

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

**Etude des effets multigénérationnels d'une
exposition chronique aux rayonnements ionisants
chez un organisme modèle : le nématode *Caenorhabditis
elegans***

Adeline Buisset-Goussen

08 décembre 2014

ISRN/IRSN-2015/175

Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides
(PRP-ENV/SERIS/LECO)

THESE – UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Ecole doctorale

ED 251 Sciences de l'environnement

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité

Océanographie

Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle : le nématode

Caenorhabditis elegans

Par

Adeline Buisset-Goussen

Thèse dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Catherine Lecomte-Pradines

Soutenance publique le 8 décembre 2014

Devant le jury d'examen composé de :

Pr. Simon Galas	Professeur, Université Montpellier 1	Président du jury
Dr. Hildegard Vandenhove	Directrice de recherche, SCK-CEN	Rapporteur
Dr. Patrice Gonzalez	Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux	Rapporteur
Dr. Rémy Beaudouin	Chargé de Recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte	Examineur
Dr. Aymeric Bailly	Chercheur, CRBM, Montpellier	Membre invité
Pr. Jean-Christophe Poggiale	Professeur, Université Aix-Marseille	Directeur de thèse
Dr. Catherine Lecomte-Pradines	Chercheur, IRSN, Cadarache	Tuteur de thèse

Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à Jacqueline Garnier Laplace pour m'avoir accueillie à l'IRSN dans son service (SERIS) et pour avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de ce doctorat. Merci à l'IRSN et à la région PACA d'avoir financé ce projet.

Je tiens également à remercier Jean-Christophe Poggiale d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour la disponibilité et le soutien dont j'ai pu bénéficier dans les moments importants de cette thèse.

Cathy, vraiment un merci ne suffirait pas à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude. Tu as été comme une seconde maman pour moi, me boostant quand il le fallait (dès fois un petit peu trop...), sachant aussi me préserver durant les moments difficiles qu'on a dû traverser ! Merci pour le réconfort, le soutien, la confiance et l'écoute dont tu as su faire preuve durant ces trois années ! Malgré les difficultés, c'était vraiment excellent de travailler avec toi, j'ai vraiment beaucoup appris à tes côtés ! Merci pour tout.

Je tiens à remercier Hildegard Vandenhove et Patrice Gonzalez de prendre le temps d'évaluer mon manuscrit en tant que rapporteur, ainsi que Simon Galas, Aymeric Bailly et Rémy Beaudouin pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci également à Hildegard Vandenhove, Simon Galas et Aymeric Bailly pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire pour que je puisse mener à bien mes différents travaux de recherche. Merci pour toutes les discussions et réflexions intéressantes que vous avez pu avoir sur mes travaux.

Un très grand merci à Myriam et à Aurélien de m'avoir accueillie et formée à différentes techniques ! J'en profite aussi pour remercier pour leur accueil et leur sympathie Audrey, Zhahra, Elige, Laure-Anaïs, Chaker

Nele, May, Eline, Elke, Arne, Robin, Jean, dank u voor uw gastvrijheid en uw hulp!

Merci à tous les membres des laboratoires de l'IRSN, pour les moments de détente et de discussions intensives sur tout et n'importe quoi (surtout n'importe quoi !). Tout d'abord, merci à tout le LM2E (et plus particulièrement à Marie, Karine, Véronique et Patrick) de m'avoir accueillie et même très bien accueillie durant la dernière phase de rédaction (la plus compliquée...). Je ne sais pas ce que j'aurais fait, ni comment j'aurais pu le faire sans vous... merci encore !

Un très grand merci à Claire, pour avoir pris le temps de se pencher sur mes stats, pour l'aide très précieuse apportée sur l'analyse des données multigé et pour les nombreux conseils que tu m'as donnés tout au long de mes analyses.

Christelle, merci pour ta disponibilité, pour m'avoir soutenue jusqu'au bout, pour les conversations enrichissantes sur le sujet de thèse et pour avoir relu ma thèse une toute dernière fois ! Rodolphe, tu fus mon chef de labo au tout début de ma thèse (ce fut bref mais intense ! ;)). Merci pour toutes ces discussions à refaire le monde le soir après 19h ou au labo lors de photos ou de comptages de nématodes ! Jean-François, merci pour ces discussions sur la Nouvelle-Zélande, sur les tuyaux et les conseils que tu m'as donné (et aussi pour le bouquin !) sur ce beau pays ! Merci à Sylvie, Nadine (qui a

failli me faire mourir de peur sur la fin de la thèse...méchante va !^^) et Julien, avec qui je n'ai malheureusement pas eu beaucoup de contact, mais avec qui j'ai pu avoir des discussions agréables. Nico, merci pour le travail que tu as fait sur la partie dosimétrie. Merci d'avoir pris le temps de bien tout m'expliquer et de t'être rendu disponible pendant mes manips ! Merci aussi pour les petits délires à côté qui font redescendre la pression quand il faut ! Isabelle, Virginie, Arnaud, Fred C. et Pierre, je ne vous ai pas beaucoup côtoyé (à mon grand regret), mais je me suis toujours sentie à l'aise avec vous, et rien que pour ça merci beaucoup ! Merci pour les petites discussions détente au coin café ! Laurent, merci de t'être rendu disponible pour les stats et de m'avoir donné quelques conseils supplémentaires. Merci aussi pour les discussions « entre-deux » (portes, murs...), je sais maintenant que les Ogres de Barback font aussi des chansons pour enfant ! Magali, j'ai vraiment appris à te connaître sur le tard (malheureusement...) mais j'ai pu découvrir ta passion pour le MET ! J'ai vraiment adoré travailler avec toi, c'était vraiment motivant et rien que pour ça je te dis un énorme merci ! Pascale, merci pour m'avoir fait découvrir le Tai-Chi avec Claudine, pour les grandes discussions à refaire le monde au labo et surtout dans le bureau de Claudine (la pauvre...) ! Merci de m'avoir si bien accueillie ! Béatrice, merci pour ta relecture et tes remarques pertinentes sur ma thèse. Merci également pour m'avoir fait découvrir les fêtes de la science, c'est quelque chose que j'ai vraiment adoré ! Sandrine F., merci pour le soutien lors du congrès de la SETAC (quelle aventure ! 😊) , pour ton franc parler et pour m'avoir dégoutée pendant au moins 5 ans d'avoir des enfants !^^ Fred A., merci pour les soirées, les discussions de tout (tout va bien !) et surtout de rien (ce n'est rien !), pour m'avoir fait confiance sur la garde de Pacha, pour les DVD cultissimes et la soirée jeux ! Merci pour ton accueil, ta simplicité et surtout pour ton humour ! Olivier, merci pour tout, déjà pour m'avoir aidée au labo quand c'était nécessaire, ensuite pour avoir relu ma thèse et avoir eu des suggestions très pertinentes ! J'ai vraiment apprécié de discuter avec toi et de partager nos points de vue ! Jean-Marc, merci pour toutes les discussions intéressantes que j'ai pu avoir avec toi, que ce soit sur le travail, sur l'avenir ou sur la photographie ! Merci également pour ton écoute durant les périodes difficiles ! Laureline, merci pour ton humour et tes sarcasmes (sisisi) ! Merci également pour toutes les discussions sur tous les sujets possibles et imaginables, mais surtout merci de m'avoir fait découvrir ce grand moment de télévision qu'est « P'tit Quinquin » ! Et oui, je continuerais à te faire la bise même après midi ! 😊

Claudine, Cloclo (ou Madame Claude, mais faut pas le dire trop fort...pas taper hein^^)...avoue, tu as cru que je t'avais oublié ! Comment aurais-je pu ?? Tout d'abord, merci de m'avoir fait découvrir avec Pascale le Tai-Chi, Omar et le Karaté ! Que de fous rires...Merci de m'avoir également soutenue tout au long de l'écriture (elle est finie cette thèse ? elle est finie cette thèse ? elle est finie cette thèse ? quand est-ce que tu la finies cette thèse ?^^), pour les fous rires, les commérages et bien entendu TOUTE la paperasse administrative !!! Pour les phrases cultes (« mais quelle est con celle-là »), les engueulades aussi parfois et surtout pour m'avoir supportée, je te dis mille mercis !!! Tu as bien gagné ton droit de partir à la retraite !^^ Et n'oublie pas, tu seras toujours la bienvenue (sisi, bienvenue) en Angleterre !

Un grand merci à Omar, aux « dames du Tai-Chi » (sympa pour Richard !^^) et à toute la clique du karaté (Lolotte, Delphine, Tania, Ley et Raf) sans oublier Sabine. Merci pour ces heures de souffrance à faire des abdos, des pompes, de la corde à sauter, des combats et des kata !^^ N'empêche, j'ai appris que rien ne s'obtient sans douleurs, ce qui est aussi le cas d'une thèse !

Valérie, Magali et Stéphanie (non je ne t'oublie pas !), merci pour tout ce que vous avez fait, pour le café, les moments de discussion et de partage. Merci d'avoir toujours laissé votre bureau grand ouvert (enfin presque, vu que vous êtes dans un bunker^^) lors des déjeuners. J'espère qu'on restera en contact les filles ! Valérie, je te remercie chaleureusement de m'avoir sorti et fait découvrir des gens vraiment extras, pour m'avoir invité à diverses réunions, où je me suis vraiment bien amusée !

A mes deux co-bureaux « quand on n'était encore que 2 dans un bureau » (et à qui j'ai survécu !!!^^) : Delphine et Sandrine. Merci à toutes les deux de m'avoir supporté l'une durant sa dernière année de thèse, l'autre durant ces derniers mois à l'IRSN. A tous les anciens, avec qui j'ai partagé (et partagé encore pour certains et certaines !) de bons moments : Antoine, Morgan, Iris (« roulroulroulroul ! » « Et mais c'est Delin ! »), Audrey (« L'excuse, jamais en dernier !! »), Starrlight (j'ai vraiment hâte de te revoir, on a plein de choses à se dire !!!), M. et Mme Théodorakopoulos (merci pour le Liban ! Et Nico, comment va ton cœur ? ;)) et Guillaume.

Et maintenant, le fond du panier, la crème de la crème... La Dream Team des doctorants (pas tous doctorants, mais si je disais djeuns, y'en a cité au-dessus qui se serait vexé...) ! Je ne sais vraiment pas par qui commencer... il en faut bien un, ce sera Loic ! Loic, merci de m'avoir pourri mon bureau durant mes semaines d'absence pour manip à l'extérieur, pour m'avoir démonté TOUTES les touches de mon clavier et avoir fait un Tétris avec et enfin pour ta phrase qui restera dans les annales (comprendra qui voudra ! ;)) : « UNE T... » !! Marie, complice de Loic (n'empêche, c'était super le Pac-Man dans tout le bureau, j'ai encore des reliquats sur mon pc...), trèèèèèèèèèèèè mauvaise joueuse, un peu rancunière sur les bords (surtout quand tu perds au laser game !), merci pour tes délires et tes discussions qui ont grandement contribué à me détendre. Tristan, allié contre les préjugés des gens sur le nord (oui, on dit p'tit pain chez nous et on vous), au moins quand je parlais quelqu'un me comprenait ! J'espère que tu as trouvé une thèse et que tu t'éclates ! Qui sait, peut-être qu'on s'crois'ra din ch'nord ? Amine, merci de me faire découvrir ta culture et tes petits plats, c'est vraiment sympa de discuter avec toi ! Bon courage pour la suite de ta thèse ! Yvan (« hmmm...bonnant malant, je dirais que... », désolée, je ne m'en remets toujours pas !^^), merci pour tes discussions (animées dès fois, souvent en fait !), pour ta culture générale et pour la façon énervante dont tu remets tout en question ;) Fais gaffe maintenant, j'ai quelques photos d'un certain après-midi accrobranche où tu n'es pas à ton avantage...^^ J'espère en tout cas que tu prendras du plaisir à faire cette thèse, et que tout se déroulera comme tu le souhaites ! Tiens-moi au courant quand tu soutiens en tout cas ! Dans la dernière fournée des doctorants, je demande... Laure ! Franchement, merci, ça fait du bien d'avoir un peu de féminin dans ce monde de brutes !^^ Merci pour tout, pour ta gentillesse, pour toutes les discussions et l'écoute dont tu as fait preuve, les abdos et les pompes au Tai-Chi (chuuuuuuuuuuuuut, j'ai rien dit !) et pour les soirées, passées ou à venir, avec ou sans Bastien (ça dépend si y'a Ben, si j'ai bien compris...) ! N'hésite pas à me demander des photos pour faire chanter ton co-bureau s'il t'embête...☺ ! Bon courage pour la suite de ta thèse, je suis sûre que tu vas super bien t'en sortir ! Florence, j'ai malheureusement appris à te connaître sur le tard (faut dire aussi que t'es maligne toi, t'arrives quand je suis dans ma dernière phase de rédaction...pffff...^^) ! Merci pour tes connaissances sur le cinéma et particulièrement sur les films d'horreur (« meuh nan, ça joue plus sur le psychologique, tu vois pas vraiment les esprits ni les fantômes » avant de regarder Amytiville...) ! Merci également pour tes blagues (je kiffe) et je rajouterai juste que c'est pas faux et que j'aimerais que tu me considères en tant que tel. Seb, j'avoue ne pas trop te connaître, mais juste merci, merci de me comprendre quand je dis de baisser le carreau ! Merci également pour l'ambiance festive que tu apportes ! Florian, je ne sais pas quoi dire ni par où

commencer...juste reste comme tu es (enfin, si t'as le temps...☺) ! Merci pour les franches parties de rigolades, les dévissages complets de cerveau, les blagues nulles (sisisi), le roi burgonde et plein de trucs encore ! Pour la partie un peu plus sérieuse, merci pour toutes les discussions autour de la thèse et de l'avenir. Accroche-toi, c'est la dernière ligne droite ! Par contre, mon mouton ne te dit pas merci de l'avoir malmené (ça peut être très très mal interprété ça...). Attention, les voilà ! Un énorme, énoooooorme merci au TWIX, pour avoir « sorti mémé » quand elle était toute seule ou avait le bourdon...merci pour les parties effrénées de ping-pong et les fous rires à en faire fuir les autres joueurs ! Toche, merci pour les concerts, enfin LE concert qui a malheureusement été annulé (j'suis dèg, mais alors dèg !), pour LA sortie dans LE bar (renommé «vodka bar»), et pour tant d'autres choses !! Kewin, Kewin, Kewin (dit Marco, Renaudelle (mix entre Renaud et Axelle Red), Maquegiveure (à la française !) et surtout Michel Jaxon, sosie français de Michael Jackson !) ...que dire ? Merci tout simplement d'être ce que tu es, merci pour les coups de main au labo, le soutien pendant les moments difficiles, les grandes déconnades, les cris d'animaux en tout genre, les films complètement débiles, les références à faire froid dans le dos et les grands moments de karaoké et de dance-floor en soirée ! Merci aussi de m'avoir fait découvrir les « mille et une façons de manger le porc/le bœuf » et pour les rêves de pâté (« le gras, c'est la vie » !) et la pêche avec des grands moments d'anthologie ! Et n'oublie pas pour ta thèse, l'important, c'est d'avoir le choix dans la date ! Cécile, petite dernière recrutée, souffre-douleur (avec moi) des débilités des gugusses dans le bureau...Merci d'avoir supporté tout ça avec moi ! Merci pour les fous rires à Dance Party, les soirées films d'horreur sans film d'horreur☺, les parties de pêche, les anecdotes et j'en passe et des meilleurs ! Bon courage pour ta thèse (elle a pas froid aux yeux la p'tite !), continue à t'éclater ! Adrien, je te passe le flambeau, prend bien soin des petits (et je ne parle pas des nématodes, attention à ne pas te faire submerger, ils sont teigneux !)^^. J'ai été ravie de te connaître, de partager le voyage DEBtox au Danemark, les expériences sur les nématodes avec toi, les délires au labo (ou pas dès fois ;)) et les discussions sur la fin de thèse ! J'espère ne pas t'avoir fait trop peur...En tout cas, merci pour le soutien que tu m'as apporté durant les années de thèse, les aides que tu as pu me fournir en modélisation ou au labo et les discussions pour refaire le monde !

Pour finir, je tenais à remercier du plus profond du cœur les personnes qui ont fait et font toujours la personne que je suis aujourd'hui ! Papa, maman, merci à tous les deux d'avoir été là dans les moments difficiles, pour votre confiance, votre soutien sans faille, votre écoute, votre amour, qui m'ont permis de tenir et d'arriver jusqu'ici ! Merci papa d'avoir relu à fond ma thèse, traqué les petites (ou grandes !) fautes ! Maman, juste merci pour tout ! Merci aussi à mon frerot Alex et à ma belle-sœur Karine pour votre soutien, votre humour et surtout pour toutes ces discussions qui m'ont fait sortir de ma bulle d'écriture et de mon monde quand il le fallait ! Un énorme merci aussi à mes jolis-parents pour leur soutien, leur bonne humeur et tout simplement leur présence durant les moments pénibles. Fabien, merci pour ton humour décapant !^^ Enfin, mon Amour, mon Cœur, un énorme merci pour m'avoir supportée tout au long de ce projet, de m'avoir épargnée quand c'était ton tour de passer la thèse, de t'être occupée de moi durant la période la plus difficile de cette thèse. Sans toi, je n'aurais sans doute pas tenu le coup, toi seul à su me faire comprendre que ce que je faisais en valait la peine. Merci.

*« Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir...
En d'autres termes...Plus ça rate et plus on a de chances que ça marche... »*

Les Shadoks

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	xv
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES	7
1. Les rayonnements ionisants	9
1.1. Notions	9
1.2. Dommages biologiques radio-induits	10
1.2.1. Stress oxydatif	11
1.2.2. Atteinte de l'ADN	12
1.3. Problématique environnementale	14
1.3.1. Comparaison entre exposition aiguë et exposition chronique.....	15
1.3.2. Etude des effets chroniques d'une exposition aux rayonnements ionisants ..	17
1.3.2.1. Traits d'histoire de vie et rayonnements ionisants	17
1.3.2.2. Etudes multigénérationnelles et rayonnements ionisants.....	18
1.3.2.3. Effets sur la population	21
2. Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
2.1. Ecologie	23
2.2. Cycle de vie	24
2.2.1. Phase embryonnaire	26
2.2.2. Phase post-embryonnaire	26
2.2.2.1. Le système épithélial	27
2.2.2.2. Le système reproducteur	28
2.2.3. Formes de résistance.....	32
2.2.3.1. Stade dauer	32
2.2.3.2. Diapause de la reproduction et bagging	32
3. <i>C. elegans</i> et radiotoxicologie	33
3.1. Etude des effets de l'irradiation sur la lignée germinale chez <i>C. elegans</i>	34
3.1.1. Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation	34
3.1.1.1. Détection des dommages.....	34
3.1.1.2. Mécanismes de réparation.....	36

3.1.2.	Apoptose.....	38
3.1.3.	Arrêt du cycle cellulaire.....	39
3.2.	Etude des effets de l'irradiation sur les traits d'histoire de vie.....	40
3.2.1.	Survie des individus.....	40
3.2.2.	Reproduction.....	40
3.2.3.	Croissance.....	41
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES		43
4.	Maintenance et condition de culture de <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
4.1.	Conditions de culture	47
4.2.	Transferts et synchronisation des individus	49
4.2.1.	Repiquage	49
4.2.2.	« Bleaching »	50
5.	Irradiation.....	51
5.1.	Dosimétrie	51
5.1.1.	Estimation des débits de dose	51
5.1.2.	Vérification des débits de dose et validation de la simulation numérique	52
6.	Etude des traits d'histoire de vie.....	55
6.1.	Croissance.....	55
6.2.	Reproduction.....	55
7.	Tests moléculaires et cellulaires	57
7.1.	Arrêt du cycle cellulaire (zone mitotique) et étude de la spermathèque	57
7.1.1.	Dissection de <i>C. elegans</i>	58
7.1.2.	Marquage et lecture des lames	58
7.2.	Etude de l'expression du gène <i>egl-1</i> par RT-qPCR (stade pachytène tardif)	60
7.2.1.	Extraction des ARN totaux	61
7.2.2.	Dosage de l'ARN et rétro-transcription (RT)	62
7.2.3.	PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	63
8.	Analyse des données	67
8.1.	Modélisation	67
8.1.1.	Données de reproduction.....	67
8.1.2.	Données de croissance.....	67

8.2.	Traitements statistiques	69
8.2.1.	Croissance et expression de gène	69
8.2.1.1.	Croissance	69
8.2.1.2.	Expression de gène	70
8.2.2.	Reproduction	70
8.2.2.1.	Nombre cumulé de larves par individu	70
8.2.2.1.	Comptage des spermatozoïdes et des cellules en mitose	71
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION		73
9.	Conséquences phénotypiques d'une exposition externe aux rayonnements gamma sur une génération de <i>C. elegans</i>	77
9.1.	Démarche expérimentale	77
9.1.1.	Dispositif d'irradiation	77
9.1.2.	Design expérimental	80
9.2.	Résultats	81
9.2.1.	Dosimétrie	81
9.2.2.	Paramètres de croissance	82
9.2.3.	Paramètres de reproduction	84
9.3.	Discussion	86
9.3.1.	Croissance	86
9.3.2.	Reproduction	87
9.4.	Conclusion	89
10.	Etude des effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants	91
10.1.	Démarche expérimentale	91
10.1.1.	Dispositif d'irradiation	91
10.1.2.	Plan expérimental	95
10.2.	Résultats	97
10.2.1.	Dosimétrie	97
10.2.2.	Etude des générations continuellement exposées	98
10.2.2.1.	Paramètres de croissance	98
10.2.2.2.	Reproduction	98
10.2.3.	Etude des générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2') après exposition parentale	101

10.2.3.1.	Paramètres de croissance	101
10.2.3.2.	Reproduction	101
10.2.4.	Comparaison entre les générations exposées (F1 et F2) et les générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2') après exposition parentale (F0)	104
10.3.	Discussion	106
10.3.1.	Etude des traits d'histoire de vie au sein des générations	106
10.3.1.1.	Croissance	106
10.3.1.2.	Reproduction	107
10.3.2.	Diminution de la capacité de reproduction entre les générations	107
10.3.3.	Différence entre F1 et F1' : Transmission d'effets après exposition parentale ?	109
10.4.	Conclusion	110
11.	Etudes des mécanismes moléculaires et cellulaires	111
11.1.	Matériel et méthodes	112
11.1.1.	Design expérimental et dispositif d'irradiation	112
11.1.2.	Reproduction	113
11.2.	Résultats	114
11.2.1.	Dosimétrie	114
11.2.2.	Etude des générations continuellement exposées	114
11.2.2.1.	Reproduction	114
11.2.2.2.	Comptage de la spermathèque et des cellules mitotiques de la lignée germinale	115
11.2.2.3.	Etude de l'expression du gène <i>egl-1</i>	115
11.2.3.	Etude des générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2') après exposition parentale	118
11.2.3.1.	Reproduction	118
11.2.3.2.	Comptage de la spermathèque et des cellules mitotiques de la lignée germinale	118
11.2.3.3.	Etude de l'expression du gène <i>egl-1</i>	119
11.2.4.	Comparaison individus exposés et individus non exposés (F1 - F1' et F2-F2'),	121
11.2.4.1.	Etude à la deuxième génération (F1-F1')	121
11.2.4.2.	Etude à la troisième génération (F2-F2')	123

11.3.	Discussion	125
11.3.1.	Reproduction	125
11.3.2.	Etudes mécanistiques sur trois générations exposées	126
11.3.3.	Transmission d'effets maternels	128
11.4.	Conclusion	129
PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		131
12.	Discussion générale.....	133
12.1.	Synthèse des résultats	133
12.1.1.	Cohérence des résultats	133
12.1.2.	Irradiation aiguë versus irradiation chronique	134
12.2.	Etude sur trois générations	138
12.3.	Evaluation du risque	139
12.3.1.	Changement d'échelle	139
12.3.2.	Pertinence et sensibilité des marqueurs utilisés	140
13.	Perspectives	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		143
ANNEXES.....		165
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES DE LA THESE		197

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique, leur pertinence et leur sensibilité d'après Fedorenkova et collaborateurs (2010).....	4
Figure 2. Pouvoir de pénétration des différents rayonnements (Delacroix et al., 2012).	9
Figure 3. Schéma de l'équilibre/déséquilibre de la balance prooxydants (ERO) et antioxydants (AOX) d'après Scandalios (2002).	12
Figure 4. Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects (radiolyse de l'eau) des rayonnements ionisants (Gault, n.d.).....	13
Figure 5. Cycle de vie de la souche N2 <i>C. elegans</i> à 22°C d'après Altun et Hall (2009).	25
Figure 6. Schéma représentatif du système épithélial du nématode <i>C. elegans</i> adulte avec les cellules de jonction en orange (formant un syncytium) et les cellules de l'hypoderme (hyp), dont les cellules qui entourent une grande partie du corps du nématode (hyp 7), selon Altun et Hall (2005).....	27
Figure 7. Schéma du haut, vue générale du système reproducteur de l'adulte hermaphrodite. Avec en violet les bras de la gonade en forme de U, en rose l'intestin, en bleu foncé la spermathèque et en bleu ciel les embryons. Schéma du bas, zoom sur un des bras de la gonade. Avec la cellule d'extrémité distale (DTC), la partie distale de la gonade (DG) et la spermathèque (Sp). Lints et Hall (2009).	28
Figure 8. Synthèse du développement de l'appareil reproducteur de <i>C. elegans</i> selon Hubbard et Greenstein (2005) et Lints et Hall (2009). (A) schéma du développement des gonades somatiques avec : les cellules d'extrémité distale (en rouge), les cellules précurseurs de la spermathèque et de la gaine (en bleu foncé), les cellules de la gaine (en bleu clair), la spermathèque en gris et l'utérus en blanc. (B) Schéma du développement de la lignée germinale.	31
Figure 9. Schéma des différentes voies de réparation de dommages à l'ADN radio-induits. Une irradiation va induire des cassures double-brin à l'ADN. Ces cassures sont par la suite détectées par des complexes protéiques qui vont permettre l'activation de protéines kinase et la phosphorylation de protéines.....	35
Figure 10. Schéma simplifié de la voie de réparation par recombinaison homologue suite à des cassures double-brin radio-induites, selon Lemmens et Tijsterman (2011)	37
Figure 11. Schéma récapitulatif des différentes protéines impliquées dans l'apoptose des cellules de la lignée germinale chez <i>C. elegans</i> , selon Craig et collaborateurs (2012).....	39

- Figure 12. Présentation des différentes étapes de préparation des boîtes de Petri avec le dépôt du NGM (A), le dépôt des bactéries (B) et leur inactivation par UV (C,D). © J-M Bonzom/IRSN 49
- Figure 13. Photo de dosimètres RPL utilisés lors des différentes expérimentations de ce projet de recherche. © N Dubourg/IRSN 53
- Figure 14. Exemple de mesure d'une larve L1 avec le logiciel ImageJ®. Le trait jaune est tracé à l'aide d'un stylo sur la tablette graphique, de la tête jusqu'à la queue du nématode. Le nombre de pixel par μm (selon le grossissement) a été préalablement rentré (Set Scale) et permet de mesurer la taille de l'individu en μm (Results). 56
- Figure 15. Représentation schématique d'un bras de la gonade de *C. elegans* avec les différentes cellules de la lignée germinale (Craig et al., 2012). Les cellules en mitose vont passer par une phase de transition avant d'entamer les différents stades de la prophase I de méiose pour former des oocytes matures, prêts à être fécondés en passant par la spermathèque. Entourées de rouge : zones de la gonade et cellules germinales associées où les différents tests ont été réalisés. 57
- Figure 16. Comparaison des cellules mitotiques provenant de la lignée germinale d'individus témoins (-IR) et d'individus exposés à 60 Gy (+IR). Le marquage est effectué au DAPI après dissection des nématodes. L'échelle correspond à 10 μm (Bailly et al., 2010). 59
- Figure 17. Photo prise au microscope à épifluorescence (objectif x40) montrant la localisation de la spermathèque et des spermatozoïdes dans la partie proximale de la gonade de *C. elegans*. Les points visibles dans la spermathèque correspondent aux spermatozoïdes. 60
- Figure 18. Schéma récapitulatif des protéines déclenchant l'apoptose radio-induite. 61
- Figure 19. Exemple de courbes d'amplification obtenues par qPCR (selon Sigma-Aldrich). Le bruit de fond est représenté par le trait noir. L'intersection de ce trait avec les différentes courbes d'amplification donne différents Ct. Ici seul un exemple est présenté sur la première courbe. 64
- Figure 20. Exemple d'une courbe de croissance obtenue par modélisation selon l'équation de Gompertz. Les points représentent les données expérimentales, la courbe correspond au modèle de Gompertz ajusté sur les données expérimentales. 68
- Figure 21. Schéma récapitulatif présentant la méthode statistique utilisée pour évaluer les différentes données obtenues dans le cadre de ce projet de recherche en fonction des débits de dose ou des générations. Avec NS : non significatif, S : significatif. 72

Figure 22. Présentation de la chambre d'irradiation, avec en haut un gros plan sur le dispositif en métal contenant la source lors d'une irradiation et en bas une vue d'ensemble avec différents dispositifs expérimentaux (lentille d'eau sur la gauche, nématodes au milieu et daphnies sur la droite)..... 79

Figure 23. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour chaque condition. Les boîtes de Petri sont disposées sous une boîte en plastique opaque afin de maintenir l'obscurité. Le pourcentage d'humidité relative, la luminosité et la température) sont contrôlés par un data logger. Afin de mesurer précisément le débit de dose, les dosimètres ont été placés de manière à encadrer les différentes unités expérimentales..... 80

Figure 24. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$. L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle (* p -value < 0,05 ; *** p -value < 0,001)..... 83

Figure 25. (A) Nombre cumulé de larves en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$. L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle (* p -value < 0,05 ; *** p -value < 0,001). (B) Courbe dose-réponse de l'effet sur la reproduction (ici le nombre cumulé de larves par individu) en fonction des débits de dose (en mGy/h). Avec en rouge la valeur estimée du DDE_{10} (intervalle de confiance à 95% représenté en rose) et en bleu la valeur estimée du DDE_{50} (intervalle de confiance à 95% représenté en turquoise). 85

Figure 26. Dispositif d'irradiation de l'IRSN. (A) Vue générale de l'irradiateur (incubateur thermo-régulé) entouré de plomb. (B) Présentation de l'irradiateur ouvert avec le plateau permettant d'accueillir les échantillons et la source, au centre du plateau, protégée par un château de plomb. © J-M Bonzom/IRSN..... 93

Figure 27. Présentation schématique d'un dispositif expérimental dans l'irradiateur (vue de profil). Les unités expérimentales (boîtes de Petri) sont placées verticalement dans un conteneur en carton. Les distances (en cm) entre les organismes et la source déterminent les différents débits de dose. Un dosimètre RPL est placé à l'arrière du conteneur pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation. 94

Figure 28. Organisation des 7 dispositifs expérimentaux autour de la source. Les boîtes de Petri sont placées parallèlement à la source grâce à des conteneurs en carton. Un dosimètre RPL est placé à l'arrière de chaque dispositif pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation. © N Dubourg/IRSN..... 94

Figure 29. Schéma du design expérimental utilisé sur trois générations de *C. elegans*. A gauche sont présentées les trois générations de témoins. A droite sont présentées les générations continuellement exposées (exposed) (F0, F1 et F2) et les générations placées en environnement contrôle (recovery) (F1' et F2') après exposition de la première génération (F0). 96

Figure 30. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) pour les trois générations exposées (F0, F1 et F2). Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés. 99

Figure 31. Nombre cumulé de larves dans les trois générations exposées (F0, F1 et F2). Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés. L'astérisque indique une différence significative entre la première (F0) et la troisième (F2) génération ($p\text{-value} < 0,05$). 100

Figure 32. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) pour les deux générations placées en environnement contrôle (F1' et F2'). Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés..... 102

Figure 33. Nombre cumulé de larves dans les deux générations placées en environnement contrôle (F1' et F2'). Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés..... 103

Figure 34. Nombre cumulé de larves au sein de F1 et F1'. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson, avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les différentes conditions d'exposition (individus exposés ou placés en environnement contrôle). Les témoins sont les mêmes quelle que soit la condition d'exposition. Les débits de dose des individus non exposés (F1') correspondent aux débits de dose de la génération parentale. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les individus F1 et F1' ($p\text{-value} < 0,05$)..... 105

Figure 35. Schéma d'un dispositif expérimental utilisé. (A) Les unités expérimentales (boîtes de Petri) contenant environ 300 individus sont placées verticalement dans un conteneur en carton. Un dosimètre RPL est placé dans chaque boîte de Petri intermédiaires pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation. (B) Les différents conteneurs sont placés autour de la source. Les lettres correspondent aux différents réplicats, avec en noir les réplicats utilisés pour les tests et en orange les réplicats utilisés pour obtenir la génération suivante. 113

Figure 36. Etude des trois générations exposées (F0, F1 et F2). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves/individu \pm écart-type avec $n=20$; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes \pm écart-type avec $n=10$; (C) Nombre de cellules mitotiques par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose \pm écart-type avec $n=7$; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm écart-type avec $n=3$ (3 pools de 300 individus). * indique une différence significative entre les débits de dose et le témoin de la génération correspondante (p -value $< 0,05$). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose..... 117

Figure 37. Etude des deux générations placées en environnement contrôle (F1' et F2'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves/individu \pm écart-type avec $n=20$; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes \pm écart-type avec $n=10$; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose \pm écart-type avec $n=7$; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm écart-type avec $n=3$ (3 pools de 300 individus). * indique une différence significative entre les débits de dose et le témoin de la génération correspondante (p -value $< 0,05$). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose. 120

Figure 38. Comparaison entre les individus exposés et les individus non exposés à la deuxième génération (F1 et F1'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm écart-type avec $n=20$; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes \pm écart-type avec $n=10$; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose \pm écart-type avec $n=7$; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm écart-type avec $n=3$ (3 pools de 300 individus). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose..... 122

Figure 39. Comparaison entre les individus exposés et les individus non exposés à la troisième génération (F2 et F2'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm écart-type avec $n=20$; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes \pm écart-type avec $n=10$; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose \pm écart-type avec $n=7$; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm écart-type avec $n=3$ (3 pools de 300 individus). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose..... 124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Développement de la souche N2 <i>C. elegans</i> pour différentes températures selon Byerly et collaborateurs (1976).	25
Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour les amplifications du gène de référence (<i>tbg-1</i>) et du gène d'intérêt (<i>egl-1</i>).	65
Tableau 3. Débits de dose théoriques (calculés en fonction de la distance par rapport à la source) et débits de dose mesurés par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne \pm écart-type). L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés.	81
Tableau 4. Débits de dose calculés (par simulation numérique utilisant le code Monte-Carlo interaction rayonnement-matière (MCNP) et débits de dose mesurés par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne \pm écart-type), avant l'expérience pour valider le modèle et pendant l'expérience pour vérifier les débits de dose à une distance donnée. L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose calculés et les débits de dose mesurés.	97
Tableau 5. Débits de dose théoriques (calculés en fonction de la distance par rapport à la source) et débits de dose mesurés pendant l'expérimentation par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne \pm écart-type). L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés.	114
Tableau 6. Tableau de synthèse des différents résultats obtenus dans le cadre de ce doctorat. Les différences de paramètres entre les différentes expérimentations sont présentées en rouge et les similitudes sont présentées en vert. NA signifie que le paramètre n'a pas été testé dans l'expérimentation.	137

GLOSSAIRE

A

Acide Désoxyribonucléique (ADN) : constituant essentiel des chromosomes et support moléculaire de l'information génétique.

Activité nucléaire : nombre de désintégrations qui se produisent par unité de temps. L'activité nucléaire s'exprime en Becquerel (Bq), qui est égal à une désintégration par seconde.

