6)**, p.589-610.

**Lei C.H. et Armitage K.B. (1980)** Energy budget of *Daphnia ambigua* Scourfiels. *Journal of Plankton Research*, **2**, p.261-281.

**Lerebours A., Gonzalez P., Adam C et al. (2009)** Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**(6), p. 1271-1278.

**Leslie P.H. (1945)** On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika*, **33**, p. 184-212.

**Liess M. et Schulz R. (1996)** Chronic effects of short-term contamination with the pyrethroid insecticide fenvalerate on the caddisfly *Limnephilus lunatus*. *Hydrobiologia*, **324**(2), p. 99-106.

**Lika K. et Nisbet R. M. (2000)** A dynamic energy budget model based on partitioning of net production. *Journal of Mathematical Biology*, **41**, p. 361-386.

**Lopes C., Péry A.R.R., Chaumont A. et al. (2005)** Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, **188**, p. 30-40.

**Lottermoser B., Ashley P., Costelloe M. (2005)** Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology*, **48**, p. 748-761.

**Luther S.M, Dudas M.J, Rutherford P.M. (1993)** Radioactivity and chemical characteristics of Alberta phosphogypsum. *Water, Air and Soil Pollution*, **69**, 277-290.

## M

---

**Maltby L. et Naylor C. (1990)** Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology*, **4**, p.393-397.

- Maltby L., Naylor C., Calow P. (1990)** Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: Scope for growth in *gammarus pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **19**(3), p. 285-291.
- Markich S.J., Brown P. L., Jeffree, R. A. et al. (2000)** Valve movement responses of *Velesunio angasi* (*Bivalvia: Hyriidae*) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology*, **51**(2): p. 155-175.
- Markich, S.J. (2002)** Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal* [electronic resource], **2**: p. 707-729.
- Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L. et al. (2010)** Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, **99**(3), p. 309-319.
- Mathews T., Beaugelin-Seiller K., Garnier-Laplace J. et al. (2009)** A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science and Technology*, **43**(17), p. 6684-6690.
- McCauley E., Murdoch W.W., Nisbet R.M. et al. (1990)** The physiological ecology of *Daphnia*: development of a model of growth and reproduction. *Ecology*, **71**(2), p. 703-715.
- Métivier H., Ansoborlo E., Chazel V. et al. (2001)** Biocinétique et dosimétrie des expositions à l'uranium. *L'Uranium de l'environnement à l'homme*, p. 213-238.
- Miller A.C., Stewart M., Brooks K. et al. (2002)** Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **91**(1): p. 246-252.
- MOEE (1994)** Water management – Policies, guidelines, Provincial water quality objectives of the ministry of the environment, Queen printer for Ontario, PIB 3303E.
- Morel F.M.M. (1983)** Principles of aquatic chemistry, New York, Wiley-Intersciences, 301p.

**Morrow P., Gelein R, Beiter H. (1982)** Inhalation and intravenous studies of UF<sub>6</sub>/UO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> in dogs. *Health Physics*, **43**(6), p.859-873.

**Münzinger A. (1990)** Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel. *Water Research*, **24**(7), p. 845-852.

**Muysen B.T.A. et Janssen C.R. (2004)** Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution*, **130**(3), p. 309-316.

---

## N

---

**Nakajima A., Horikoshi T., Sakaguchi T. (1979)** Ion effects on the uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **43**(3), p. 625-629.

**Nieböer E. et Richardson D.H.S. (1980)** The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, **1**(1): 3-26.

**Nielsen M.V. et Olsen Y. (1989)** The dependence of the assimilation efficiency in *Daphnia magna* on the C-labeling period of the food alga *Scenedesmus acutus*. *Limnology and Oceanography*, **34**, p. 1311-1315.

**Nisbet R. M., Ross A. H. et A. J. Brooks (1996)** Empirically-based dynamic energy budget models: theory and an application to ecotoxicology. *Nonlinear World* **3**, p. 85-106.

**Nisbet R.M., Muller E.B., Lika K. et al. (2000)** From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *Journal of Animal Ecology*, **69**, p. 913-926.

**O**

---

**OCDE, Organisation de Coopération et de Développement Economiques (2004)** *Daphnia sp.*, Acute immobilisation test. Guidelines for testing for chemicals, Rep. No. 202.

**OCDE, Organisation de Coopération et de Développement Economiques (2008)** *Daphnia magna* acute immobilisation test and reproduction test. Guidelines for testing for chemicals, Rep. No. 211.

**Okumus I. et Stirling H.P. (1994)** Physiological energetics of cultivated mussel (*Mytilus edulis*) populations in two Scottish west coast sea lochs. *Marine Biology*, **119**, p. 125-131.

**Oliveira-Filho E., Grisolia C.K., Paumgartten F.J. (2009)** Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: A multigeneration study. *Chemosphere*, **75**, p. 398-404.

**P**

---

**Pane E.F., McGeer J.C., Wood C.M. (2004)** Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(4), p. 1051-1056.

**Paquin P.R.J.W (2002)** The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 133 p.3-35.

**Péry A.R.R., Flammarion P., Vollat B. et al. (2002)** Hazard/risk assessment: Using a biology-based model (debtox) to analyze bioassays in ecotoxicology: Opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(2), p. 459-465.

**Péry A.R.R., Ducrot V., Mons R. et al. (2003)** Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, **65**(3): p. 281-292.

**Peters R.H. (1972)** Phosphorus regeneration by zooplankton. Dissertation. Univ. of Toronto, Toronto, Canada.

**Peters R.H. (1984)** Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters, p. 336-412.

**Pickett J.B., Specht W.L., Keyes J.L. (1993)** Acute and Chronic Toxicity of Uranium Compounds to *Ceriodaphnia dubia*. Savannah River, Aiken, South Carolina, p. 57.

**Porter K.G., Gerritsen J., Orcutt J.D. (1982)** The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration by *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **27**(5), p. 935-949.

**Porter K.G., Orcutt Jr J.D., Gerritsen J. (1983)** Functional response and fitness in a generalist filter feeder *Daphnia magna* ( *Cladocera: Crustacea*). *Ecology*, **64**(4), p. 735-742.

**Postma J.F. et Davids C. (1995)** Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (*Diptera*) during consecutive generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **30**(2), p. 195-202.

**Poston T.M. (1982)** Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **28**, p. 682-690.

**Poston T.M., Hanf Jr. R.W., Simmons M.A. (1984)** Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, **22**(3), p. 289-298.

---

**R**

---

**Ragnarsdottir K.V. et Charlet L. (2000)** Uranium behaviour in natural environments. *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Antropogenic Influences, Contaminated Lands and Waste Management*, p. 333-377.

**Reynaldi S. et Liess M. (2005)** Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), p. 1160-1164.

**Reynaldi S., Duquesne S., Jung K. et al. (2006)** Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), p. 1826-1830.

**Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., et al. (1996)** Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 146: p. 53-89.

**Richman S. (1958)** The transformation of energy by *Daphnia pulex*, *Ecological Monographs*, 28(3), p.273-291.

**Riethmuller N., Markich S. J., Van Dam R. A. et al. (2001)** Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*hydra viridissima*). *Biomarkers*, 6(1), p. 45-51.

**Rigler F.H. (1971)** Methods for the measurement of assimilation of food by zooplankton. A manual on methods for the assessment of secondary production, IBH Handbook, 17, W.T. Edmonson, ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, p. 264-269.

**Riisgard H.U. and Randlov A. (1981)** Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Marine Biology*, 61, p. 227-234.

---

**S**

---

**Salice C.J. et Miller T.J. (2003)** Population-level responses to long-term cadmium exposure in two strains of the freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: Results from a life-table response experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, p. 678-688.

**Salice C.J., Miller T.J., Roesijadi G. (2009)** demographic responses to multigeneration cadmium exposure in two strains of the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**, p. 785-795.

**Salminen R. (2005)** Geochemical Atlas of Europe. Part 1: Background Information, Methodology and Maps. Espoo: Geological Survey of Finland.

**Sánchez M., Ferrando M. D., Sancho E. et al. (1999)** Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, **124**(3), p. 247-252.

**Sánchez M., Ferrando M. D., Sancho E. et al. (2000)** Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* straus exposed to diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**(1), p. 87-94.

**Sánchez M., Andreu-Moliner E., Ferrando M.D. (2004)** Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **59**(3), p. 316-323.

**Saskatchewan Environment (2006)** Surface water quality objectives: interim edition, EPB 356.

**Schindler D.W. (1968)** Feeding, assimilation and respiration rates of *Daphnia magna* under various environmental conditions and their relation to production estimates. *Journal of Animal Ecology*, **37**, p. 369-385.

**Schneider D.W., Madon S. P., Stoeckel J. A. et al. (1998)** Seston quality controls zebra mussel [*Dreissena polymorpha*] energetics in turbid rivers. *Oecologia*, **117**(3), p. 331-341.

**Semaan, M., Holdway D.A., Van Dam R.A. (2001)** Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environmental Toxicology*, **16**(5), p. 365-376.

**Sheppard S.C., Sheppard M. I., Gallerand M. O. et al. (2005)** Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, **79**(1), p. 55-83.

**Sibly R.M. (1981)** Strategies of digestion and defecation, *Physiological Ecology*, eds. Townsend C.R. and Calow P., Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.109-139.

**Sibly R.M. et Calow P. (1985)** Classification of habitats by selection pressures : a synthesis of life-cycle and r/K theory. In Sibly R.M. et Smith R.H. (Eds), *Behavioural Ecology*, Oxford : Blackwell Scientific Publications, p. 75-90.

**Simon O. et Garnier-Laplace J. (2004)** kinetic analysis of uranium accumulation in the bivalve *Corbicula fluminea* : effect of pH and direct exposure levels. *Aquatic Toxicology*, **68**, p. 95-108.

**Simon O. et Garnier-Laplace J. (2005)** Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquatic Toxicology*, **74**, p. 372-383.

**Smolders R., Bervoets L., Blust R. (2002)** Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(9), p. 1889-1896.

**Smolders R., Baillieul M., Blust R. (2005)** Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, **73**(2), p. 155-170.

**Stark J.D., Wennergren U. (1995)** Can population effects of pesticides be predicted from demographic toxicological studies? *Journal of Economic Entomology*, **88**, p. 1089-1096.

**Stark J.D., Tanigoshi L., Bounfour M. et al. (1997)** Reproductive potential : its influence on the susceptibility of a species to pesticides, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **37**, p.273-279.

**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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **101**(3): p. 732-736.

**Suter G.W. (1996)** Risk characterization for ecological risk assessment of contaminated sites. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN pp.46;

**Swanson S.M. (1982)** Levels and effects of radionuclides in aquatic fauna of the Beaverlodge Area. (Saskatchewan)/ed. S. Publication, No. C-806-5-E-82, Saskatoon, Saskatchewan Research Council, 187p.

**Swanson S.M. (1985)** Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Physics*, 49, p. 747-770.

## **T**

---

**Tarzwel C.M., Henderson C. (1960)** Toxicity of less common metals to fish. *Industrial Wastes*, **5**, p.52-67.

**Taulan M. (2004)** Conséquences moléculaires des expositions aigue et chronique à l'uranium sur le transcriptome murin. Thèse Université de Montpellier I, Montpellier, 190p.