Apoptose : processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un événement.

B

Biocénose : ensemble des êtres vivants peuplant un écosystème.

Biotope : ensemble des facteurs physiques et chimiques caractérisant un écosystème.

C

Cellule germinale : cellule reproductrice susceptible de former les gamètes (oocytes et spermatozoïdes).

Cellule somatique : cellule non reproductrice constituant la majorité des cellules d'un organisme.

D

Débit de dose : détermine l'intensité de la dose absorbée (voir dose absorbée) par unité de temps en Gray par seconde, minute, heure, etc. (Gy/s, Gy/min, Gy/h, etc.).

Débit de dose d'effet (DDE_x) : débit de dose induisant X% d'effet.

Dose absorbée : quantité d'énergie cédée par unité de masse. Elle s'exprime en Gray (Gy) et équivaut à l'absorption d'un Joule dans 1 kg de matière homogène.

E

Ecosystème : unité écologique de base, constituée par l'association de deux composantes en constante interaction, le biotope et la biocénose (voir biocénose et biotope).

Ecotoxicologie : science qui étudie l'impact et le devenir des polluants sur les écosystèmes.

Effet transgénérationnel : transmission des effets observés chez la génération parentale aux descendants non exposés.

Epigénétique : étude de facteurs héritables (comme par exemple, le changement de fonction d'un gène) qui interviennent par le biais de mécanismes qui diffèrent d'un changement dans la séquence d'ADN.

Exposition aiguë : se dit d'une exposition reçue pendant une période de temps courte, en opposition à une exposition chronique (voir exposition chronique).

Exposition chronique : se dit d'une exposition reçue pendant une durée de temps longue, en opposition à une exposition aiguë (voir exposition aiguë).

G

Gène : unité de transmission héréditaire de l'information génétique, contrôlant un caractère particulier correspondant à un segment d'ADN situé à un endroit précis d'un chromosome. Contient la séquence codant pour une protéine et les séquences qui permettent et régulent son expression.

L

Lowest Observed Effect Dose Rate (LOEDR) : plus petit débit de dose pour lequel une différence significative par rapport au témoin est observée.

N

Nematode Growth Medium (NGM) : milieu de culture gélosé des nématodes.

No-Observed Effect Dose Rate (NOEDR) : plus haut débit de dose pour lequel aucun effet significatif n'est observé par rapport au témoin.

T

Trait d'histoire de vie : ensemble de caractéristiques fonctionnelles permettant de décrire le cycle de vie des individus d'une population (taille, reproduction, longévité, etc.).

INTRODUCTION GENERALE

L'émission des rayonnements ionisants dans l'environnement est un phénomène naturel et ubiquiste dû aux éléments radioactifs présents naturellement dans le sol et l'atmosphère depuis la formation de la Terre (potassium 40, uranium 235, uranium 238 et thorium 232). A ces éléments radioactifs naturels se rajoutent des éléments radioactifs artificiels utilisés pour des applications industrielles, militaires ou médicales (strontium 90 et césium 137 par exemple). Actuellement, leur rejet dans l'environnement est contrôlé et surveillé (déchets issus des centrales nucléaires ou d'exams médicaux), mais de grandes quantités de ces éléments radioactifs ont pu se retrouver dans l'environnement suite aux accidents nucléaires. L'impact environnemental des rayonnements ionisants est donc devenu une préoccupation majeure, mais souffre aujourd'hui d'un manque de connaissances sur les effets d'une exposition chronique sur les biotes non-humains. Plus particulièrement, peu d'études ont été menées sur l'évaluation de l'impact environnemental d'une exposition externe aux rayonnements ionisants, ou irradiation.

L'évaluation de l'impact environnemental d'une substance, peut s'effectuer à différents niveaux d'organisation biologique, du moléculaire à la structure des écosystèmes. Alors que les effets à l'échelle moléculaire, cellulaire et individuelle font partie du domaine de la toxicologie, les études à grandes échelles (population, communauté et écosystème) font partie de l'écologie. Il est devenu indispensable de relier ces deux grands domaines dans le but d'améliorer l'évaluation des risques environnementaux liés à une substance (Forbes et Forbes, 1997; Ramade, 2007; Relyea et Hoverman, 2006). C'est l'objectif de l'écotoxicologie, dont l'enjeu est de jongler entre la pertinence écologique et la sensibilité des marqueurs étudiés. Par exemple, l'étude de perturbations induites à l'échelle de la population est pertinente écologiquement mais difficile à mettre en œuvre et peu sensible. L'utilisation des tests écotoxicologiques a donc deux buts principaux qui sont (i) l'évaluation de la toxicité de substances en prenant éventuellement en considération l'influence d'autres paramètres susceptibles d'interagir avec les substances à tester et les organismes (effets de mélange, biodisponibilité...), et (ii) la prédiction des risques sur les populations, les communautés et les écosystèmes (Boucheseiche et al., 2002; Wilson et Kakouli-Duarte, 2009). Cette prédiction va pouvoir être réalisée par extrapolation des effets observés à l'échelle individuelle sur de grandes fonctions, telles que la reproduction, la croissance et la survie (Forbes et Calow, 1999; Van den Brink, 2008). Cependant, les tests écotoxicologiques menés actuellement sur ces grandes

fonctions physiologiques ne permettent pas toujours d'apporter des informations suffisantes dans tous les cas et sont limités par leur temps de réponse, bien souvent trop long (Figure 1) (Fedorenkova et al., 2010; Robbins et al., 2007; Snape et al., 2004).

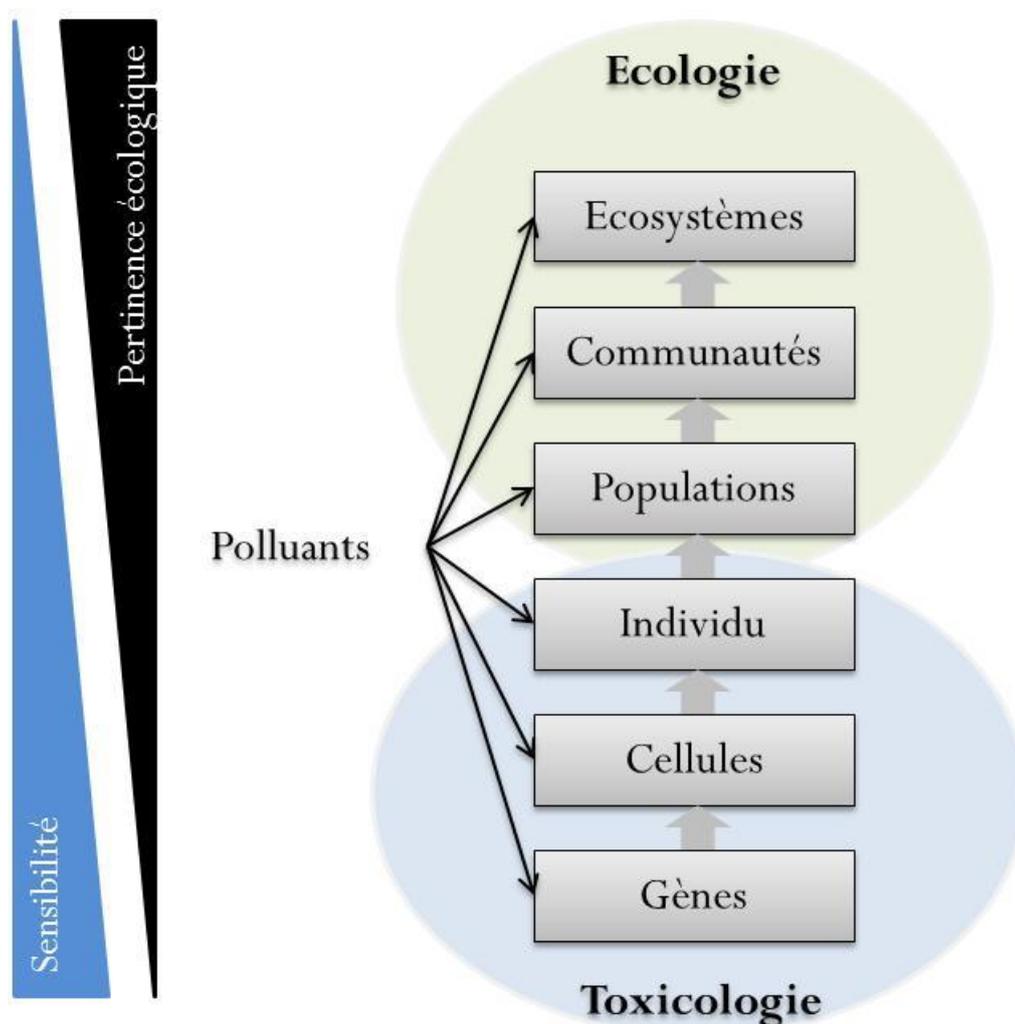


Figure 1. Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique, leur pertinence et leur sensibilité d'après Fedorenkova et collaborateurs (2010).

Il devient donc indispensable, dans le but d'améliorer l'évaluation des risques environnementaux, de comprendre les mécanismes liés à l'action d'un polluant sur les organismes. Sans cette compréhension mécanistique, il est difficile d'extrapoler les effets observés d'une part entre les différents niveaux d'organisation biologique et d'autre part entre les différentes espèces présentes dans le compartiment étudié. C'est dans ce cadre qu'est apparu

une nouvelle discipline appelée « écotoxicogénomique », proposée pour la première fois en 2004 par Snape et collaborateurs et qui concerne l'intégration des méthodes dites « omiques » (transcriptomique, protéomique et métabolomique) dans l'évaluation des risques environnementaux (Snape et al., 2004). Plus particulièrement, l'écotoxicogénomique vise à comparer les réponses des différents organismes aux polluants à travers la mesure des niveaux d'expression des gènes et des protéines (Miracle et Ankley, 2005; Sanchez et al., 2011; Snape et al., 2004). Ce n'est que plus récemment que cette technique a été couplée à l'observation d'effets à de plus hauts niveaux d'organisation biologique (Chen et al., 2014; Connon et al., 2008; Menzel et al., 2009; Roh et al., 2009a; Soetaert et al., 2007; Swain et al., 2010). Les effets induits à l'échelle subcellulaire (gènes, cellules) peuvent à terme impacter les individus, être répercutés sur les populations et par extension sur la structure d'un écosystème. C'est pourquoi les gènes d'intérêt sont principalement ceux qui peuvent prédire des effets sur la croissance, la survie et la reproduction (Roh et al., 2009b).

Cependant, la grande majorité des études menées en écotoxicogénomique a été réalisée au sein d'une génération, alors que la durée d'exposition à des polluants peut dépasser (dans le cadre d'une exposition chronique) la longévité individuelle. De plus, les effets observés sur une génération ne sont pas représentatifs de ceux qui peuvent être observés dans les générations suivantes (Dutilleul, 2013; Goussen, 2013; Plaire, 2013). Il est donc important d'évaluer les effets des polluants sur plusieurs générations.

Dans ce contexte, l'objectif de ce doctorat était d'étudier les effets multigénérationnels d'une irradiation gamma chronique selon une approche intégrée, des traits d'histoire de vie aux mécanismes subcellulaires chez un organisme modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* est un organisme eucaryote ubiquiste naturellement présent dans le sol. Son cycle de vie court (3 jours) et son taux de reproduction élevé facilitent sa culture en laboratoire et en font un organisme modèle pour les études en exposition chronique. De plus, son génome est entièrement séquencé et de nombreux outils sont disponibles pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant lors d'une exposition à une pollution.

Afin de répondre à cet objectif, une stratégie en deux étapes a été mise en place. Tout d'abord, l'étude des effets d'une irradiation gamma chronique sur les traits d'histoire de vie de

C. elegans a été effectuée (Chapitres 9 et 10). Une première expérience a permis de sélectionner les débits de dose utilisés par la suite dans le cadre d'une exposition multigénérationnelle (Chapitre 9). L'objectif de l'expérience multigénérationnelle était de tester l'hypothèse d'une augmentation de la sensibilité en fonction des générations. Pour cela, trois générations ont été exposées aux différents débits de dose sélectionnés. En parallèle, deux générations ont été placées en environnement « contrôle » après exposition parentale, afin de tester une possible transmission des effets maternels (Chapitre 10). Le deuxième volet de cette thèse a eu pour objectif d'étudier les différents mécanismes subcellulaires pouvant expliquer les effets observés sur les traits d'histoire de vie lors de l'exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants (Chapitre 11).

Ce manuscrit de thèse est présenté en quatre grandes parties. La première décrit l'état des connaissances sur les différents thèmes abordés dans ce doctorat (Chapitres 1, 2 et 3). La seconde partie présente le matériel et les méthodes qui ont été utilisés dans le cadre de ce projet de recherche (Chapitres 4, 5, 6, 7 et 8). La troisième partie aborde la description des dispositifs expérimentaux propres à chaque expérimentation, les résultats obtenus et la discussion qui en découle (Chapitre 9, 10 et 11). Enfin, le manuscrit se termine par une conclusion générale et présente les perspectives de ces travaux de recherche (Chapitres 12 et 13).

PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES

1. Les rayonnements ionisants

1.1. Notions

Un rayonnement est une émission d'énergie due à la désintégration de noyaux instables. Le nombre de désintégration qui se produit par unité de temps s'exprime en Becquerel (Bq) et correspond à l'activité nucléaire.

Certains rayonnements sont dits ionisants car l'énergie qu'ils transfèrent est suffisante pour arracher un ou plusieurs électrons aux atomes qu'ils traversent, ce qui a pour conséquence de rendre la matière instable. Les rayonnements ionisants sont de nature différente : électromagnétique, tels que les photons gamma et les rayons X ou particulaire comme les rayonnements bêta ou alpha. La nature électromagnétique ou particulaire ainsi que l'énergie émise confèrent aux rayonnements ionisants des modes d'interaction différents avec la matière. Les rayonnements alpha particulaires, sont ainsi fortement ionisants mais ont une distance de parcours faible dans l'air (quelque cm) et une feuille de papier suffit à les arrêter. Les rayonnements bêta sont faiblement ionisants par rapport aux particules alpha, mais ont un parcours dans l'air de l'ordre de quelques mètres. Quelques millimètres de matériaux légers tels que l'aluminium suffisent généralement à arrêter les particules bêta (Figure 2, page 9) (Delacroix et al., 2012).

Contrairement aux rayonnements particulaires, les rayonnements électromagnétiques ne sont pas arrêtés mais seulement atténués dans la matière (environ 1 mètre de béton ou quelques cm de plomb). Ils sont donc plus pénétrants que les rayonnements alpha et bêta mais sont moins ionisants (Figure 2).

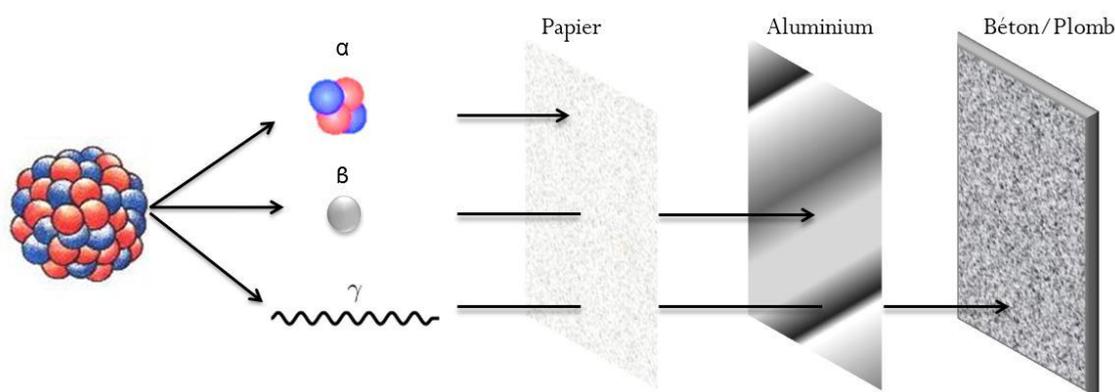


Figure 2. Pouvoir de pénétration des différents rayonnements (Delacroix et al., 2012).

Deux types d'exposition peuvent être définis selon la nature du rayonnement : interne ou externe. Lors d'une exposition interne, ou contamination, les radionucléides pénètrent dans l'organisme par inhalation ou ingestion. Dans le cas d'une exposition externe, la source de rayonnement est située à l'extérieur de l'organisme. Il existe deux types d'exposition, l'exposition externe avec contact (par exemple suite à un dépôt de radionucléides à la surface de la peau) et l'exposition externe sans contact, ou irradiation. La contamination et l'exposition externe avec contact sont particulièrement dangereuses dans le cas de rayonnements à fort pouvoir ionisant, comme les particules alpha. L'irradiation est dangereuse quand les rayonnements ionisants sont très pénétrants, comme les rayonnements gamma ou X, car ils traversent l'organisme. Les organes situés en profondeur, comme la moelle épinière et le foie, sont alors impactés (Delacroix et al., 2012).

Les effets des rayonnements ionisants sont donc fonction du radioélément mais également de la dose absorbée et du débit de dose absorbée. La dose absorbée, ou dose, est la quantité d'énergie cédée par unité de masse et s'exprime en Gray (Gy) (un Gray équivaut à l'absorption d'un joule dans 1 Kg de matière). Le débit de dose absorbée, ou débit de dose, est la dose délivrée par unité de temps. Cette grandeur s'exprime donc en Gray par seconde, minute, heure, jour ou an (Gy/s, Gy/min, Gy/h, Gy/j ou Gy/an) (Ménager et al., 2009).

1.2.Dommages biologiques radio-induits

Comme décrit ci-dessus, les rayonnements ionisants interagissent avec la matière et causent des altérations majeures dans la structure et la fonction des molécules constitutives de la cellule (acides nucléiques, protéines, lipides, etc.). Ce phénomène se fait par : (i) un effet indirect via la production d'espèces pro-oxydantes par radiolyse de l'eau (Spitz et al., 2004) et (ii) un effet direct par excitation et ionisation des atomes et des molécules. Bien que toutes les molécules puissent subir ce type de dommage, la grande majorité des études se sont focalisées sur les atteintes de la molécule d'ADN, support de l'information génétique et dont les modifications peuvent avoir des effets irréversibles pour le devenir de la cellule, de l'organisme et de sa descendance (Adam-Guillermin et al., 2012; Anderson et Wild, 1994; Bertrand et al., 2009).

1.2.1. Stress oxydatif

Les rayonnements ionisants, par radiolyse de l'eau, peuvent induire des espèces réactives de l'oxygène (ERO), tels que le radical hydroxyle (OH^\bullet), le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et des radicaux organiques (H_2O_2). Ces molécules, et notamment le radical hydroxyle (considéré comme le plus réactif par son fort pouvoir oxydant (Halliwell et Gutteridge, 2007)) vont modifier, le plus souvent de manière irréversible, les molécules biologiques comme par exemple les sucres, les protéines, les lipides, les acides nucléiques et organiques (Favier, 2003).

Pour lutter contre l'augmentation de radicaux libres, les cellules disposent de systèmes de défense appelés anti-oxydants (AOX) de nature chimique (vitamines, glutathion, etc.) ou enzymatique (superoxyde dismutase, catalases, etc.).

Le stress oxydatif (ou oxydant) a été défini par Sies dès 1997 comme étant une perturbation de la balance entre les pro-oxydants (espèces réactives de l'oxygène (ERO)) et les anti-oxydants, en faveur des premiers (Sies, 1997) (Figure 3 (A)). Le déséquilibre de cette balance est la conséquence de deux facteurs qui sont (i) une augmentation de la production d'ERO (Figure 3 (B)) et/ou (ii) une diminution du niveau des antioxydants (Figure 3 (C)). Le stress oxydatif a pour conséquence la perturbation du fonctionnement cellulaire pouvant conduire à des modifications géniques, au vieillissement ou à la mort cellulaire (Genestra, 2007).

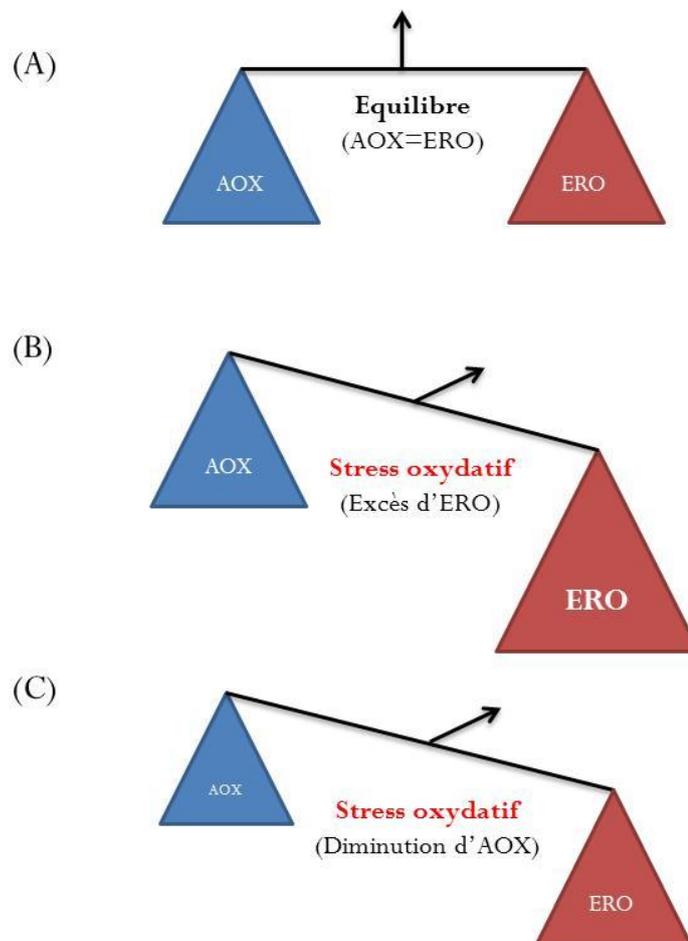


Figure 3. Schéma de l'équilibre/déséquilibre de la balance prooxydants (ERO) et antioxydants (AOX) d'après Scandalios (2002).

1.2.2. Atteinte de l'ADN

Comme le suggèrent Douki et collaborateurs (2006), l'ionisation directe de la molécule d'ADN reste minoritaire et les dommages sont principalement induits par les espèces issues de la radiolyse de l'eau. Les modifications de l'ADN peuvent être classées en trois grands types :

- Modifications de bases. Elles résultent d'une oxydation des bases composant l'ADN (cytosine, thymine, adénine, guanine), principalement par addition du radical hydroxyle OH^\bullet . Ces modifications ne sont pas létales, mais peuvent créer des mutations si elles ne sont pas réparées ou si les réparations sont fautive. Dans certains cas, les lésions peuvent induire une rupture de la liaison N-glycosidique qui relie la base au squelette sucre-phosphate. Ceci a pour conséquence d'éliminer les bases créant ainsi un site abasique (perte de base).

- **Pontages.** Des liaisons covalentes supplémentaires entre l'ADN et les histones ou d'autres protéines nucléaires peuvent être observées sous l'action des rayonnements ionisants (Oleinick et al., 1987).
- **Cassures.** Cela concerne à la fois les cassures simple-brin et les cassures double-brin. Cependant, seules les cassures double-brin peuvent conduire à une mort cellulaire (arrêt du cycle cellulaire ou apoptose et senescence) (Foray et al., 1997). Il existe deux principaux mécanismes de réparation de ces cassures double-brin : la recombinaison homologue (HR) et la jonction non-homologue (NHEJ) (Smith et Jackson, 1999). Le principe du processus de réparation HR est le suivant : une matrice d'ADN sur une chromatide sœur ou un chromosome homologue est utilisée afin de fournir une réparation sans erreur (West, 2003). Par contre, la NHEJ est un mécanisme dit avec erreurs car il relie directement les extrémités d'ADN cassées. Ceci peut entraîner l'ajout ou la suppression de nucléotides sur le site de réparation (Lopez-Contreras et Fernandez-Capetillo, 2012).

Les lésions de l'ADN non ou mal réparées peuvent conduire à la mort cellulaire ou à une instabilité génomique (par exemple, la présence d'aberrations chromosomiques ou la présence de micronoyaux) si la cellule survit (Junot et al., 2009). La Figure 4 présente un récapitulatif des différents dommages sur la structure de l'ADN produits par les rayonnements ionisants.

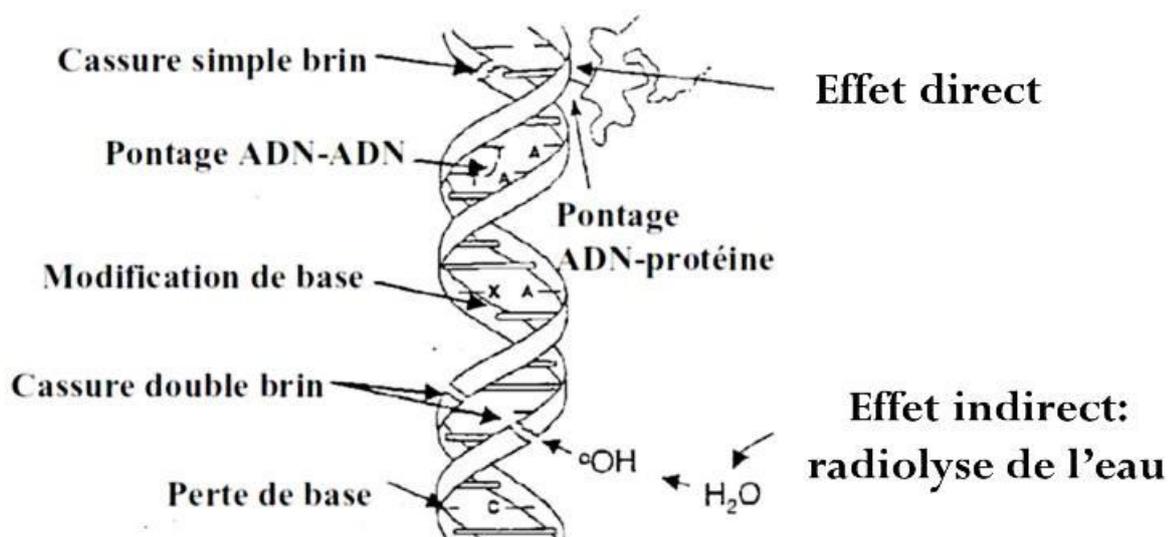


Figure 4. Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects (radiolyse de l'eau) des rayonnements ionisants (Gault, n.d.).

1.3.Problématique environnementale

L'émission des rayonnements ionisants dans l'environnement est un phénomène naturel et ubiquiste (rayonnements cosmiques, telluriques), dû aux radioéléments présents dans le sol et l'atmosphère depuis la formation de la Terre. A cette radioactivité naturelle se rajoute une radioactivité artificielle, générée par les activités humaines (civile ou militaire) pour laquelle deux types de sources peuvent être distingués :

- (i) les sources artificielles à caractère exceptionnel, qui vont rejeter de grandes quantités de radionucléides dans l'environnement. Les exemples les plus connus sont les essais nucléaires et les accidents nucléaires tels qu'à Tchernobyl (1986, avec un relargage de radionucléides dans l'environnement compris entre $9,35 \times 10^3$ et $1,24 \times 10^4$ PBq (Yablokov et al., 2009)) et Fukushima (2011, avec un relargage dans l'environnement de 1.5×10^{16} Bq de césium (NERH, 2011)). Les organismes sont alors soumis à une exposition aiguë,
- (ii) les sources artificielles liées aux activités humaines régulières, comme par exemple les rejets issus des centrales nucléaires lors du cycle normal de fonctionnement, mais également les rejets issus des activités médicales ou militaires (par exemple, l'usine de recyclage d'Areva La Hague a rejeté dans la Manche moins de 1×10^{12} Bq durant l'année 2000 (Devos, 2013)). Si l'ensemble de ces rejets est contrôlé et surveillé, il n'en demeure pas moins que les différents compartiments de l'écosystème (eau, sol, atmosphère) sont en contact permanent avec de faibles niveaux de radionucléides. Par conséquent, les organismes y sont exposés continuellement, il est alors question d'exposition chronique.

Pendant de nombreuses années, la protection radiologique s'est focalisée sur l'impact des rayonnements ionisants sur l'homme. Les normes définies par les instances internationales considéraient que ce qui protégeait l'homme était suffisant pour protéger l'environnement (ICRP, 1977; Whicker et Bedford, 1995). Au cours de la dernière décennie, cette stratégie a été remise en cause et la nécessité d'un accord international sur la protection de l'environnement a

été reconnue (Valentin, 2007). Le projet FASSET (pour Framework for ASSESSment of Environmental impact) a ainsi été créé en 2000, dans le but d'élaborer un cadre pour l'évaluation de l'impact environnemental des rayonnements ionisants dans les écosystèmes européens (Larsson, 2004). C'est dans ce cadre qu'un autre projet a été créé, le projet ERICA (Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management) en 2004 (<http://www.ceh.ac.uk/protect/>). Il a pour but de veiller à la pertinence des décisions sur les questions environnementales au regard de l'exposition, des effets et des risques liés aux rayonnements ionisants en veillant à la structure et la fonction des écosystèmes (Brown et al., 2008). Pour ce faire, une base de données regroupant les informations de la littérature sur les effets des rayonnements ionisants sur les biotes non-humains a été mise en place (Larsson, 2008). Suite à l'analyse de cette base de données, il a été mis en évidence qu'il existe deux fois plus de données en exposition aiguë qu'en exposition chronique (Beresford et al., 2007). Les connaissances liées aux effets chroniques des rayonnements ionisants sont donc limitées. De ce fait, l'évaluation du risque environnemental lié à l'exposition chronique aux rayonnements ionisants repose sur l'extrapolation de données obtenues lors d'une exposition aiguë (Coplestone et al., 2001; Garnier-Laplace et al., 2004).

1.3.1. Comparaison entre exposition aiguë et exposition chronique

Peu d'études se sont intéressées aux différences de réponses des organismes soumis à une exposition chronique et à une exposition aiguë aux rayonnements ionisants. De plus, ces études diffèrent légèrement selon leur design expérimental. En effet, si les organismes sont exposés plus longtemps lors d'une expérimentation chronique, ils le sont également à des doses plus faibles qu'en exposition aiguë. Le domaine des faibles doses est souvent indissociable d'une exposition chronique. Dès 2000, l'équipe d'Olga Kovalchuk a montré que les plantes *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* - exposées pendant 35 jours à du césium 137 pour des doses cumulées comprises entre 4,17 μ Gy et 199,24 μ Gy - présentaient une plus haute fréquence de recombinaison homologue que celles irradiées à des doses comprises entre 0,1 et 10 Gy (source de cobalt 60 délivrant un débit de dose de 1,5 Gy/h) (Kovalchuk et al., 2000). Les travaux de Pereira et collaborateurs, basés sur le même mode de comparaison, ont été menés sur des

cellules embryonnaires de poisson zèbre exposées à l'aide d'une source radioactive de césium 137. Pour l'exposition chronique, les doses étaient de 1, 10, 100 et 750 mGy (dose cumulée après une durée d'exposition de 24h), tandis que pour l'exposition aiguë, les doses cumulées étaient de 0,3, 1 et 2 Gy (avec une source délivrant 1 Gy/min). Les résultats de cette étude montrent que l'irradiation chronique induit des dommages irréversibles de l'ADN et des effets sur le développement (accélération de l'éclosion), tandis que l'irradiation aiguë provoque un développement anormal de l'embryon (malformation) (Pereira et al., 2011).

D'autres auteurs ont effectué une comparaison exposition aiguë/exposition chronique, mais pour une même dose cumulée. Une étude a ainsi été menée sur des souris soumises à une exposition chronique et aiguë aux rayons X. La dose cumulée pour les deux conditions d'exposition était de 500 mGy. Les souris exposées chroniquement ont été soumises à une irradiation sur 10 jours à un débit de dose de 50 mGy/j, alors que les souris soumises à une exposition aiguë ont reçu le 10^{ème} jour une dose de 500 mGy. Les auteurs ont étudié la méthylation de l'ADN génomique des tissus musculaires et du foie. Aucun effet n'a été observé sur la méthylation du génome quel que soit le tissu pour les souris irradiées en aigu. Par contre, l'irradiation chronique a mené à l'hypométhylation du génome dans le muscle mais pas dans le foie (Kovalchuk et al., 2004). Une autre étude réalisée chez la plante *Arabidopsis thaliana* a montré que les individus exposés pendant 21 jours à une dose cumulée de 1 Gy (exposition chronique) présentaient une plus haute fréquence de recombinaison homologue que les individus exposés à la même dose cumulée le 21^{ème} jour (exposition aiguë) (Kovalchuk et al., 2007). De la même manière, une irradiation de *Petunia x hybrida* (pétunia) à une dose cumulée de 50 Gy (débits de dose de 0,33 Gy/min pendant 2,5 jours en exposition chronique et de 5,15 Gy/min pendant 10 minutes en exposition aiguë) a montré qu'une exposition chronique ne semblait pas activer de mécanismes de protection efficaces, tel que la réparation de l'ADN, tandis qu'une exposition aiguë améliorerait fortement les mécanismes de défense (Donà et al., 2013).

Ces études tendent à montrer que la qualité et l'intensité des effets induits par exposition chronique aux rayonnements ionisants diffèrent de ceux induits par une exposition aiguë. La durée d'exposition des organismes, pour une même dose cumulée, semble jouer un rôle dans ces dissemblances. Il est donc nécessaire de réaliser des études ciblées pour une meilleure évaluation du risque lié à une exposition chronique. La suite de ce chapitre sur les rayonnements

ionisants va donc s'intéresser plus particulièrement à l'étude des effets chroniques des organismes non-humains.

1.3.2. Etude des effets chroniques d'une exposition aux rayonnements ionisants

1.3.2.1. Traits d'histoire de vie et rayonnements ionisants

Les principaux critères biologiques utilisés au niveau phénotypique pour évaluer l'effet des rayonnements ionisants sont : la morbidité, la reproduction et dans une moindre mesure la mortalité. Ces critères d'effet sont pertinents pour évaluer les impacts sur les populations (Woodhead, 2003). La morbidité, comme décrit par Dallas et collaborateurs en 2012, est définie comme étant l'ensemble des impacts subis par les processus biologiques, causant ainsi une diminution de la valeur sélective (capacité à vivre et à se reproduire) des organismes à plus ou moins long terme (Dallas et al., 2012). La reproduction, quant à elle, est considérée comme l'un des points les plus critiques car elle influence la dynamique de population (Anderson et Wild, 1994; Coutellec et Barata, 2011; Jha, 2004; Wurgler et Kramers, 1992). Sous le terme de reproduction sont regroupés deux effets qui sont la fécondité et la fertilité. La fécondité est la capacité d'un organisme à produire des gamètes viables, tandis que la fertilité concerne la qualité des descendants (malformations lors du développement, survie, etc.).

Une grande partie des études sur les effets des rayonnements ionisants sur la morbidité et la reproduction a été réalisée chez les végétaux supérieurs terrestres, les organismes aquatiques et les mammifères (Adam-Guillermin et al., 2012; Coplestone et al., 2008; Dallas et al., 2012; Real et al., 2004). Le principal effet observé sur la reproduction est une diminution de la fécondité, quel que soit le modèle biologique considéré. En effet, chez les végétaux supérieurs, les données obtenues après une irradiation externe (avec principalement des émetteurs gamma) montrent une réduction de la production de graines, de la germination et une diminution de la fertilité du pollen (Geras'kin et al., 2008; Geras'kin et al., 2013; Minouflet et al., 2005; Sheppard et al., 1992; Whicker, 1997; Zaka et al., 2004). De la même manière, une diminution de la ponte et des portées, liée à une altération des gamètes, est observée chez les organismes

aquatiques et chez les mammifères (chez les souris et les rats) lorsque ceux-ci sont exposés à des rayonnements ionisants (Alonzo et al., 2006; Coppenger et Brown, 1967; Gilbin et al., 2008; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986; Knowles et Greenwood, 1994, 1997; Leonard et al., 1985; Marshall, 1962, 1966; Searle et al., 1980; Zeman et al., 2008). Les débits de dose utilisés dans ces différentes études varient selon le type de rayonnements ionisants : en contamination interne (alpha), les débits de dose estimés dans les organismes varient de 2,1 à 13 $\mu\text{Gy/h}$, tandis que les débits de dose délivrés par une source émettant des rayonnements gamma ou bêta varient de 0,4 à 43 mGy/h . Seules quelques études ont mis en évidence un impact sur la qualité des descendants issus de parents exposés, notamment une diminution (i) du poids ou de la masse des embryons produits, (ii) du taux d'éclosion, (iii) de la survie des embryons (Alonzo et al., 2006; Harrison et Anderson, 1994; Hertel-Aas et al., 2007; Muramatsu et al., 1964).

Une exposition chronique aux rayonnements ionisants induit également des effets sur la morbidité. Chez les plantes, une diminution du poids des feuilles, des racines et de la plante entière a été observée (Biermans et al., 2015; Real et al., 2004; Vandenhove et al., 2010; Vandenhove et al., 2009; Zaka et al., 2004). Des études menées chez les poissons et les mammifères ont également montré une diminution de la croissance cérébrale et du poids ainsi qu'un impact des rayonnements ionisants sur la formulation sanguine (Fuma et al., 2014; Real et al., 2004). En revanche, les différentes études menées sur les invertébrés (daphnie, vers du fumier) n'ont pas montré d'effet sur la croissance des individus exposés (Gilbin et al., 2008; Hertel-Aas et al., 2007). Ces différents effets sur la morbidité ont été observés pour des débits de dose compris entre 81 $\mu\text{Gy/h}$ et 100 mGy/h (débits de dose délivrés principalement par une source émettant des rayonnements gamma).

1.3.2.2. Etudes multigénérationnelles et rayonnements ionisants

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2 de cet état des connaissances, les rayonnements ionisants sont connus pour induire des dommages à l'ADN, créant ainsi des altérations du génome (instabilité génomique), qui peuvent être transmises au travers des générations. Deux types d'études sont menés lors d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants. Tout d'abord, plusieurs générations sont soumises aux rayonnements ionisants, il s'agit d'une exposition continue. Le second type d'étude consiste à exposer

uniquement la génération parentale et à observer si des effets apparaissent chez les descendants non exposés.

Exposition continue

Peu d'études sont disponibles concernant les effets des rayonnements ionisants sur plusieurs générations continuellement exposées. Toutefois, ces études montrent généralement qu'il existe une augmentation de la radiosensibilité en fonction des générations, c'est-à-dire une aggravation des effets liés à l'exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les travaux menés sur trois générations du polychète *Ophryotrocha diadema* ont montré que pour la première génération, seul le nombre d'œufs pondus diminuait pour un débit de dose de 13,7 mGy/h. Cependant, pour les générations 2 et 3, le nombre d'œufs, la survie des œufs et des larves étaient affectés dès 1,7 mGy/h (Knowles et Greenwood, 1994). Dans la même optique, une étude menée par Harrison et Anderson (1994) a mis en évidence les effets d'une irradiation chronique sur le succès reproducteur en exposant deux générations de *Neanthes arenaceodentata* (vers marins). Selon cette étude, le nombre d'embryons vivants issus de la deuxième génération était significativement plus faible que les témoins, quel que soit le débit de dose (de 0,19 à 17 mGy/h). Associé à cela, une augmentation du nombre de déformations des embryons a été observée (Harrison et Anderson, 1994).

Seule l'irradiation chronique sur deux générations de vers du fumier (*Eisenia fetida*) a montré que la deuxième génération était moins sensible que la première. En effet, le nombre de larves ayant éclos était diminué par rapport au témoin pour les individus exposés à 4 mGy/h à la première génération et à 11 mGy/h pour la deuxième génération. De plus, les auteurs ont observé que le taux d'éclosion des larves issues de la deuxième génération augmentait avec le temps, suggérant une possible adaptation ou acclimatation (Hertel-Aas et al., 2007). Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé lors d'une deuxième expérimentation, pour laquelle le nombre de larves éclos était diminué à 11 mGy/h par rapport au témoin à partir de la deuxième génération uniquement (Hertel-Aas et al., 2011).

Exposition de la génération parentale et effets transgénérationnels

Plusieurs études ont mis en évidence des effets après exposition parentale sur les générations suivantes, alors même que celles-ci ne sont plus exposées. Il est alors question d'effets transgénérationnels. La toute première étude d'un effet transgénérationnel lié à une exposition aux rayonnements ionisants a été conduite en 1976 sur des rats. Celle-ci a montré que la progéniture non exposée issue de mâles exposés à du plutonium (émetteur alpha) présentait elle aussi un taux élevé de mutations dominantes létales sur les cellules de la lignée germinale (Lüning et al., 1976). Depuis, de nombreuses études ont été menées sur les effets transgénérationnels au niveau cellulaire et moléculaire (HPA Advisory Group on Ionising Radiation (AGIR), 2013; Merrifield et Kovalchuk, 2013; Morgan, 2003). Ces différentes études montrent que l'exposition aux rayonnements ionisants de la génération parentale, et plus particulièrement sur les gamètes mâles, conduit à la transmission de dommages à l'ADN et de ce fait à une instabilité génomique (Barber et al., 2006; Baulch et Raabe, 2005; Baulch et al., 2001; Dubrova, 2003a, b; Vance et al., 2002).

En plus de ces études à l'échelle cellulaire et moléculaire, certaines expérimentations ont été conduites sur l'influence de l'exposition parentale sur les traits d'histoire de vie des descendants non exposés. Une première étude a été menée sur deux générations du pois *Pisum sativum*. La génération parentale a été exposée à une source de cobalt 60 (rayonnements gamma) à des doses cumulées de 0,4, 3, 6, 10, 40 et 60 Gy. Cette étude a montré que les effets étaient non seulement transmis d'une génération à l'autre mais aussi qu'ils étaient plus sévères pour la deuxième génération. En effet, une diminution de la taille, du poids sec, du nombre de gousses et du nombre de graines par gousse a été observée à 10 Gy pour la première génération et dès 0,4 Gy (dose correspondant à la dose parentale) pour la deuxième génération. La deuxième génération non irradiée, tout comme la première génération irradiée, a également montré une augmentation du nombre de micronoyaux (fragment de chromosome créé par effet aneugène ou clastogène) par rapport aux témoins dès 3 Gy (Zaka et al., 2004). Cette aggravation des effets à la seconde génération non exposée est également retrouvée chez les papillons *Zizeeria maha* après l'accident de Fukushima. En effet, Hiyama et collaborateurs ont observé des anomalies à la deuxième génération qui n'étaient pas nécessairement observées à la première génération. Les papillons de la première génération ont été récoltés en zone contaminée en mai 2011, soit deux

mois après l'accident de Fukushima, et leurs descendants ont été obtenus en laboratoire, suffisamment loin de Fukushima pour ne pas subir d'irradiation artificielle. La plupart des individus de la première génération semblaient morphologiquement normaux et avaient un comportement normal. Seuls quelques individus, après une inspection poussée, présentaient de légères anomalies, telles que des déformations des yeux, des palpes ou des ailes. Les descendants non exposés de ces individus ont présenté, quant à eux, des anomalies morphologiques plus sévères, comme des ailes cassées ou pliées. De plus, ces anomalies ont été transmises à la troisième génération (Hiyama et al., 2012).

Seule une étude menée sur le ver du fumier (*Eisenia fetida*) a montré que les descendants non exposés issus d'individus exposés à 11 mGy/h ne présentaient pas d'impact quant à leur capacité de reproduction (Hertel-Aas et al., 2011).

1.3.2.3. Effets sur la population

La prédiction des risques liés à une exposition chronique aux rayonnements ionisants sur la population va pouvoir être réalisée par extrapolation des effets observés à l'échelle individuelle sur de grandes fonctions, telles que la reproduction, la croissance et la survie (Forbes et Calow, 1999; Van den Brink, 2008). Cependant, les tests menés actuellement sur ces grandes fonctions physiologiques sont peu sensibles (temps de réponse bien souvent trop long) (Fedorenkova et al., 2010; Robbens et al., 2007; Snape et al., 2004). Il est donc nécessaire de réaliser des études sur des effets subcellulaires (plus sensibles) qui doivent être liés à des échelles biologiques supérieures pour être écologiquement pertinents (Geras'kin et al., 2013). En effet, dans le but d'améliorer la compréhension des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants, étudier les effets subcellulaires seuls ne suffit plus.

Cependant, peu d'études font le lien entre les effets phénotypiques et les effets subcellulaires lors d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants. Chez les plantes, les réponses au stress oxydatif (étude de la capacité enzymatique et production d'espèces réactives de l'oxygène) et les dommages à l'ADN (par le test comète) ont été étudiés en même temps que la croissance et la reproduction (Vandenhove et al., 2010). Cependant, les auteurs en concluent que des perturbations au niveau de ces marqueurs, pourtant précoces, ne permettent pas de faire

le lien avec les variations des traits d'histoire de vie dans leur étude. De la même manière, Geras'kin et collaborateurs ont montré que l'observation d'anomalies cytogénétiques ne permettait pas d'expliquer l'impact sur la capacité de reproduction des pins exposés (Geras'kin et al., 2013; Geras'kin et al., 2011). Ce constat est le même chez les invertébrés aquatiques. En effet, comme décrit par Dallas et collaborateurs (2012), les données actuelles sur les invertébrés aquatiques exposés aux rayonnements ionisants sont trop limitées pour permettre une extrapolation d'un niveau d'organisation biologique à un autre.

Les effets moléculaires et cellulaires observés dans le cadre de ces études ne sont cependant pas spécifiques d'un effet phénotypique (comme cela pourrait être le cas de l'étude de l'expression de gènes impliqués dans la croissance ou la reproduction). Afin de lier ces différents niveaux d'organisation biologiques il est nécessaire de choisir un organisme modèle dont la physiologie et les mécanismes moléculaires et cellulaires sont bien caractérisés.

2. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

2.1. Ecologie

Les nématodes (vers ronds non segmentés) sont des organismes eucaryotes pluricellulaires ubiquistes qui jouent un rôle important dans le cycle, la dégradation et la décomposition des nutriments clés de l'environnement.

Caenorhabditis elegans (Metazoa, Nematoda, découvert par Maupas en 1901 (Maupas, 1901)) est un nématode qui vit dans le sol, majoritairement dans les habitats anthropiques tels que le compost, ou le sol des jardins. Certains ont également été recensés dans les sédiments aquatiques des systèmes d'eau douce polysaprobies (Barbuto et Zullini, 2005; Hirschmann, 1951; Zullini, 1989). *C. elegans* est un organisme bactériophage non-parasitaire qui vit libre dans le sol, mais il est possible de le trouver en association libre et non destructrice (phorésie) avec d'autres invertébrés comme les mille-pattes, les escargots ou encore les limaces (Barrière et Félix, 2005b; Caswell-Chen et al., 2005; Mengert, 1953; Sudhaus et Kiontke, 1996). Cette association concerne un stade de résistance particulier de *C. elegans* qui est appelé le stade dauer et qui sera développé dans le paragraphe suivant. Même si cet organisme a été découvert au début du siècle dernier, ce n'est que très récemment que des études ont montré que les individus dans les sols se trouvaient au stade de résistance (dauer), ce qui n'est pas le cas des individus se développant sur de la matière organique en décomposition comme le compost ou les fruits (Barrière et Félix, 2005a, b; Hodgkin et Partridge, 2008). *C. elegans* est capable de se développer dans une large gamme de température (de 8°C à 27°C) (Félix et Braendle, 2010), mais son utilisation se fait en laboratoire à une température de 20°C. La souche la plus communément utilisée en laboratoire est de type sauvage (N2) et a été isolée à partir de l'humus (Staniland, 1957). Il existe deux sexes chez le nématode de la souche N2 : les mâles (X0) et les hermaphrodites (XX). La présence de mâles dépend du taux de production spontanée par non-disjonction du chromosome X à la méiose. Ce taux est d'environ 1‰ dans les conditions de laboratoire mais peut augmenter lors de conditions environnementales particulières et notamment en réaction face à un stress. Leur présence au sein d'une population est de plus

facultative car les hermaphrodites sont capables de se reproduire par autofécondation (Altun et Hall, 2005).

2.2.Cycle de vie

Caenorhabditis elegans a un cycle de vie de trois jours à sa température de référence en laboratoire (20°C). Cependant, une variation de température peut avoir des effets sur le cycle de vie du nématode, son taux de ponte et sa fécondité (Byerly et al., 1976) (Tableau 1).

Il existe deux grandes parties dans le cycle de vie de cet organisme, qui sont le développement embryonnaire et la phase post-embryonnaire, constituée par différents stades larvaires (Figure 5). Ces différentes phases de développement peuvent être observées tout au long de son cycle de vie, *C. elegans* possédant une enveloppe (tégument) transparente. Cette particularité a permis de décrire précisément les différents stades de vie de l'organisme, mais également d'établir le lignage cellulaire, qui est invariant entre les individus (Brenner, 1974; Byerly et al., 1976; Sulston et al., 1983). Au stade adulte, l'hermaphrodite possède 1090 cellules, dont 131 sont destinées à l'apoptose (Altun et Hall, 2009c) et six paires de chromosomes, dont cinq paires d'autosomes et une paire de gonosomes de type XX (Araiz et al., 2008).

	16°C ± 0,3	20°C ± 0,5	25°C ± 0,2
Ponte	0 h	0 h	0 h
Eclosion	16-18 h	10-12 h	8-9 h
Première mue	36,5 h	26 h	18 h
Seconde mue	48 h	34,5 h	25,5 h
Troisième mue	60 h	43,5 h	31 h
Quatrième mue	75 h	56 h	39 h
Début de ponte	~90 h	~65 h	~47 h
ponte maximale	~140 h	~96 h	~62 h
Fin de ponte	~180 h	~128 h	~88 h
Taille à la première mue	360 µm	370 µm	380 µm
Taille à la seconde mue	490 µm	480 µm	510 µm
Taille à la troisième mue	650 µm	640 µm	620 µm
Taille à la quatrième mue	900 µm	850 µm	940 µm
Taille au début de la ponte	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Taux maximal de ponte	5,4 h ⁻¹	9,1 h ⁻¹	8,1 h ⁻¹
Nombre total d'œufs pondus	275	280	170

Tableau 1. Développement de la souche N2 *C. elegans* pour différentes températures selon Byerly et collaborateurs (1976).

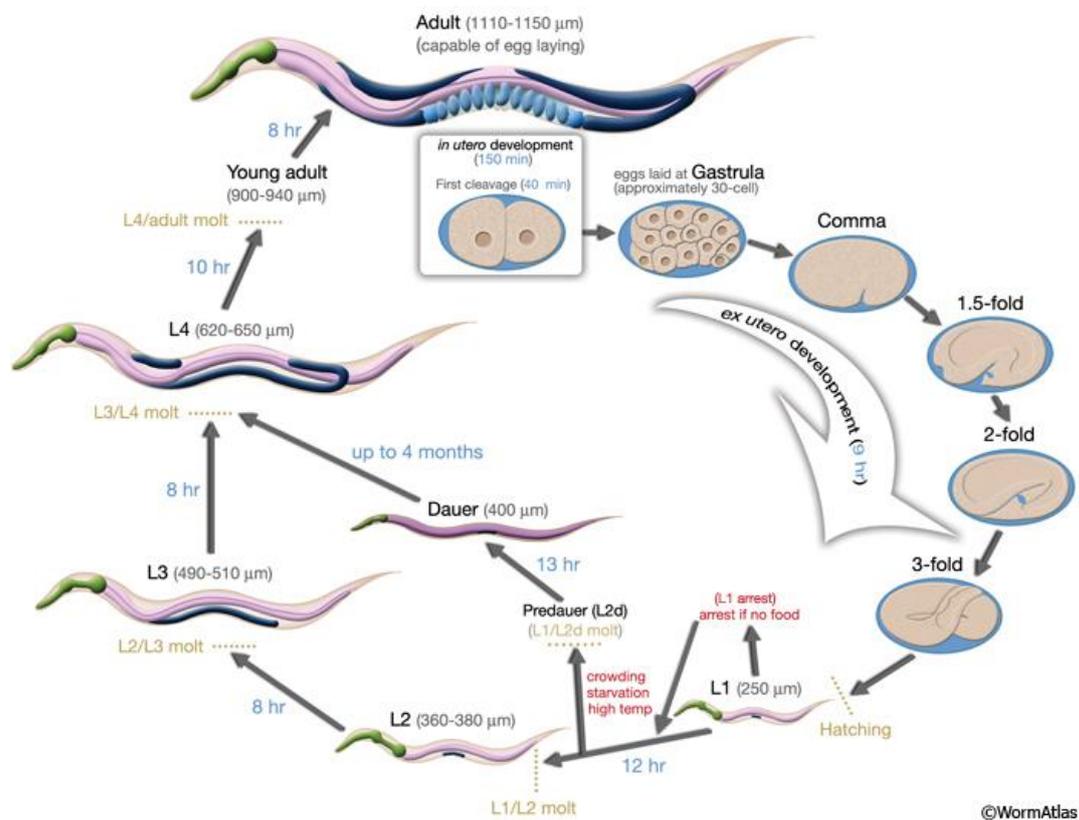


Figure 5. Cycle de vie de la souche N2 *C. elegans* à 22°C d'après Altun et Hall (2009).

2.2.1. Phase embryonnaire

L'embryogénèse se déroule en deux phases : une prolifération cellulaire suivie d'une phase d'organogénèse et de morphogénèse. La première phase se met en place tout de suite après la fertilisation de l'oocyte et aboutit à 550 cellules qui sont essentiellement indifférenciées. A la fin de cette première phase, l'embryon est de forme sphéroïde et possède trois couches ou feuillettes : l'ectoderme (qui va donner l'hypoderme et les neurones), le mésoderme (qui va générer le pharynx et les muscles) et l'endoderme (qui va aboutir à la lignée germinale et à l'intestin). La seconde phase ne concerne que la différenciation cellulaire : l'embryon va tripler de volume et prendre sa forme finale avec tous ses tissus et ses organes différenciés. A la fin de cette phase, la larve peut bouger à l'intérieur de l'œuf. Lorsque la larve éclot, et en présence de nourriture, elle rentre dans la deuxième partie de son cycle de développement (Altun et Hall, 2009c).

2.2.2. Phase post-embryonnaire

Le développement post-embryonnaire fait passer l'organisme au travers de quatre stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) avant d'atteindre le stade adulte (Figure 5). Ces stades sont séparés par des mues, périodes durant lesquelles le nématode entre en léthargie (Altun et Hall, 2009c; Araiz et al., 2008). Les cellules blastiques vont se diviser selon des patterns temporels et spatiaux invariants pour donner un nombre fixe de cellules (959 à l'âge adulte) avec des fonctions bien déterminées (Altun et Hall, 2009c; Sulston et Horvitz, 1977; Wood, 1987). Durant les différents stades larvaires, le corps de *C. elegans* va grandir significativement (d'environ 250 μm au stade L1 jusqu'à atteindre approximativement 1200 μm au stade adulte), sans qu'il y ait de changements dans la forme du nématode. Dans le cadre de ces travaux de recherche, nous nous sommes intéressés à la croissance (liée au système épithélial) et à la reproduction (liée à l'appareil reproducteur) de *C. elegans*.

2.2.2.1. Le système épithélial

Le système épithélial de *C. elegans* est constitué de deux catégories de cellules qui sont l'hypoderme et les cellules épithéliales spécialisées (dont les cellules de jonction).

L'hypoderme joue un rôle important durant le développement et est notamment indispensable pour le stockage des nutriments et le dépôt des cuticules spécifiques au stade (ou mues). Une atteinte du développement et de la fonction des cellules de l'hypoderme a pour conséquence un défaut dans : la morphogénèse du corps, le développement musculaire et la structure et la fonction de la cuticule (Altun et Hall, 2009a). Le développement post-embryonnaire de l'hypoderme se fait à partir des cellules de jonction et de cellules blastiques ventrales (Sulston et Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Au stade adulte, l'hypoderme est constitué principalement d'un syncytium (formé par les cellules de jonction) et de cellules hypodermiques (appelées hyp 7) qui enveloppent tout le corps à l'exception des extrémités de la tête et de la queue. Les cellules de jonction ont des fonctions similaires à l'hypoderme, puisqu'elles vont également sécréter les cuticules entre chaque stade larvaire (Thein et al., 2003). Au début des stades larvaires L2, L3 et L4 (avant la mue), les cellules de jonction vont se diviser en cellules souches qui vont donner deux cellules filles : une qui va venir fusionner avec les cellules de l'hypoderme et une qui va devenir une nouvelle cellule de jonction, capable de se diviser (Altun et Hall, 2009b).

La Figure 6 ci-dessous regroupe les deux catégories de cellules épithéliales qui viennent d'être présentées :

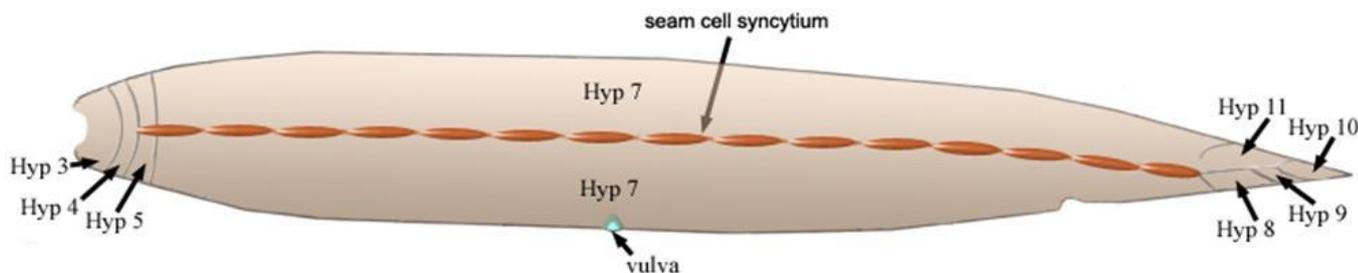


Figure 6. Schéma représentatif du système épithélial du nématode *C. elegans* adulte avec les cellules de jonction en orange (formant un syncytium) et les cellules de l'hypoderme (hyp), dont les cellules qui entourent une grande partie du corps du nématode (hyp 7), selon Altun et Hall (2005).

2.2.2.2. Le système reproducteur

Le système reproducteur va à la fois produire des gamètes matures et fournir des environnements propices à la fertilisation et à la ponte. Il est composé de trois grandes parties : les gonades somatiques, la lignée germinale et l'appareil de ponte (utérus, vulve et les muscles et neurones associés) (Lints et Hall, 2009a). Les gonades somatiques font référence à tous les composants qui ne font pas partie de la lignée germinale : une cellule d'extrémité distale de chaque bras, appelée DTC (pour Distal Tip Cell), une gaine qui entoure la gonade, la spermathèque, la valve située entre la spermathèque et la cavité utérine et l'utérus. Comme indiqué dans la figure 7, les gonades somatiques et la lignée germinale forme deux tubes distincts en forme de U (aussi appelé bras) qui sont reliés entre eux par un appareil de ponte commun au milieu du corps de l'organisme (Figure 7).

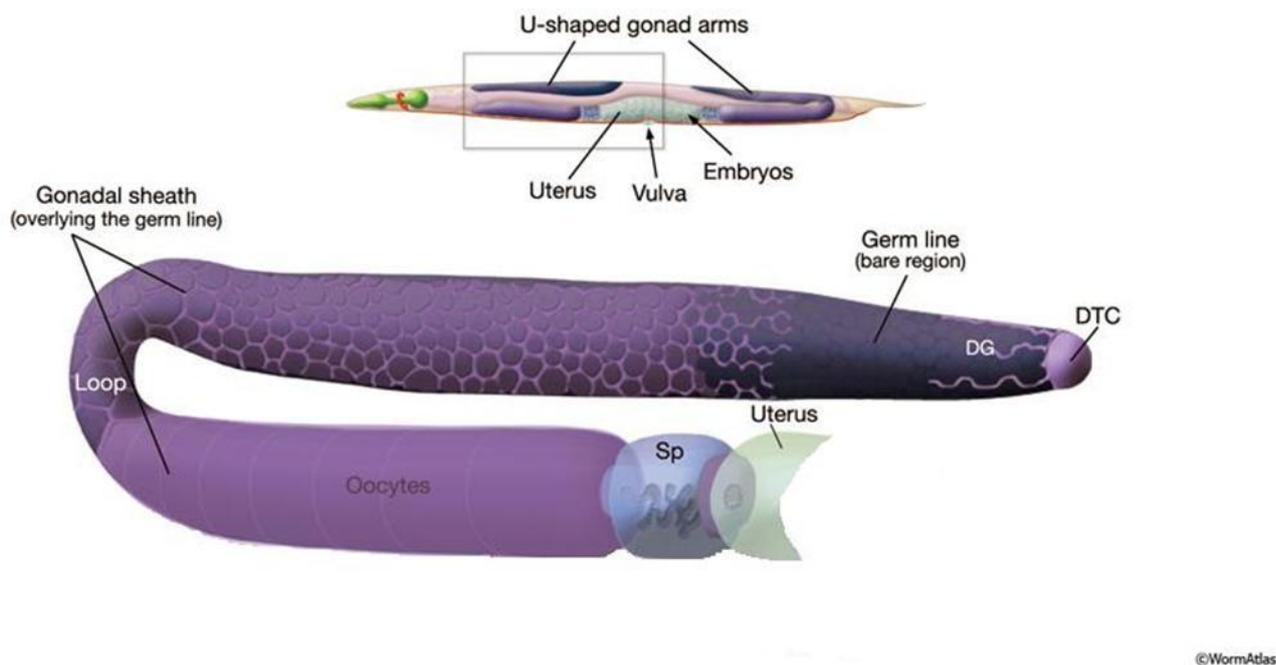


Figure 7. Schéma du haut, vue générale du système reproducteur de l'adulte hermaphrodite. Avec en violet les bras de la gonade en forme de U, en rose l'intestin, en bleu foncé la spermathèque et en bleu ciel les embryons. Schéma du bas, zoom sur un des bras de la gonade. Avec la cellule d'extrémité distale (DTC), la partie distale de la gonade (DG) et la spermathèque (Sp). Lints et Hall (2009).

Les différentes étapes du développement de l'appareil reproducteur sont présentées ci-dessous, avec un descriptif réalisé en fonction des stades de vie du nématode. La Figure 8 synthétise ce descriptif.

Stade L1

A l'éclosion, le système reproducteur contient les cellules germinales primordiales Z2 et Z3 qui sont entourées par les cellules précurseurs des gonades somatiques notées Z1 et Z4. A la fin du stade L1, les cellules Z2 et Z3 vont donner des cellules germinales en mitose. Quant aux cellules Z1 et Z4, celles-ci ont proliféré pour donner deux cellules d'extrémité distale (DTC), essentielles à la prolifération de la lignée germinale, et dix cellules proximales (Hubbard et Greenstein, 2005). Chez les hermaphrodites, la cellule d'extrémité distale a deux grands rôles : l'élongation du bras de la gonade durant tout son développement et la promotion et/ou l'inhibition de la mitose et de la méiose dans la lignée germinale que ce soit durant le développement de celle-ci ou chez l'adulte (Blelloch et al., 1999; Blelloch et Kimble, 1999; Crittenden et al., 2003; Hall et al., 1999; Hansen et al., 2004; Kimble et White, 1981; Pepper et al., 2003).

Stade L2/L3

Les dix cellules proximales qui ont été formées au stade précédent vont se réarranger à la fin du stade L2 pour former les cellules primordiales somatiques. Ces cellules vont notamment être les précurseurs de la lignée des cellules de la gaine des gonades. En tout début de stade L3, une rapide extension du bras de la gonade est observée, due à une prolifération des cellules germinales mitotiques en réponse aux signaux des DTC et des cellules de la gaine. La prophase I de méiose débute également au stade L3 (Ellis et Schedl, 2007; Hubbard et Greenstein, 2005).

Stade L4 tardif

A la fin du stade L4, les bras de la gonade sont formés. La prolifération des cellules germinales se poursuit dans la zone mitotique distale constituant ainsi une réserve de cellules. Ces cellules vont passer par la suite en prophase I de méiose pour donner les différents gamètes. A ce stade, chaque bras de la gonade contient environ 37 cellules en méiose à sa partie proximale qui vont s'engager dans la spermatogénèse et produire environ 150 spermatozoïdes

(L'Hernault, 1997). Au stade jeune adulte, une fois que les spermatozoïdes ont été produits, un switch de la gonade est observé et celle-ci va produire des oocytes (Lints et Hall, 2009a).

Adulte

Les cellules de la gaine des gonades forment une couche qui va entourer les différents composants de la lignée germinale de chaque bras de la gonade. Ces cellules se trouvent par paires (cinq) le long de la gonade et vont promouvoir la prolifération des cellules germinales, leur sortie du pachytène et la gamétogénèse (McCarter et al., 1997; Rose et al., 1997; Seydoux et al., 1990). Les cellules de la gaine qui se trouvent du côté distal de la gonade sont indispensables pour éliminer (par ingestion) les cellules de la lignée germinale qui rentrent en apoptose. Les raisons de cette élimination de certaines cellules germinales par apoptose sont encore aujourd'hui mal connues. Les cellules se trouvant du côté proximal, quant à elles, sont nécessaires à la maturation des oocytes et à l'ovulation (Hall et al., 1999; McCarter et al., 1999). Au stade adulte, les oocytes vont se développer tout au long de la gonade : les cellules mitotiques vont progresser le long de la gonade et vont passer par les différents stades de la prophase I de méiose (leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse) (Figure 8 (A)). Cette progression est dépendante d'un mécanisme de signalisation de la MAPK (pour mitogen-activated protein kinase) (Greenstein, 2005; Hubbard et Greenstein, 2005). Arrivés en diacinèse, les oocytes s'accumulent dans la partie proximale de la gonade où ils peuvent entamer leur maturation en réponse à un stimulus hormonal produit par le sperme (la major sperm protein ou MSP) (Johnston et Dennis, 2012) (Figure 8 (B)). En réponse, les oocytes vont débiter leur maturation. Cette même protéine va être responsable par la suite de la stimulation de la fréquence et de l'intensité des contractions de la gaine des gonades, ce qui va faciliter l'ovulation. Lors de l'ovulation, la spermathèque s'ouvre, les cellules de la gaine vont se contracter rapidement et vont tirer la spermathèque autour de l'oocyte. Dès que l'oocyte est à l'intérieur, la spermathèque se ferme, l'oocyte est immédiatement fécondé et relâché dans l'utérus (Greenstein, 2005; Lints et Hall, 2009b). Il devient un embryon qui va poursuivre son développement dans l'utérus avant d'être pondu. Un nématode va pondre environ 300 œufs fécondés avant de s'arrêter, limité par sa réserve de spermatozoïdes (arrêt de la stimulation hormonal par la MSP).

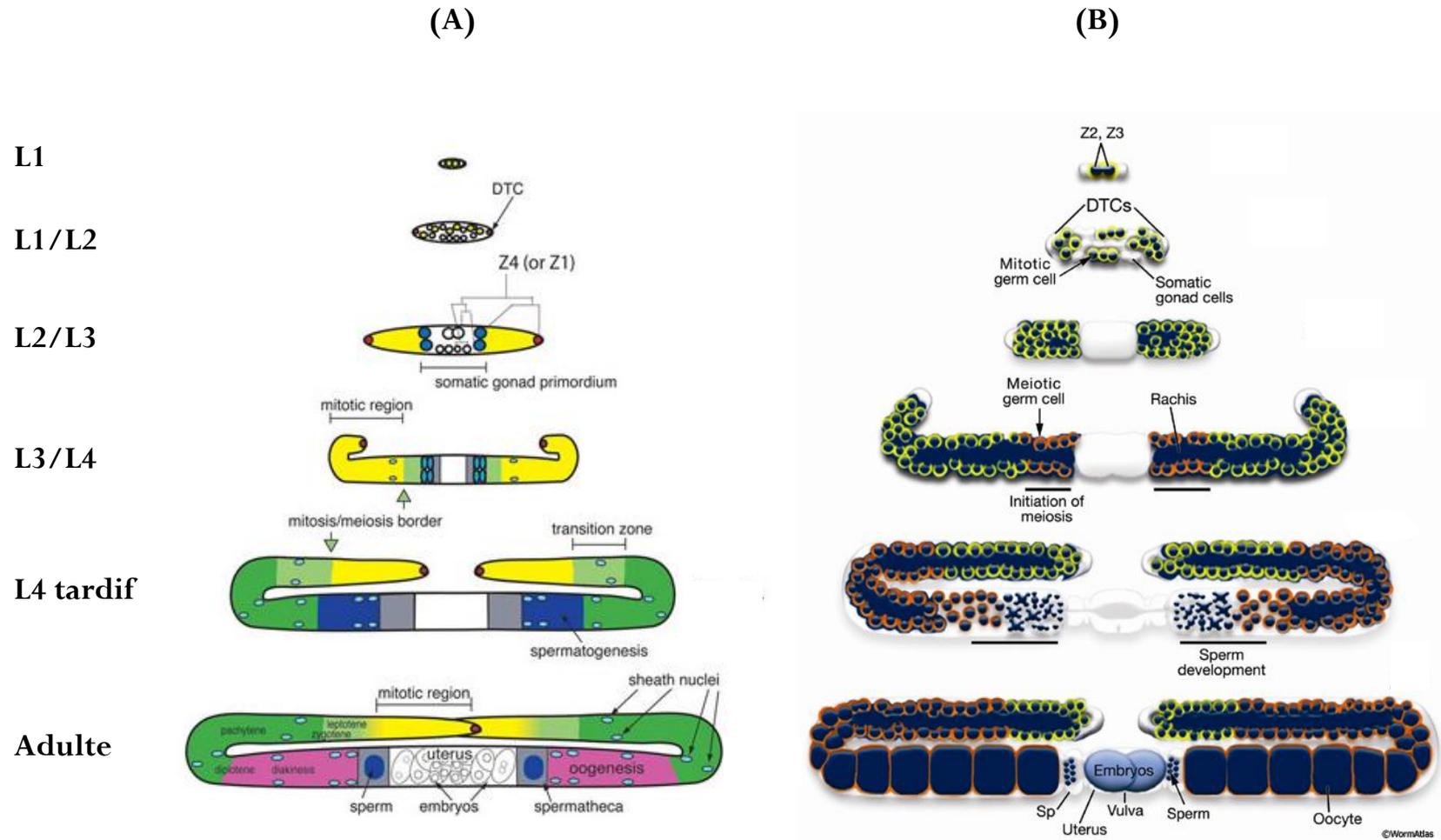


Figure 8. Synthèse du développement de l'appareil reproducteur de *C. elegans* selon Hubbard et Greenstein (2005) et Lints et Hall (2009). (A) schéma du développement des gonades somatiques avec : les cellules d'extrémité distale (en rouge), les cellules précurseurs de la spermatheque et de la gaine (en bleu foncé), les cellules de la gaine (en bleu clair), la spermatheque en gris et l'utérus en blanc. (B) Schéma du développement de la lignée germinale.

2.2.3. Formes de résistance

2.2.3.1. Stade dauer

Lorsque les conditions environnementales ne sont pas favorables (manque de nourriture, température élevée ou forte densité de population (Golden et Riddle, 1984)), *C. elegans* entre dans un stade de résistance qui peut durer plusieurs mois et qui est appelé le stade dauer. Le passage à ce stade peut se faire à la fin du stade L1 et passe par la formation d'une larve appelée pré-dauer (L2d) (Figure 5). Si les conditions environnementales deviennent à nouveau favorables au développement de *C. elegans*, la larve va reprendre un cycle normal en atteignant le stade L3 (Altun et Hall, 2009c). Si, au contraire, les conditions environnementales ne sont pas favorables lorsque *C. elegans* est au stade L2d, la larve va passer en stade dauer.