**Tayibi H., Choura M., López F. et al. (2009)** Environmental impact and management of phosphogypsum. *Journal of Environmental Management*, 90(8): 2377-2386.

**Tessier A.J., Henry L. L., Goulden C. E. et al. (1983)** Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. *Limnology and Oceanography*, **28**, p. 667-676.

**Tessier A.J. et Consolatti N.L. (1989)** Variation in offspring size in *Daphnia* and consequences for individual fitness. *Oikos*, **56**(2), p. 269-276.

**Trapp, K.E. (1986)** Acute Toxicity of Uranium to Waterfleas (*Daphnia pulex*) and Bluegill (*Lepomis macrochirus*), Environmental and Chemical Sciences, Savannah River, Aiken, South Carolina, Report ESC-SR-30, p.57.

**Tsui M.T.K. et Wang W.X. (2005)** Multigenerational acclimation of *Daphnia magna* to mercury: Relationships between biokinetics and toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(11), p. 2927-2933.

## U

---

**UNSCEAR (1996)** Source and effects of ionizing radiation, Report to the General Assembly with scientific annex. United Nations, New York, USA.

**Urabe J. and Watanabe Y. (1991)** Effect of food concentration on the assimilation and production efficiencies of *Daphnia galeata* G-O Sars (Crustacea: Cladocera). *Functional Ecology*, **5**(5), p. 635-641.

## V

---

**Vandegheuchte M.B., Vandebrouck T., De Conick D. et al. (2010)** Gene transcription and higher-level effects of multigenerational Zn exposure in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, in press.

**van Haren R. J. F. et S. A. L. M. Kooijman (1993)** Application of a dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Neth. J. Sea Res.* 31: 119-133.

**Vanoverbeke J. (2008)** Modeling individual and population dynamics in a consumer-resource system : Behavior under food limitation and crowding and the effect on population cycling in *Daphnia*. *Ecological Modelling*, 216, p. 385-401.

**Villarroel M.J., Ferrando M. D., Sancho E. et al. (2000)** Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), p. 39-47.

**von Bertalanffy L. (1960)** Principles and theory of growth. In: Wowinski WW (ed) Fundamental aspects of normal and malignant growth. Elsevier. Amsterdam, p. 137-259.

---

## W

---

**Waite D.T., Joshi S.R., Sommerstad H. (1988)** The effect of uranium mine tailings on radionuclide concentrations in Langley Bay, Saskatchewan, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(3), p. 373-380.

**Walinder G (1989)** Metabolism and sites of effects of uranium after incorporation along different routes in mice, rabbits and piglets. *Radiation Protection Dosimetry*, 26(1-4), p.89-95.

**Warren C.E. and Davis G.E. (1967)** Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth of fish. The Biological Basis of Freshwater Fish Production (ed. S.D. Gerking), Blackwell Scientific, Oxford, p. 175-214.

**Whicker F.W. et Schultz V. (1982)** Radioecology: Nuclear energy and the Environment, 1, CRC, Boca Raton, FL, USA.

**White P.A., Robitaille S., Rasmussens J.B. (1999)** Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales Promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(8), p. 1843-1847.

**Widdows J. and Johnson D. (1988)** Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, **46**, p. 113-121.

**Withers P.C. (1992)** Comparative Animal Physiology, Saunders College Publishing, London, Sydney, Tokyo.

**WHO, World Health Organization (2001)** Depleted uranium: Sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1, Geneva, Switzerland.

**WHO, World Health Organization (2004)** Radiological quality of drinking water (Chapter 9), Guidelines for drinking water quality, third edition. Geneva, World Health Organization, p.197-209.

## Y

---

**Yu R.Q. et Wang W.X. (2002)** Trace metal assimilation and release budget in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, **47**(2), p. 495-504.

## Z

---

**Zeileis F (2006)** Object-oriented computation of sandwich estimators. *Journal of Statistical Software*. **16**, p.1-16.

**Zeman F.A., Gilbin R., Alonzo F. et al. (2008)** Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **86**(3), p. 370-378.

**Zeman F. (2008)** Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*, Etude des effets biologiques de l'uranium et de sélénium seuls et en mélange. Thèse IRSN, Université Montpellier II.

## **ANNEXES**

## Annexe 1 : Composition et caractéristiques du milieu M4

Le milieu M4 (**Elendt et Bias, 1990**) est utilisé en tant que milieu d'essai, de dilution mais également en tant que milieu d'élevage.

Toutes les solutions sont préparées à partir d'eau UHQ et conservées au réfrigérateur à 4°C sauf la solution de vitamines qui est conservée au congélateur.

Eléments traces	Concentration des éléments trace (mg.L <sup>-1</sup> )	Volume à prélever pour préparer la solution mère I (mL.L <sup>-1</sup> )
Acide borique H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	1
Chlorure de Manganèse MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7 210	
Chlorure de lithium LiCl	6 120	1
Chlorure de rubidium RbCl	1 420	1
Chlorure de strontium hexahydraté SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3 040	1
Bromure de sodium NaBr	320	1
Sodium molybdate Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1 260	1
Chlorure de cuivre CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	335	1
Chlorure de zinc ZnCl <sub>2</sub>	260	1
Chlorure de cobalt CoCl <sub>2</sub>	200	1
Iodure de potassium KI	65	1
Sodium sélénite Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1
Ammonium monovadate NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O a)	5 000	
Sulfate de fer FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a)	1 991	
a) les solutions Na <sub>2</sub> EDTA et FeSO <sub>4</sub> sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises à l'étuve à 120 °C pendant 30 min, ce qui donne		
Solution Fe-EDTA		20

**Tableau 16 : préparation de la solution mère I**

Vitamines	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )
Chlorhydrate de thiamine	750
Cyanocobalamine (B <sub>12</sub> )	10
Biotine	7,5

**Tableau 17 : préparation de la solution de vitamines**

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

Solutions mères	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Volume de solution mère ajouté pour préparer le milieu M4 (mL.L <sup>-1</sup> )
<b>Solution mère I</b>		50
<b>Solutions mères de macro-nutriment</b>		
Chlorure de calcium CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	293 800	1,0
Sulfate de magnésium MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246 600	0,5
Chlorure de potassium KCl	58 000	0,1
Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0
Sodium métasilicate Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	50 000	0,2
Nitrate de sodium NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1
Potassium dihydrogénophosphate KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1
Di-potassium Hydrogénophosphate K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1
Solution mère de vitamines		0,1

**Tableau 18 : préparation du milieu M4**

Avant utilisation, le milieu est saturé en O<sub>2</sub> par bullage pendant 24 h (air filtré <0,2 µm).

Le milieu ainsi préparé doit posséder les caractéristiques décrites dans le tableau 18.

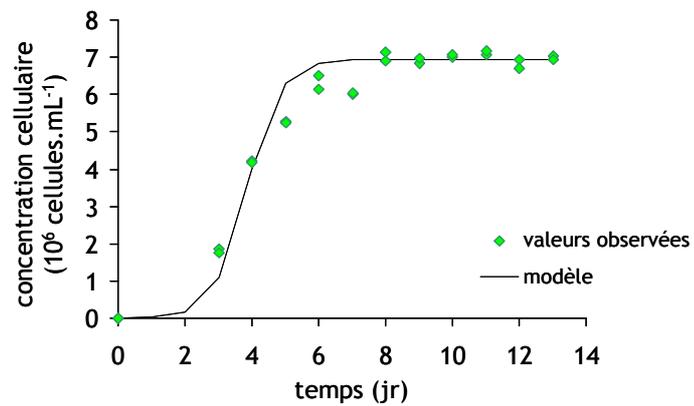
Dureté :	Dureté totale de <b>250 ± 20 mg/L</b> exprimé en CaCO <sub>3</sub>
Aération :	Il doit être aéré jusqu'à obtenir une concentration en oxygène dissous voisine de la saturation dans l'air soit <b>supérieure à 7 mg/L</b> .
PH :	<b>8.0 ± 0.3</b> . sinon ajuster le pH avec soit une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.
Conservation :	A 4 °C pendant <b>1 semaine</b>

*Tableau 19 : caractéristiques du milieu M4*

**Annexe 2 : Protocole de préparation des algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) pour les daphnies**

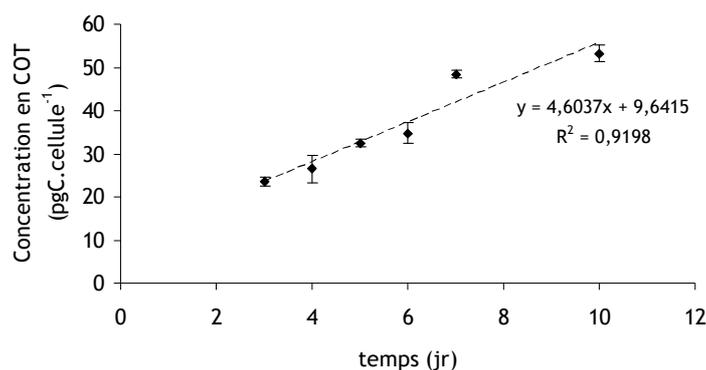
**Souche utilisée : 11/32B**

**Lieu d'approvisionnement : "Culture Collection of Algae and Protozoa", Cumbria, Royaume-Uni**



**Figure 55 :** culture de *Chlamydomonas reinhardtii* au laboratoire et sa dynamique de croissance, inoculée à 2 000 cellules.mL<sup>-1</sup>. Ajustement des données avec le modèle de

Delignette-Muller 
$$N(t) = \frac{N(\infty)}{1 + \left(\frac{N(\infty)}{N(0)} - 1\right)e^{(-\mu t)}}$$



**Figure 56 :** concentration en Carbone Organique Totale dans *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du temps

Le lancement de nouvelles cultures algales est fonction de la quantité de daphnies à nourrir. Les daphnies sont nourries avec des algues en phase de croissance exponentielle, c'est-à-dire avec des cellules âgées en moyenne de 4-6 jours (Figure 55). En phase de croissance exponentielle, le diamètre moyen des cellules est de 4-5  $\mu\text{m}$  et la teneur moyenne en carbone est de 28-35  $\text{pgC.cellule}^{-1}$ .

Les cultures asynchrones sont maintenues sous une luminosité et agitation constante (40  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 100 rpm)

#### Préparation du milieu de culture HSM (High Salt Medium, Harris, 1989) :

Le milieu HSM est préparé à l'aide de 3 solutions stock :

Solutions stock	Quantités
Phosphates #2	25 $\text{mL.L}^{-1}$
Beijerink	5 $\text{mL.L}^{-1}$
AAP	1 $\text{mL.L}^{-1}$

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

Solutions	Eléments	Quantités (g.L <sup>-1</sup> )
Phosphates #2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29.6
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57.6
Beijerink	NH <sub>4</sub> Cl	100
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2
AAP	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186
	Mn (10 g.L <sup>-1</sup> )	115
	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	160
	Na <sub>2</sub> EDTA, 2H <sub>2</sub> O	300
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	3.5
	Co (1 g.L <sup>-1</sup> )	0.64
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	3.63
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	8.79

## Annexe 3 : Article paru dans Aquatic Toxicology

Aquatic Toxicology 99 (2010) 309–319



Contents lists available at ScienceDirect

### Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)

### Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations

Sandrine Massarin<sup>a</sup>, Frédéric Alonzo<sup>a,\*</sup>, Laurent Garcia-Sanchez<sup>a</sup>, Rodolphe Gilbin<sup>b</sup>,  
Jacqueline Garnier-Laplace<sup>c</sup>, Jean-Christophe Poggiale<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Modélisation Environnementale, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 159, BP3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

<sup>c</sup> Service d'Etude du Comportement des Radionucléides dans les Ecosystèmes, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 159, BP3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines (UMR CNRS 6117), Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 901, Marseille Cedex 9, 13288, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 11 February 2010

Received in revised form 4 May 2010

Accepted 8 May 2010

##### Keywords:

*Daphnia magna*

Uranium

Multigeneration

Recovery

Energy budget

#### ABSTRACT

*Daphnia magna* was exposed to waterborne uranium (U) at concentrations ranging from 10 to 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  over three successive generations (F0, F1 and F2). Progeny was either exposed to the same concentration as mothers to test whether susceptibility to this radioelement might vary across generations or returned to a clean medium to examine their capacity to recover after parental exposure.

Maximum body burdens of 17, 32 and 54 ng U daphnid<sup>-1</sup> were measured in the different exposure conditions and converted to corresponding internal alpha dose rates. Low values of 5, 12 and 20  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  suggested that radiotoxicity was negligible compared to chemotoxicity. An increasing sensitivity to toxicity was shown across exposed generations with significant effects observed on life history traits and physiology as low as 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  and a capacity to recover partially in a clean medium after parental exposure to  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Using a <sup>14</sup>C-labelled food technique, the study showed that uranium affected carbon assimilation in F0 at concentrations of 25 and 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  (34 and 80% reduction respectively) and as low as 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and F2 (40 and 36% reduction respectively). Consequences were strong for both somatic growth and reproduction and increased in severity across generations. Maximum size was reduced by 12% at 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and 23% at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F2. Reduction in 21-day fecundity ranged from 27 to 48% respectively at 25 and 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and from 43 to 71% respectively at 10 and 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F2. Growth retardation caused a delay in deposition of first brood of 1.3 days at 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F0, of 1.9 days at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and of 5 days at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  in F2. Differences in respiration rates and egg dry mass between the control and exposed daphnids were mainly an indirect result of uranium effect on body size.

The observed increase in toxic effects across generations indicated the necessity of carrying out multi-generation tests to assess environmental risk of uranium in daphnids.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Uranium (U), a naturally occurring radioactive metal, is present in freshwaters at trace concentrations from 0.02 to 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  and may increase up to 2  $\text{mg L}^{-1}$  in the vicinity of uraniferous sites (Bonin and Blanc, 2001; WHO, 2001). Anthropogenic activities mainly associated with the use of uranium as nuclear fuel (uranium mining, milling and refining as well as spent fuel reprocessing) contribute to uranium redistribution in freshwaters and may cause water concentrations to exceed background concentrations

(Ragnarsdottir and Charlet, 2000). As a consequence, uranium has become of increasing concern for biota protection over the past decades (Environment Canada, 2003; Sheppard et al., 2005). In fact, natural uranium causes both a chemical and radiological hazard to aquatic ecosystems, because of its toxicity as a metal and as a mixture of three alpha-emitting radioisotopes along with their progenies (<sup>234</sup>U, <sup>235</sup>U and <sup>238</sup>U, in relative abundance of 0.005, 0.720 and 99.275%; Weigel, 1986).

To address these hazards, toxicity of uranium has been intensively studied in a wide range of freshwater species, including benthic and pelagic invertebrates as well as fish. Reported effects have covered many different endpoints which concern levels of biological organisation from subcellular damages to perturbations in physiology and life history of organisms: reduced hepatic antiox-

\* Corresponding author. Fax: +33 4 42 19 91 43.  
E-mail address: frederic.alonzo@irsn.fr (F. Alonzo).

ident activities and increased levels of neurotoxicity biomarker in the zebrafish, *Danio rerio*, after 20 days of waterborne exposure to  $100 \mu\text{g UL}^{-1}$  (Barillet et al., 2007); at an organism level in *D. rerio*, increase in mortality and a reduction in hatching success and larval growth at  $250 \mu\text{g UL}^{-1}$  (Bourrachot et al., 2008); reduced larval survival, development time and growth in benthic insect *Chironomus riparius*, after 10 days at  $3 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt sediment (Dias et al., 2008). Toxicity data in cladocerans concern mainly acute exposure whereas studies on chronic toxicity remain scarce. Both acute and chronic toxicities vary among tested species (Semaan et al., 2001; Pickett et al., 1993; Kuhne et al., 2002) and have been shown to depend strongly on water conditions (Trapp, 1986; Bywater et al., 1991; Barata et al., 1999; Semaan et al., 2001; Kuhne et al., 2002). Alkalinity, hardness and pH modify uranium speciation, changing concentrations of free uranyl ion and inorganic uranium complexes (e.g., carbonate complexes) and allowing potential competition for biotic ligands with other cations such as calcium and magnesium (Markich, 2002). In *Daphnia magna*, water concentrations causing 50%-lethality at 48 h range from  $0.39$  to  $51.9 \text{ mg UL}^{-1}$  and 50%-effect on 21-day reproduction has been reported to vary from  $91$  to  $520 \mu\text{g UL}^{-1}$  (Poston et al., 1984; Barata et al., 1998; Zeman et al., 2008). Differences in uranium toxicity resulted from changes in uranium bioavailability because water parameters varied among studies (Sheppard et al., 2005; Zeman et al., 2008).

Consequences of toxicity of uranium for the population demography were not evaluated although higher levels of organisation are ecologically more relevant than the organism level. Several concepts, such as the *Scope for Growth* (SFG) and the *Dynamic Energy Budget* (DEB) theory have been used to link effects at the individual level with population level effects (Widdows and Johnson, 1988; Kooijman, 2000). These approaches assume that toxic exposure might cause perturbations in nutrition and/or induce compensatory processes which are energetically costly (Calow and Sibly, 1990). Decrease in energy acquisition and/or increase in metabolic costs associated with toxicity come at the expense of growth and reproduction, which are fundamental processes for population dynamics. Zeman et al. (2008) addressed effects on various components of energy budget in daphnids exposed to uranium for 21 days at a controlled pH of 7 to enhance uranium bioavailability. Perturbations in physiological processes were reported at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  with strong consequences for SFG, body mass and fecundity. Observed damages in intestinal epithelium at  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  indicated assimilation inhibition as a possible mode of action (Zeman, 2008).

Assessing population responses to pollutants requires examining toxic effects on a long-term basis, as a population might be exposed for a period of time which exceeds individual lifespan. This issue is of major importance because biological effects have been shown to differ from a generation to the next during exposure to the radionuclide  $^{241}\text{Americium}$  (Am-241) and other metals (Bodar et al., 1990; Muyssen and Janssen, 2004; Pane et al., 2004; Guan and Wang, 2006; Alonzo et al., 2008). Multigenerational differences between parent and progeny included increase in sensitivity (as a result of toxicant transfer from mothers to offspring and/or exposure during early stages of development) and increase in tolerance to toxicants (on a longer term basis by adaptive responses). As observed for Am-241, an increase in sensitivity of offspring to uranium was strongly suggested by the observed reduction in egg mass above  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (Zeman et al., 2008). This hypothesis remained to be investigated as effects of uranium were studied over one generation only.

In this study, *D. magna* was exposed to waterborne uranium at concentrations ranging from  $10$  to  $75 \mu\text{g UL}^{-1}$  over three successive generations. The objectives were to examine: (1) how chronic uranium exposure might affect food assimilation; (2) whether uranium toxicity for *D. magna* might differ between generations. Simultaneously, recovery from uranium stress was investigated

in offspring returned to a clean medium after parental exposure.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Culture conditions

*D. magna* cultures were maintained in laboratory for several years in continuous parthenogenetic reproduction following OECD guideline 211 (1998). Daphnids were cultivated in freshwater artificial medium M4 (Elenndt and Bias, 1990) at pH 7 over several generations so as to increase uranium bioavailability during uranium tests (Zeman et al., 2008). A pH of 7 was obtained with a modification in Cl concentration and maintained by renewing medium twice a week. Daphnids were reared at a density of 1 animal per 50 mL in 2-L bottles at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  under a 16:8-h light:dark photoperiod and a light intensity of  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Axenic cultures of unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* were grown at  $24^\circ\text{C}$  in high salt medium (HSM, Harris, 1989) under fluorescent light with gentle shaking. Algal cultures were centrifuged, resuspended in M4-pH7 and fed to daphnids at a concentration of  $80,000 \text{ cells mL}^{-1}$  equivalent of a daily ration of  $100 \mu\text{g C daphnid}^{-1}$ . Culture conditions met the OECD requirement of  $>60$  neonates produced per adult over 21 days.

### 2.2. Exposure conditions

Uranium was obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) as uranyl nitrate hexahydrate ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) and stored as a stock solution of  $1 \text{ g L}^{-1}$  in  $0.2\%$   $\text{HNO}_3$ . Daphnids were exposed in polycarbonate bottles at a pH of 7 to four different conditions, including three nominal U concentrations of  $10$ ,  $25$  and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  and an unexposed control. In all conditions,  $\text{NaNO}_3$  concentration was adjusted to  $3.2 \mu\text{M}$  (without consequence for survival in the control) so as to eliminate differences in  $\text{NO}_3^-$  concentration associated with uranium spikes. The tested concentration range was selected in agreement with an  $\text{EC}_{10}$  of  $14 \mu\text{g UL}^{-1}$  and an  $\text{EC}_{50}$  of  $91 \mu\text{g UL}^{-1}$  for 21-day reproduction reported in M4-pH7 (Zeman et al., 2008).

Test and control media were renewed every day before food addition. Animals were fed daily with *C. reinhardtii* ( $80,000 \text{ cells mL}^{-1}$ ) at a ration of  $100 \mu\text{g C daphnid}^{-1}$ . Bottles were changed every week to limit U adsorption on bottle walls. Samples of freshly renewed medium were collected on a daily basis. Samples of medium after daphnid exposure were collected twice a week and filtrated on  $2\text{-}\mu\text{m}$  membranes. All water samples were stored at  $4^\circ\text{C}$  in darkness until U and ion analyses. Uranium concentrations in freshly renewed medium remained within 10% of nominal concentrations. Decrease in uranium concentration after 24 h exposure never exceeded 30% of nominal concentrations.

### 2.3. Experimental design

All generations were started with neonates of the brood 5 (within 24 h of release). Offspring were either exposed to the same concentration as their parent (Experiment A: Exposure of generations F0, F1 and F2) or returned to a clean medium to assess their capacity to recover from a parental exposure (Experiment B: Recovery of generations F'1 and F'2).

(A) *Exposure experiment (generations F0, F1 and F2)*: Each treatment was composed of six 1-L bottles containing 20 neonates. Three bottles were used to monitor daily survival and neonate production for 23 days. The three remaining bottles were used to measure respiration rate, body length and dry mass, brood size and dry mass and uranium bioaccumulation in daphnid tissues and eggs upon

deposition of broods 1, 3 and 5. Ingestion and assimilation rates were measured upon deposition of broods 1 and 5.