Ce stade présente plusieurs particularités morphologiques et physiologiques. Tout d'abord, la larve dauer va cesser de se nourrir du fait du rétrécissement et de la fermeture de sa cavité buccale (Cassada et Russell, 1975; Félix et Braendle, 2010; Riddle, 1988). De plus, la cuticule de la larve dauer va s'épaissir (Wolkow et Hall, 2011). La larve dauer peut ainsi survivre plusieurs mois dans l'attente de conditions environnementales plus favorables pour reprendre le cycle au stade L4 (Altun et Hall, 2009c).

2.2.3.2. Diapause de la reproduction et bagging

L'arrêt de la reproduction chez l'adulte a été découvert lors de l'étude de la privation de la nourriture lors de stade tardif de développement (Angelo et Van Gilst, 2009). Cette étude montre que lorsque que les nématodes sont privés de leur source de nourriture au stade L4, deux cas de figures peuvent se présenter : les organismes arrêtent leur cycle cellulaire au stade L4, ou les organismes sont adultes et vont entrer en diapause, bloquant ainsi le processus de reproduction. Par contre, lorsque l'absence de nourriture survient au stade L4 tardif ou pendant le stade adulte, il est observé un phénomène de rétention des embryons : ceux-ci vont éclore et se développer dans le corps de l'adulte. Ce phénomène est appelé bagging (Chen et Caswell-Chen, 2004).

3. *C. elegans* et radiotoxicologie

L'utilisation du nématode *Caenorhabditis elegans* dans de nombreux domaines scientifiques, tels que la génétique, la biologie du développement, la neurophysiologie, la toxicologie et même l'écotoxicologie, s'est considérablement développée depuis ces trente dernières années (Leung et al., 2008; Wilson et Kakouli-Duarte, 2009). Cet engouement est dû aux nombreux avantages de *C. elegans*, comme par exemple un corps transparent, un cycle de vie rapide et surtout un génome entièrement séquencé et des degrés élevés de conservation de séquence de gènes avec les mammifères (Hope, 1999). De nombreuses voies de signalisation impliquées dans les réponses au stress sont ainsi conservées (Committee on Developmental Toxicology et al., 2000), faisant de *C. elegans* un organisme de choix en remplacement d'organismes vertébrés dans l'évaluation de substances chimiques (Becker et al., 2006). C'est ainsi que de récentes méthodes ont été développées pour l'utilisation de *C. elegans* dans l'évaluation des sols, des sédiments et des eaux usées (ASTM E2172-01, 2008; Hitchcock et al., 1997; Höss et al., 2009; ISO, 2010; Schloter et al., 2003; Sochová et al., 2006). La toxicité de nombreux polluants a ainsi été testée, comme les composés organiques, les nanoparticules, les métaux lourds et les rayonnements non-ionisants (UV) et ionisants (Anderson et Wild, 1994; Choi et al., 2014; Dutilleul et al., 2013; Goussen et al., 2013; Handy et al., 2012; Leung et al., 2008; McVey et al., 2012; Sakashita et al., 2010; Sochová et al., 2007). Cependant, seuls les résultats des études sur les effets des rayonnements ionisants chez *C. elegans* vont être détaillés dans ce chapitre. Comme nous l'avons vu précédemment, les effets des rayonnements ionisants peuvent être observés à différents niveaux d'organisation biologique (cf. Chapitre 1). Dans ce chapitre, nous traiterons dans un premier temps des connaissances sur les effets moléculaires des rayonnements ionisants sur la lignée germinale de *C. elegans*. Nous aborderons ensuite les effets sur les traits d'histoire de vie tels que la reproduction, la croissance ou la survie. A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible quant à l'effet multigénérationnel des rayonnements ionisants chez *C. elegans*, thème principal de ce travail de recherche.

3.1. Etude des effets de l'irradiation sur la lignée germinale chez *C. elegans*

Comme abordé précédemment, les cellules du système épithélial du nématode et les cellules somatiques du système reproducteur ne subissent plus de divisions cellulaires au stade adulte (cf. Paragraphe 2.2.2). Les cellules germinales sont, quant à elles, prolifératives et doivent assurer la transmission du matériel génétique aux générations suivantes (Bailly et Gartner, 2011). Les différentes études menées sur la réponse à un stress génotoxique au sein de la lignée germinale ont été réalisées après irradiation aiguë des individus. L'irradiation aiguë induit des dommages à l'ADN dans les cellules de la lignée germinale sans provoquer de changements sur les cellules somatiques (Lant et Derry, 2014). De ce fait, l'irradiation aiguë a été largement utilisée pour étudier la réponse moléculaire et cellulaire de la lignée germinale à un stress génotoxique (Bailly et Gartner, 2011; Sakashita et al., 2010). Ces réponses mécanistiques peuvent être classées en trois catégories avec l'étude des cassures double-brin à l'ADN, l'étude de l'apoptose et l'étude de l'arrêt du cycle cellulaire.

3.1.1. Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation

3.1.1.1. Détection des dommages

Des protéines clés vont détecter les cassures double-brin à l'ADN et intervenir en amont du processus de réparation, d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire. Ces protéines sont sous forme de complexes, avec le complexe 9-1-1, dont font partie les protéines MRT-2 et HUS-1, et le complexe RAD-5/CLK-2. Ces complexes sont nécessaires à l'activation de protéines kinase ATM-1 et ATL-1. La protéine ATM-1 joue cependant un rôle mineur dans la détection des dommages à l'ADN. L'activation de la protéine ATL-1 permet la phosphorylation de protéines telles que CHK-1 pour l'arrêt du cycle cellulaire et CEP-1 pour l'apoptose (Bailly et Gartner, 2011; Craig et al., 2012; Sakashita et al., 2010) (Figure 9).

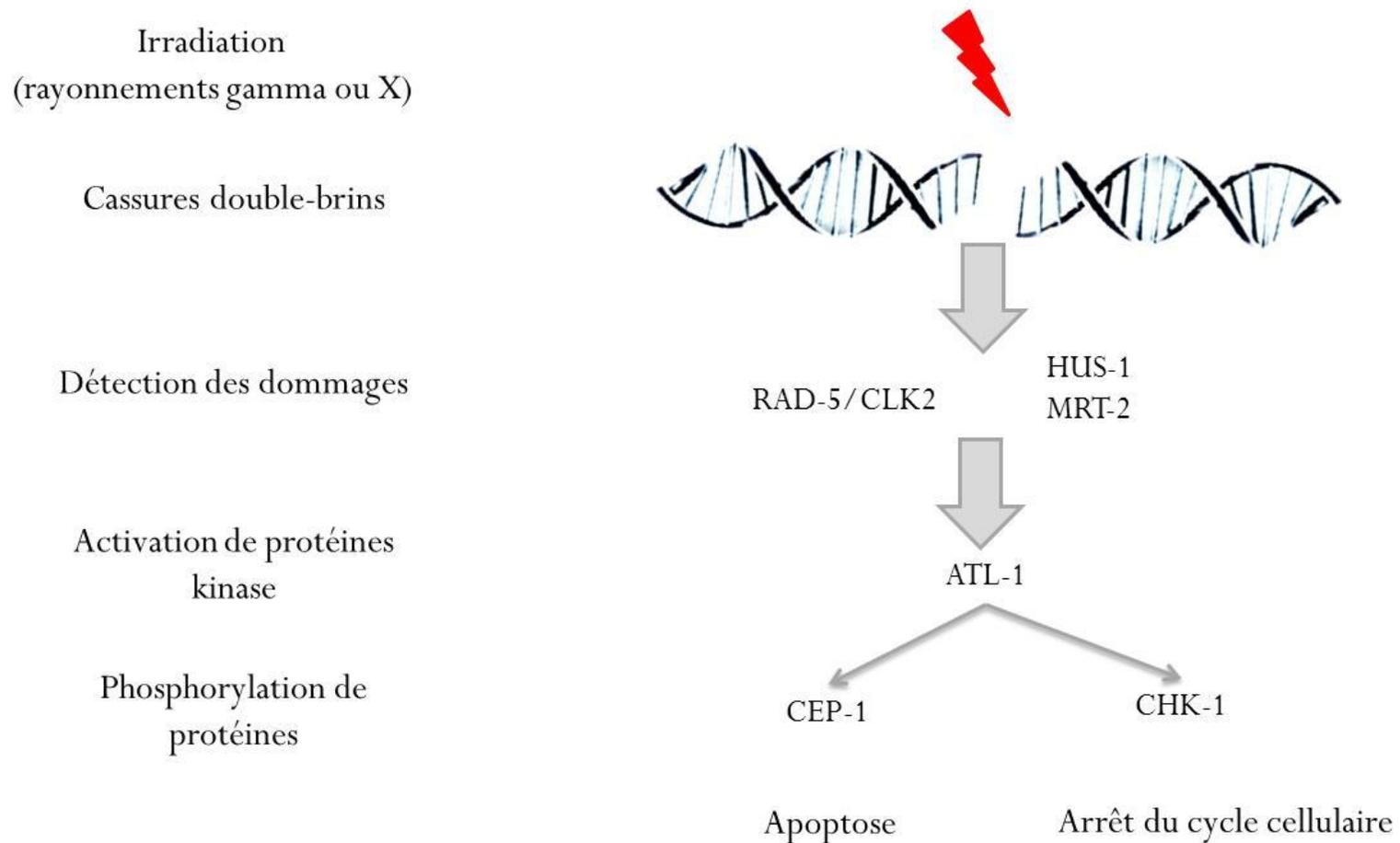


Figure 9. Schéma des différentes voies de réparation de dommages à l'ADN radio-induits. Une irradiation va induire des cassures double-brin à l'ADN. Ces cassures sont par la suite détectées par des complexes protéiques qui vont permettre l'activation de protéines kinase et la phosphorylation de protéines.

Les mécanismes régissant les phénomènes de réparation, d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire sont décrits plus en détail ci-dessous.

3.1.1.2. Mécanismes de réparation

Quel que soit le stade de développement de la lignée germinale, la principale voie de réparation des cassures double-brin radio-induites est la recombinaison homologue (Clejan et al., 2006). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la lignée germinale est constituée de cellules mitotiques et méiotiques (cf. Chapitre 2, Paragraphe 2.2.2.2). Les dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation des cellules méiotiques ont été particulièrement étudiés, la méiose étant le processus biologique générant le plus de cassures double-brin (Lemmens et Tijsterman, 2011).

Comme décrit dans certaines revues (Bailly et Gartner, 2011; Bailly et al., 2010; Lemmens et Tijsterman, 2011), l'ADN double-brin est tout d'abord réséqué en ADN simple-brin. Cette résection résulte, dans les cellules méiotiques, de l'activité d'un complexe de nucléases composé de MRE-11, RAD-50 et COM-1 (Lemmens et al., 2013; Lui et Colaiácovo, 2013; Mimitou et Symington, 2009). Comme décrit par Lemmens et Tijsterman (2011), d'autres nucléases spécifiques des cassures double-brin produites par les rayonnements ionisants interviendraient. La protéine A de réplication (RPA) vient ensuite se fixer sur les queues de l'ADN avant d'être remplacée par une recombinase appelée RAD-51. L'ensemble forme alors un filament de nucléoprotéine capable de chercher un brin donneur complémentaire pour amorcer la synthèse d'ADN (Bailly et Gartner, 2011; Craig et al., 2012; Lemmens et Tijsterman, 2011). La stabilité de ce filament est sous le contrôle d'une protéine, appelée BRC-2, qui est également indispensable au bon recrutement de RAD-51 (Martin et al., 2005; Petalcorin et al., 2007). La Figure 10 ci-dessous représente un schéma simplifié des mécanismes décrits ci-dessus.

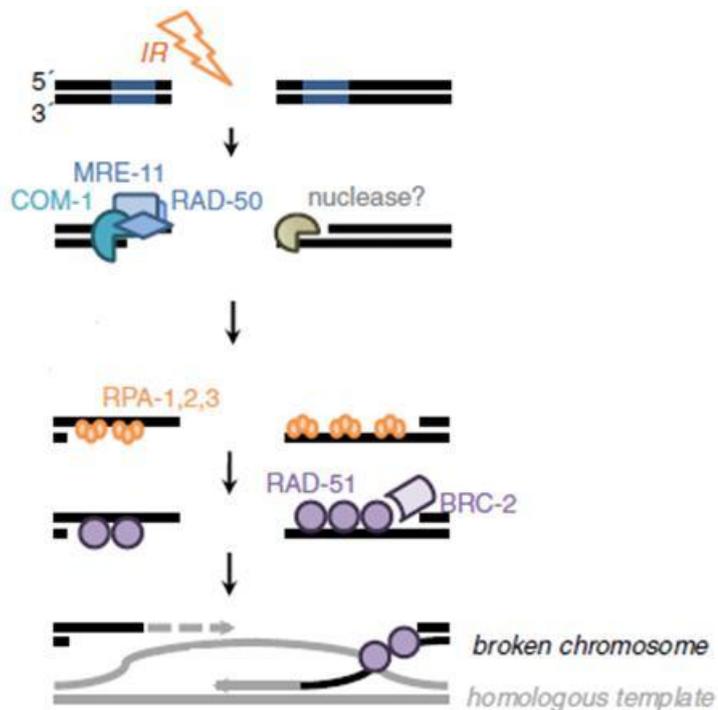


Figure 10. Schéma simplifié de la voie de réparation par recombinaison homologue suite à des cassures double-brin radio-induites, selon Lemmens et Tijsterman (2011)

L'étude des mécanismes de réparation des cellules mitotiques a mis en évidence des différences par rapport à ceux décrits précédemment. En effet, bien que la protéine recombinase (RAD-51) soit également détectée dans les cellules mitotiques (Saito et al., 2009; Wicky et al., 2004), la résection d'ADN simple-brin provient de complexe de nucléases différent (absence de RAD-50) (Hayashi et al., 2007).

Ces processus de réparation des cassures doubles-brins radio-induites, s'ils sont efficaces, vont intervenir afin de limiter les mutations de l'ADN de la cellule (Stergiou et Hengartner, 2003). Cependant, si les cassures sont trop nombreuses et que les processus de réparation sont dépassés, la cellule va soit stopper sa prolifération cellulaire (arrêt du cycle cellulaire), soit entrer en apoptose (Bailly et Gartner, 2013). Une des particularités de la lignée germinale de *C. elegans* est que l'arrêt du cycle cellulaire est spécifique des cellules mitotiques tandis que l'apoptose ne concerne que les cellules méiotiques (Bailly et Gartner, 2011).

3.1.2. Apoptose

L'apoptose est un phénomène physiologique qui peut également être induit en réponse à un stress génotoxique. Chez *C. elegans*, l'apoptose, qu'elle soit d'origine physiologique ou radio-induite, dépend de complexes protéiques de base identiques, composés de CED-9, CED-4 et CED-3. Les protéines CED-9 et CED-4 forment un complexe qui inhibe l'induction de l'apoptose. Sous l'impulsion de stimuli, la protéine CED-4 va se désolidariser du complexe et conduire par la suite à l'activation de la caspase CED-3 et à l'induction de l'apoptose (Conradt et Xue, 2005). Si les stimuli physiologiques induisant l'apoptose sont encore inconnus (Bailly et Gartner, 2013) ceux induits par irradiation sont bien documentés. En effet, une irradiation va induire la production de protéines appelée EGL-1 et CED-13 qui vont se lier à CED-9 et ainsi libérer CED-4. Comme décrit par Bailly et Gartner, l'induction d'EGL-1 joue un rôle prédominant dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN, tandis que le rôle de CED-13 est important lors de l'apoptose induite par UV (Bailly et Gartner, 2013). La transcription d'*egl-1* sous l'effet des rayonnements ionisants est induite par une protéine orthologue de la p53 (protéine suppresseur de tumeurs), CEP-1 (Figure 11). L'expression protéique de CEP-1 est régulée par les protéines GLD-1 et MPK-1. GLD-1 assure une fonction de répression protéique de CEP-1 et est elle-même régulée par MPK-1. Sous l'action d'une irradiation, MPK-1 peut également activer directement CEP-1. Il est intéressant de noter que GLD-1 est surexprimée dans le pachytène jeune et moyen et que son expression diminue au pachytène tardif. De la même manière, la protéine MPK-1 restreint l'expression de CEP-1 aux cellules du pachytène tardif. Cela signifie que l'induction de CEP-1 (et par extension d'EGL-1) est située dans une région précise de la gonade, appelée pachytène tardif (Bailly et Gartner, 2013).

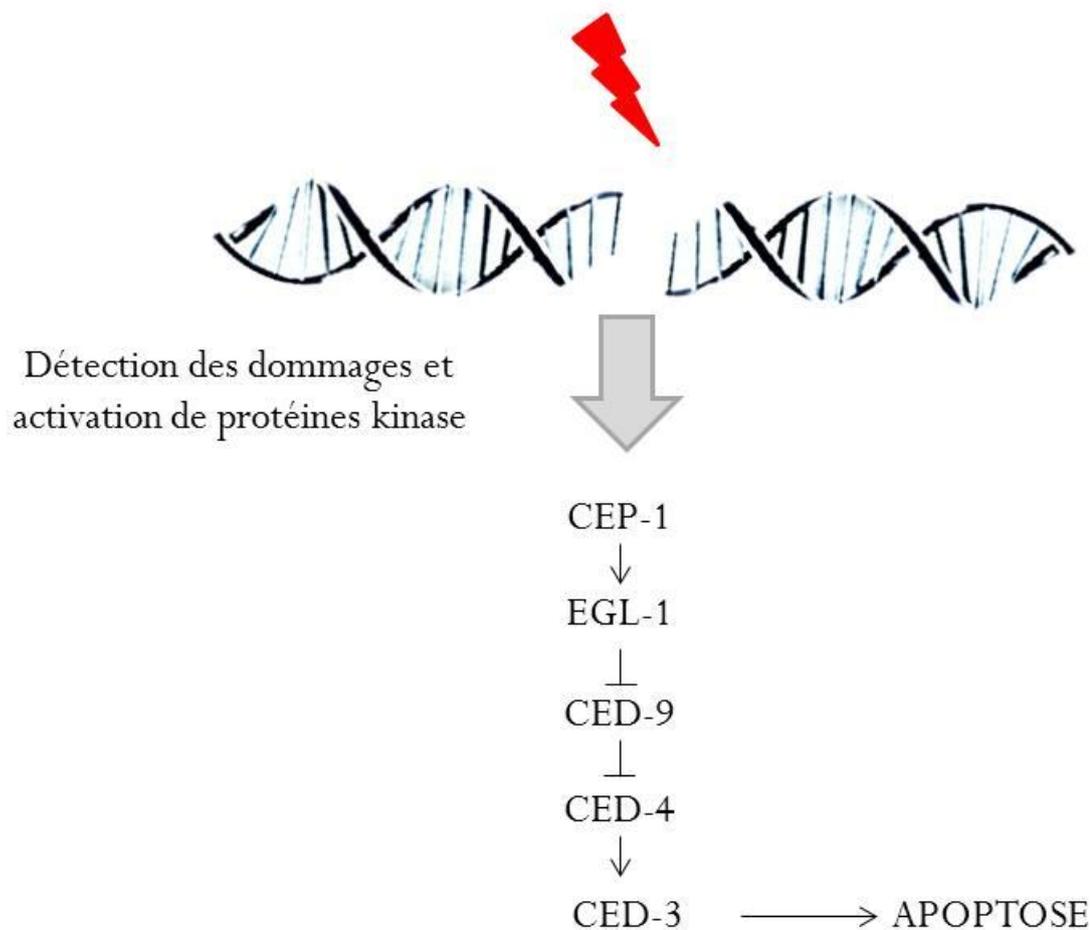


Figure 11. Schéma récapitulatif des différentes protéines impliquées dans l'apoptose des cellules de la lignée germinale chez *C. elegans*, selon Craig et collaborateurs (2012).

3.1.3. Arrêt du cycle cellulaire

Un autre impact lié aux dommages de l'ADN après exposition à l'irradiation des cellules de la lignée germinale est l'arrêt du cycle cellulaire. Après irradiation, les cellules en arrêt de cycle cellulaire peuvent être facilement reconnaissables car elles apparaissent plus grandes que les cellules non-irradiées. L'élargissement cellulaire se produit lorsque les cellules arrêtent de proliférer tout en continuant de grandir. Suite à une irradiation, l'arrêt du cycle cellulaire intervient principalement en phase G2, comme le montrent les marquages réalisés sur la phosphorylation d'un résidu de tyrosine de la protéine CDK-1 (Bailly et Gartner, 2011; Craig et al., 2012). Cette protéine kinase est nécessaire à la progression du cycle cellulaire à travers la phase M et est inactive si le résidu de tyrosine est phosphorylé (Boxem et al., 1999; van der Voet et al., 2009).

Cette inactivation est dépendante du gène *chk-1* qui est activé en réponse à des dommages à l'ADN et empêche l'entrée de la cellule en mitose par inhibition de la machinerie du cycle cellulaire (Kalogeropoulos et al., 2004).

3.2. Etude des effets de l'irradiation sur les traits d'histoire de vie

Peu d'études se sont intéressées aux effets individuels des rayonnements ionisants sur *C. elegans*. Les données décrites dans cette partie sont extraites d'études destinées à caractériser les mécanismes de réponse à un stress génotoxique (irradiation aiguë). Les informations regroupées peuvent être classées selon (i) les effets sur la survie, (ii) les effets sur la reproduction, (iii) les effets sur la croissance.

3.2.1. Survie des individus

Des données sont disponibles concernant la survie des embryons et des larves (au stade L1). Ces données montrent que les stades précoces de développement, tel que l'embryon, sont plus sensibles que les stades tardifs, comme le stade L1. En effet, à une dose de 25 Gy seuls 10% des embryons survivent, tandis qu'il faut atteindre 900 Gy pour obtenir le même effet en irradiant des larves au stade L1 (Hartman et Herman, 1982).

3.2.2. Reproduction

D'autres expériences ont été conduites sur la survie de larves issues de parents irradiés. Classiquement, une dose de 60 Gy délivrée à des individus au stade L4 conduit à la mort de 40 à 50% de la progéniture et une dose de 120 Gy à la mort d'environ 60% de la progéniture (Bailly et Gartner, 2011; Bailly et al., 2010; Craig et al., 2012; Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005). Comme démontré par les travaux de Bailly et collaborateurs, les nématodes exposés au stade L1 à des doses supérieures à 90 Gy deviennent stériles et la viabilité de la descendance est réduite (Bailly et Gartner, 2011; Bailly et al., 2010). Il est important de noter que la sensibilité des gamètes à l'irradiation aiguë est dépendante de leur stade de développement et va directement influencer la survie de l'embryon. En effet, lorsque l'irradiation s'effectue sur des cellules en fin de diacinese ou lors de l'embryogenèse précoce, la survie des embryons est

sévèrement impactée dès 40 Gy. Cependant, si ces embryons proviennent de cellules irradiées au stade pachytène, la survie ne diminue pas de plus de 5%, y compris pour une dose de 100 Gy (Takanami et al., 2000). Un autre paramètre de reproduction affecté par l'irradiation est le taux de ponte, à savoir le nombre d'œufs pondus sur une heure. En effet, celui-ci diminue chez les individus exposés dès 30 Gy (Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005).

3.2.3. Croissance

A notre connaissance, une seule étude relate les effets d'une irradiation aiguë chez *C. elegans*. Comme le montrent Lee et collaborateurs, une diminution du taux de croissance est observée lorsque les individus sont exposés à 10 et 20 Gy au stade L1 (Lee et al., 2004).

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

Dans cette partie sont présentés les conditions de culture de l'élevage de nématode, l'irradiation dans un contexte général, les différents tests et mesures réalisées et les tests statistiques, chapitres communs à l'ensemble des expérimentations. Le dispositif d'irradiation, spécifique à chaque expérience, sera présenté par la suite pour chaque expérience présentée dans la partie résultats et discussion.

4. Maintenance et condition de culture de *Caenorhabditis elegans*

La souche testée dans les différentes études menées dans le cadre de ce projet est la souche de type sauvage N2, souche de référence en laboratoire et communément utilisée pour les études en écotoxicologie (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2004; Dhawan et al., 2000; Monteiro et al., 2014; Ritu Dhawan, 1999; Ura et al., 2002; Williams et Dusenbery, 1990). Cette souche est fournie par le *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), basé à l'Université du Minnesota (Missouri, Etats-Unis).

4.1. Conditions de culture

La population d'élevage ainsi que les individus utilisés lors d'expérimentation, sont maintenus sur des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé spécifique aux nématodes, le Nematode Growth Medium (NGM) (Brenner, 1974). La composition du NGM qui a été utilisée est présentée en Annexe A. La présence de cholestérol dans ce milieu s'explique par l'incapacité du nématode à produire cette molécule pourtant indispensable à son développement (Kessin et al., 1996). L'utilisation du milieu gélosé a été choisie afin de permettre la mesure quotidienne des traits d'histoire de vie mesurés dans ce projet de recherche. D'autres milieux sont couramment utilisés pour étudier *C. elegans*, tels que les milieux aqueux (recommandée pour l'étude d'un très grand nombre d'individus) ou constitués de sols naturels ou artificiels. Ces milieux ne permettent cependant pas une observation rapide de certains traits d'histoire de vie. Par exemple, les mesures de croissance sont rendues difficiles par l'opacité du milieu ou par la position du nématode dans le plan (qui est un problème fréquent lors de l'utilisation de milieux aqueux). L'utilisation d'un milieu gélosé permet une observation rapide et un suivi quotidien de certains critères d'effet, tels que la croissance ou la reproduction.

Pour éviter toute contamination du milieu gélosé par des champignons ou d'autres bactéries indésirables, le dépôt du NGM dans les boîtes de Petri et dans les puits est réalisé sous hotte à flux laminaire avec du matériel stérile. Lorsque le NGM est solidifié, un tapis bactérien, source nutritive de *C. elegans*, est déposé à la surface. Les bactéries utilisées dans le cadre de ces travaux de recherche sont des *Escherichia coli* de la souche OP50 (non pathogène). Cette souche a la particularité d'être auxotrophe à l'uracile, ce qui limite le développement du tapis bactérien sur

le NGM et de ce fait, facilite les observations (Brenner, 1974). La veille de l'ensemencement des boîtes, une culture de *E. coli* est réalisée à partir d'une seule colonie isolée (Stiernagle, 2006; Sutphin et Kaeberlein, 2009). Pour ce faire, la culture est réalisée dans un bouillon lysogène (lysogeny broth, ou LB) placé dans un incubateur avec agitation pendant au minimum 12 heures (37°C, 120 rpm). Le lendemain, la densité optique de la culture bactérienne est mesurée par spectrophotomètre ($DO_{600} = 3$). La culture bactérienne est ensuite centrifugée à 3500 g durant 10 minutes et le surnageant (LB) est retiré. Dans le cadre de nos expérimentations, les bactéries sont remises en suspension dans un volume de NaCl à 5g/L de manière à les concentrer cinq fois.

Les bactéries concentrées sont ensuite déposées sur le NGM contenu dans les boîtes de Petri à raison de 75 μ L ou 250 μ L pour les boîtes de Petri 3 cm et 6 cm respectivement. Afin d'éviter une croissance inégale des bactéries entre les différentes conditions et expériences, entraînant ainsi une différence de quantité de nourriture, les bactéries sont tuées en exposant les boîtes aux ultraviolets pendant 20 minutes (Bio-Link Crosslinker, $\lambda = 254$ nm; intensité = 200 μ watt m^{-2}). Les boîtes et les plaques sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

La Figure 12 illustre les différentes étapes présentées ci-dessus avec comme exemple la préparation de boîtes de Petri.

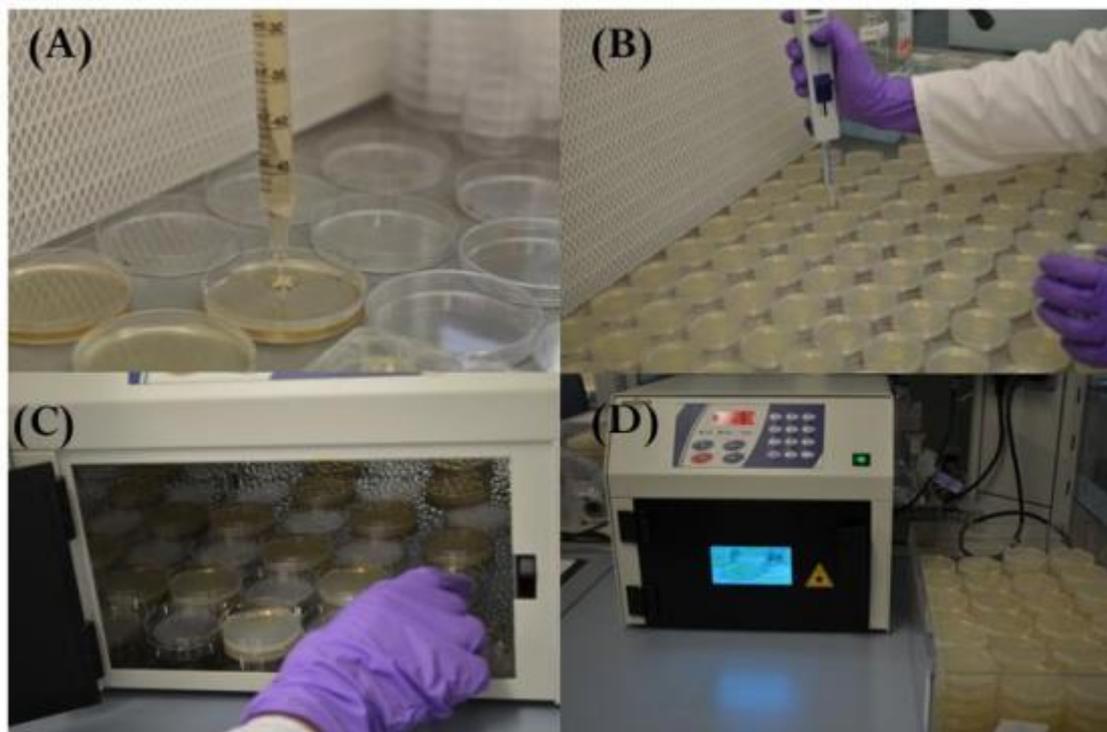


Figure 12. Présentation des différentes étapes de préparation des boîtes de Petri avec le dépôt du NGM (A), le dépôt des bactéries (B) et leur inactivation par UV (C,D). © J-M Bonzom/IRSN

4.2. Transferts et synchronisation des individus

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour transférer et synchroniser les nématodes sur les boîtes (Stiernagle, 2006). Lors des différentes expérimentations qui ont été menées pendant ces travaux de recherche, deux méthodes ont été utilisées : le repiquage, utilisé pour le transfert et la synchronisation des individus et le « bleaching », nécessaire lors de la synchronisation de population.

4.2.1. Repiquage

Le repiquage est réalisé à l'aide d'un fil de platine monté sur une pipette Pasteur. Avant chaque repiquage, ce fil est stérilisé à la flamme pour éviter toute contamination lors du transfert. Cette technique présente de nombreux avantages, notamment celui de pouvoir transférer des nématodes individuellement. Cependant, cette technique demande de la pratique

et est peu rapide. Elle n'est donc pas applicable lorsqu'un grand nombre d'individus doit être transféré.

Pour maintenir la population du laboratoire dans des conditions de nourriture *ad libitum*, un repiquage sur une nouvelle boîte de Petri est effectué tous les trois jours. Cette méthode de transfert a également été utilisée pour synchroniser les individus avant ou pendant une expérimentation. Pour ce faire, des adultes gravides sont déposés dans une boîte de Petri et laissés à pondre pendant une heure avant d'être retirés. Les embryons obtenus au bout d'une heure sont considérés synchronisés et peuvent être déposés dans de nouvelles boîtes de Petri.

4.2.2. « Bleaching »

Le bleaching est une méthode utilisant une solution alcaline d'hypochlorite de sodium à 10%. Cette méthode permet de récupérer les œufs d'une population tout en tuant les larves et les adultes et est couramment employée pour synchroniser une population ou pour éliminer une contamination (Hart, 2006; Porta-de-la-Riva et al., 2011; Shaham, 2006). Le protocole utilisé a été adapté de celui du Wormbook (Stiernagle, 2006) et est présenté en Annexe B. Afin de limiter la perte de nématodes, qui adhèrent aux parois en plastique, toutes les étapes sont réalisées avec du matériel en verre. L'avantage d'utiliser cette technique par rapport à la précédente est d'obtenir un très grand nombre d'individus synchronisés au stade œuf. Cependant, il est important de noter que les œufs récupérés par cette méthode présentent 10 à 12h de décalage sur leur stade de développement à 20°C (contre une heure pour le repiquage).

5. Irradiation

Comme décrit dans le chapitre 1 de l'état des connaissances (1. Les rayonnements ionisants), une exposition externe est l'action des rayonnements ionisants émis par des sources situées à l'extérieur de l'organisme. Lorsque cette exposition est sans contact avec la source radioactive, c'est une irradiation. La dose totale (ou cumulée) exprimée en Gray (Gy) reçue par les organismes est fonction du débit de dose et du temps d'exposition des individus. Le débit de dose (Gy/unité de temps) est calculé selon l'élément radioactif, l'activité de la source radioactive et de la distance des individus par rapport à celle-ci. La détermination et la vérification de ces débits de dose avant et pendant une expérimentation sont réalisées à l'aide de la dosimétrie.

5.1. Dosimétrie

5.1.1. Estimation des débits de dose

Les données de la littérature fournissent pour chaque élément radioactif un débit de dose calculé à un mètre d'une source radioactive ayant une activité de 1 Bq (Delacroix et al., 2012). Par exemple, pour 1 Bq de césium 137 (élément radioactif utilisé lors de cette thèse), le débit de dose à un mètre de la source est de $9,2 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{Gy}/\text{h}$. Le débit de dose à un mètre, spécifique de l'activité de la source et du radioélément, est fourni par la formule suivante :

$$D_1 = A * \Gamma$$

Avec A : activité de la source ;

Γ : débit de dose à un mètre (en mGy/h) pour une activité de 1 Bq

Ce débit de dose (en mGy/h) va par la suite permettre de calculer soit à quelle distance positionner les unités expérimentales en fonction des débits de dose souhaités, soit quels débits de dose peuvent être attendus pour une distance donnée, selon la formule suivante :

$${}^{\circ}D1 = {}^{\circ}D2 * d2^2$$

Avec ${}^{\circ}D1$: débit de dose calculé selon l'activité de la source à une distance de 1m ;

${}^{\circ}D2$: débit de dose souhaité ou débit de dose obtenu pour une distance $d2$ souhaitée ;

$d2$: distance à la source nécessaire pour obtenir ${}^{\circ}D2$ ou distance souhaitée

Ces calculs ne prennent cependant pas en compte le transport et les interactions des particules chargées ou neutres dans la matière. Aussi, pour apporter plus de précisions sur les débits de dose en considérant l'atténuation des rayonnements ionisants par les unités expérimentales (boîtes de Petri en plastique) et le milieu (NGM), une simulation numérique utilisant le code MCNP (Monte-Carlo d'interaction rayonnement-matière) a été utilisée. Cette simulation, lorsqu'elle était possible, a été réalisée par Nicolas Dubourg (responsable technique à l'IRSN/GARM). Le schéma du dispositif expérimental ainsi que les informations concernant la source utilisée (activité, débit de dose à 30 cm) sont tout d'abord implémentés dans le logiciel. Trois phases sont ensuite définies dans les unités expérimentales (boîtes de Petri) : l'air, le NGM, et le centre d'intérêt dans l'air qui correspond à la position du nématode à la surface du NGM. C'est sur ce centre d'intérêt que les débits de dose ont été calculés par simulation numérique pour chaque unité expérimentale, en prenant en compte l'atténuation des rayonnements émis par le plastique de la boîte de Petri, la composition et l'épaisseur du NGM.