(B) *Recovery experiment (generations F1 and F2)*: Each treatment was composed of five 500-mL bottles containing 10 neonates. Three bottles were used to monitor daily survival and neonate production for 23 days. The two remaining bottles were used to measure body length and dry mass, brood size and dry mass upon deposition of broods 1, 3 and 5.

#### 2.4. Ingestion and carbon assimilation rates

In generations F0, F1 and F2, ingestion and carbon assimilation rates were measured in adult daphnids upon deposition of broods 1 and 5 using the radiocarbon method described by Peters (1984) and Lampert (1987).

Radiolabelled algae were prepared by incubating 300 mL of log phase culture with  $925 \text{ Bq mL}^{-1} \text{ NaH}^{14}\text{CO}_3$  in a closed flask for 2 days. Algae were centrifuged and washed three times with M4-pH7 to remove traces of radioactivity in the solution.  $^{14}\text{C}$ -labelled algae were adjusted to a concentration of  $80,000 \text{ cells mL}^{-1}$  in M4-pH7 of each uranium concentration. Triplicate samples of 5 mL were collected and filtered on acetate cellulose membranes ( $0.2 \mu\text{m}$ ) in order to measure radioactivity in algae.

Six polycarbonate vials per exposure condition, each containing five daphnids in 70 mL of radiolabelled food, were placed on a plankton wheel (1 rpm). Daphnids were allowed to feed on labelled algae for 30 min only, to prevent losses of  $^{14}\text{C}$  by defecation (Peters, 1984). Then, daphnids were rinsed and half were collected to measure ingestion rate, whereas the second half were transferred into vials filled with 70 mL of unlabelled food at respective uranium concentration. Daphnids were placed onto the plankton wheel for 3 additional hours, then rinsed and used to measure carbon assimilation.

Daphnid and membrane samples were placed individually in scintillation vials with 1 mL of tissue solubiliser (Soluec 350, PerkinElmer, Boston, USA) and incubated overnight at  $55^\circ\text{C}$ . After solubilisation, 19 mL of scintillation cocktail (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, USA) were added and radioactivity of  $^{14}\text{C}$  was measured with a liquid scintillation counter (Quantulus 1220, Wallac-PerkinElmer, Finland; detection limit:  $30 \text{ mBq}$ ). Carbon ingestion rate ( $\mu\text{g C h}^{-1} \text{ daphnid}^{-1}$ ) was calculated by the following equation:

$$I = \frac{A1_{\text{daphnid}}}{A_{\text{algae}} \times \Delta t}$$

where  $A1_{\text{daphnid}}$  was the activity in daphnids ( $\text{Bq daphnid}^{-1}$ ) after 30 min,  $A_{\text{algae}}$  was the specific activity in algae ( $\text{Bq } \mu\text{g}^{-1} \text{ C}$ ) and  $\Delta t = 0.5 \text{ h}$  of incubation time.

During the 3 h-incubation, a fraction of the newly assimilated food was turned over and respired as  $^{14}\text{CO}_2$ . This fraction was taken into account by measuring dissolved  $^{14}\text{CO}_2$  in samples of filtered medium from each vial ( $0.2 \mu\text{m}$  acetate cellulose membrane) following Bohrer and Lampert (1988). A first 8-mL subsample was transferred into a scintillation vial containing one drop of 10 M NaOH. Another 8-mL subsample was acidified with one drop of concentrated  $\text{HNO}_3$  and aerated for 10 min to remove  $\text{CO}_2$ . Both vials were added with 12 mL of scintillation cocktail and counted by liquid scintillation analysis. The difference in radioactivity between the acidified and alkaline subsamples was attributed to  $^{14}\text{CO}_2$  (Bohrer and Lampert, 1988). Carbon assimilation rate ( $\mu\text{g C h}^{-1} \text{ daphnid}^{-1}$ ) was calculated by the following equation:

$$A = \frac{A2_{\text{daphnid}} + A_{\text{CO}_2}}{A_{\text{algae}} \times \Delta t}$$

where  $A2_{\text{daphnid}}$  was the activity in daphnids ( $\text{Bq daphnid}^{-1}$ ) after 3 h,  $A_{\text{CO}_2}$  was the “respired” fraction of activity ( $\text{Bq daphnid}^{-1}$ ) after 3 h,  $A_{\text{algae}}$  was the specific activity in algae ( $\text{Bq } \mu\text{g}^{-1} \text{ C}$ ) and  $\Delta t = 0.5 \text{ h}$  of incubation time. Assimilation efficiency AE (dimensionless) was calculated as:  $AE = A/I$ .

#### 2.5. Respiration rate

On deposition of broods 1, 3 and 5, three daphnids per condition were placed individually into respiration chambers containing 1 mL of the test medium, maintained at  $20^\circ\text{C}$ . The decrease in oxygen partial pressure associated with respiration was recorded for 40–60 min using the Unisense microrespiration system (Unisense S/A, Aarhus, Denmark). Sensor signal was calibrated using vigorously bubbled clean medium (100% of  $\text{O}_2$ -saturation) and a solution of sodium ascorbate (0.1 M) in NaOH (0.1 M) (0% of  $\text{O}_2$ -saturation). The percentage saturation was converted into oxygen concentration using an equilibrium concentration in water of  $282.3 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$  ( $20^\circ\text{C}$ , 1 atm). Oxygen consumption rates ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ daphnid}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) were calculated as:

$$R = \frac{[\text{O}_2]_0 \times (1 - \exp^{-k \times \Delta t}) \times V}{\Delta t}$$

where  $[\text{O}_2]_0$  was the oxygen concentration ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) measured at  $t = 0$ ,  $V$  the volume (L) of medium in the respiration chamber,  $\Delta t = 1 \text{ h}$  and  $k$  was the consumption coefficient ( $\text{h}^{-1}$ ) obtained by fitting exponential models to observed oxygen concentrations:  $[\text{O}_2]_t = [\text{O}_2]_0 \times \exp^{-k \times t}$ .

#### 2.6. Body length and dry mass

Body length and dry mass were measured in each condition in neonates (<24 h) upon start of a new generation and in adult daphnids within 24 h of deposition of broods 1, 3 and 5. Five replicate samples composed of 5–8 neonates or individual adults (including those used for respirometry in F0, F1 and F2) were also collected. Samples were rinsed with ultra-pure water and body length was measured from the apex of the helmet to the base of the tail spine under a binocular microscope equipped with a micrometer. In adults, eggs were carefully dissected out from the brood pouch and counted. Neonates, dissected females and pooled eggs were transferred into pre-weighed aluminium pans. Samples were dried for 24 h at  $55^\circ\text{C}$ , cooled in a desiccator and weighed immediately with an SE2 ultra-microbalance (Sartorius AG, Göttingen, Germany) at a precision of  $0.1 \mu\text{g}$ .

#### 2.7. Uranium and major ion analyses

Water samples were acidified with 0.2 mL  $\text{HNO}_3$  (69%) prior to the quantification of U and major cations by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA; detection limit of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  for U and cations respectively). Major anions were quantified by ion chromatography (ILC DX-120, Dionex, detection limit of  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Dry daphnid, egg and neonate samples were mineralized on sand bath ( $90^\circ\text{C}$ ) until evaporation in 1 mL of  $\text{HNO}_3$  (69%) and 1 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) successively. Mineralised samples were taken in 10 mL of  $\text{HNO}_3$  ultra pure 2% (v/v) and diluted before analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS 7500Cx, Agilent Technologies, Tokyo, Japan; detection limit  $\sim 0.11 \text{ ng UL}^{-1}$ ).

**Table 1**

List of equations and parameters used to describe daphnid physiology and life history in agreement with the DEB theory (Kooijman, 2000; Kooijman and Bedaux, 1996).

States variables (units)	Equations	Parameters, definitions (units)
Body length (mm)	$BL_t = BL_m - (BL_m - BL_b) \cdot \exp(-\gamma \cdot t)$ (1)	$BL_m$ , Maximum body length (mm); $BL_b$ , body length at birth (mm); $\gamma$ , von Bertalanffy growth rate ( $d^{-1}$ )
Body dry mass ( $\mu g$ )	$BW_t = \delta \cdot BL_t^3$ (2)	$\delta$ form coefficient ( $\mu g DW mm^{-3}$ )
Ingestion rate ( $\mu g C daphnid^{-1} h^{-1}$ )	$I_t = \alpha \cdot BL_t^2$ (3)	$BL_t$ , Body length at time t (mm); $\alpha$ , surface specific ingestion rate ( $\mu g C mm^{-2} h^{-1}$ )
Assimilation rate ( $\mu g C daphnid^{-1} h^{-1}$ )	$A_t = \varepsilon \cdot BL_t^2$ (4)	$\varepsilon$ , Surface specific assimilation rate ( $\mu g C mm^{-2} h^{-1}$ )
Respiration rate ( $\mu g O_2 daphnid^{-1} h^{-1}$ )	$M_t = r_1 \cdot BL_t^2 + r_2 \cdot BL_t^3$ (5)	$r_1$ , Surface specific respiration rate ( $\mu g O_2 mm^{-2} h^{-1}$ ); $r_2$ , volume specific respiration rate ( $\mu g O_2 mm^{-3} h^{-1}$ )
Egg dry mass ( $\mu g$ )	$EW_t = \beta \cdot BL_t + \omega$ (6)	$\beta$ ( $\mu g DW mm^{-1}$ ), $\omega$ ( $\mu g DW$ ), slope and intercept of the linear regression
Internal [U] in daphnid ( $ng U \mu L^{-1}$ )	$\frac{d}{dt} C_t = C_{ext} \frac{k_1}{BL_t} - C_t \cdot \left( \frac{k_2}{BL_t} + \frac{d}{dt} \ln BL_t^3 \right)$ (7)	$C_{ext}$ , External [U] ( $\mu g U L^{-1}$ ); $k_1$ , accumulation rate ( $d^{-1}$ ); $k_2$ , elimination rate ( $d^{-1}$ )

### 2.8. Bioaccumulation and calculation of dose rates

Uranium was considered to be homogeneously distributed in daphnid tissues. Internal uranium concentration  $C_t$  ( $ng U \mu L^{-1}$ ) was calculated as:

$$C_t = \frac{Q_t}{V_t}$$

where  $Q_t$  is the amount of bioaccumulated uranium measured per daphnid ( $ng U daphnid^{-1}$ ) and  $V_t = 0.04\pi \cdot BL_t^3$  is the estimated body volume ( $\mu L$ ) assuming an ellipsoid shape with constant axial ratio of 1:0.6:0.4 (Alonzo et al., 2008).

Bioaccumulation factor (BAF) was defined at equilibrium as the amount of uranium in daphnids ( $\mu g kg^{-1}$  fresh weight, hereafter "fw"; calculated assuming that daphnid dry weight represents 10% of fresh weight) relative to the concentration in the medium ( $\mu g L^{-1}$ ). Values at equilibrium were calculated, using the coefficients  $k_1$  and  $k_2$  of the fitted biokinetic model (Table 1).

Grams of U were converted to activities (Bq) based on depleted uranium specific activity of  $1.43 \times 10^4 Bq g^{-1} U$  measured in the stock solution. Delivered dose rates  $DR$  ( $mGy h^{-1}$ ) were obtained from the following equation:

$$DR = \sum_i DCC_i \cdot [activity]_i$$

where  $DCC_i$  ( $mGy h^{-1} Bq^{-1} mL$ ) are dose conversion coefficients calculated for uranium in the medium and in daphnid tissues (Table 2) by EDEN-v2 software (Beaugelin-Seiller et al., 2006),  $[activity]_i$  are volume-specific activities ( $Bq mL^{-1}$ ) in daphnid tissues and in the medium. Uranium daughters down to  $^{231}Th$  were accounted for in the dose calculations.

**Table 2**Dose conversion coefficients (DCC) for depleted uranium in daphnid tissues and in the medium calculated in relation to body length (mm) and used to convert volume-specific activities ( $Bq mL^{-1}$ ) to dose rates ( $mGy h^{-1}$ ) delivered to daphnids.

Body length (mm)	DCC ( $mGy h^{-1} Bq^{-1} mL$ )	
	Daphnid tissues	Medium
1.0	$2.64 \times 10^{-2}$	$13.6 \times 10^{-4}$
2.0	$2.70 \times 10^{-2}$	$6.84 \times 10^{-4}$
3.0	$2.72 \times 10^{-2}$	$4.61 \times 10^{-4}$
4.0	$2.73 \times 10^{-2}$	$3.46 \times 10^{-4}$
5.0	$2.74 \times 10^{-2}$	$2.77 \times 10^{-4}$

### 2.9. Statistical analyses

Effects of uranium exposure on body length, body dry mass, ingestion rate, assimilation rate, respiration rate, egg dry mass and bioaccumulation were tested after accounting for the coincident influence of body length and/or time (Table 1). Used relationships conformed to the DEB theory (Kooijman, 2000). The analytical solution of the differential equation for bioaccumulation  $Q_t$  was solved algebraically with Mathematica 6 (Wolfram Research Inc., Champaign, USA). Statistical analyses were conducted with the statistical computing software R (R Development Core Team, 2006), linear and non-linear models being fitted with routines `lm` and `glm` following the least-squares criterion. Errors normality assumption was tested with statistics of Shapiro–Wilk, Lilliefors, Anderson–Darling, Cramer–von Mises, Shapiro–Francia and Jarque–Bera. Errors homoscedasticity assumption was tested with statistics of Levene, Bartlett and Filigner–Killeen. In case of heteroscedasticity, sandwich covariance matrix estimators, provided by the R package `sandwich`, were used for hypothesis testing of linear models (Zeileis, 2006). Finally, multiple comparison tests were achieved with the sequential Holm procedure (Holm, 1979), to ensure 5% error of first kind.

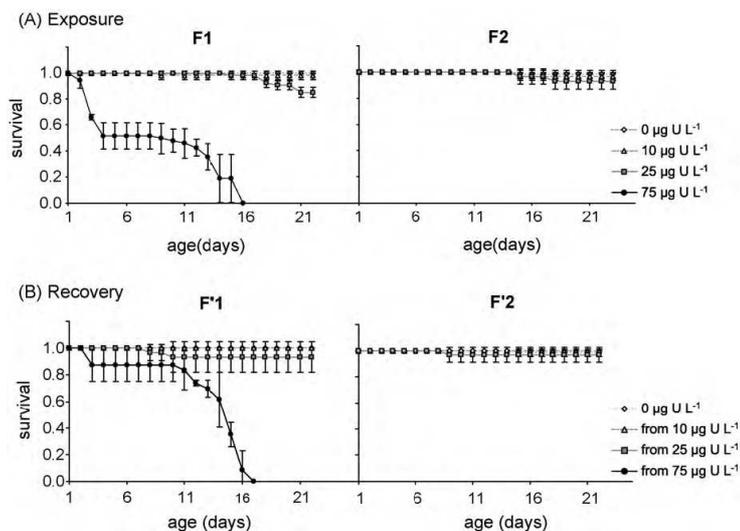
## 3. Results

### 3.1. Survival

Survival of daphnids in generation F0 was not affected by uranium exposure whatever the tested concentration. In F1 and F2, daphnids exposed to  $10 \mu g L^{-1}$  or recovering from a parental exposure to this concentration exhibited a very low mortality, never exceeding 3% after a 23-day period.

A slight mortality was also observed in F1 after 15 days at  $25 \mu g L^{-1}$  and reaching 15% on day 23 (Fig. 1A). Comparable effects were observed at this concentration among F'1, F'2 and F'2 generations, with mortality ranging from 3 to 7% after 23 days in offspring exposed or recovering from parental exposure.

This contrasted with generation F1 exposed to  $75 \mu g L^{-1}$  (Fig. 1A), which showed a mortality of 52% after 4 days of exposure and 100% on day 16. A strong mortality was similarly observed on day 11 in F'1 offspring transferred to clean medium after a parental exposure to  $75 \mu g L^{-1}$  (Fig. 1B). No F'2 and F'2 generations could be studied at  $75 \mu g L^{-1}$ , in absence of reproduction in F1 at this concentration.



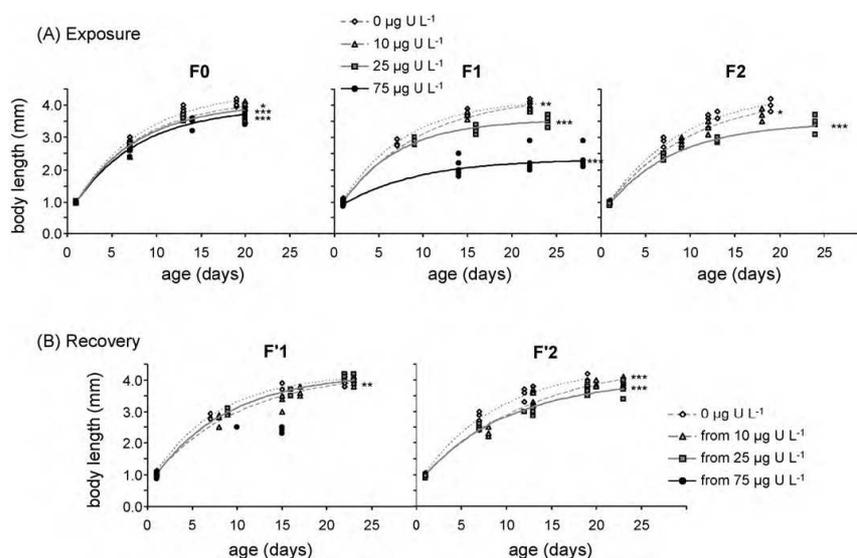
**Fig. 1.** Daphnid survival in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  (F1 and F2) and in recovering generations (F'1 and F'2).

### 3.2. Somatic growth in length and mass

Uranium exposure induced a reduction in body length with increasing concentration (Fig. 2 and Table 3). Observation suggested that the effect on somatic growth in length might increase over generations. This reduction was significant in F0 at a concentration as low as 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  as shown by fitting von Bertalanffy curves (Table 1–Eq. (1)). At this concentration, fits yielded a reduction in maximum length  $L_m$  of 6% compared to the control in F0 ( $p \leq 0.05$ ). This reduction in body length remained very slight, although statistically significant, in F1 and F2 exposed to 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  as well as in F'1 and F'2 recovering from parental exposure. Growth

inhibition was strong at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  with maximum length reduced by 9, 16 and 23% compared to the control in F0, F1 and F2 respectively. At 75  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $L_m$  was reduced by 11% in F0 and 44% in F1, showing that offspring returned to a clean medium did not recover after parental exposure.

Body dry mass was strongly affected by uranium exposure mainly as a result of the reduction in size observed with increasing concentration (Fig. 3 and Table 3). Furthermore, body dry mass as a function of body length (Table 1–Eq. (2)) significantly differed in F0 at concentrations  $\geq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  and in F1 at concentrations  $\geq 10 \mu\text{g L}^{-1}$  compared to the control. In fact, at equal body length,



**Fig. 2.** Daphnid body length (mm) in relation to age in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  (F0, F1 and F2) and in recovering generations (F'1 and F'2). Statistics: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

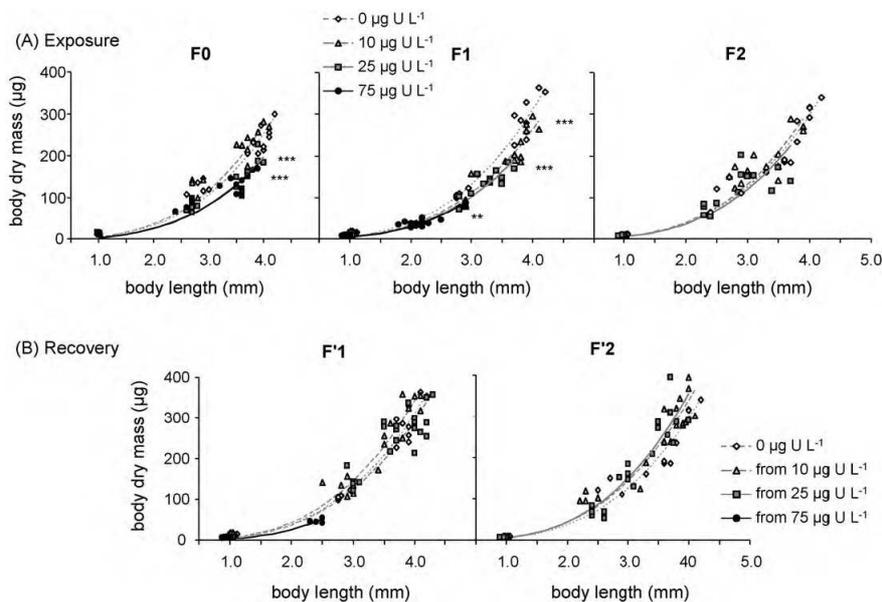


Fig. 3. Daphnid body dry mass ( $\mu\text{g}$ ) in relation to body length (mm) in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  (F0, F1 and F2) and in recovering generations (F'1 and F'2). Statistics: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ .

daphnid dry mass was 22% smaller at 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  than in the control in both F0 and F1 and 16% smaller at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  than in the control in F1. No significant difference in body dry mass between

the control and exposed daphnids was observed in F2 while offspring returned to a clean medium exhibited significantly greater body mass than the control in F'2.