5.1.2. Vérification des débits de dose et validation de la simulation numérique

Les débits de dose théoriques ont été mesurés à l'aide de dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL, d'une hauteur de 12 mm pour un diamètre de 1,5 mm) placés au centre des boîtes de Petri, sur le NGM. Ces dosimètres sont composés d'un verre phosphaté composé d'ions argent (Ag^+) (Figure 13), qui, lorsqu'ils sont exposés à un rayonnement ionisant, vont se transformer en Ag^0 et Ag^{++} . Ce sont ces ions qui vont former les centres de luminescence du verre. Lors de la lecture, une excitation du verre par rayonnement UV est réalisée. Les centres de luminescence vont alors émettre une fluorescence orangée ; phénomène appelé « radiophotoluminescence » ; qui est proportionnelle à la dose de radioactivité. Les dosimètres

RPL présentent de nombreux avantages, comme une bonne reproductibilité de la valeur de lecture, une stabilité à long terme et une meilleure linéarité de dose. De plus, ils sont spécifiques des rayonnements X et gamma (Hsu et al., 2006; Ranogajec-Komor et al., 2008). Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'un lecteur DOSE-ACE FGDS-1000 (Chiyoda technol corporation; limite de détection de 1 μ Gy à 10 Gy (avec une reproductibilité de 5% pour des doses inférieures à 100 μ Gy et une reproductibilité de 2% pour des doses supérieures à 1 mGy). Pour la calibration de l'appareil, un dosimètre standard irradié à une dose connue de rayons gamma (6 mGy à l'aide d'une source de césium 137) a été utilisé.

Lorsqu'une simulation numérique est effectuée, le modèle est validé expérimentalement avant d'exposer les organismes. Pour ce faire, une exposition aux rayonnements gamma est réalisée dans les conditions expérimentales en plaçant un dosimètre sur le NGM à la place des nématodes.



Figure 13. Photo de dosimètres RPL utilisés lors des différentes expérimentations de ce projet de recherche. © N Dubourg/IRSN

6. Etude des traits d'histoire de vie

6.1. Croissance

La croissance des individus est suivie quotidiennement, depuis l'éclosion jusqu'à la fin de la croissance. Pour ce faire, les organismes ont été photographiés à l'aide d'un stéréo microscope (appareil photo couplé à une loupe binoculaire, ZEISS SteREO Discovery V20) à différents grossissements en fonction de leur stade de vie : x 240 pour les larves et x 160 pour les adultes. Les photographies ont été prises deux fois par jour aux premiers stades larvaires puis une fois par jour à partir du stade L4 jusqu'à maturité.

Par la suite, les photographies ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ® et d'une tablette graphique (l'échelle étant préalablement déterminée aux différents grossissements à l'aide d'une lame micrométrique). L'utilisation de la tablette graphique permet une mesure plus précise de la taille des individus (Figure 14).

6.2. Reproduction

Au cours des différents travaux menés dans cette thèse, le nombre cumulé de larves et le nombre d'embryons non éclos par nématode ont été comptés. Pour ce faire, dès leur début de ponte, les individus ont été transférés quotidiennement dans de nouvelles boîtes de Petri (avec du NGM et des bactéries). Les boîtes de Petri contenant les œufs ont été placées dans l'incubateur témoin à 20°C pendant au minimum douze heures. Ceci permet aux larves d'éclore. Le lendemain, le nombre de larves et d'œufs non éclos a été compté. Cinq transferts par nématode ont été effectués afin de couvrir l'intégralité de la ponte.

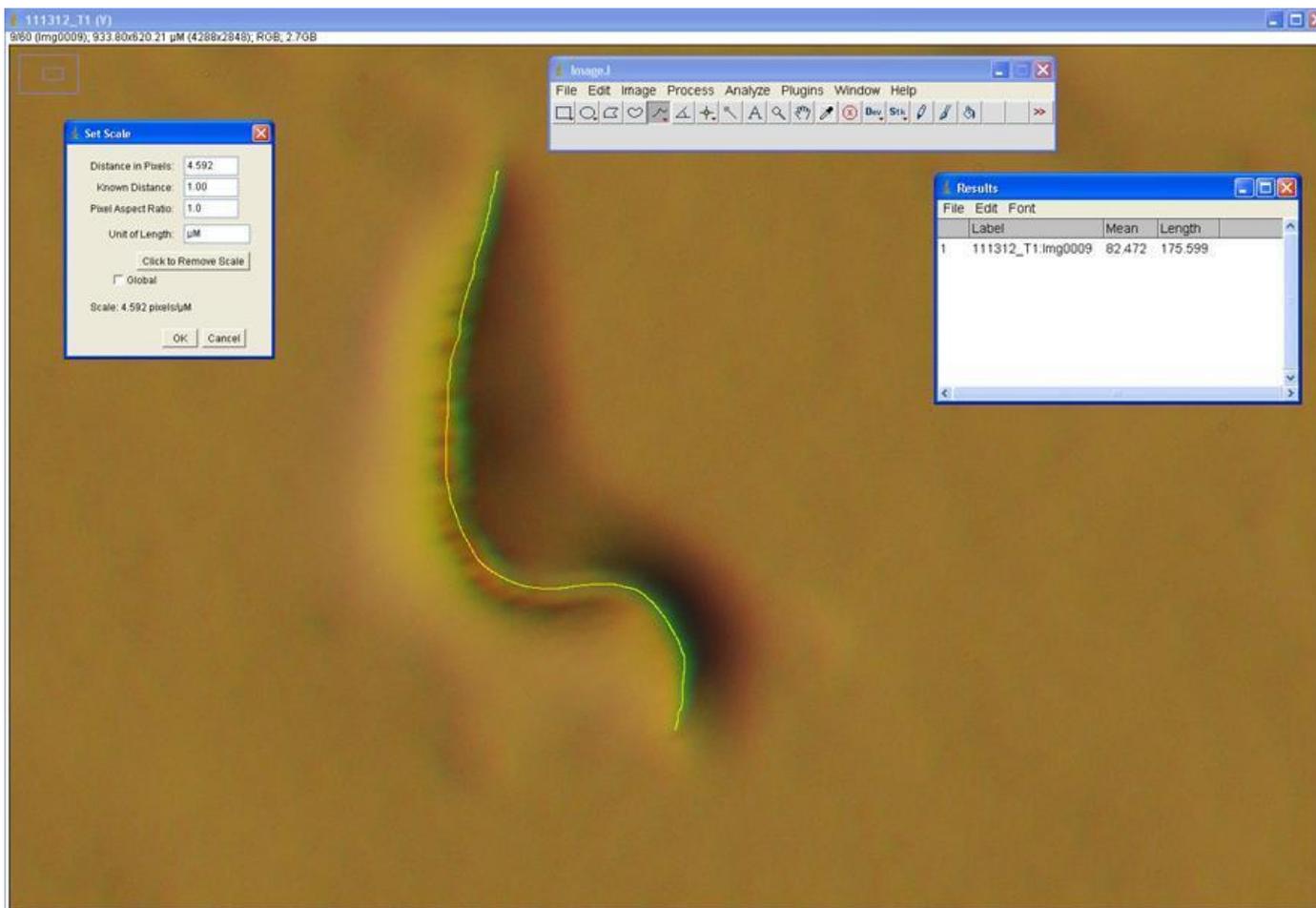


Figure 14. Exemple de mesure d'une larve L1 avec le logiciel ImageJ®. Le trait jaune est tracé à l'aide d'un stylo sur la tablette graphique, de la tête jusqu'à la queue du nématode. Le nombre de pixel par μm (selon le grossissement) a été préalablement rentré (Set Scale) et permet de mesurer la taille de l'individu en μm (Results).

7. Tests moléculaires et cellulaires

Les tests moléculaires et cellulaires ont été réalisés sur des nématodes au stade jeune adulte, soit environ 65 heures après la synchronisation et le début de l'irradiation. Les individus ont été récupérés et traités immédiatement après l'arrêt de l'irradiation. La Figure 15 ci-dessous présente un schéma récapitulatif des différentes cellules de la lignée germinale d'un bras de gonade de *C. elegans* (hermaphrodite), de la zone mitotique à la production d'embryons (Craig et al., 2012). Les zones entourées en rouge correspondent à la partie de la gonade et aux cellules associées qui ont été étudiées dans ce projet.

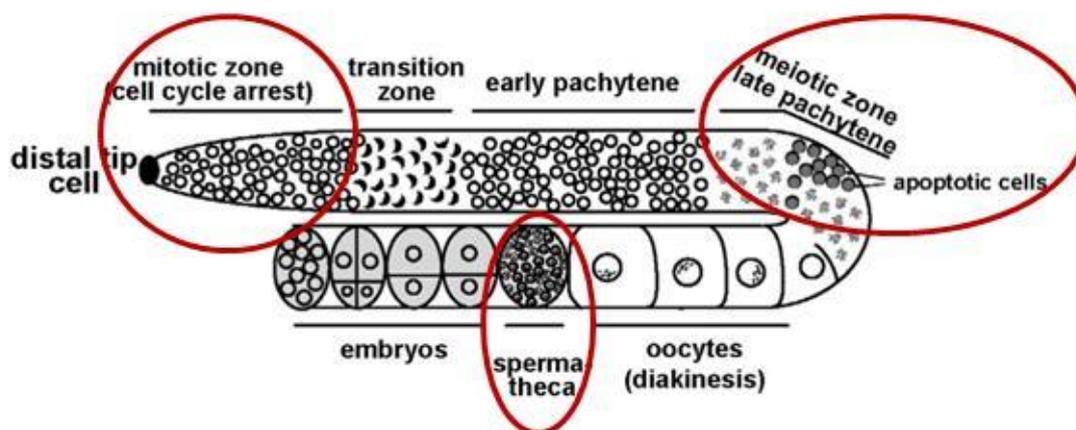


Figure 15. Représentation schématique d'un bras de la gonade de *C. elegans* avec les différentes cellules de la lignée germinale (Craig et al., 2012). Les cellules en mitose vont passer par une phase de transition avant d'entamer les différents stades de la prophase I de méiose pour former des oocytes matures, prêts à être fécondés en passant par la spermathèque. Entourées de rouge : zones de la gonade et cellules germinales associées où les différents tests ont été réalisés.

7.1. Arrêt du cycle cellulaire (zone mitotique) et étude de la spermathèque

Les cellules mitotiques en arrêt du cycle cellulaire, le nombre de cellules mitotiques et le nombre de spermatozoïdes ont été étudiés par observation au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI des cellules de la lignée germinale (sur gonades isolées).

7.1.1. Dissection de *C. elegans*

Dans un premier temps, les lames de microscopie (lames SuperFrost®, VWR) ont été recouvertes d'une couche de polylysine (0,1% (p/v) dans l'eau), qui permet l'adhérence des gonades sur la lame. 8 µL d'une solution de levamisole à 0,2 mM (Sigma-Aldrich) sont ensuite déposés au centre de la lame. Le levamisole immobilise les nématodes et faciliter ainsi leur dissection. Dix individus pour chaque condition ont été prélevés et déposés dans le levamisole. Ils sont rapidement coupés sous le pharynx et près de l'anus à l'aide d'une aiguille hypodermique de 0,5 mm de diamètre dans le but d'extruder les bras des gonades. Une étape de fixation des gonades est effectuée, en mélangeant 8 µL d'une solution de paraformaldehyde à 2% (PFA 38%, Sigma-Aldrich) à la solution de levamisole. Une lamelle est placée de biais sur la lame et les gonades sont incubées dans la solution de fixation pendant cinq minutes. Cette étape de fixation permet de préserver les tissus en l'état en inhibant la dégradation des éléments cellulaires. La lame est ensuite plongée dans de l'azote liquide pendant dix minutes. Au bout de ce laps de temps, la lame est retirée et la lamelle enlevée d'un coup sec. Cette étape est appelée le « freeze-cracking » et est un moyen simple et rapide pour enlever des parties de la cuticule du nématode, facilitant le marquage. Celui-ci est couramment utilisé en immunohistochimie pour faciliter le passage des anticorps (Miller et Shakes, 1995; Spector et al., 1998; Strome et Wood, 1982).

A partir de cette étape, les lames peuvent être stockées tel quel à -80°C jusqu'au marquage et à la lecture au microscope à épifluorescence. Dans le cadre de ces travaux, trois lames de dix individus ont été effectués pour chaque condition dans le but d'obtenir un minimum de sept gonades pouvant être observées (gonades intactes).

7.1.2. Marquage et lecture des lames

Le jour de l'observation des échantillons, les lames sont décongelées, puis une goutte de mounting-medium (milieu de montage) est déposée en leur milieu. Cette solution permet de stabiliser et des préserver les échantillons sur la lame, mais également d'obtenir une bonne qualité d'image au microscope. Pour ces travaux, le milieu de montage utilisé est enrichi avec du DAPI (Fluoroshield™ with DAPI, Sigma-Aldrich), molécule fluorescente capable de se lier

fortement aux bases azotées de l'ADN. Le DAPI est excité à 360 nm et va émettre une fluorescence bleue (à 460 nm). Pour éviter la déshydratation de l'échantillon, une lamelle a été déposée puis scellée par une couche de vernis. Les échantillons peuvent ainsi être gardés à 4°C pendant plusieurs mois.

Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope inversé motorisé à épifluorescence Axio Observer Z1 (Zeiss). L'objectif x100 a été utilisé pour étudier les cellules des différentes lignées germinales.

Seules les lignées germinales extrudées intactes ont été observées. Les anomalies du cycle cellulaire ont été étudiées sur les cellules mitotiques, présentes dans la partie distale de la lignée germinale. A la suite d'un stress génotoxique, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est généralement observé. Les cellules arrêtent de se diviser mais continuent de croître. Elles sont donc moins nombreuses et possèdent un noyau plus volumineux, ce qui les rend facilement identifiable. Le comptage de ces cellules se fait dans les 50 µm suivant la Distal Tip Cell, reconnaissable à sa forme de croissant de lune (Craig et al., 2012). Dans le cadre de cette thèse, les photos ont été prises par une caméra microscopique de haute résolution AxioCam MRm et analysées avec le logiciel ZEN. La Figure 16 présente une comparaison entre les cellules mitotiques normales et les cellules subissant un arrêt du cycle cellulaire après un impact génotoxique (ici après irradiation aiguë).

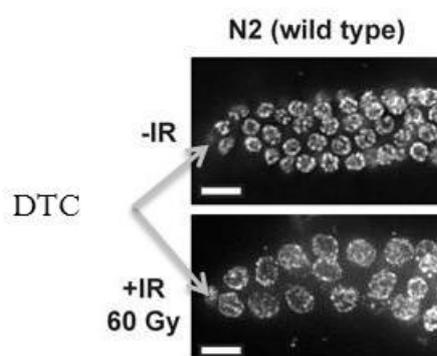


Figure 16. Comparaison des cellules mitotiques provenant de la lignée germinale d'individus témoins (-IR) et d'individus exposés à 60 Gy (+IR). Le marquage est effectué au DAPI après dissection des nématodes. L'échelle correspond à 10 µm (Bailly et al., 2010).

Le nombre de spermatozoïdes de dix lignées germinales par condition a également été compté. Comme le montre la Figure 17, la spermathèque est facilement repérable dans la partie proximale de la gonade. Chaque point contenu dans la spermathèque correspond à un spermatozoïde.

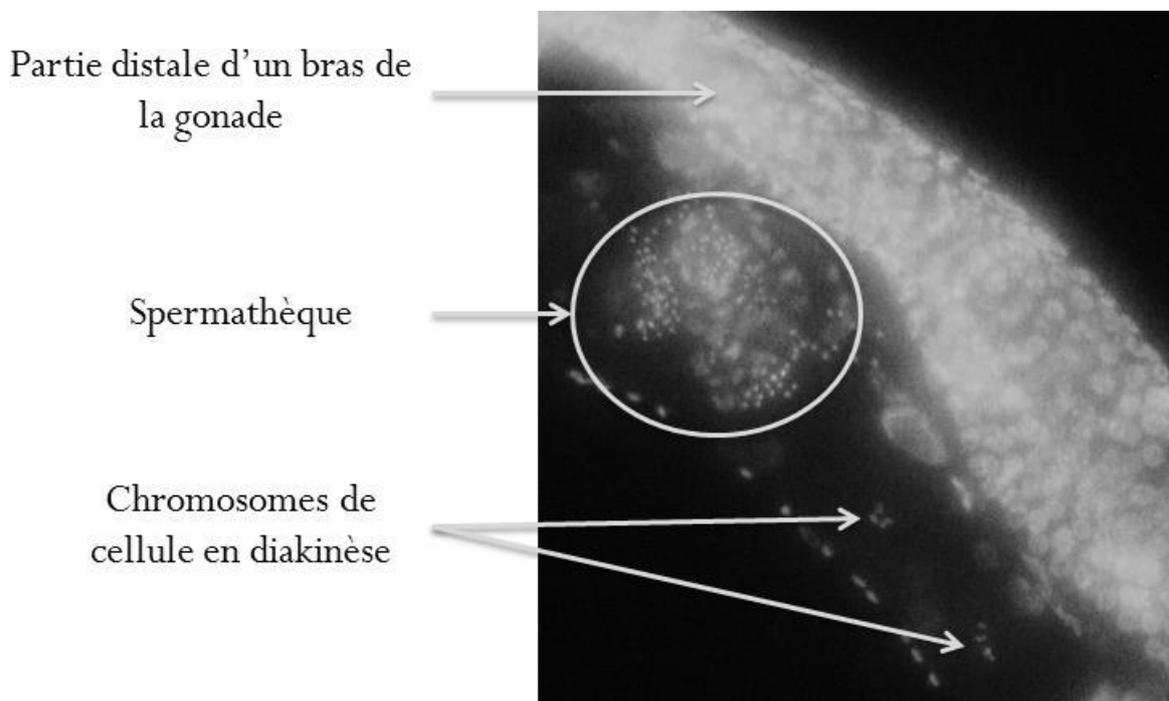


Figure 17. Photo prise au microscope à épifluorescence (objectif x40) montrant la localisation de la spermathèque et des spermatozoïdes dans la partie proximale de la gonade de *C. elegans*. Les points visibles dans la spermathèque correspondent aux spermatozoïdes.

7.2. Etude de l'expression du gène *egl-1* par RT-qPCR (stade pachytène tardif)

Lors de ces travaux de thèse, l'apoptose a été suivie en mesurant le niveau d'expression du gène *egl-1* suite à une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez *C. elegans*. Comme décrit dans le paragraphe 3.1.2, ce gène code pour une protéine qui fonctionne comme un activateur en amont de la voie générale de l'apoptose suite à un stress génotoxique (Conradt et Horvitz, 1998; Gartner et al., 2004; Schumacher et al., 2004). La Figure 18 ci-dessous présente un récapitulatif des différentes protéines intervenant dans le déclenchement de l'apoptose suite à des dommages à l'ADN. Les différents mécanismes ont été détaillés dans le paragraphe 3.1.

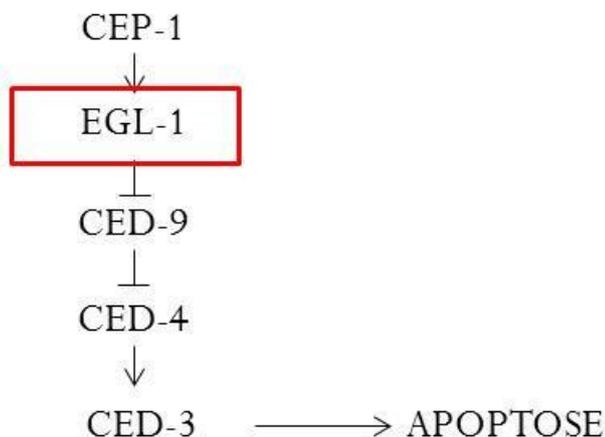


Figure 18. Schéma récapitulatif des protéines déclenchant l'apoptose radio-induite.

Le niveau d'expression transcriptionnelle du gène *egl-1* a été déterminé par PCR (polymerase chain reaction) quantitative après rétro-transcription (RT-qPCR), présentée ci-dessous.

7.2.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux issus d'un pool de 300 individus ont été extraits de la manière suivante : à la fin de l'irradiation, chaque boîte de Petri est lavée avec du milieu M9 pour récolter les nématodes. Trois lavages successifs par centrifugation sont effectués pour éliminer les bactéries et ne garder que les nématodes. Ceux-ci sont ensuite placés dans un tube eppendorf 1,5 mL contenant du *RNAlater* (Sigma Aldrich) puis stockés à -20°C jusqu'à extraction des ARN totaux. Le *RNAlater* stabilise et protège les ARN des échantillons en inactivant les RNases et permet de les conserver plusieurs mois à -20°C . L'extraction des ARN totaux est réalisée en plusieurs étapes. La première consiste à lyser les cellules afin de libérer dans le milieu tous les composants cellulaires. Pour ce faire, les échantillons sont décongelés et le *RNAlater* est remplacé par 0,5 mL de TRIzol® (life technologies). Plusieurs étapes de congélation/décongélation à -80°C vont permettre d'éclater les cellules et d'augmenter le rendement d'extraction. Des billes de zircon/silice (0,5 mm de diamètre, BioSpec Products) sont ajoutées jusqu'à remplir les 2/3 du tube et les eppendorfs sont agités pendant quatre minutes.

La deuxième étape permet de séparer l'ARN des protéines. 200 μL de chloroforme sont ajoutés dans les tubes eppendorfs. Après centrifugation du mélange à 12000g pendant 15

minutes à 4°C, l'échantillon est séparé en trois phases : une phase inférieure rose hydrophobe (phénol/chloroforme), une phase intermédiaire blanche contenant les protéines et une phase supérieure aqueuse contenant l'ARN. Cette dernière phase est prélevée et placée dans un nouveau tube eppendorf (1,5 mL) et un volume équivalent d'éthanol à 70% y est ajouté pour faire précipiter l'ARN et pour le rincer (une partie des sels va se trouver en solution dans les 30% d'eau).

Ceci permet d'optimiser l'étape suivante qui est la purification de l'ARN. Cette purification est réalisée à l'aide du kit Qiagen RNeasy Plus Mini Kit® en suivant le protocole donné par le fournisseur. Il est possible par la suite de stocker les échantillons d'ARN totaux à -80°C, cependant, dans le cadre de ces travaux, la rétro-transcription a été effectuée à la suite de l'extraction, les ADNc étant plus stables que les ARN.

7.2.2. Dosage de l'ARN et rétro-transcription (RT)

Le dosage de l'ARN a été effectué avec un spectrophotomètre Nanodrop 2000c® (Thermo Scientific). 2 µL d'eau RNase-free sont déposés sur la plateforme de mesure afin de réaliser le blanc. Un volume de 2 µL pour chaque échantillon est ensuite déposé sur la plateforme pour être dosé. La concentration d'ARN en ng/µL est donnée directement par le spectrophotomètre, ainsi que le degré de pureté de l'ARN. Celui-ci est calculé à partir du rapport A260/A280 (absorbance des acides nucléiques/absorbance des protéines) dont la valeur optimale est de 2.

Le processus de rétro-transcription a été réalisé par la suite à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription® (Qiagen). Cette étape permet de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN à l'aide d'une ADN polymérase ARN-dépendante (ou reverse transcriptase). Toute trace d'ADN génomique pouvant interférer dans l'étape d'amplification par PCR est tout d'abord éliminée. Pour ce faire, 12 µL d'une solution contenant 300 ng d'ARN totaux et de l'eau RNase-free (les volumes sont obtenus en fonction de la quantité d'ARN dosé par le Nanodrop®) est préparée. Un volume de 2 µL de gDNA Wipeout Buffer (tampon fourni par le kit) est ensuite rajouté et l'échantillon est incubé à 42°C pendant deux minutes (ce qui permet la linéarisation de l'ARN), avant d'être placé sur de la glace. La solution de rétro-transcription est préparée sur de la glace, en mélangeant 1 µL de

solution contenant la reverse transcriptase avec 4 μL de tampon comprenant les dNTPS et 1 μL d'hexaprimers (les différentes solutions étant fournies par le kit). Cette solution est ajoutée aux 14 μL préparés précédemment et l'ensemble est incubé pendant 15 minutes à 42°C pour permettre l'hybridation des amorces et la synthèse des brins d'ADNc. La reverse transcriptase est ensuite désactivée en plaçant l'échantillon à 95°C pendant trois minutes. Après cette étape, les échantillons sont stockés à -20°C en attendant l'étape de PCR quantitative en temps réel.

7.2.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été analysés par PCR quantitative en temps réel (real-time qPCR). Le principe de cette technique repose sur celui de la PCR dite conventionnelle, qui permet d'amplifier spécifiquement une région d'intérêt de l'ADN (ou d'un gène) afin d'en obtenir une quantité suffisante à étudier, à l'aide d'une enzyme polymérase thermostable, la Taq polymérase. Cette enzyme est placée en présence des ADNc (obtenus par rétro-transcription), des amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt et de dNTPs. Ce mélange réactionnel va subir différents cycles thermiques comprenant trois étapes : (i) une phase de dénaturation du double brin d'ADN à 95°C, (ii) une phase d'hybridation des amorces dont la température dépend de la température de fusion des amorces (comprise généralement entre 55°C et 65°C) et (iii) une phase d'élongation (synthèse du brin d'ADN complémentaire) à 72°C. Ce cycle de températures est répété 35 à 55 fois, en fonction de la quantité de copies du gène étudié présente dans l'échantillon. Dans le cas d'une PCR quantitative en temps réel, une sonde fluorescente (le SYBR® Green) est ajoutée au mélange réactionnel permettant de quantifier les amplifications du gène d'intérêt en temps réel. La particularité de cette sonde est de n'émettre de la fluorescence que si elle est intercalée entre les bases d'une séquence nucléotidique double-brin. Les appareils utilisés pour la qPCR (LightCycler®) sont équipés d'un spectrophotomètre mesurant la fluorescence à 530 nm émise par la sonde fluorescente à la fin de chaque phase d'élongation. L'intensité lumineuse est proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié, l'appareil est donc capable de suivre leur production en temps réel tout au long de la PCR. Le logiciel fourni avec l'appareil permet d'obtenir les courbes d'amplification issues de la qPCR en temps réel ainsi que les Ct (Cycle Threshold). Les Ct correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise dépasse le bruit de fond et puisse

être quantifiée (Figure 19). Moins il y aura d'ADNc dans l'échantillon, au plus le nombre de cycles nécessaires pour dépasser le bruit de fond sera important.

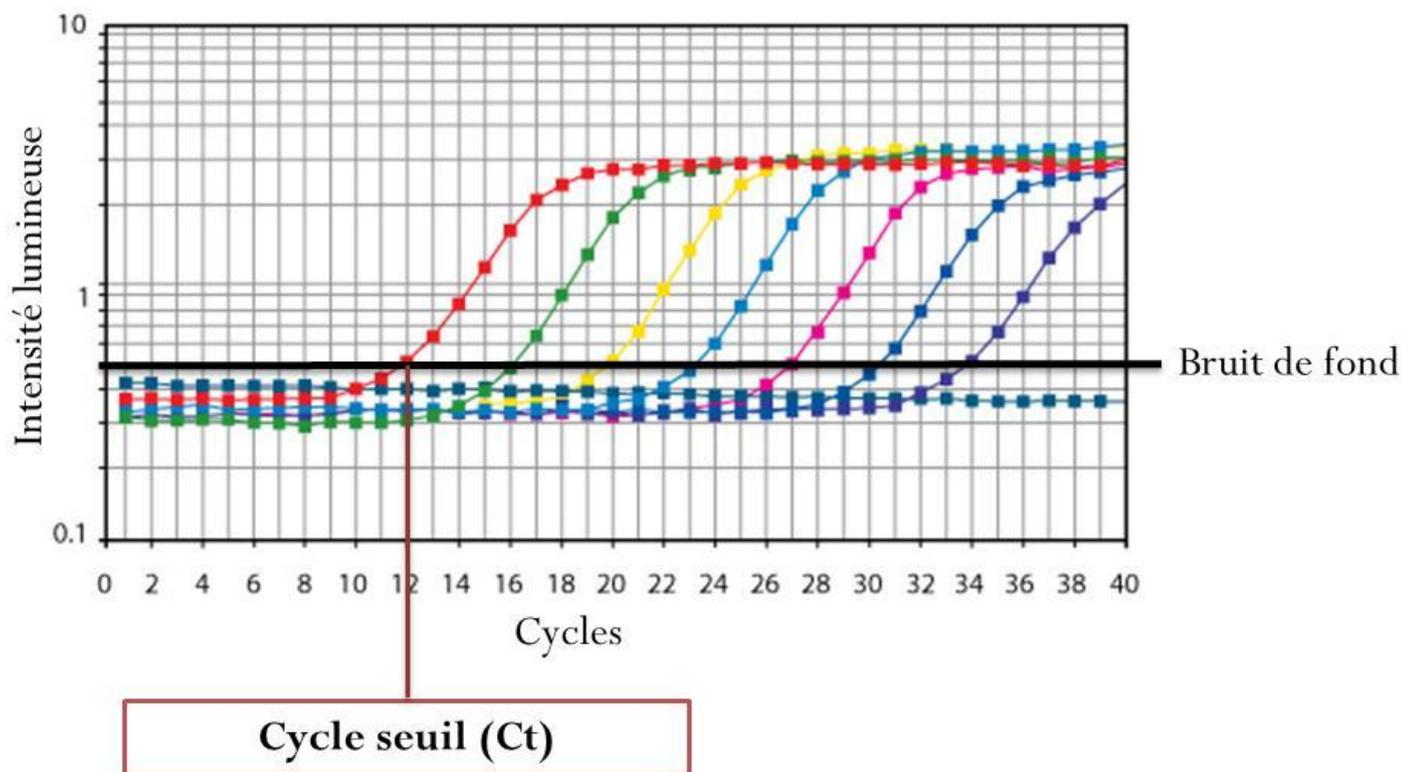


Figure 19. Exemple de courbes d'amplification obtenues par qPCR (selon Sigma-Aldrich). Le bruit de fond est représenté par le trait noir. L'intersection de ce trait avec les différentes courbes d'amplification donne différents Ct. Ici seul un exemple est présenté sur la première courbe.

Une autre spécificité de la PCR quantitative en temps réel est l'utilisation d'un gène dit de référence. Celui-ci possède un niveau d'expression stable dans toutes les cellules de l'organisme, quelles que soient les conditions d'exposition testées. L'utilisation de ce gène permet la quantification relative du gène d'intérêt en évitant les biais liés à des variations de quantité d'ARN entre les échantillons (dues à l'échantillonnage ou à la manipulation des échantillons). Dans le cadre de ces travaux de recherche, les amplifications en qPCR ont été réalisées à l'aide d'un LightCycler® 480 (Roche) en plaque 96 puits. Pour chaque échantillon, des triplicats de mesure du gène de référence (*tbg-1*, qui code pour la tubuline gamma) et du gène d'intérêt (*egl-1*) ont été effectués. Le mélange réactionnel est préparé de manière à déposer dans chaque puits 12,5 µL de SYBR® Green (Mesa Green, Eurogentec), 0,75 µL d'amorce sens, 0,75 µL d'amorce anti-sens, 10,5 µL d'eau ultra-pure et 0,5 µL d'ADNc. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 2 ci-dessous. Les séquences et l'efficacité de ces amorces ont été déterminées au Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM de Montpellier) par Aymeric Bailly.

GENE	AMORCE SENS	AMORCE ANTISENS
<i>tbg-1</i>	5' AAGATCTATTGTTCTACCAGGC 3'	3' CTTGAACTTCTTGTCCTTGAC 5'
<i>egl-1</i>	5' CCTCAACCTCTTCGGATCTT 3'	3' TGCTGATCTCAGAGTCATCAA 5'

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour les amplifications du gène de référence (*tbg-1*) et du gène d'intérêt (*egl-1*).

La plaque est filmée puis centrifugée pour mélanger tous les réactifs et faire tomber le mélange réactionnel au fond des puits avant d'être placée dans le LightCycler® 480. Les Ct donnés par le logiciel associé à l'appareil permettent de calculer l'expression relative du gène à tester par rapport au gène de référence pour les témoins et pour les individus exposés, selon la formule suivante :

$$2^{(Ct \text{ gène de référence} - Ct \text{ gène d'intérêt})}$$

8. Analyse des données

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.1) (R Development Core Team, 2013).

8.1. Modélisation

8.1.1. Données de reproduction

Les données de reproduction (ici le nombre cumulé de larves par individu) ont été utilisées pour établir une relation dose-réponse afin d'estimer les débits de dose d'effet pour lesquels une réduction de 10% et de 50% du nombre cumulé de larves est observée (DDE_{10} et DDE_{50}). La relation dose réponse a été modélisée à l'aide d'un modèle log-logistique à trois paramètres dont l'équation est la suivante :

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

Avec :

d : limite haute de la réponse

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

b : pente au point d'inflexion (paramètre « e »)

x : dose

y : réponse biologique

8.1.2. Données de croissance

Les données de croissance ont été modélisées par ajustement d'un modèle de Gompertz (Goussen et al., 2013) dont l'équation est la suivante :

$$L = L_{inf} \times \exp^{\ln(\frac{L_0}{L_{inf}}) \times \exp^{-at}}$$

Pour chaque individu, la modélisation fournit les estimations de trois paramètres de croissance qui sont la taille à l'éclosion L_0 , la taille maximale L_{inf} , et la constante relative au taux de croissance a (Figure 20).

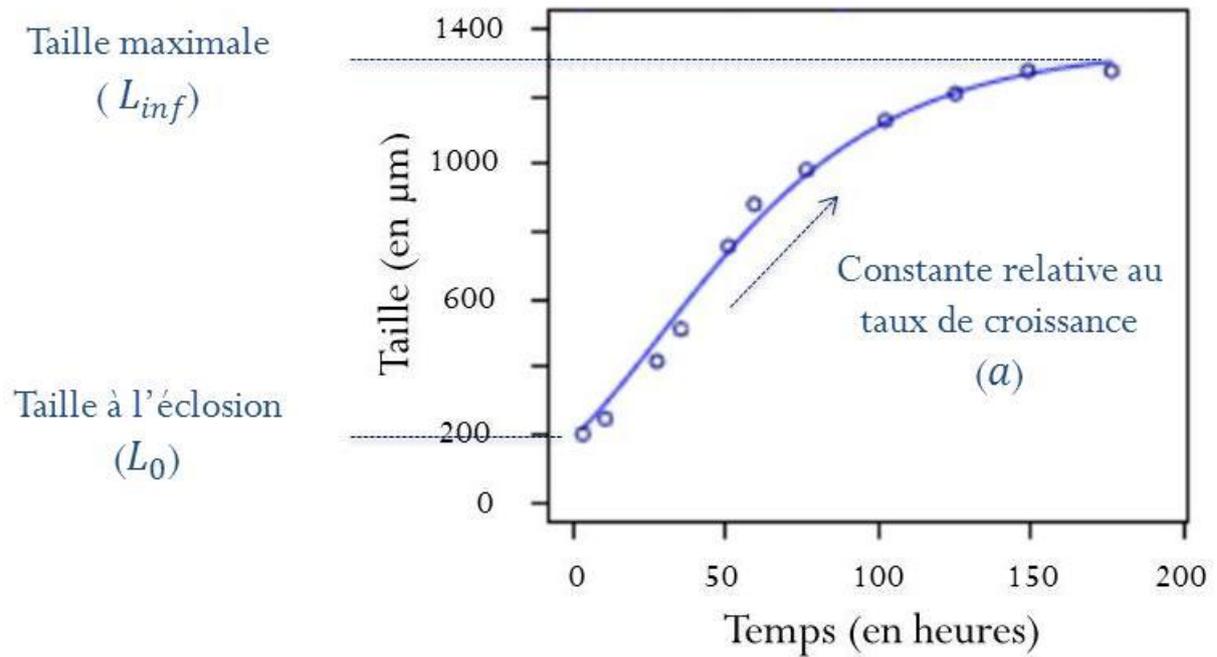


Figure 20. Exemple d'une courbe de croissance obtenue par modélisation selon l'équation de Gompertz. Les points représentent les données expérimentales, la courbe correspond au modèle de Gompertz ajusté sur les données expérimentales.