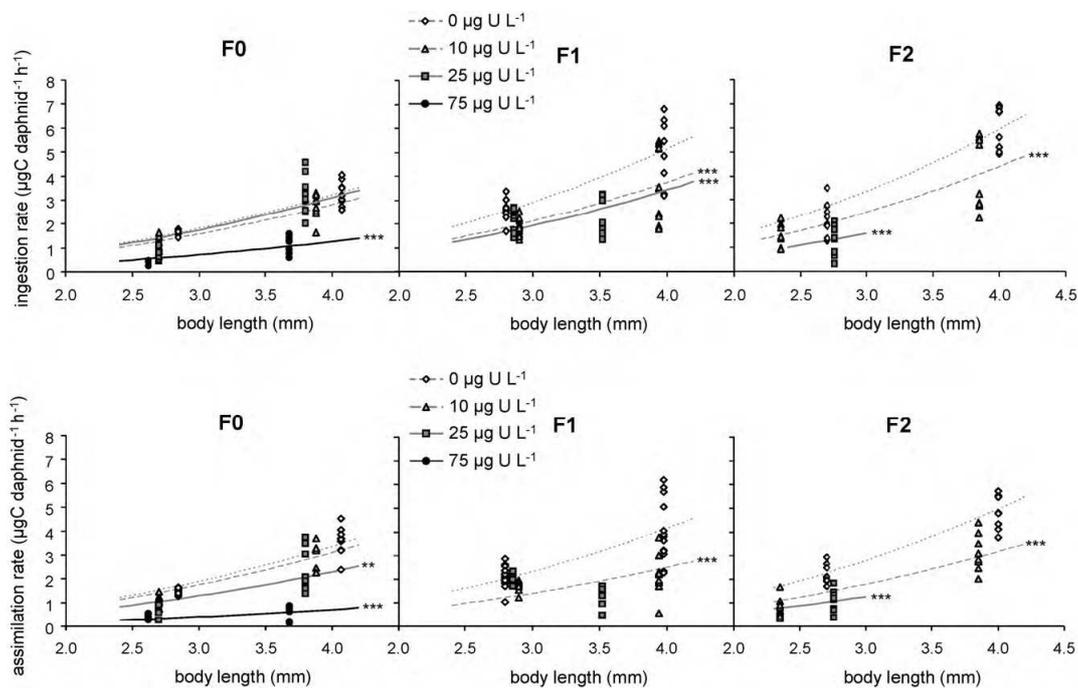


Fig. 4. Daphnid ingestion rate ( $\mu\text{g C daphnid}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) in relation to body length (mm) in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  (F0, F1 and F2). Statistics: \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Table 3**  
Parameters of growth in body length and body dry mass, ingestion, assimilation, respiration and egg dry mass fitted for different exposure conditions in three successive generations (F0, F1 and F2) and in generations returned to a clean medium (F1 and F2) (statistics: \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.05$ ).

Generation	[U] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Body length			Body dry mass			Egg dry mass			C ingestion			C assimilation			O <sub>2</sub> consumption		
		$BL_p$ (mm)	$BL_m$ (mm)	$\gamma$ (d <sup>-1</sup> )	$\delta$ ( $\mu\text{g mm}^{-3}$ )	$\beta$ ( $\mu\text{g mm}^{-1}$ )	$\omega$ ( $\mu\text{g}$ )	$\alpha$ ( $\mu\text{g h}^{-1} \text{mm}^{-2}$ )	$\varepsilon$ ( $\mu\text{g h}^{-1} \text{mm}^{-2}$ )	$r_1$ ( $\mu\text{g h}^{-1} \text{mm}^{-2}$ )	$r_2$ ( $\mu\text{g h}^{-1} \text{mm}^{-3}$ )	$p$	$p$	$p$	$p$	$p$			
F0	0	0.99	4.42	0.13	3.92	3.03	-3.57	0.20	0.21	0.033	0.035								
	10	0.99	4.18	0.14	4.27	3.88	-5.75	0.17	0.19	0.104	0.025								
	25	0.99	4.05	0.14	3.06	3.05	-3.75	0.19	0.14	0.125	0.016								
F1	75	1.00	3.92	0.14	3.04	2.01	-0.91	0.08	0.04	0.120	-0.008								
	0	1.07	4.20	0.14	4.85	2.76	-1.37	0.32	0.26	0.219	-0.008								
	10	1.02	4.30	0.11	4.10	1.44	3.02	0.23	0.16	0.443	-0.071								
F2	25	1.01	3.55	0.16	3.78	2.11	-0.03	0.21	0.16	0.231	-0.034								
	75	0.93	2.34	0.12	3.61	3.32	-3.41												
	0	1.02	4.45	0.12	4.63	2.29	-0.68	0.37	0.31	0.146	0.011								
F1	10	0.99	4.34	0.11	4.84	1.63	1.25	0.27	0.20	0.121	0.349								
	25	0.96	3.46	0.13	4.45	1.83	0.92	0.18	0.14	0.591	-0.122								
	From 10 From 25 From 75	1.04 1.01 Failed <sup>a</sup>	4.28 4.22 Failed <sup>a</sup>	0.10 0.12 0.12	5.34 4.57 3.28	4.43 2.39	-6.65 -0.72												
F2	From 10	0.96	4.60	0.08	5.27	2.91	-2.47												
	From 25	0.98	4.03	0.10	5.56	3.02	-3.05												

<sup>a</sup> General linear model failed using R.

### 3.3. Ingestion, assimilation and respiration

Ingestion and assimilation rates were described as linear functions of square body length (Table 1—Eqs. (3) and (4)). Because uranium strongly affected daphnid size, increasing concentration resulted in a strong reduction in nutrition (Fig. 4). Relationships fitted in exposed daphnids were compared to the control in order to take the indirect effect on size into account. Surface-specific ingestion rates  $\alpha$  (Table 3) did not differ from the control in F0 at concentrations  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  suggesting that the reduced ingestion was only a consequence of the observed reduction in daphnid size. The values of  $\alpha$  were significantly smaller than the control at a concentration of  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and at concentrations  $\geq 10 \mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and F2, suggesting that uranium directly affected ingestion, independent of body length.

Surface specific assimilation rates  $\varepsilon$  were calculated and showed a significant difference from the control at concentration  $\geq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and as low as concentrations  $\geq 10 \mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and F2. Assimilation efficiency was reduced in F0 at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (74%) and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  (57%) compared to the control (80–100%) and in F1 at deposition of brood 5, e.g., after 24 days of exposure to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (60%) and  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (57%).

Respiration rates, measured in F0, F1 and F2, were described as functions of square and cubic body length (Table 1—Eq. (5)). Relationships fitted for exposed daphnids did not significantly differ from the control at any uranium concentration and in any generation, due to a high individual variability. As a consequence, the observed reduction in respiration rates with increasing concentration (as an example in F0, from 2.77–3.69 to 2.01–2.54  $\mu\text{g O}_2 \text{daphnid}^{-1} \text{h}^{-1}$  respectively in the control and at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  at deposition of brood 5) was mainly a result of the reduction in body size induced by uranium (in the example, from 4.0 to 3.7 mm).

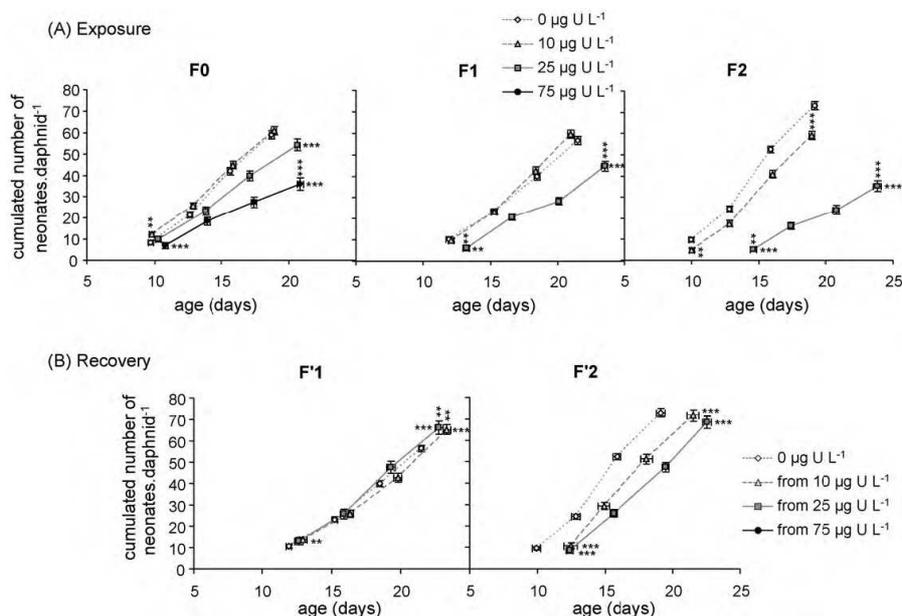
### 3.4. Reproduction

Reproduction closely followed moulting cycles with brood deposition occurring every 3 days in the control within a few hours of cuticle renewal. Uranium exposure induced perturbations in reproduction causing delay in brood release, reduction in fecundity and mass invested per egg with increasing concentration (Figs. 5 and 6).

In F0, average delays in brood release were greatest at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , ranging from 1.3 to 2.5 days at deposition of broods 1 and 4, respectively. Furthermore, fecundity was reduced by 48% compared to the control. The vast majority of daphnids exposed to  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  did not reproduce in F1, possibly because daphnids did not reach the required size for reproduction. Very few abortive eggs were produced in this condition. Delays in F0 exposed to  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  ranged from 0.7 to 1.9 days at deposition of broods 1 and 4, respectively. Delays increased over the course of generations reaching 1.9 and 5.0 days in F2 at deposition of broods 1 and 4, respectively. Fecundity decreased in parallel over the course of generations, with reduction in average brood size of 25 and 42% in F1 and F2, respectively. The only effect on reproduction observed at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  was a reduction in fecundity of 20% in F2.

Dry mass invested per egg increased linearly with mother body length. No significant difference in this relationship was observed between the control and exposed daphnids (Fig. 6). Consequently, the decrease in egg dry mass observed between exposure conditions was a result of the decrease in size observed with increasing uranium concentration.

Returning offspring to a clean medium improved reproduction only after parental exposure to  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ . This improvement mainly concerned fecundity, with a neonate production 28% greater in F1 than in the control F1 and not significantly different in F2

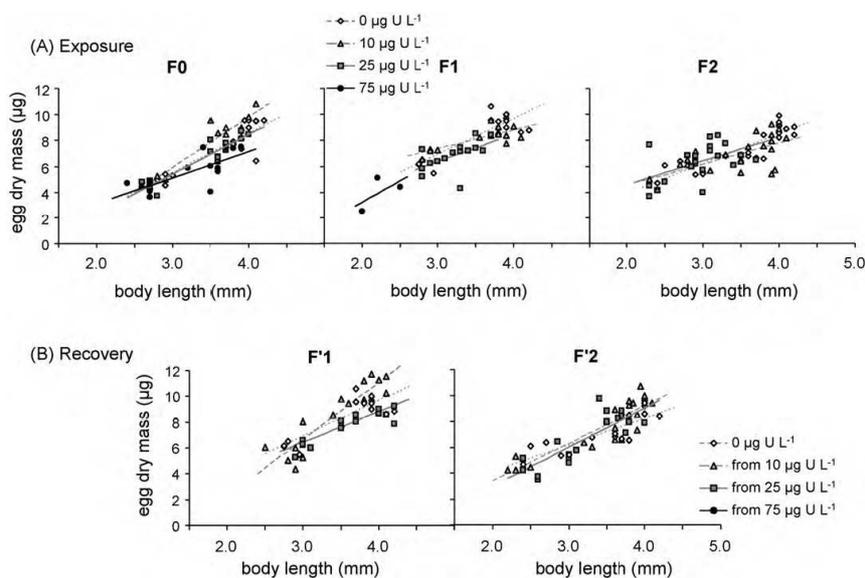


**Fig. 5.** Cumulated number of neonates produced per daphnid over four broods in relation to age in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and 75 µg L<sup>-1</sup> (F0, F1 and F2) and in recovering generations (F'1 and F'2). Statistics: \*\*\**p* < 0.001, \*\**p* < 0.01.

compared to the control F2. Delays in brood release remained of the same magnitude in both F'1 and F'2 as in exposed parents at 25 µg L<sup>-1</sup>. Coping with exposure to 10 µg L<sup>-1</sup> might have metabolic costs which become visible only once offspring are returned to a clean medium. In fact, delays of 1–2.3 days in brood release were observed after parental exposure to 10 µg L<sup>-1</sup> although no significant delay was detected in daphnids exposed to 10 µg L<sup>-1</sup>.

### 3.5. Bioaccumulation and dose rates

Uranium amounts in freshly deposited eggs were below quantification limit of ICP-MS, in every exposure condition and generation. In agreement with the biokinetic model (Table 1—Eq. (7)), uranium content in daphnids increased with age and with increasing concentration in the medium (Fig. 7), reaching average maxima



**Fig. 6.** Dry mass per egg (µg) in relation to body length (mm) in the successive generations exposed to uranium concentrations of 0, 10, 25 and 75 µg L<sup>-1</sup> (F0, F1 and F2) and in recovering generations (F'1 and F'2).

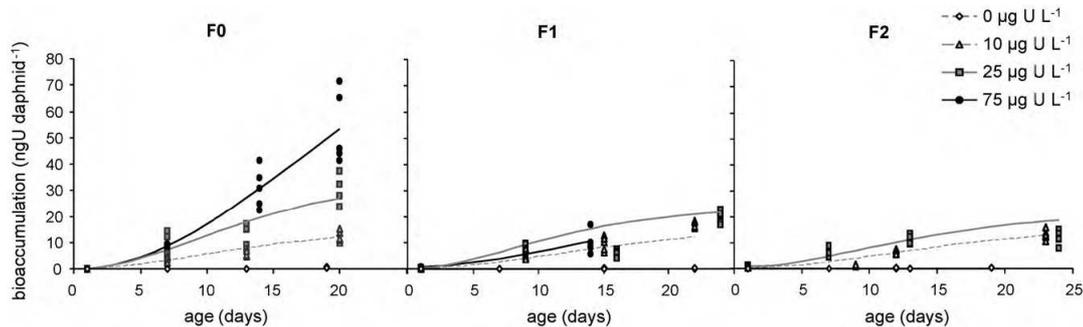


Fig. 7. Uranium bioaccumulation in daphnids ( $\text{ng U daphnid}^{-1}$ ) in relation to age in the successive generations exposed uranium concentrations of 0, 10, 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  (F0, F1 and F2). Lines represent to fitted curves.

of  $17 \pm 1$ ,  $32 \pm 6$  and  $54 \pm 13 \text{ ng U daphnid}^{-1}$  after 20 days of exposure to 10, 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. However, no difference in the amount of bioaccumulated uranium was observed between exposures at 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  in F1, due to the strong inhibition in somatic growth observed at the highest concentration in F1. Best fits (least sums of squares) were obtained with accumulation and elimination rates differing between exposure conditions, with  $k_1 = 0.223 \text{ d}^{-1}$  and  $k_2 = 1.327 \text{ d}^{-1}$  at concentrations  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $k_1 = 0.043 \text{ d}^{-1}$  and  $k_2 = 0.126 \text{ d}^{-1}$  at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  independent of the generation.

Bioconcentration factors based on measured burdens ranged from 417 to  $870 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$  at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  and from 348 to  $658 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$  at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ . However, measurements were not performed at equilibrium. Bioaccumulation factors at equilibrium predicted from  $k_1$  and  $k_2$  reached 690 and  $1410 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$  at  $\leq 25$  and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.

Average dose rates were calculated in each exposure condition based on uranium uptake predicted by the biokinetic model, yielding maxima of 5, 12 and  $20 \mu\text{Gy h}^{-1}$  at 10, 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  respectively. Alpha particles from uranium in daphnid tissues contributed  $>99.9\%$  to total dose rates whereas beta- and gamma-emissions from uranium in daphnids or in the water remained well below 0.1% of total dose rates.

#### 4. Discussion

The low penetrating power of alpha particles, which are attenuated by water and do not pass through exoskeletons of aquatic organisms (Whicker and Schultz, 1982) resulted in minimal radiological hazard of external exposure to uranium. Levels of internally accumulated uranium were used to calculate bioaccumulation factors (BAF) and address the associated radiological hazard (Blaylock et al., 1993; Whicker and Schultz, 1982). Values of BAF estimated at equilibrium were from 690 to  $1410 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$  at 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  but showed some variability among sampled daphnids. BAF values for uranium in freshwater invertebrates were recently reviewed in the literature and ranged over five orders of magnitude (from 3.6 to  $60,000 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$ ) with a mean of  $170 \text{ L kg}^{-1} \text{ fw}$  (IAEA, 2009). Internal dose rates were evaluated based on maximal average burdens observed at the different concentrations independent of the generation. Maximum values obtained in the different exposure conditions ranged from 5 to  $20 \mu\text{Gy h}^{-1}$ . These values were of the same order of magnitude as those found by Zeman et al. (2008) under similar exposure conditions. In Alonzo et al. (2008), slight reduction in growth with no effect on ingestion and fecundity rates was observed after exposure of several generations to internal alpha delivered by exposure to Am-241 at a 15-fold higher dose rate ( $300 \mu\text{Gy h}^{-1}$ ) than in the present study. Thus, effects of uranium

in daphnids were only attributable to chemical toxicity, confirming that chemotoxicity of depleted uranium is of much greater concern in comparison to its radiotoxicity, in agreement with Miller et al. (2002), Sheppard et al. (2005) and Mathews et al. (2009).

In *D. magna* exposed to uranium, structural damages on intestinal epithelium were observed at  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  suggesting that uranium might cause some functional perturbations in assimilation (Zeman, 2008). This hypothesis was confirmed in this study with a significant reduction in surface specific assimilation rates detected at 25 and  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and at concentrations as low as  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and F2. Metabolic rates are known to vary with organism size. Observed respiration rates were affected only through the reduction in size induced by uranium, since no significant difference in oxygen consumption was visible between the control and exposed daphnids of equal size. Baillieul et al. (2005) similarly found that cadmium mainly affected energy budget through a reduction in assimilation, whereas respiration showed little response to this metal. Other studies similarly showed that stress affects energy intake to a greater extent than energy consumption in a wide range of species including *Gammarus pulex* (Maltby et al., 1990), *D. magna* (Baird et al., 1990; Barber et al., 1990) and *Dreissena polymorpha* (Schneider et al., 1998; Smolders et al., 2002).

In the present study, observed effects on growth and reproduction were in good agreement with predictions of net production and DEB theories (Nisbet et al., 2004; Kooijman, 2000), in case of a reduced energy intake, due to low food availability or exposure to toxicants. In fact, daphnids exposed to uranium showed reduced fecundity, body size and mass. Furthermore, a delay in the release of the first brood was observed at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  in F0 and at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  in F1 and F2. This observation might partly result from growth retardation under toxic stress (Reynaldi et al., 2006) because daphnids need to reach a size threshold in order to mature. It might also be caused by the reduced size at birth observed at  $\geq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  as small neonates are known to grow smaller, reach maturity later and produce fewer eggs than large neonates (Ebert, 1991, 1992, 1994). At  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  the slight reduction in size observed in F2 caused only a small reduction in fecundity and no delay in reproduction. Age and size at maturity are among key life history traits in *Daphnia* (Ebert, 1992), delay in first reproduction having critical consequences for population dynamics (Alonzo et al., 2008).

In our study, increasing uranium concentration was shown to induce a reduction in egg mass in agreement with Zeman et al. (2008). This observation was mainly a consequence of the reduced size of mothers, in agreement with Tessier and Consolatti (1989). Small egg mass might be a good indicator of a strong and irreversible reduction in offspring viability at  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , as suggested by the very strong mortality observed in the following generation either under the same uranium exposure or after neonates were

returned to a clean medium. Similarly, neonates of small size or born from eggs of small mass showed a greater sensitivity to toxic effects after parental exposure to Am-241 contamination, external gamma irradiation and cadmium (Alonzo et al., 2008; Gilbin et al., 2008; Enserink et al., 1990). Those results highlight the necessity to consider offspring quality as an additional endpoint in chronic 21-day tests (Hammers-Wirtz and Ratte, 2000). A reduction in energy reserves deposited in eggs, as reflected in egg mass, might explain the increased offspring sensitivity to uranium. This observation might also result from an exposure of eggs in the brood pouch, during 3 days of embryogenesis. A direct exposure of embryos in the brood chamber to environmental pollutants, such as aniline derivatives, was suggested by Abe et al. (2001) on the basis that daphnids actively exchange the fluid in the brood chamber for environmental water in order to support embryonic oxygen demand (Kobayashi et al., 1987). In our results, the absence of uranium in freshly laid eggs, even at the highest tested concentration, suggested that ovaries acted as a barrier against a direct maternal transfer of uranium. Further experimental tests are required to investigate uranium contamination during embryonic stage.

In this study, effects of uranium were shown to increase in severity across exposed generations. This result might differ depending on which brood number is used to start subsequent exposed generations. Using 5th brood in our experiments allowed uranium to accumulate in mothers and potentially increased effects across generations whereas 3rd brood is often regarded as the fittest offspring in *D. magna*. At  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , sublethal effects on reproduction and growth were observed in F0 whereas daphnids did not survive in F1. Like Brennan et al. (2006) observed with daphnids exposed to four environmental oestrogens for two generations, results with uranium suggested that a weakening of the offspring might occur in the first generation leading to a higher susceptibility to lethal effects in the progeny. Toxicity of uranium for reproduction also increased across generations at 10 and  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , causing delay in brood deposition and reduction in number of eggs per brood. Similar observations were reported in the third generation exposed to internal alpha irradiation at  $15 \text{mGy h}^{-1}$  (Alonzo et al., 2008) or to  $50 \text{mg L}^{-1}$  estrogen diethylstilbestrol (Baldwin et al., 1995). Daphnid reproductive capacity mainly declined across generations exposed to alpha irradiation at 0.3 and  $1.5 \text{mGy h}^{-1}$ , through a decreased proportion of breeding daphnids (Alonzo et al., 2008).

The observed increase in toxic effects of uranium across generations contrasted with results obtained during long-term exposure to other stable metals such as cadmium, nickel and copper. In fact, *D. magna* exposed to sublethal concentrations of copper for 12 successive generations or cadmium for three generations was shown to become more resistant to acute toxicity (LeBlanc, 1982; Bodar et al., 1990). *D. magna* exposed to  $160 \mu\text{g L}^{-1}$  nickel for seven successive generations showed an increase in intrinsic rate of population growth despite decreased mean life span and body length of primiparous daphnids (Münzinger, 1990). These results suggested the development of an adaptive response which was shown to involve the induction of metallothionein-like protein (MTLP) (Stuhlbacher et al., 1992; Guan and Wang, 2004; Bodar et al., 1990). This mechanism controlling the homeostasis of essential metals and sequestering toxic metals in the cell might protect organisms against chemotoxicity but not radiotoxicity. In our study, toxic resistance was not observed over three exposed generations suggesting that uranium might not induce MTLP or might induce MTLP after a longer multigeneration exposure, or that MTLP does not protect against uranium chemotoxicity.