Ces estimations seront ensuite utilisées pour évaluer les effets du débit de dose et de la génération.

8.2. Traitements statistiques

8.2.1. Croissance et expression de gène

8.2.1.1. Croissance

Analyse de l'effet « débit de dose » au sein de chaque génération

L'effet de la variable « débit de dose » sur les paramètres estimés de croissance (taille à l'éclosion L_0 , taille maximale L_{inf} , et constante relative au taux de croissance a) a été étudié globalement au sein de chaque génération (variable fixée) par une ANOVA à un facteur. Si l'ANOVA est significative, alors il existe un effet global de la variable « débit de dose ». Afin de déterminer les différences significatives entre la moyenne du groupe témoin et la moyenne des autres groupes de traitement, un test post-hoc de Dunnett a été utilisé.

Analyse de l'effet « génération » pour un débit de dose

L'effet de la variable « génération » sur les paramètres estimés de croissance (taille à l'éclosion L_0 , taille maximale L_{inf} , et constante relative au taux de croissance a) a été étudié globalement pour un débit de dose (variable fixée) par une ANOVA à un facteur. Si l'ANOVA est significative, il existe un effet global de la variable « génération ». Afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes des différents groupes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé.

Les hypothèses de normalité des résidus pour les deux ANOVA ont été vérifiées visuellement à l'aide d'un graphique de type « quantile-quantile » et complétées à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les hypothèses d'homogénéité des résidus ont été évaluées visuellement par un graphique de type « valeurs prédites versus résidus standardisés » et à l'aide d'un test de Levene (Environnement-Canada, 2005). Concernant les données de croissance, ces deux hypothèses étaient satisfaites.

8.2.1.2. Expression de gène

La même méthodologie a été employée pour l'analyse de l'effet du débit de dose et de la génération sur le niveau d'expression du gène étudié. Néanmoins, les hypothèses de normalité et d'homogénéité des résidus n'étant pas satisfaites, une transformation de BoxCox a été appliquée (Box et Cox, 1964) avant de réaliser les ANOVA à un facteur.

8.2.2. Reproduction

8.2.2.1. Nombre cumulé de larves par individu

Analyse de l'effet « débit de dose » au sein de chaque génération

L'effet de la variable « débit de dose » sur le nombre cumulé de larves par individu a été étudié globalement au sein de chaque génération (variable fixée) à l'aide de modèles linéaires généralisés avec une distribution « Poisson ». La présence d'une éventuelle sur-dispersion a été évaluée par le ratio de la déviance résiduelle sur le nombre de degrés de liberté. Si ce ratio est supérieur à 1, une sur-dispersion est mise en évidence et est prise en considération en employant une distribution « quasi-Poisson ». Comme pour les paramètres estimés de croissance, si l'effet global est significatif, un test post-hoc de Dunnett a été réalisé.

Analyse de l'effet « génération » pour un débit de dose

L'effet de la variable « génération » sur le nombre cumulé de larves par individu a été étudié globalement pour un débit de dose (variable fixée) à l'aide de modèles linéaires généralisés avec une distribution « Poisson ». La présence d'une éventuelle sur-dispersion a été évaluée par le ratio de la déviance résiduelle sur le nombre de degrés de liberté. Si ce ratio est supérieur à 1, une sur-dispersion est mise en évidence et est prise en considération en employant une distribution « quasi-Poisson ». Comme pour les paramètres estimés de croissance, si l'effet global est significatif, un test post-hoc de Tukey a été réalisé.

8.2.2.1. Comptage des spermatozoïdes et des cellules en mitose

La même méthodologie a été employée pour l'analyse de l'effet du débit de dose d'une part et de la génération d'autre part sur le nombre de spermatozoïdes et le nombre de cellules en mitose.

La Figure 21 présente un récapitulatif de la stratégie statistique utilisée dans ces travaux de doctorat pour étudier l'évolution des données (croissance, expression de gène, reproduction, comptage des cellules mitotiques et des spermatozoïdes) en fonction des variables « débits de dose » ou « générations ».

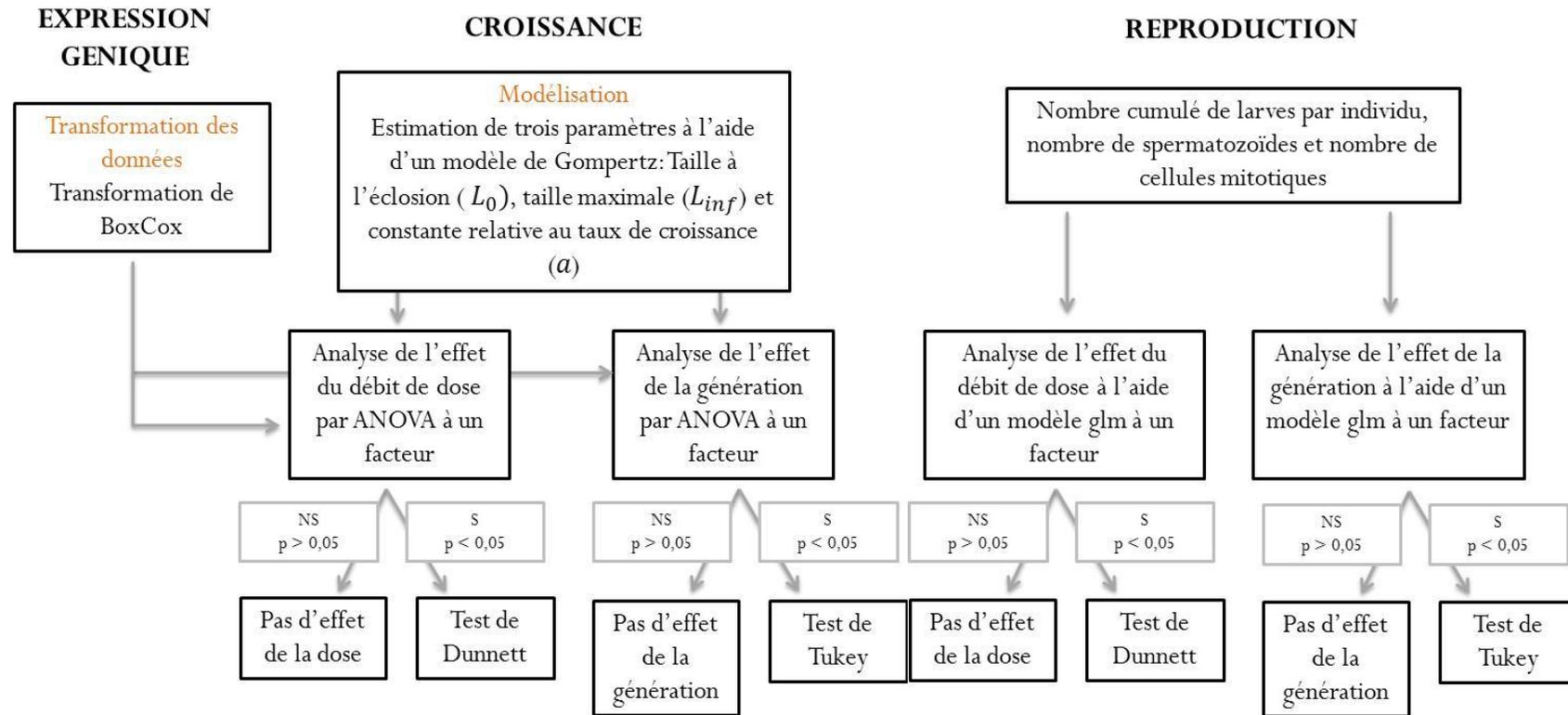


Figure 21. Schéma récapitulatif présentant la méthode statistique utilisée pour évaluer les différentes données obtenues dans le cadre de ce projet de recherche en fonction des débits de dose ou des générations. Avec NS : non significatif, S : significatif.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La partie Résultats et Discussion de ce manuscrit est composée de trois chapitres reprenant les principaux résultats obtenus dans ce projet de recherche. Une expérience préliminaire sur les effets phénotypiques d'une exposition externe sur une génération (Chapitre 9) ainsi que des étapes de mise au point du dispositif expérimental sur les irradiateurs de l'IRSN (Chapitre 10 et 11) ont été réalisées. Ces résultats complémentaires, ainsi que les étapes de mise au point sont présentés en annexe par soucis de clarté (Annexe C et D).

9. Conséquences phénotypiques d'une exposition externe aux rayonnements gamma sur une génération de *C. elegans*

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, peu de données sont disponibles concernant l'effet d'une exposition externe aux rayonnements gamma sur les traits d'histoire de vie des invertébrés terrestres, la majorité des études ayant été réalisées chez les plantes, les mammifères et les invertébrés aquatiques (Adam-Guillermin et al., 2012; Copplestone et al., 2008; Dallas et al., 2012; Real et al., 2004).

L'objectif de cette étude était de déterminer le seuil d'effet d'une irradiation chronique sur les traits d'histoire de vie de *C. elegans* à l'aide d'une courbe dose-réponse (cf. Chapitre 8, Paragraphe 8.1.1).

9.1. Démarche expérimentale

9.1.1. Dispositif d'irradiation

Dans le but d'obtenir une courbe dose-réponse sur les traits d'histoire de vie de *C. elegans*, une large gamme de débits de dose a été testée. Ces débits dose ont été obtenus à l'aide d'un dispositif d'irradiation situé sur le Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire (SCK-CEN, Belgique). En effet, celui-ci est capable de délivrer de fortes doses de rayonnements gamma à l'aide d'une source de césium 137 d'une activité de 1,17 TBq.

L'irradiateur se présente sous la forme d'une pièce, ou chambre d'irradiation, climatisée à une température de 22°C et fermée par deux portes blindées. Au centre de cette pièce se trouve un tube en métal qui va contenir la source radioactive lors de l'irradiation. Cette source est enterrée en l'absence d'irradiation, ce qui permet d'accéder à la chambre d'irradiation pour placer les dispositifs expérimentaux. Ceux-ci sont disposés autour de la source à des distances qui sont fonction des débits de dose souhaités (cf. paragraphe 5.1.1) Au moment de l'irradiation, les portes blindées sont fermées et la source est propulsée dans le tube en métal. La

Figure 22 présente le tube en métal contenant la source ainsi qu'une vue d'ensemble de la chambre d'irradiation avec différents dispositifs expérimentaux.

Une étude préliminaire a mis en évidence une absence d'effet sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*, pour une gamme de débits de dose comprise entre 0,01 mGy/h et 42,7 mGy/h (Annexe C). Il a donc été décidé de tester des débits de dose plus élevés. C'est ainsi une gamme de 9 débits de dose (40, 53, 71, 94, 126, 168, 224, 300 et 400 mGy/h), répartis selon une dilution géométrique (facteur de dilution : 0,75), qui a été testée.

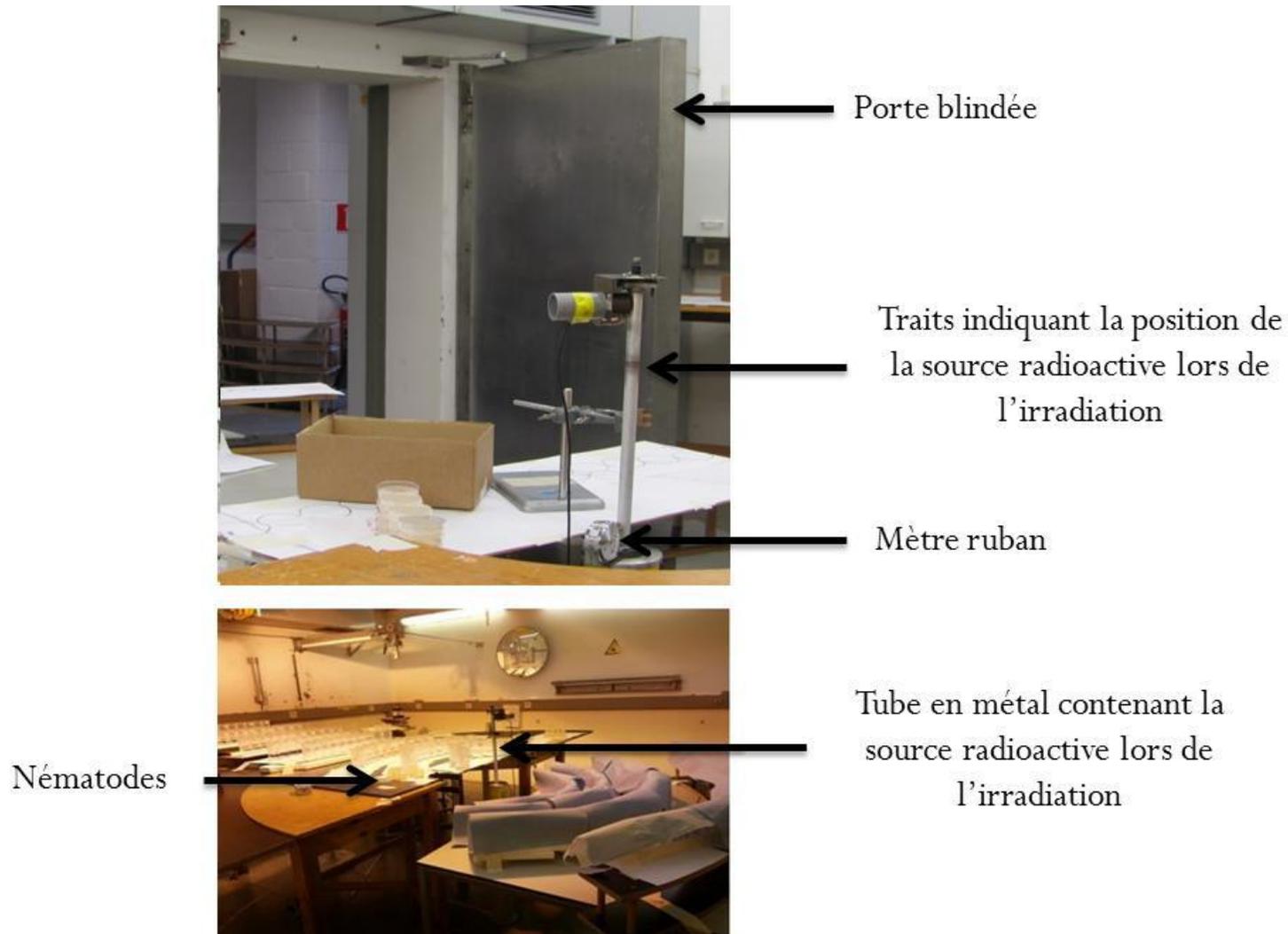


Figure 22. Présentation de la chambre d'irradiation, avec en haut un gros plan sur le dispositif en métal contenant la source lors d'une irradiation et en bas une vue d'ensemble avec différents dispositifs expérimentaux (lentille d'eau sur la gauche, nématodes au milieu et daphnies sur la droite).

9.1.2. Design expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour chaque débit de dose et pour les témoins est présenté ci-dessous (Figure 23). Quelle que soit la condition, 10 unités expérimentales (correspondant au nombre de réplicats : boîtes de Petri contenant chacune un nématode) ont été placées sous une boîte opaque (appelée plus loin boîte noire) afin de limiter les apports de lumière. Une boîte de Petri remplie d'eau saturée en NaCl est également disposée en dessous pour maintenir un taux d'humidité constant, proche de 80%, et suffisant pour éviter le dessèchement du NGM. Un data logger est placé sous le dispositif expérimental (boîte noire) et enregistre toutes les trente minutes les différents paramètres (température, luminosité, humidité). La chambre d'irradiation étant à 22°C, toute l'expérimentation a été réalisée à cette température.

Les débits de dose pour chaque condition ont été vérifiés à l'aide de dosimètres RPL, placés dans les mêmes conditions que les individus.

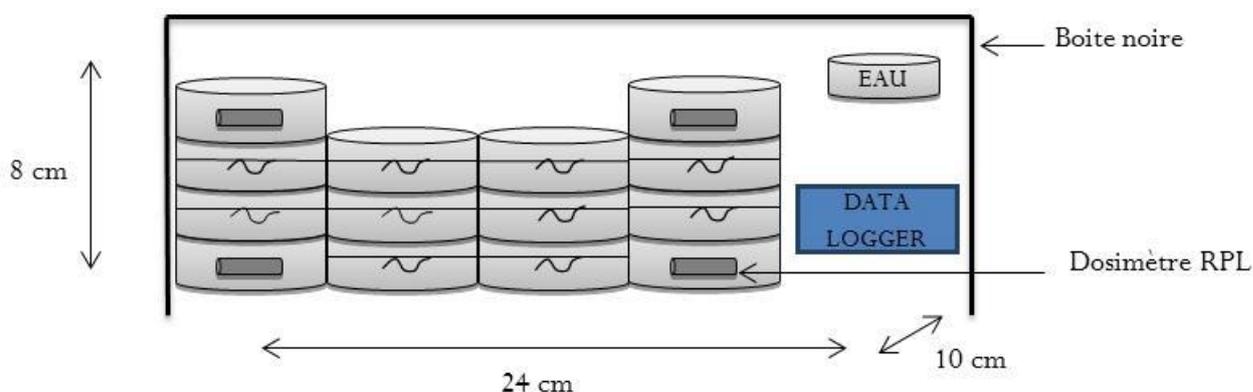


Figure 23. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour chaque condition. Les boîtes de Petri sont disposées sous une boîte en plastique opaque afin de maintenir l'obscurité. Le pourcentage d'humidité relative, la luminosité et la température) sont contrôlés par un data logger. Afin de mesurer précisément le débit de dose, les dosimètres ont été placés de manière à encadrer les différentes unités expérimentales.

Pour réaliser des mesures individuelles de croissance et de reproduction comparables entre les conditions, les individus doivent être synchronisés selon la méthode de repiquage présentée en 4.2.1. Trois œufs sont déposés aléatoirement dans chaque boîte de Pétri (unité expérimentale), qui sont ensuite placées soit dans la pièce d'irradiation, soit dans un incubateur contrôle. Après

éclosion les larves surnuméraires sont retirées afin de ne laisser qu'un individu par boîte de Pétri.

L'exposition a duré neuf jours afin d'obtenir la taille maximale et le nombre total de larves pour chaque nématode, en prenant en compte les éventuels retard de croissance ou de ponte qui pourraient apparaître pour les plus forts débits de dose.

9.2. Résultats

9.2.1. Dosimétrie

Comme le montre le Tableau 3 ci-dessous, une variabilité a été observée entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés (de 8% à la dose théorique de 40 mGy/h à 21% à la dose théorique de 53 mGy/h). Les débits de dose qui seront utilisés dans la suite des résultats sont les débits de dose mesurés par les dosimètres RPL.

Débits de dose théoriques (en mGy/h)	Débits de dose mesurés (en mGy/h)	Erreur relative
40	37,2 ± 0,3	8%
53	43,9 ± 3,2	21%
71	64,8 ± 2,6	10%
94	85 ± 3,4	11%
126	113,3 ± 4,3	11%
168	146,6 ± 9,6	15%
224	201,2 ± 14,1	11%
300	251,7 ± 26,7	19%
400	336,1 ± 26,1	19%

Tableau 3. Débits de dose théoriques (calculés en fonction de la distance par rapport à la source) et débits de dose mesurés par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne ± écart-type). L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés.

9.2.2. Paramètres de croissance

Le modèle de Gompertz utilisé dans cette expérimentation a fourni un ajustement pertinent sur les données individuelles de croissance. En effet, les valeurs de R^2 données par le modèle étaient égales ou supérieures à 0,9 quels que soient les individus. De plus, les paramètres estimés par le modèle étaient cohérents avec les données observées et les données de la littérature, avec une taille à l'éclosion de 192 μm environ et une taille maximale aux alentours de 1400 μm (Byerly et al., 1976; Goussen et al., 2013; Jager et al., 2005).

Aucune différence significative n'a été trouvée entre le témoin et les différents débits de dose testés pour ce qui est de la taille à l'éclosion (L_0) et de la taille maximale (L_{inf}) (Figure 24 (A) et (B)). Cependant, une différence significative a été observée sur la constante relative au taux de croissance entre le témoin et les doses 201,2 mGy/h (p-value du test post-hoc de Dunnett $< 0,001$) et 251,7 mGy/h (p-value du test post-hoc de Dunnett $< 0,05$). Les individus exposés à ces débits de dose ont une croissance significativement plus rapide que les témoins (Figure 24 (C)).

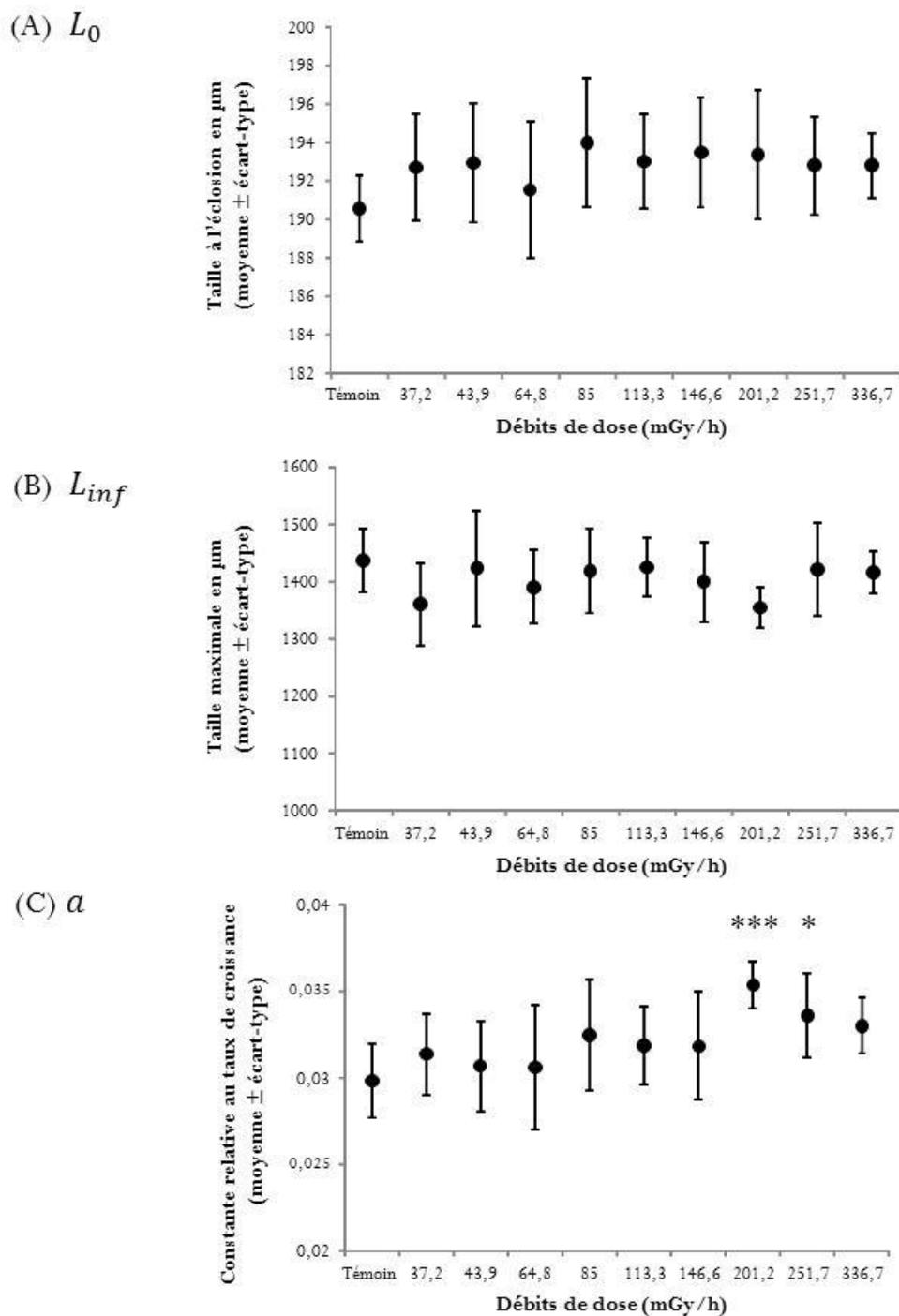


Figure 24. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$. L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle (* p -value $< 0,05$; *** p -value $< 0,001$).

9.2.3. Paramètres de reproduction

Quels que soient les débits de dose, 98% des embryons pondus par les nématodes ont éclos. Les observations menées sur la reproduction des nématodes ont pu mettre en évidence une diminution du nombre cumulé de larves par individu dès 64,8 mGy/h (p-value du test *post-hoc* de Dunnett <0,05). Le nombre cumulé de larves chez les témoins était de $245,7 \pm 19,5$ et varie de $188,2 \pm 55,6$ (à 37,2 mGy/h) à $54,6 \pm 26,9$ au plus fort débit de dose (336,7 mGy/h) (Figure 25 (A)).

La relation dose-réponse obtenue à partir des données de reproduction a permis d'estimer une valeur de DDE_{10} à $11,37 \pm 4,70$ mGy/h et une valeur de DDE_{50} à $87,04 \pm 13,62$ mGy/h (Figure 25 (B)).

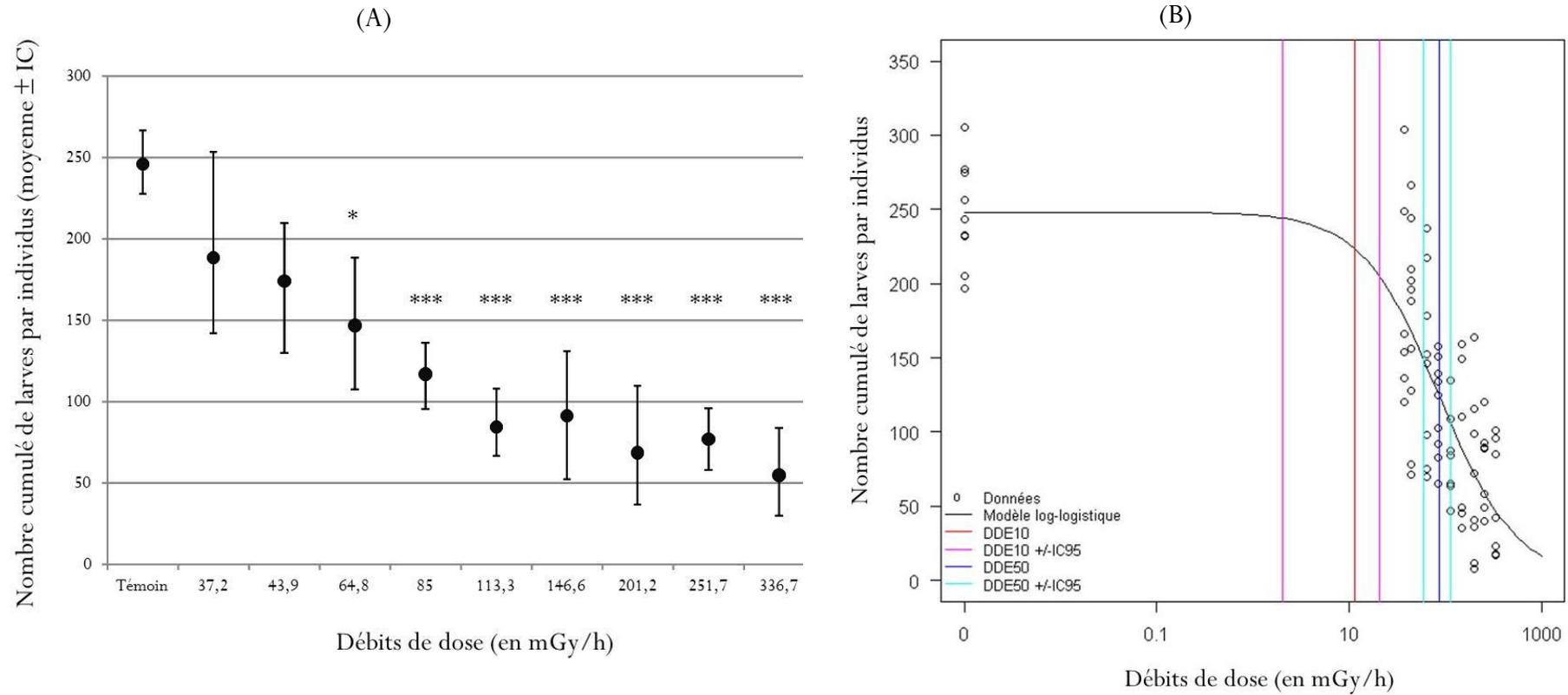


Figure 25. (A) Nombre cumulé de larves en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$. L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle (* p -value < 0,05 ; *** p -value < 0,001). (B) Courbe dose-réponse de l'effet sur la reproduction (ici le nombre cumulé de larves par individu) en fonction des débits de dose (en mGy/h). Avec en rouge la valeur estimée du DDE_{10} (intervalle de confiance à 95% représenté en rose) et en bleu la valeur estimée du DDE_{50} (intervalle de confiance à 95% représenté en turquoise).

9.3. Discussion

Dans l'état actuel des connaissances, ces travaux sont les premiers à s'intéresser aux effets d'une irradiation gamma externe chronique sur les traits d'histoire de vie (croissance et reproduction) du nématode *C. elegans*.

9.3.1. Croissance

Aucune différence significative de la taille à l'éclosion et de la taille maximale n'a en effet été mise en évidence entre le témoin et les différents débits de dose testés. Seule une augmentation significative de la constante relative au taux de croissance a été observée entre le témoin et les doses 201,2 mGy/h et 251,7 mGy/h. Ceci pourrait s'expliquer par un problème expérimental lié à la température rencontré pendant les premiers stades de vie de l'expérimentation. En effet, les data loggers utilisés durant l'expérimentation ont permis de mettre en évidence une augmentation de la température de 1 à 1,5°C pour ces deux conditions (201,2 mGy/h et 251,7 mGy/h) par rapport aux autres durant le premier jour d'exposition. Or, comme démontré par Byerly dès 1976, une augmentation de la température se traduit par une augmentation du taux de croissance sans affecter la taille à l'éclosion et la taille maximale (Byerly et al., 1976), ce qui est également retrouvé dans nos données.

Cette absence d'effet sur les paramètres de croissance est comparable aux données de la littérature sur les effets d'une irradiation chronique externe gamma chez la daphnie. En effet, Gilbin et collaborateurs (2008) ont montré qu'une exposition de *Daphnia magna* à du césium 137 à des débits de dose compris entre 0,4 et 31 mGy/h pendant 23 jours n'avait aucun effet sur la croissance. De la même manière, une exposition chronique (à une source externe de cobalt 60) d'un invertébré terrestre, le ver du fumier *Eisenia fetida*, n'a induit aucun effet significatif sur le poids des vers, et ce quels que soient les débits de dose testés (dans une gamme de débits de dose comprise entre 0,19 et 43 mGy/h) (Hertel-Aas et al., 2007).

9.3.2. Reproduction

L'utilisation d'une courbe dose-réponse est une démarche courante en écotoxicologie pour quantifier les effets d'une substance. Dans notre étude, le débit de dose induisant 10% d'effet (DDE_{10}) sur la reproduction a été estimé à 11,4 mGy/h, alors que le débit de dose le plus élevé pour lequel aucune différence significative n'a été observée (NOEDR) est de 43,9 mGy/h. Il faut donc considérer ses valeurs avec précaution. L'estimation de la NOEDR dépend du plan expérimental et notamment du nombre de conditions testées et de réplicats utilisés. En effet, des tests réalisés avec un nombre insuffisant d'individus associé à des intervalles de concentrations trop élevés peuvent conduire à des valeurs sans effet surestimées (Isnard et al., 2001; Warne et van Dam, 2008). Le DDE_{10} estimé dans le cadre de notre étude est également discutable. En effet, la précision de l'estimation des DDE_x diminue dans la zone d'effets « faibles » et la valeur estimée induisant 50% est considérée comme plus précise (Isnard et al., 2001). De plus, le DDE_{10} estimé dans notre étude est situé dans une zone pour laquelle aucun point expérimental n'a été réalisé. Des expérimentations complémentaires pourraient être réalisées, avec des débits de dose plus rapprochés dans la zone encadrant la NOEDR et le DDE_{10} , dans le but d'améliorer la détermination de ces deux valeurs.

Les données obtenues ont montré que la reproduction de *C. elegans*, et plus particulièrement le nombre cumulé de larves par individu, était significativement diminuée par rapport au témoin dès 64,8 mGy/h. Des effets similaires sur la reproduction ont été observés chez d'autres invertébrés, mais à des débits de dose plus faibles. En effet, l'étude menée sur une génération de *Daphnia magna* a montré une diminution de la taille de ponte chez les individus exposés au plus fort débit de dose (31 mGy/h) (Gilbin et al., 2008). Cet effet a aussi été retrouvé chez un annélide marin (néreïs) chez qui une diminution du nombre de sacs d'œufs, d'œufs et de larves a été observée à la suite d'une exposition chronique à 7,3 mGy/h et à 13,7 mGy/h. Cette même étude suggère que le taux d'éclosion était affecté sans pour autant mettre en évidence de différences significatives (Knowles et Greenwood, 1994, 1997). Chez les invertébrés terrestres, tel qu'*Eisenia fetida*, des effets similaires sur la reproduction ont été trouvés, avec une diminution significative du taux d'éclosion des cocons (de 61% par rapport aux témoins) produits par les vers irradiés à 43 mGy/h pendant les quatre premières semaines

d'exposition. Une aggravation de cet effet a été observée pendant les huit semaines suivantes, puisqu'aucun cocon n'a éclos à ce débit de dose et que les individus exposés dès 11 mGy/h étaient également impactés. Enfin, les débits de dose effectifs induisant 10% et 50% d'effet sur la fécondité de trois organismes marins ont été estimés à 1,73 et 9,12 mGy/h chez le ver aquatique *Ophryotrocha diadema* ; 9,55 et 18,19 mGy/h chez le polychète *Neanthes arenaceodentata* ; 54,95 et 74,13 mGy/h chez le mollusque *Physa heterostropha* (Lance et al., 2012). Ces valeurs (sauf pour le DDE_{10} de *Physa heterostropha*) sont inférieures aux valeurs de DDE_{10} (11,37 mGy/h) et de DDE_{50} (87,04 mGy/h) estimées dans notre étude pour *C. elegans*.

La différence du seuil d'apparition des effets entre nos données et celles de la littérature souligne la faible radiosensitivité de *C. elegans*. Un certain nombre d'études montre que la radiosensibilité des organismes est plus forte dans les stades précoces de développement. En effet, chez le copépode marin *Paracyclopsina nana*, la dose induisant 50% de mortalité est plus élevée pour les adultes (172 Gy à 96 h) que pour les stades précoces (œufs) (110 Gy à 48h) (Eun-Ji Won et Jae-Seong Lee, 2014). De la même manière, les stades de développement du coléoptère *Dermestes maculatus* et du papillon *Pseudozizeeria maha* sont plus sensibles que les adultes. Les œufs du coléoptère sont plus sensibles que les autres stades de développement (Seal et Tilton, 1986 ; Hiyama et al., 2013). Ces résultats sont également retrouvés chez le nématode *C. elegans*. En effet, les données disponibles chez *C. elegans* sur la survie après irradiation aiguë montrent une diminution de 90% de la survie des embryons pour une dose de 25 Gy (Hartman et Herman, 1982). Une étude menée sur la survie des descendants a montré que l'exposition de nématodes au stade larvaire L1 à 90 Gy induisait une mortalité de 90% des embryons produits. Cette mortalité diminue lorsque les nématodes sont exposés à des stades plus tardifs. Lorsque les nématodes sont exposés au stade L4 à 120 Gy, le nombre d'embryons vivants est seulement diminué de 40% par rapport au témoin (Bailly et al., 2010). Or, lors d'une irradiation chronique, il est important de prendre en compte une des caractéristiques physiologiques de *C. elegans* qui est son cycle de vie court (trois jours contre neuf, par exemple, pour la daphnie). Les phases de développement, plus sensibles à l'action d'une irradiation, sont donc plus rapides ce qui pourrait expliquer pourquoi les effets sur la reproduction apparaissent à des débits de dose plus élevés que ceux des autres espèces étudiés. Les données de la littérature suggèrent d'utiliser la dose cumulée lors d'exposition chronique plutôt que le débit de dose, les temps

d'exposition entre les organismes étant différents (Hinton et al., 2012). La dose cumulée correspondant au débit de dose pour lequel un effet chez *C. elegans* est observée est de 14 Gy (64,8 mGy/h pendant neuf jours, soit 216 h) et les doses cumulées pour lesquelles des effets ont été observés dans la littérature sont comprises entre 11 Gy et 54 Gy (11 Gy pour la daphnie, 20 Gy pour le ver du fumier et 54 Gy pour la néréis). Une des particularités du nématode est que la ponte s'arrête 120 heures après éclosion (soit environ 130 h après la fertilisation) (Stiernagle, 2006). En conséquence, le laps de temps pendant lequel la reproduction pourrait être impactée est de 130 h. Dans notre étude, la dose cumulée correspondante est donc d'environ 8,4 Gy (64,8 mGy/h pendant 130 h), ce qui semble plus faible que celles reportées pour les autres espèces, qui ne possèdent pas ce facteur limitant.

9.4. Conclusion

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été montrée concernant la taille à l'éclosion et la taille maximale des individus exposés pour des débits de doses allant jusqu'à 337 mGy/h. Seul un effet sur le taux de croissance a été observé pour les débits de dose de 201 et 252 mGy/h. La croissance ne semble pas être un critère d'effet sensible aux rayonnements gamma. En revanche, une relation dose-réponse a pu être modélisée à partir des données de reproduction (ici le nombre cumulé de larves par individu). Celle-ci a mis en évidence une diminution significative de la capacité de ponte par rapport au témoin pour des individus exposés à un débit de dose supérieur ou égal à 64,8 mGy/h et a permis d'estimer une DDE_{10} de 11 mGy/h (valeur à prendre avec précaution) et une DDE_{50} de 87 mGy/h. La reproduction (et plus précisément le nombre cumulé de larves) est donc le critère d'effet le plus sensible lors d'une exposition à l'irradiation gamma.

10. Etude des effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants

Le chapitre 9 décrit les conséquences d'une exposition chronique à l'irradiation (rayonnements gamma) sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*. Cette première expérience a montré que la reproduction est le critère d'effet le plus sensible et a permis d'estimer un DDE_{10} de l'ordre de 11 mGy/h et de déterminer un débit de dose sans effet (NOEDR) de 43,9 mGy/h. Cependant, comme discuté précédemment, ces deux valeurs sont à prendre avec précaution, notamment par le manque de données expérimentales dans la zone des effets « faibles ». Il a donc été décidé dans cette expérience de balayer une gamme de débits de dose encadrant ces deux valeurs. Une étude multigénérationnelle a de plus été menée, car la durée d'exposition aux polluants dans le cadre d'une exposition chronique dépasse la longévité individuelle. Une aggravation des effets au cours des générations peut être observée comme cela a été montré dans d'autres études (Dallas et al., 2012; Dutilleul et al., 2013; Marshall, 1962, 1966; Muramatsu et al., 1964).

Les objectifs de cette étude étaient donc d'évaluer (i) si une augmentation de la radiosensibilité, c'est-à-dire une aggravation des effets observés sur la croissance et la reproduction, était observée entre les générations exposées, et (ii) si l'exposition de la génération parentale pouvait avoir un impact sur les descendants non exposés. Ce travail a fait l'objet d'une publication qui est présentée Annexe E.

10.1. Démarche expérimentale

10.1.1. Dispositif d'irradiation

L'irradiation externe gamma de plusieurs générations de nématodes *C. elegans* a été effectuée sur le site de Cadarache (IRSN) à l'aide d'une source de césium 137. L'irradiateur utilisé est constitué d'un incubateur thermo-régulé à 20°C, entouré par des protections en plomb (briques et tabliers) (Figure 26 (A)). Cet incubateur dispose en son centre d'un plateau métallique permettant d'accueillir les échantillons à irradier. La source radioactive de césium

137 (fournie par le CERCA-LEA, Framatome ANP, Pierrelatte, France), d'une activité de 1,55 GBq au moment de l'expérimentation, est placée au milieu de ce plateau. Elle se présente sous forme solide (paillettes de césium) et est encapsulée dans de l'inox. Un château de plomb amovible permet d'atténuer les rayonnements gamma et est baissé pour permettre les interventions. Lors d'une irradiation, celui-ci est relevé afin de découvrir la source radioactive (Figure 26 (B)).

Les unités expérimentales sont disposées autour de la source sur le plateau métallique. Différents débits de dose peuvent être utilisés en fonction de la distance des organismes par rapport à la source (estimations données selon le modèle MCNP). Les débits de dose estimés varient de 2,1 mGy/h à 42,7 mGy/h au plus près de la source. Ainsi cette gamme de débits de dose permet d'encadrer les valeurs de DDE_{10} et de NOEDR estimées dans l'expérience précédente (cf. Chapitre 9). La gamme de débit de dose testée dans cette expérience a été estimée à l'aide du modèle MCNP.

Des expériences préliminaires menées avec ces irradiateurs ont montré qu'une variation importante du débit de dose était observée au sein des unités expérimentales, lorsque celles-ci étaient posées à plat (dans un plan perpendiculaire à la source). Différents designs expérimentaux ont donc été testés afin de limiter les variations des débits de dose au sein des unités expérimentales (Annexe D). Comme le montre la Figure 27, les boîtes de Petri ont finalement été placées verticalement, face à la source, afin de limiter les variations de débits de dose à la surface du NGM (plan sur lequel évolue le nématode) Pour ce faire, elles ont été disposées dans des conteneurs en carton. Dans les incubateurs, sept conteneurs sont placés autour de la source et correspondent au nombre de réplicats utilisés dans l'expérimentation (Figure 28).

L'incubateur est programmé pour maintenir une température de 20°C et un pot d'eau saturée en NaCl est placé dans les incubateurs afin de maintenir un % d'humidité relative proche de 80% tout au long de l'expérimentation. Afin de vérifier la température et l'humidité, des data loggers sont placés dans les incubateurs et le relevé des données est effectué quotidiennement.

(A)



(B)



Figure 26. Dispositif d'irradiation de l'IRSN. (A) Vue générale de l'irradiateur (incubateur thermo-régulé) entouré de plomb. (B) Présentation de l'irradiateur ouvert avec le plateau permettant d'accueillir les échantillons et la source, au centre du plateau, protégée par un château de plomb. © J-M Bonzom/IRSN

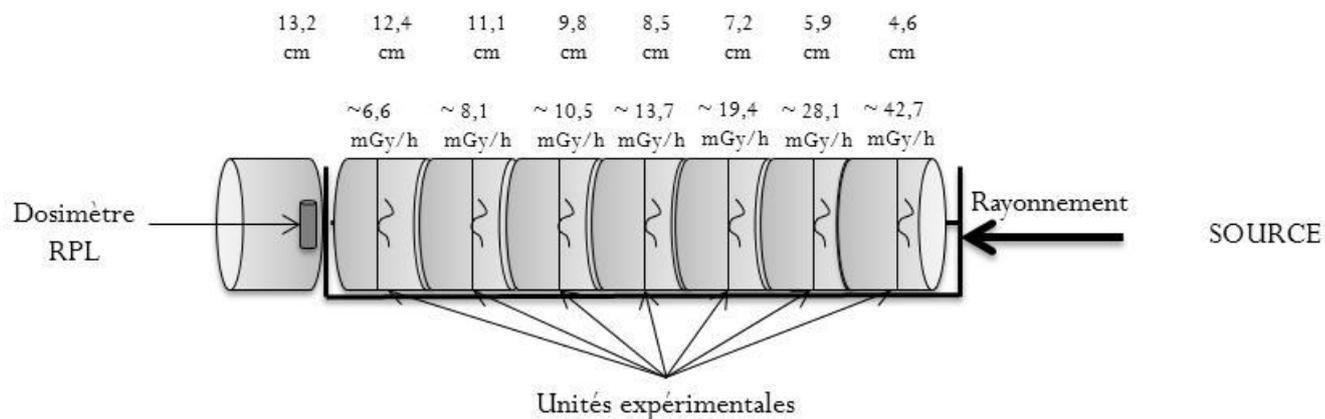


Figure 27. Présentation schématique d'un dispositif expérimental dans l'irradiateur (vue de profil). Les unités expérimentales (boîtes de Petri) sont placées verticalement dans un conteneur en carton. Les distances (en cm) entre les organismes et la source déterminent les différents débits de dose. Un dosimètre RPL est placé à l'arrière du conteneur pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation.



Figure 28. Organisation des 7 dispositifs expérimentaux autour de la source. Les boîtes de Petri sont placées parallèlement à la source grâce à des conteneurs en carton. Un dosimètre RPL est placé à l'arrière de chaque dispositif pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation. © N Dubourg/IRSN

10.1.2. Plan expérimental

Dans cette étude, les nématodes ont été exposés à une gamme de débits de dose (6,6 ; 8,1 ; 10,5 ; 13,7 ; 19,4 ; 28,1 et 42,7 mGy/h) pendant trois générations. Différents statuts d'exposition ont été testés : d'une part, trois générations ont été continuellement exposées et d'autre part, seule la génération parentale a été exposée et les deux générations suivantes ont été placées en environnement contrôle, sans irradiation (Figure 29).

De la même manière que la précédente expérience, les individus doivent être synchronisés afin de faciliter les comparaisons entre les différentes mesures individuelles (croissance et reproduction). La même méthode (décrite en 9.1.2) a donc été appliquée pour obtenir la première génération, appelée F0. Quatre jours après le début de l'expérimentation, les individus de la génération F0 sont devenus des adultes gravides. Ils sont déposés individuellement sur une nouvelle boîte de Pétri et replacés dans les mêmes conditions expérimentales (dans un incubateur contrôle pour les témoins et dans l'irradiateur pour les individus exposés) pendant une heure. Les œufs pondus constituent la deuxième génération (F1). Ils sont soit replacés dans l'irradiateur aux débits de dose correspondant à ceux de la génération parentale, soit placés en environnement contrôle (F1'), avec les témoins. De la même manière que pour la première génération, les larves surnuméraires sont retirées le lendemain afin de ne laisser qu'un seul individu par boîte de Pétri. La synchronisation des œufs en vue d'obtenir la troisième génération, F2, suit la même méthode à ceci près que les individus F1 vont donner la troisième génération exposée (F2), tandis que les individus F1' vont donner la deuxième génération non exposée après exposition parentale (F2') (Figure 29).

Quelle que soit la génération, les nématodes ont été exposés pendant six jours, le temps minimum nécessaire pour atteindre la taille maximale et la fin de la reproduction.

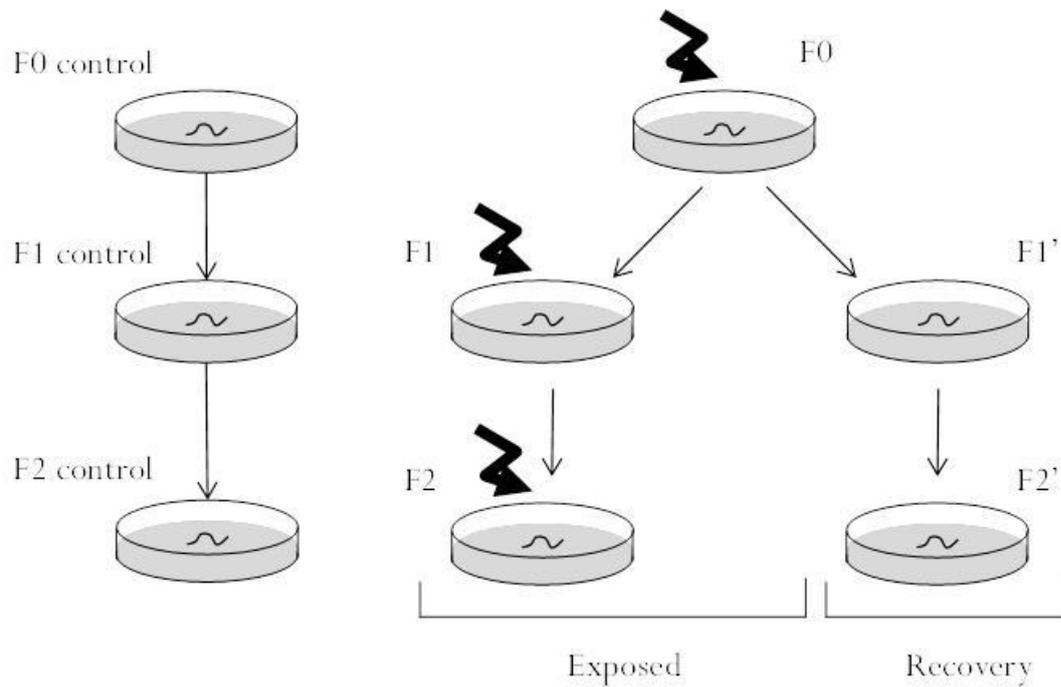


Figure 29. Schéma du design expérimental utilisé sur trois générations de *C. elegans*. A gauche sont présentées les trois générations de témoins. A droite sont présentées les générations continuellement exposées (exposed) (F0, F1 et F2) et les générations placées en environnement contrôlé (recovery) (F1' et F2') après exposition de la première génération (F0).

10.2. Résultats

10.2.1. Dosimétrie

Une pré-expérimentation au cours de laquelle des dosimètres RPL ont été installés à la place des organismes a permis d'observer moins de 15% d'erreur entre les débits de dose estimés par MCNP et ceux mesurés par les dosimètres RPL (Tableau 4, première partie). Au regard de ces résultats, le modèle est validé et pourra servir de référence pour vérifier les débits de dose pendant les expérimentations. Pendant l'expérience, la valeur du débit de dose moyen mesuré à l'arrière des containers était de $4,6 \text{ mGy/h} \pm 0,1$ (Tableau 4, seconde partie). Le faible écart-type indique que les débits de dose étaient constants quels que soient la génération et les replicats utilisés.

Avant l'expérience		
Débits de dose calculés (MCNP) (mGy/h)	Débits de dose mesurés (mGy/h)	Erreur relative (%)
8,1	$8,4 \pm 0,2$	4
10,5	$10,2 \pm 0,1$	3
13,7	$13,6 \pm 0,2$	1
19,4	$17,1 \pm 0,7$	14
28,1	$26,1 \pm 2,4$	7
42,7	$40,2 \pm 2,6$	6
Pendant l'expérience		
4,7	$4,6 \pm 0,1$	3

Tableau 4. Débits de dose calculés (par simulation numérique utilisant le code Monte-Carlo interaction rayonnement-matière (MCNP) et débits de dose mesurés par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne \pm écart-type), avant l'expérience pour valider le modèle et pendant l'expérience pour vérifier les débits de dose à une distance donnée. L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose calculés et les débits de dose mesurés.

10.2.2. Etude des générations continuellement exposées

10.2.2.1. Paramètres de croissance

Aucune différence significative n'a été observée pour les différents paramètres de croissance (estimés à l'aide du modèle de Gompertz) entre les débits de dose et le contrôle, quelle que soit la génération (Figure 30). De plus, lorsque les paramètres de croissance sont comparés entre générations pour un même débit de dose, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

10.2.2.2. Reproduction

Le taux d'éclosion des embryons pondus par les individus exposés était de 98% pour toutes les générations et les débits de dose étudiés. Tout comme pour les paramètres de croissance, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les débits de dose étudiés au sein des différentes générations. Cependant lorsque les générations ont été comparées entre elles, la troisième génération présentait une diminution significative du nombre cumulé de larves par rapport à la première génération pour la plus forte dose (respectivement $171,2 \pm 13,1$ et $238,8 \pm 15,4$; p-value du test *post-hoc* de Tukey $<0,05$). Aucune différence significative n'a été observée sur le nombre cumulé de larves entre les témoins des trois générations ($232,6 \pm 15,2$ pour F0, $216,2 \pm 14,7$ pour F1 et $225 \pm 15,1$ pour F2). De ce fait, la diminution significative entre la première et la troisième génération pourrait être due à une augmentation de la radiosensibilité (Figure 31).

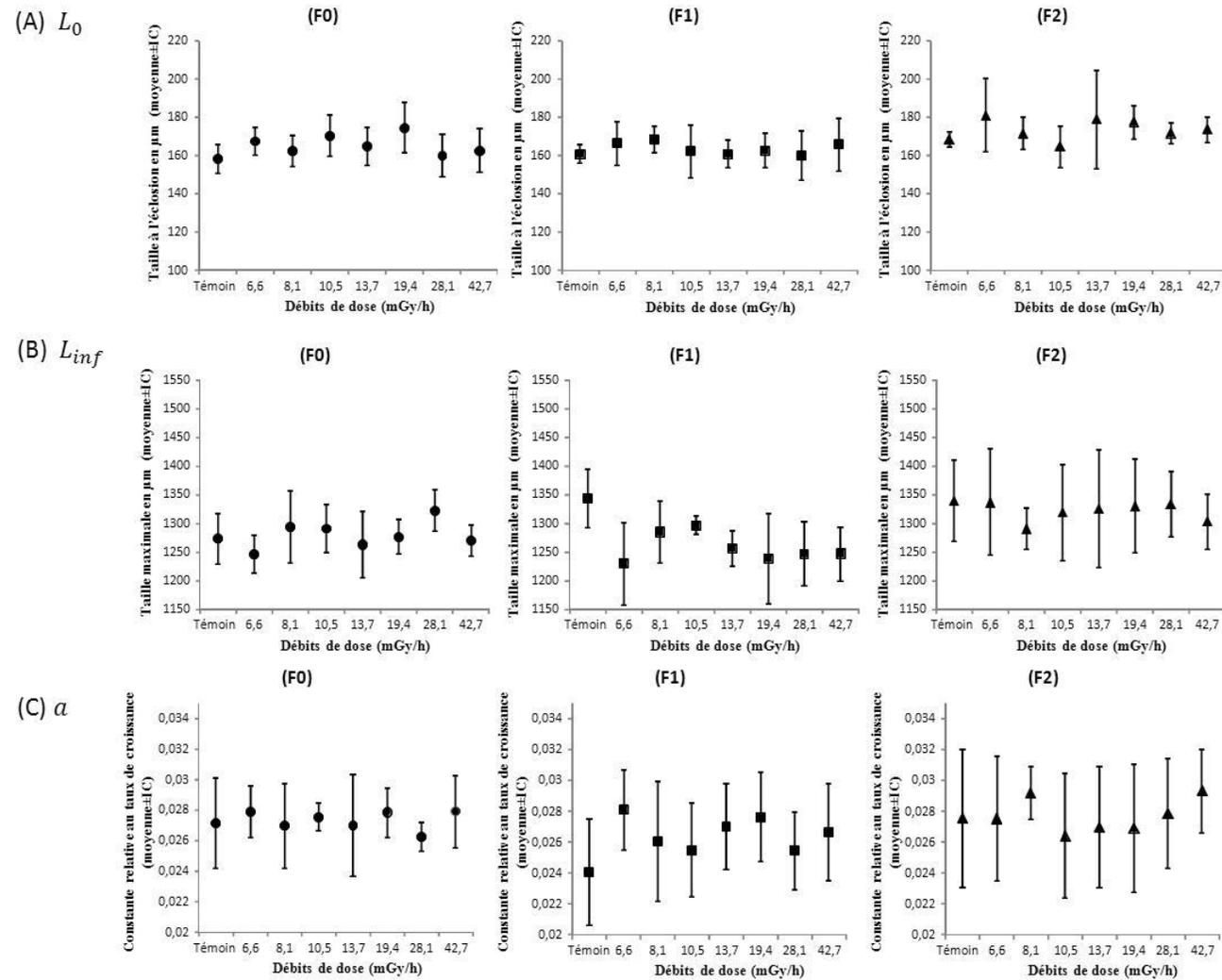


Figure 30. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) pour les trois générations exposées (F0, F1 et F2). Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés.

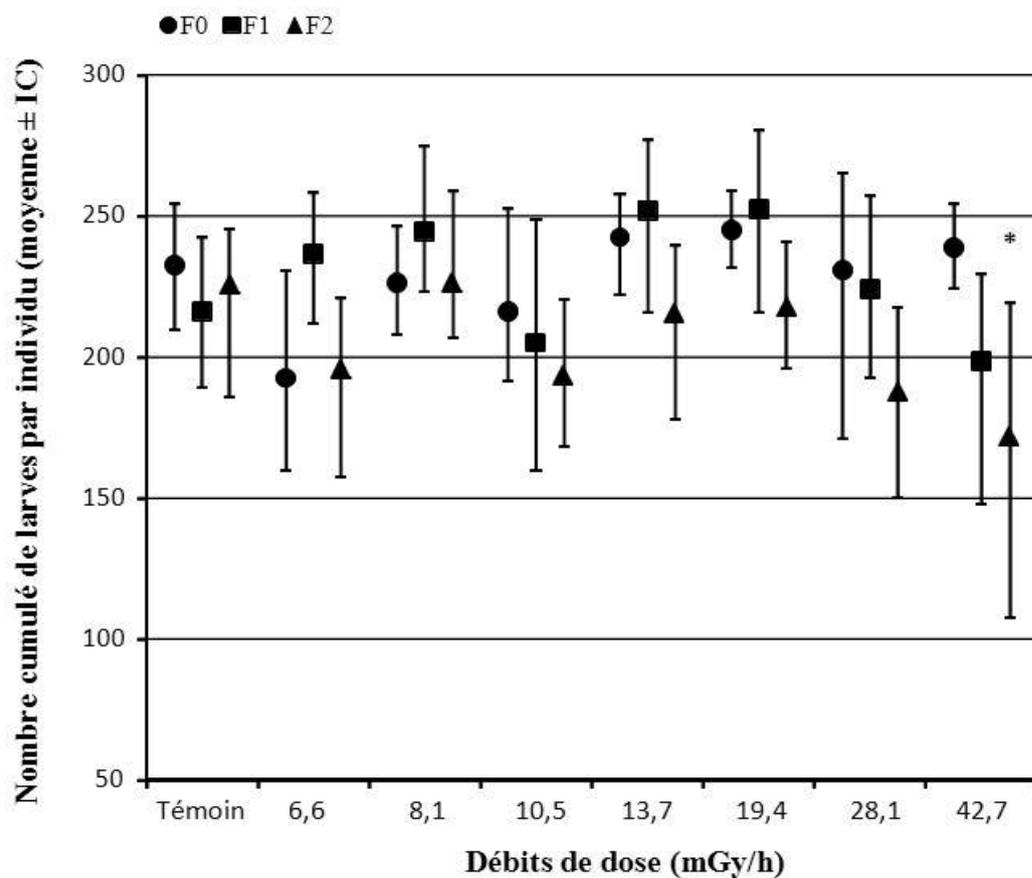


Figure 31. Nombre cumulé de larves dans les trois générations exposées (F0, F1 et F2). Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés. L'astérisque indique une différence significative entre la première (F0) et la troisième (F2) génération (p -value < 0,05).

10.2.3. Etude des générations placées en environnement contrôle (F1' et F2') après exposition parentale

10.2.3.1. Paramètres de croissance

Une différence significative a été observée sur la taille à l'éclosion (L_0) entre les témoins et la dose 19,4 mGy/h (correspondant au débit de dose de la génération parentale) à la génération F1' (p-value du test *post-hoc* de Dunnett $<0,05$). Les individus de cette génération provenant de parents irradiés à ce débit de dose étaient significativement plus grands à l'éclosion que les témoins (Figure 32 (A)). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les témoins et les différents débits de dose pour les autres paramètres de croissance. Concernant les individus issus de la deuxième génération non-exposée (F2'), aucune différence significative n'a été montrée, quel que soit le paramètre de croissance étudié, entre les témoins et les différents débits de dose de la génération F0.

10.2.3.2. Reproduction

Comme pour les générations exposées, le taux d'éclosion des embryons pondus par les individus exposés était de 98% quels que soit le débit de dose et les générations étudiées. Les analyses statistiques effectuées n'ont montré aucune différence significative entre les témoins et les différentes conditions au sein des générations non exposées (Figure 33). De la même manière, aucune différence significative n'a été observée entre les générations.

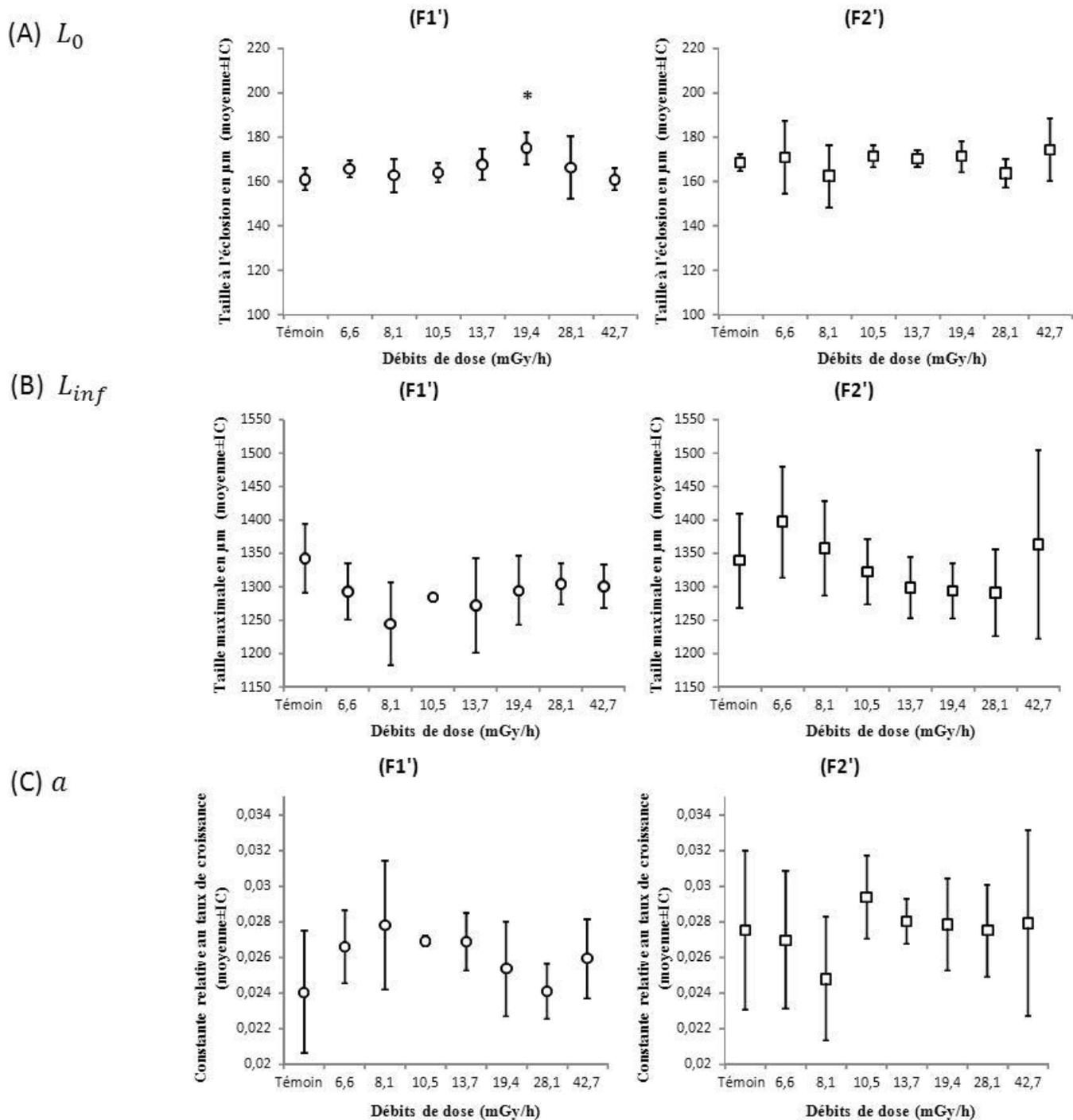


Figure 32. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (A), taille maximale (B) et constante relative au taux de croissance (C)) pour les deux générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2'). Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés.

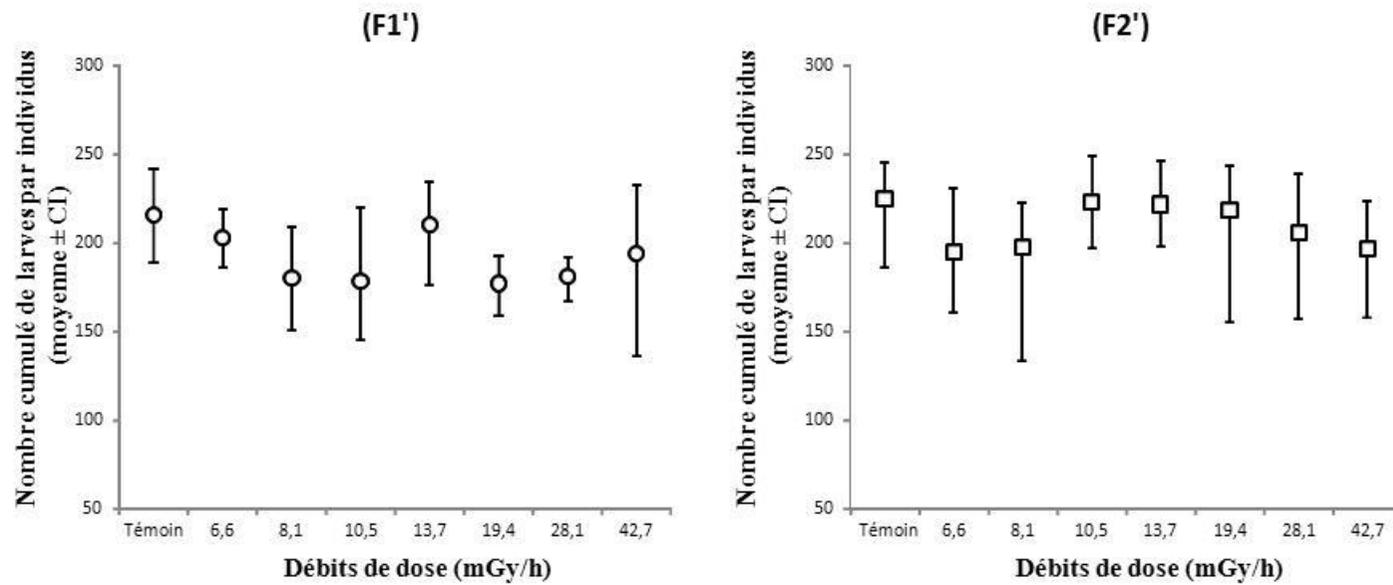


Figure 33. Nombre cumulé de larves dans les deux générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2'). Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm l'intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson) avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les exposés.

10.2.4. Comparaison entre les générations exposées (F1 et F2) et les générations placées en environnement contrôle (F1' et F2') après exposition parentale (F0)

Aucune différence significative n'a été observée entre les individus exposés et les individus non exposés au sein de la deuxième génération (F1 et F1') quels que soient les paramètres de croissance testés. Cependant, l'étude du nombre cumulé de larves entre ces deux conditions d'exposition a montré que les individus non-exposés (F1') pondaient significativement moins que les individus exposés (F1) aux débits de dose suivants : 6,6 mGy/h (avec respectivement $202,8 \pm 14,2$ pour F1' et $236,5 \pm 15,4$ pour F1 ; p-value du test de Tukey $<0,05$), 8,1 mGy/h (avec respectivement $180,2 \pm 13,4$ pour F1' et $244,6 \pm 15,6$ pour F1; p-value du test de Tukey $<0,01$), 19,4 mGy/h (avec respectivement $177,3 \pm 13,3$ pour F1' et $252,3 \pm 15,8$ pour F1 ; p-value du test de Tukey $<0,01$) et 28,1 mGy/h (avec respectivement $181,1 \pm 13,4$ pour F1' et $244 \pm 14,9$ pour F1 ; p-value du test de Tukey $<0,01$) (Figure 34).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les paramètres de croissance et le nombre cumulé de larves entre les individus exposés et les individus non-exposés de la troisième génération (F2 et F2').

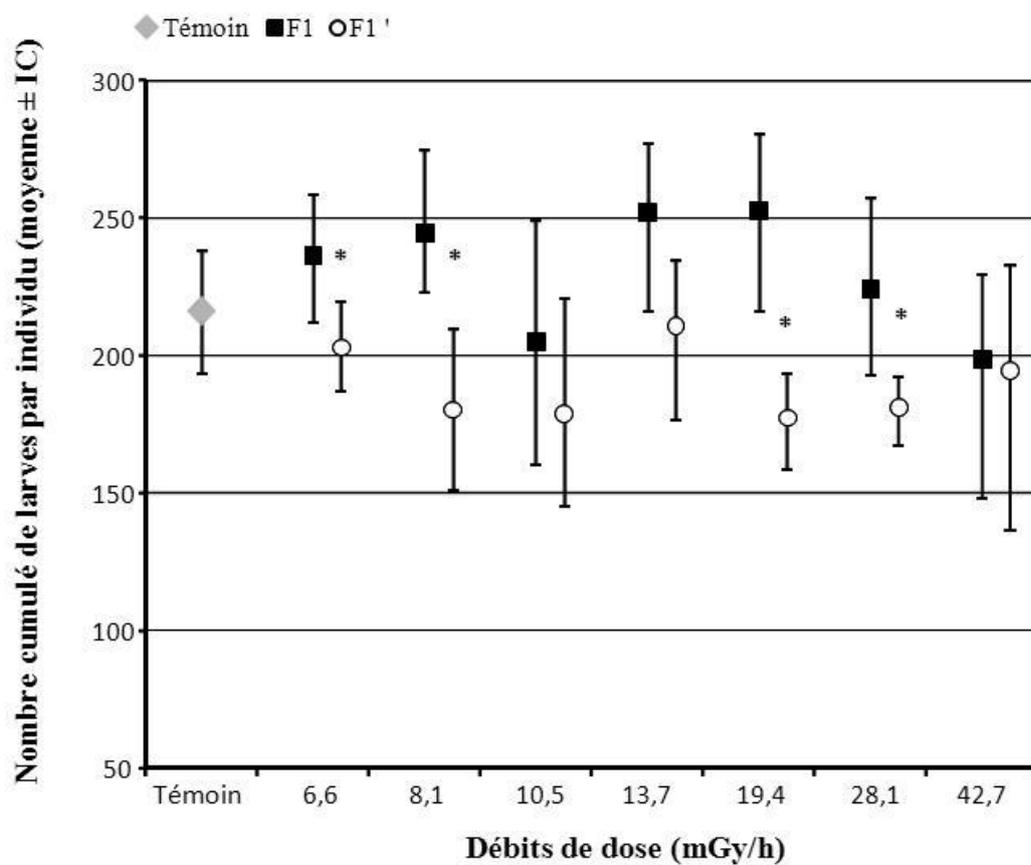


Figure 34. Nombre cumulé de larves au sein de F1 et F1'. Chaque point représente le nombre moyen de larves \pm intervalle de confiance (intervalle de confiance de Poisson, avec $n=10$ pour les témoins et $n=7$ pour les différentes conditions d'exposition (individus exposés ou placés en environnement contrôlé). Les témoins sont les mêmes quelle que soit la condition d'exposition. Les débits de dose des individus non exposés (F1') correspondent aux débits de dose de la génération parentale. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les individus F1 et F1' (p -value $< 0,05$).