Continuously changing conditions in ecosystems require taking an interest in recovery ability of organisms after a stress situation, which determines the population resistance to episodes of toxic stress in the environment. This study showed that once returned to a clean medium, progeny did not survive after parental exposure to

$75 \mu\text{g L}^{-1}$  uranium suggesting irreversible effects at this concentration whereas effects on survival and reproduction decreased after parental exposure to  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$ . A similar increase in reproduction rates was observed in *D. magna* whose parents were previously exposed to diazinon below  $0.5 \text{ng L}^{-1}$  (Sanchez et al., 1999). Daphnids returned to a clean medium after parental exposure to uranium  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$  exhibited a greater body mass than the control. This difference was more complex to interpret and might involve some compensatory process such as additional energy storage in F2 to counterbalance effects of uranium toxicity. This process might also take place in daphnids returned to a clean medium despite the absence of toxicity and resulted in an increased body mass compared to the control.

## 5. Conclusion

In *D. magna*, uranium affects carbon assimilation with strong consequences for somatic growth and reproduction. Moreover, increased effects on life history traits and physiology were observed across exposed generations as low as  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , with potential capacity to recover in a clean medium after exposure to  $\leq 25 \mu\text{g L}^{-1}$ . Results presented in this study illustrate the necessity of carrying out multigeneration tests or examining offspring quality to assess environmental risk of waterborne uranium and other pollutants and suggest that chronic toxicity measured over one generation of *Daphnia* (21-day tests) might lead to underestimating risk.

## Acknowledgements

We would like to thank Virginie Camilleri, Sandrine Frelon, Marcel Morello and Sylvie Pierrisnard for their helpful assistance in radiological and chemical analyses.

## References

- 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.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F.A., Garnier-Laplace, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 87, 146–156.
- Baillieux, M., Smolders, R., Blust, R., 2005. The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Straus. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 140, 364–373.
- Baird, I., Barber, D.J., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Functional Ecology* 4, 399–407.
- Baldwin, W.S., Milam, D.L., Leblanc, G.A., 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 945–952.
- 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. *Aquatic Toxicology* 42, 115–137.
- Barata, C., Baird, D.J., Markich, S.J., 1999. Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones: an approach using concentration–time–response surfaces. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 326–331.
- Barber, I., Baird, D.J., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects. *Functional Ecology* 4, 409–414.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 497–505.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Physics* 90, 485–493.
- Blaylock, B.G., Frank, M.L., O'Neal, B.R., 1993. Methodology for estimating radiation dose rates to freshwater biota exposed to radionuclides in the environment. In: *Methodology for Estimating Radiation Dose Rates to Freshwater Biota Exposed to Radionuclides in the Environment*.
- Bodar, C.W.M., Van der Sluis, I., Van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 16, 33–40.
- Bohrer, R.N., Lampert, W., 1988. Simultaneous measurement of the effect of food concentration on assimilation and respiration in *Daphnia magna* Straus. *Functional Ecology* 2, 463–471.

- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In: Métivier, H. (Ed.), L'Uranium de l'Environnement à l'Homme. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 7–41.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 90, 29–36.
- Brennan, S.J., Brougham, C.A., Roche, J.J., Fogarty, A.M., 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 49–55.
- Bywater, J.F., Banackowski, R., Bailey, M., 1991. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1449–1458.
- Calow, P., Sibly, R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology* 4, 283–288.
- Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.M., 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71, 574–581.
- 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., 1992. A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. *Limnology & Oceanography* 37, 878–881.
- Ebert, D., 1994. A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size at maturity in *Daphnia magna*. *Oikos* 69, 309–317.
- Environnement Canada, 2003. Liste des substances d'intérêt prioritaire – Rapport d'évaluation – Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain), Gouvernement du Canada.
- Elenit, 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.
- Enserink, L., Luttmner, W., Maas-Diepeveen, H., 1990. Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 17, 15–26.
- Gilbin, R., Alonzo, F., Garnier-Laplace, J., 2008. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 134–145.
- Guan, R., Wang, W.X., 2004. Cd and Zn uptake kinetics in *Daphnia magna* in relation to Cd exposure history. *Environmental Science and Technology* 38, 6051–6058.
- Guan, R., Wang, W.X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 141, 343–352.
- Harris, E.H., 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, Inc.
- Hammers-Wirtz, M., Ratte, H.T., 2000. Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1856–1866.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65–70.
- IAEA, 2009. Quantification of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments for Radiological Assessments. IAEA-TECDOC.
- Kobayashi, M., Hayakawa, F., Ninomiya, M., 1987. Hatchability and hemoglobin of *Daphnia magna* embryo. *Physiological Zoology* 60, 507–512.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. 2nd ed.
- Kooijman, S.A.L.M., Bedaux, J.J.M., 1996. The Analysis of Aquatic Toxicity Data. VU University Press, Amsterdam, p. 149.
- 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*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2198–2203.
- Lampert, W., 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia* 45, 143–192.
- LeBlanc, G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological* 27, 309–322.
- Maltby, L., Naylor, C., Calow, P., 1990. Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19, 285–291.
- Markich, S.J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *The Scientific World Journal* 2, 707–729.
- Mathews, T., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., Adam, C., Della-Vedova, C., 2009. A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science and Technology* 43, 6684–6690.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91, 246–252.
- Münzinger, A., 1990. Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel. *Water Research* 24, 845–852.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution* 130, 309–316.
- Nisbet, R.M., McCauley, E., Gurney, W.S.C., Murdoch, W.W., Wood, S.N., 2004. Formulating and testing a partially specified dynamic energy budget model. *Ecology* 85, 3132–3139.
- OECD, 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test, Guidelines for Testing of Chemicals, Rep. No. 211. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Pane, E.F., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2004. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1051–1056.
- Peters, R.H., 1984. Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In: *A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*, pp. 336–412.
- Pickett, J.B., Specht, W.L., Keyes, J.L., 1993. Acute and Chronic Toxicity of Uranium Compounds to *Ceriodaphnia dubia*. Savannah River, Aiken, South Carolina, p. 57.
- 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.
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behaviour in natural environments. In: *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Lands and Waste Management*, pp. 333–377.
- Reynaldi, S., Duquesne, S., Jung, K., Liess, M., 2006. Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1826–1830.
- Sanchez, M., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E., 1999. Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology—C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 124, 247–252.
- Schneider, D.W., Madon, S.P., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998. Seston quality controls zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) energetics in turbid rivers. *Oecologia* 117, 331–341.
- Semaan, M., Holdway, D.A., Van Dam, R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environmental Toxicology* 16, 365–376.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79, 55–83.
- Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1889–1896.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comparative Biochemistry and Physiology—C Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 101, 571–577.
- Tessier, A.J., Consolatti, N.L., 1989. Variation in offspring size in *Daphnia* and consequences for individual fitness. *Oikos* 56, 269–276.
- Trapp, K.E., 1986. Acute Toxicity of uranium to waterfleas (*Daphnia pulex*) and bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Environmental and Chemical Sciences. Savannah River, Aiken, South Carolina (Report ESC-SR-30)*.
- Weigel, F., 1986. Uranium. In: Katz, J.J., Seaborg, G.T., Morss, L.R. (Eds.), *The Chemistry of the Actinide Elements*, 2nd edition. Chapman and Hall, London, New York (Chapter 5).
- Whicker, F.W., Schultz, V., 1982. *Radioecology: Nuclear Energy and the Environment*, vol. 1. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Widdows, J., Johnson, D., 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Marine Ecology Progress Series* 46, 113–121.
- World Health Organisation, 2001. *Depleted Uranium, Sources, Exposure and Health Effects*. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneva, Switzerland.
- Zeileis, A., 2006. Object-oriented computation of sandwich estimators. *Journal of Statistical Software* 16, 1–16.
- Zeman, F., 2008. Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie, *Daphnia magna*. Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thesis (IRSN-2008/103), Univ. Montpellier II, p. 200.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 86, 370–378.

## Résumé

Ce travail avait pour objectif d'étudier les effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population d'un micro-crustacé représentatif des écosystèmes aquatiques d'eau douce, *Daphnia magna*. L'étude expérimentale de la toxicité de l'uranium sur la physiologie (nutrition, respiration) et l'histoire de vie (survie, croissance, reproduction) de *D. magna* a été réalisée au travers d'expositions sur une, deux ou trois générations successives (F0, F1, F2), commencées avec des néonates issus de 1<sup>ère</sup> ou 5<sup>ème</sup> ponte, à des concentrations de 0, 10, 25 et 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Les résultats ont mis en évidence l'aggravation des effets au travers des générations (en partie liée à l'exposition des daphnies pendant l'embryogénèse) et la sensibilité plus forte des individus issus de 1<sup>ère</sup> ponte. Des réductions significatives des taux d'assimilation mesurés par méthode de marquage-traçage au  $^{14}\text{C}$  de la nourriture nous ont permis d'identifier un effet sur l'assimilation comme mode d'action de l'uranium, en accord avec les altérations importantes de la structure de la paroi du tube digestif révélées par microscopie optique. L'intégration des résultats dans un modèle de budget énergétique (DEBtox) a abouti à l'estimation de concentrations seuil sans effet (NEC) de 9.37, 8.21 et 2.31  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  au-delà desquelles le fonctionnement de l'organisme est altéré dans les générations F0, F1 et F2, respectivement. La combinaison du DEBtox avec des modèles matriciels a permis d'extrapoler les conséquences sur le taux de croissance asymptotique de la population ( $\lambda$ ), critère plus pertinent dans un contexte écologique. Les simulations ont prédit une augmentation de l'impact de l'uranium au travers des générations avec une réduction de  $\lambda$  dans F0 et une extinction des populations pour des concentrations de 51-59  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F1 et de 39-41  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  dans F2. Les simulations ont souligné l'importance de prendre en considération les individus les plus sensibles dans la détermination de la réponse des populations.

## Abstract

This work aimed to study effects of uranium on energy budget and population dynamics in *Daphnia magna* a representative microcrustacean of freshwater ecosystems. An experimental study of uranium toxicity on physiology (nutrition, respiration) and life history (survival, growth and reproduction) of *D. magna* was carried out, based on exposures over one, two or three successive generations (F0, F1 and F2) started with neonates from 1<sup>st</sup> or 5<sup>th</sup> brood, at 0, 10, 25 and 75  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ . Results showed that toxic effects increased across generations (partially due to daphnid exposure during embryogenesis) and that individuals from 1<sup>st</sup> brood were more sensitive than individuals from 5<sup>th</sup> brood. Significant reductions in assimilation rates, measured using a radiotracing method with  $^{14}\text{C}$ -labelled food, allowed us to identify an effect on assimilation as the mode of action for uranium, in agreement with important damages in the integrity of intestinal epithelium observed by optic microscopy. Integrating results in a dynamic energy budget model (DEBtox) yielded estimated no effect concentrations (NEC) of 9.37, 8.21 and 2.31  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  above which organism functions were altered in generations F0, F1 and F2, respectively. Combining DEBtox with matrix models allowed us to extrapolate consequences on asymptotic population growth rate ( $\lambda$ ), a relevant endpoint in an ecological context. Simulations predicted an increase in uranium impact across generations with reduction of  $\lambda$  in F0 and population extinctions at 51-59  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  in F1 and 39-41  $\mu\text{gU.L}^{-1}$  in F2. Simulations emphasized the importance of considering the most sensitive individuals while determining population response.