10.3. Discussion

Ces travaux présentent l'étude des effets multigénérationnels d'une irradiation gamma sur la croissance et la reproduction chez *C. elegans*. Ces effets ont été examinés au sein et entre les générations à l'aide de deux designs expérimentaux : trois générations continuellement exposées (F0, F1 et F2) et deux générations placées en environnement contrôle (F1' et F2') après exposition de la première génération (F0). De plus, des comparaisons entre les individus exposés et les individus non exposés ont été réalisées.

10.3.1. Etude des traits d'histoire de vie au sein des générations

10.3.1.1. Croissance

Une augmentation significative de la taille d'éclosion entre le témoin et le débit de dose 19,4 mGy/h a été trouvée à la deuxième génération non exposée (F1'). Cependant, cette différence n'a pas été observée pour les autres débits de dose et paramètres de croissance. C'est pourquoi nous pouvons supposer que cette différence significative serait un artefact dû aux mesures ou à la modélisation. En dehors de ce cas particulier, aucune différence entre le témoin et les différents débits de dose n'a été montrée quels que soient les débits de dose et les générations. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus et avec ceux de la littérature concernant une exposition multigénérationnelle. En effet, l'étude d'une exposition chronique de sept générations d'un annélide marin (*Ophryotrocha diadema*) à une source externe de césium 137 n'a montré aucune différence significative entre les courbes de croissance des témoin et celles des différents débits de dose testés (dans une gamme de débits de dose compris entre 1,7 mGy/h et 13,7 mGy/h) (Knowles et Greenwood, 1994). Une étude a également été menée sur les effets d'une exposition chronique (à une source de cobalt) sur le poids de deux générations d'un invertébré terrestre, le ver du fumier *Eisenia fetida*. Comme pour l'annélide marin, aucune différence significative n'a été observée sur ce paramètre, quels que soient la

génération et les débits de dose testés (dans une gamme comprise entre 0,19 mGy/h et 43 mGy/h).

10.3.1.2. Reproduction

Les données obtenues dans notre étude ont montré qu'une exposition à des débits de dose compris entre 6,6 et 42,7 mGy/h n'avait pas d'impact sur le taux d'éclosion et la survie des larves. De plus, aucun impact significatif concernant le nombre moyen cumulé de larves par individus n'a été observé entre le témoin et les différents débits de dose au sein des générations. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment sur une seule génération pour lesquels aucun effet significatif n'est observé à 43,9 mGy/h. Cependant, ils contrastent avec les données de la littérature obtenues après une exposition multigénérationnelle d'invertébrés. En effet, une exposition chronique de la néréis (*Neanthes arenaceodentata*) a conduit à une diminution significative du nombre moyen d'embryons produits par les femelles exposées à 17 mGy/h par rapport au témoin à la deuxième génération (Harrison et Anderson, 1994). De la même manière, d'autres études ont mis en évidence une diminution significative de la reproduction par rapport au témoin quelle que soit la génération étudiée (Hertel-Aas et al., 2007; Knowles et Greenwood, 1994).

Comme présenté dans le chapitre 9, l'absence d'effets significatifs dans cette étude par rapport aux données de la littérature peut être expliquée par les caractéristiques physiologiques de *C. elegans*, notamment son cycle de vie court. En effet, dans nos conditions expérimentales, la dose cumulée sur une génération correspondant au plus fort débit de dose est de 6 Gy (42,7 mGy/h pendant six jours, soit 144 h) ce qui est, approximativement deux fois plus faible que celles reportées pour les autres espèces (cf. Paragraphe 9.3.2).

10.3.2. Diminution de la capacité de reproduction entre les générations

Peu d'études concernent les effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants. Ces études montrent généralement qu'il existe une augmentation de la radiosensibilité en fonction des générations, c'est-à-dire une aggravation des effets liés à l'exposition aux

rayonnements ionisants (Alonzo et al., 2008; Harrison et Anderson, 1994; Knowles et Greenwood, 1994; Marshall, 1962, 1966; Massarin et al., 2010). Seule l'irradiation chronique sur deux générations de vers du fumier (*Eisenia fetida*) a montré que la deuxième génération était moins sensible que la première. En effet, le nombre de larves ayant éclos est diminué par rapport au témoin pour les individus exposés à 4 mGy/h à la première génération et à 11 mGy/h pour la deuxième génération. Les auteurs ont également observé que le taux d'éclosion des larves issues de la deuxième génération augmentait avec le temps, suggérant une possible adaptation ou acclimatation (Hertel-Aas et al., 2007). Dans le cadre de notre étude, une augmentation de la radiosensibilité au fil des générations a été montrée (F2). En effet, une différence significative a été observée entre la première et la troisième génération pour une exposition de 42,7 mGy/h, indiquant que la troisième génération a pondé significativement moins que la première à ce débit de dose. Nous pouvons supposer que cet effet sur la reproduction à la troisième génération serait dû à des effets génétiques qui résulteraient d'évènements complexes survenant dans les générations précédentes. Aux effets transgénérationnels (processus épigénétiques et mutations dans la lignée germinale) provenant des générations précédentes, viendraient s'ajouter les effets « directs » subis par les générations, comme cela a été démontré chez les souris de Tchernobyl, plusieurs générations après l'accident (Ryabokon et Goncharova, 2006). Plus récemment, l'étude des impacts de l'accident de Fukushima sur les populations locales de papillons a montré que la seconde génération non exposée présentait des anomalies qui n'étaient pas observées à la première génération (Hiyama et al., 2012). Dans nos travaux de recherche, le critère d'effet le plus sensible était le nombre cumulé de larves. Comme aucun impact sur le taux d'éclosion n'a été observé, une diminution du nombre de larves produit par individu a été associée à une diminution du nombre d'embryons pondus. Les rayonnements ionisants sont connus pour impacter l'ADN en créant des cassures double-brin (DSB), pouvant conduire à l'apoptose des cellules de la lignée germinale (Craig et al., 2012; Gartner et al., 2000; Guo et al., 2013). Nous pouvons donc supposer qu'une augmentation de l'apoptose, due à des dommages à l'ADN, pourrait impacter les gamètes entraînant une perte de production d'oocytes. De même, une diminution du stock de spermatozoïdes pourrait expliquer la diminution du nombre d'embryons, ceux-ci étant impliqués dans la maturation et l'ovulation des oocytes. Cependant, des analyses mécanistiques moléculaires et cellulaires sont nécessaires afin de tester cette hypothèse.

10.3.3. **Différence entre F1 et F1' : Transmission d'effets après exposition parentale ?**

Dans notre étude, les effets sur la reproduction ont également été observés au sein d'une même génération mais pour des conditions d'exposition différentes (individus exposés (F1) ou placés en environnement contrôle (F1') après irradiation parentale (F0)). Etonnamment, les individus non exposés (F1') ont pondu significativement moins d'œufs que les individus exposés. A notre connaissance, aucune étude publiée n'a déjà comparé différentes conditions d'exposition au sein d'une même génération. La diminution du nombre d'œufs pondus observée pour les individus non-exposés peut être expliquée par la transmission d'effets biologiques de la génération parentale exposée (F0) aux descendants non-exposés, comme cela a été démontré dans de nombreuses études. Il est important de noter que la majorité de ces études concernent la transmission d'effets subléthaux (aberrations chromosomiques, mutations...) suite à une exposition parentale et ont été menées chez les mammifères (Barber et al., 2006; Baulch et Raabe, 2005; Baulch et al., 2001; Dubrova, 2003a, b; Lüning et al., 1976; Streffer, 2006; Vance et al., 2002), chez qui l'irradiation a induit de l'instabilité génomique. Cependant, malgré le nombre important de ces études, les mécanismes moléculaires liés aux effets transgénérationnels restent mal compris (Kovalchuk, 2013). En plus de ces études mécanistiques, certaines expérimentations ont été conduites pour déterminer les conséquences de l'exposition parentale aux rayonnements ionisants sur les traits d'histoire de vie des descendants non exposés. Par exemple, l'étude d'une exposition aux faibles doses de rayonnements gamma menée chez *Daphnia magna* a montré que la survie de descendants non-exposés provenant d'une génération exposée étaient significativement affectée (Sarapultseva et Gorski, 2013). Une autre étude menée sur le petit pois (*Pisum sativum*) a également montré que les effets sur la taille, le poids sec, le nombre de gousses et le nombre de graines par gousse, étaient non seulement transmis d'une génération à l'autre mais aussi qu'ils étaient plus sévères pour la deuxième génération non-exposée (Zaka et al., 2004). Seule une étude contraste avec ces résultats. En effet, Hertel-Aas et collaborateurs ont montré en 2011 que la seconde génération non-exposée provenant d'une génération exposée ne présentait pas de différence significative concernant la capacité de reproduction des vers du fumier.

La transmission d'effets maternels observée avec F1' pourrait avoir été compensée chez les individus exposés (F1) par la stimulation de mécanismes de résistance induits lors d'une exposition directe aux rayonnements ionisants. Nous pouvons supposer que l'activation des processus de recombinaison homologue (déclenchée à la suite de cassures double-brin) pourrait jouer un rôle important dans la protection contre les dommages radio-induits, conduisant ainsi à une meilleure résistance face aux rayonnements gamma. En l'absence de stress, ce processus de réparation ne serait pas stimulé, ce qui pourrait expliquer que les individus non-exposés pondent significativement moins que les individus exposés au sein d'une même génération, après exposition parentale.

Les différences significatives entre F1 et F1' n'ont pas été retrouvées à la génération suivante (comparaison entre F2 et F2'), suggérant un retour à l'état normal. Ce résultat n'est pas comparable à ceux de la littérature, pour lesquels les effets dûs à une exposition parentale persistaient au bout de deux générations chez la souris (Baulch et Raabe, 2005; Baulch et al., 2001; Vance et al., 2002). Cependant, ces études se focalisaient sur les changements moléculaires et non sur les effets phénotypiques. Lorsque les effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements gamma ont été étudiés à de plus hauts niveaux d'organisation biologiques (poids moyen du foie, poids moyen de l'individu), aucune différence significative n'a été observée au-delà d'une génération suivant l'exposition parentale (Baulch et al., 2001).

10.4. Conclusion

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été montrée concernant les paramètres de croissance. Cependant, une diminution significative de la capacité de ponte entre les individus exposés de la première et de la troisième génération pour le plus fort débit de dose a été observée (à 42,7 mGy/h, pour une dose cumulée de 6 Gy). La reproduction (et plus précisément le nombre cumulé de larves) est donc le critère d'effet le plus sensible lors d'une exposition multigénérationnelle à l'irradiation gamma. De futures études doivent cependant être menées sur les réponses moléculaires à une exposition chronique aux rayonnements gamma pour apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes sous-jacents qui pourraient expliquer les effets observés au niveau phénotypique.

11. Etudes des mécanismes moléculaires et cellulaires

Comme montré dans les précédents chapitres, une exposition chronique aux rayonnements ionisants de *C. elegans* a pour conséquence une diminution de la reproduction. Plus particulièrement, c'est une diminution du nombre cumulé de larves par nématode chez les individus exposés qui a été observée. A partir de cette observation, deux hypothèses ont été posées sur les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacent à cet effet. La première est qu'une diminution du nombre d'oocytes pourrait induire une diminution du nombre d'embryons pondus. Cette diminution serait due à une augmentation de l'apoptose dans la lignée germinale associée à une diminution du nombre de cellules mitotiques, cellules précurseurs des oocytes. La seconde hypothèse concerne le nombre de spermatozoïdes présents dans la lignée germinale de *C. elegans*. Comme décrit dans l'état des connaissances de cette thèse, le nématode possède un nombre déterminé de cellules spermatiques (stockées dans la spermathèque), qui jouent un rôle dans la maturation des oocytes par l'intermédiaire de la MSP. Lorsque la spermathèque est vide, le nématode cesse de produire des oocytes. En conséquence, une diminution du nombre de cellules spermatiques pourrait également expliquer une diminution du nombre d'embryons pondus.

Ces différentes hypothèses ont été testées sur plusieurs générations avec deux conditions d'exposition différentes, comme expliqué au chapitre précédent, à l'aide de techniques moléculaires et cellulaires spécifiques de la lignée germinale du nématode (apoptose, arrêt du cycle cellulaire et comptage spermatique).

11.1. Matériel et méthodes

11.1.1. Design expérimental et dispositif d'irradiation

Le design expérimental et le dispositif d'irradiation qui ont été utilisés dans ce chapitre sont identiques à ceux du chapitre 10. Les études de différents mécanismes déclenchés lors d'une exposition chronique aux rayonnements gamma ont ainsi été conduites sur trois générations, dont trois continuellement exposées (F0, F1 et F2) et deux placées en environnement contrôle (F1' et F2') après exposition parentale. Le précédent chapitre nous a également permis de sélectionner deux débits de dose sur lesquels effectuer ces études mécanistiques. Le premier débit de dose sélectionné est 8,1 mGy/h, débit de dose pour lequel les individus non exposés pouvaient significativement moins que les individus exposés à la deuxième génération (F1 et F1'). Le second est le plus fort débit de dose (42,7 mGy/h) pour lequel une diminution significative de la capacité de ponte entre les individus exposés de la première et de la troisième génération a été observée.

Afin de respecter les conditions du chapitre précédent, les mêmes dispositifs expérimentaux ont été utilisés (conteneur en carton). Des boîtes de Petri intermédiaires contenant également du NGM ont été placées entre ces deux débits de dose, pour respecter les distances par rapport à la source. Ces boîtes intermédiaires contenaient des dosimètres, posés sur la surface du milieu gélosé, dans le but de vérifier les débits de dose reçus entre les réplicats et les différentes générations. De manière à obtenir suffisamment de matériel biologique, des pools d'individus (environ 300 par boîte de Petri) ont été utilisés (Figure 35 (A)). Les individus de chaque génération ont été synchronisés par bleaching, selon la méthode présentée en 1.2.1. Sept réplicats pour chaque débit de dose ont été utilisés, dont quatre pour réaliser les différents tests et trois pour obtenir la génération suivante (Figure 35 (B)).

L'irradiation a débuté immédiatement après le dépôt des œufs sur les boîtes de Petri et a duré 65 heures, temps nécessaire au développement et à la maturation des gonades chez *C. elegans*.

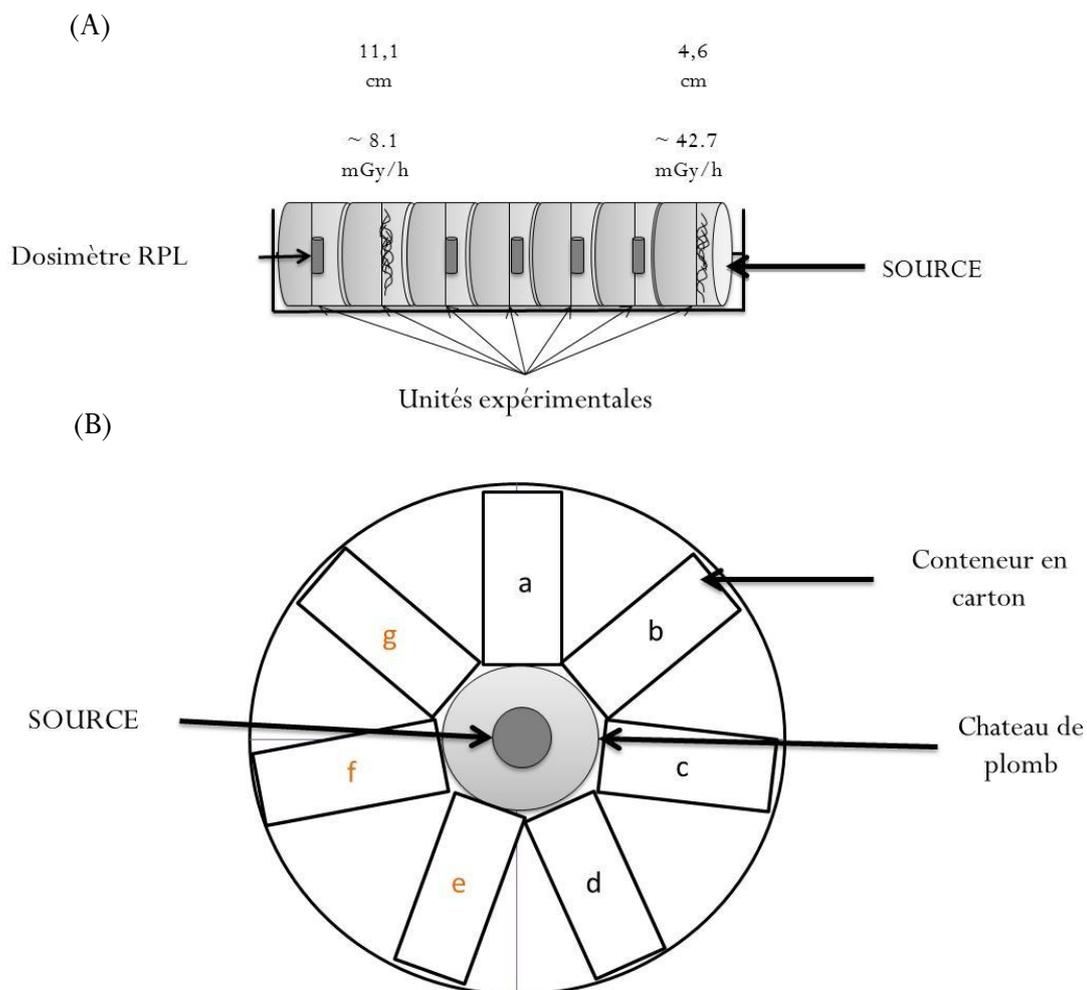


Figure 35. Schéma d'un dispositif expérimental utilisé. (A) Les unités expérimentales (boîtes de Petri) contenant environ 300 individus sont placées verticalement dans un conteneur en carton. Un dosimètre RPL est placé dans chaque boîte de Petri intermédiaires pour vérifier la stabilité des débits de dose durant l'expérimentation. (B) Les différents conteneurs sont placés autour de la source. Les lettres correspondent aux différents réplicats, avec en noir les réplicats utilisés pour les tests et en orange les réplicats utilisés pour obtenir la génération suivante.

11.1.2. Reproduction

La reproduction a été étudiée en parallèle des différents tests moléculaires et cellulaires dans le but de (i) confirmer les résultats précédemment obtenus, (ii) pouvoir mettre en relation sur une même expérience d'éventuels changements moléculaires/cellulaires avec des observations sur les traits d'histoire de vie, selon la méthode décrite au chapitre 6, paragraphe 6.2. Dans le cadre de cette étude, afin de pouvoir multiplier le nombre d'individus, la reproduction a été suivie sur quatre pools de cinq nématodes par condition d'exposition.

11.2. Résultats

11.2.1. Dosimétrie

Comme le montre le Tableau 5 ci-dessous, une variabilité a été observée entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés. En moyenne, les débits de dose mesurés sont 13% plus faibles que ceux calculés par MCNP, différence qui pourrait être due à la décroissance radioactive de la source utilisée. Les débits de dose utilisés par la suite ont été ré-estimés en prenant en compte cette différence de 13% et sont donc de 7,1 et de 37,1 mGy/h.

Débits de dose calculés (MCNP) (mGy/h)	Débits de dose mesurés pendant l'expérimentation (mGy/h)	Erreur relative (%)	Erreur relative moyenne (%)
6,6	5,6 ± 0,2	17%	
10,5	9,3 ± 0,1	13%	
13,7	12,4 ± 0,3	10%	13%
19,4	17,2 ± 0,4	13%	
28,1	24,9 ± 0,9	13%	

Tableau 5. Débits de dose théoriques (calculés en fonction de la distance par rapport à la source) et débits de dose mesurés pendant l'expérimentation par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne ± écart-type). L'erreur relative est la différence en pourcentage entre les débits de dose théoriques et les débits de dose mesurés.

11.2.2. Etude des générations continuellement exposées

11.2.2.1. Reproduction

Quels que soient les débits de dose, 98% des embryons pondus par les nématodes ont éclos. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le témoin et les débits de dose à la première génération. A la deuxième génération, les individus exposés à un débit de dose de 37,1 mGy/h ont pondus significativement moins que les témoins (respectivement 136 ± 21 et 213 ± 14). Le même effet a été observé à la troisième génération dès le plus faible débit de dose (avec un nombre moyen de larve par individu de 236 ± 18 pour les témoins, 180 ± 16 et 173 ± 15 pour les individus exposés à 7,1 et 37,1 mGy/h respectivement) (Figure 36 (A)). Lorsque les

générations ont été comparées entre elles pour un même débit de dose, les analyses statistiques ont montré que pour les individus exposés à 7,1 et 37,1 mGy/h, les générations F1 et F2 pondaient significativement moins que la première génération (F0) (p-value du test post-hoc de Tukey <0,05). De plus, la seconde génération a pondu significativement moins que la troisième génération au plus fort débit de dose (respectivement 136 ± 21 et 173 ± 15).

11.2.2.2. Comptage de la spermathèque et des cellules mitotiques de la lignée germinale

Concernant le nombre de spermatozoïdes présents dans la spermathèque, aucune différence significative n'a été mise en évidence à la première génération entre le témoin et les différents débits de dose. Le nombre de spermatozoïdes était significativement réduit à 37,1 mGy/h par rapport au témoin (respectivement $94,9\pm 11,2$ et $138,5\pm 10,4$) à la deuxième génération. Cette même observation a été effectuée à la troisième génération avec une apparition d'effet dès 7,1 mGy/h (Figure 36 (B)). Des différences significatives entre les générations ont été mises en évidence à 7,1 mGy/h. Le nombre de spermatozoïdes était significativement plus faible à la troisième génération par rapport aux deux précédentes. Au plus fort débit de dose, les deuxième et troisième générations présentaient un nombre de spermatozoïdes significativement plus faible que la première génération.

Aucune différence significative n'a été observée dans le nombre de cellules mitotiques entre le témoin et 7,1 mGy/h quelle que soit la génération (Figure 36 (C)). Cependant, des différences significatives ont été mises en évidence à la plus forte dose pour les deuxième et troisième générations. Aucune différence significative n'a été observée lorsque les générations étaient comparées entre elles pour un même débit de dose. Des exemples d'observations microscopiques de la partie distale des gonades sont présentés en Annexe F (Figure S 1).

11.2.2.3. Etude de l'expression du gène *egl-1*

Le niveau d'expression relatif d'*egl-1* est comparable entre les différents témoins ($0,09\pm 0,02$, $0,06\pm 0,03$ et $0,06\pm 0,02$) (Figure 36 (D)). Aucune différence significative n'a été détectée dans l'expression relative du gène *egl-1* à la première génération. Cependant, à la

deuxième génération et pour le plus fort débit de dose, une surexpression de ce gène a été observée par rapport au témoin (de $0,06 \pm 0,03$ pour le témoin à $0,14 \pm 0,01$ au plus fort débit de dose). Une augmentation de l'expression relative du gène *egl-1* a également été observée à la troisième génération entre le témoin et les deux débits de dose étudiés, passant de $0,06 \pm 0,02$ à $0,11 \pm 0,02$ (7,1 mGy/h) et à $0,16 \pm 0,03$ (37,1 mGy/h). Aucune différence significative n'a été mise en évidence lorsque les générations étaient comparées entre elles pour un même débit de dose.

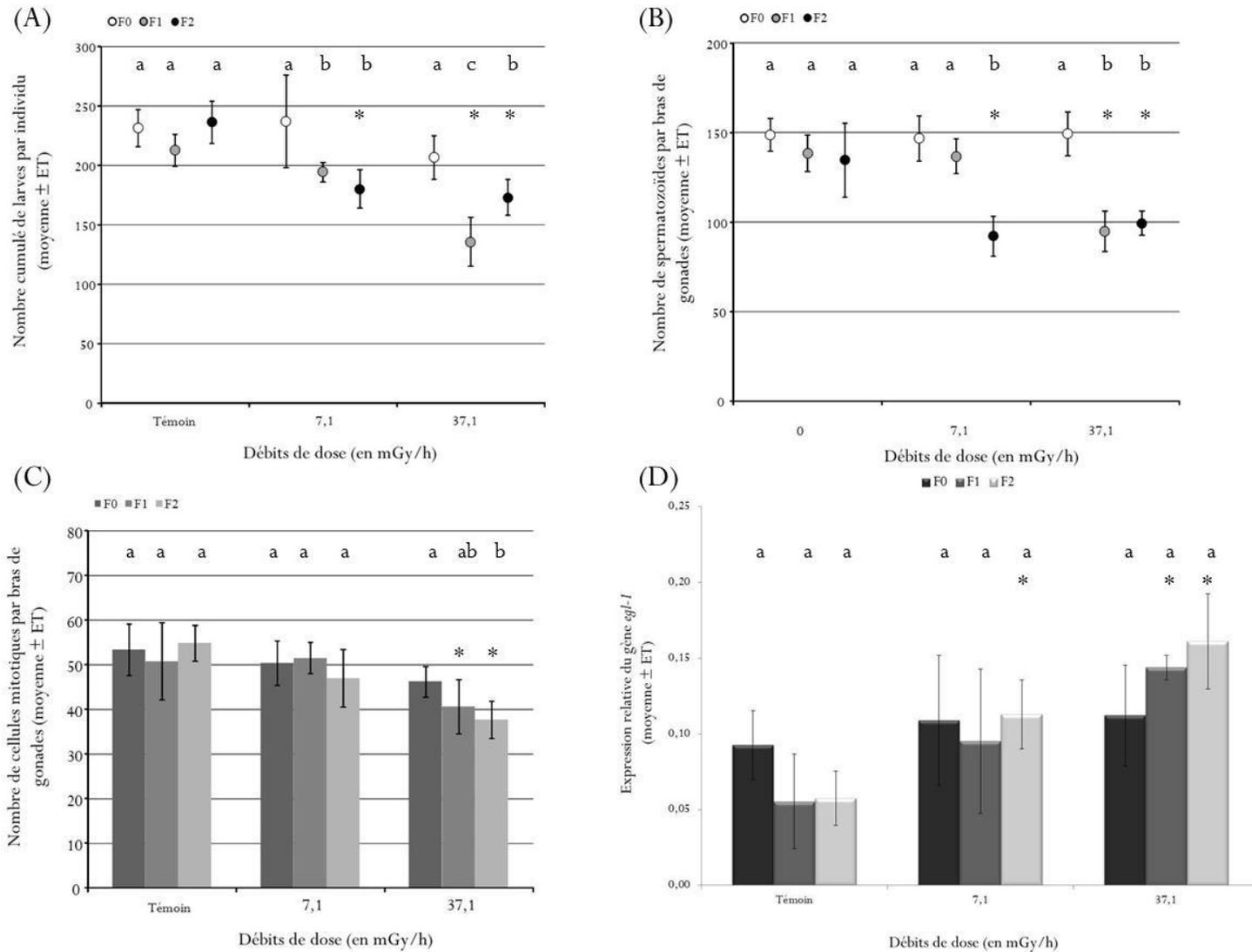


Figure 36. Etude des trois générations exposées (F0, F1 et F2). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves/individu ± écart-type avec n=20; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes ± écart-type avec n=10; (C) Nombre de cellules mitotiques par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose ± écart-type avec n=7; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative ± écart-type avec n=3 (3 pools de 300 individus). * indique une différence significative entre les débits de dose et le témoin de la génération correspondante (p-value < 0,05). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose.

11.2.3. Etude des générations placées en environnement contrôle (F1' et F2') après exposition parentale

11.2.3.1. Reproduction

Comme pour les générations exposées, le taux d'éclosion des embryons pondus par les individus exposés était de 98% quels que soit le débit de dose et les générations étudiées. Des différences significatives ont été montrées entre le témoin et les deux débits de dose testés (correspondants à ceux de la génération parentale exposée) à la deuxième génération non exposée (F1'). Les individus non exposés après exposition parentale ont pondu significativement moins d'œufs que les témoins (174 ± 14 à 7,1 mGy/h, 173 ± 27 à 37,1 mGy/h et 213 ± 14 pour les témoins). A la troisième génération non exposée (F2') seuls les individus issus d'une exposition parentale à 7,1 mGy/h avaient significativement moins pondu que les témoins (respectivement 170 ± 42 et 236 ± 18) (Figure 37 (A)). Les générations ont également été comparées entre elles au sein d'un même débit de dose. Aucune différence significative n'a été mise en évidence quel que soit le débit de dose testé.

11.2.3.2. Comptage de la spermathèque et des cellules mitotiques de la lignée germinale

De la même manière que pour le nombre cumulé de larves par individu, le nombre de spermatozoïdes était significativement réduit à la deuxième génération non exposée aux deux débits de dose par rapport au témoin ($114,7 \pm 5,4$, $106,6 \pm 7,5$ à 7,1 mGy/h et 37,1 mGy/h respectivement et $138,5 \pm 10,4$ pour le témoin). Cette même observation a été effectuée à la troisième génération non exposée où une diminution significative du nombre de spermatozoïdes par rapport au témoin n'est retrouvée qu'à 7,1 mGy/h (Figure 37 (B)). Lorsque les générations étaient comparées entre elles, des différences significatives ont été mises en évidence à 7,1 mGy/h et 37,1 mGy/h. Au plus faible débit de dose, une diminution du nombre de spermatozoïdes entre la deuxième génération non exposée (F1') et la troisième génération non

exposée (F2') a été observée, avec respectivement $114,7 \pm 5,4$ et 98 ± 9 (p-value de Tukey $< 0,05$). Cependant, au débit de dose de 37,1 mGy/h, les individus de la deuxième génération non exposée ont produit significativement moins de spermatozoïdes que ceux de la troisième génération non exposée (p-value de Tukey $< 0,05$).

Contrairement aux générations exposées, aucune différence significative sur le nombre de cellules mitotiques par bras de gonade n'a été mise en évidence quels que soient la génération et les débits de dose testés (Figure 37 (C)). Des exemples d'observations microscopiques de la partie distale des gonades des générations non-exposées sont présentés en Annexe F (Figure S 2).

11.2.3.3. Etude de l'expression du gène *egl-1*

Aucune différence significative n'a été détectée dans l'expression relative du gène *egl-1* entre les témoins et les différents débits de dose (correspondants à ceux de la génération parentale exposée), quelle que soit la génération (Figure 37 (D)).

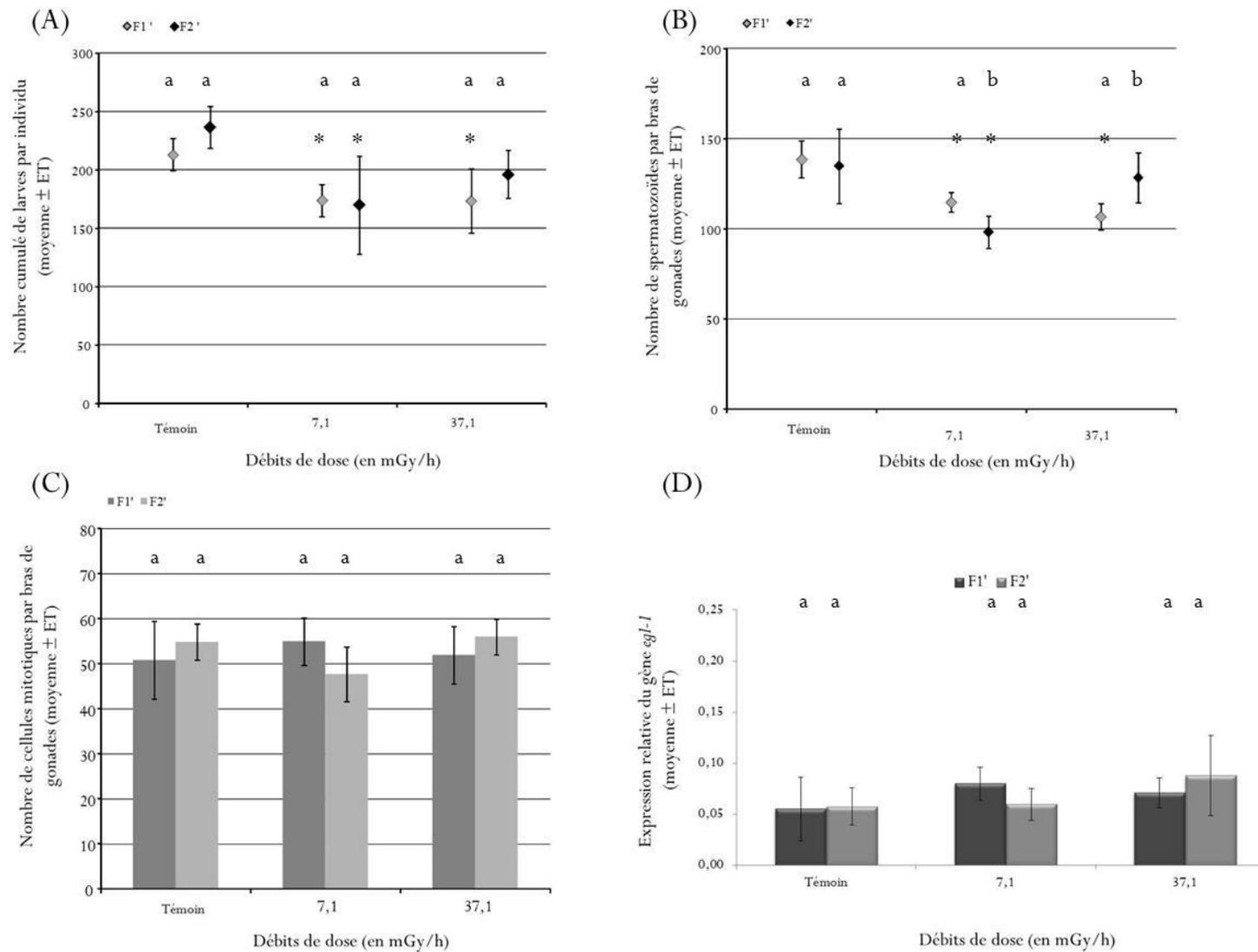


Figure 37. Etude des deux générations placées en environnement contrôlé (F1' et F2'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves/individu \pm écart-type avec n=20; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes \pm écart-type avec n=10; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose \pm écart-type avec n=7; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm écart-type avec n=3 (3 pools de 300 individus). * indique une différence significative entre les débits de dose et le témoin de la génération correspondante (p-value < 0,05). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose.

11.2.4. Comparaison individus exposés et individus non exposés (F1 - F1' et F2-F2')

11.2.4.1. Etude à la deuxième génération (F1-F1')

L'étude du nombre cumulé de larves entre ces deux conditions d'exposition a montré que les individus non-exposés (F1') pondaient significativement moins que les individus exposés (F1) au plus faible débit de dose, avec respectivement 174 ± 14 et 194 ± 8 ; p-value du test de Tukey $< 0,05$) (Figure 38 (A)). Cette différence a également été mise en évidence comme le montre la Figure 38 (B), sur le comptage des spermatozoïdes. En effet, au débit de dose de 7,1 mGy/h, les individus non exposés présentaient un nombre de spermatozoïdes de $114,7 \pm 5,4$ contre $136,7 \pm 9,8$ pour les individus exposés. Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant le nombre de cellules mitotiques entre ces deux types d'exposition (Figure 38 (C)). Cependant, lorsque les niveaux d'expression relative du gène *egl-1* sont comparés, aucune différence significative n'a été observée au plus faible débit de dose. Une différence a été trouvée au plus fort débit de dose, où les individus exposés présentaient un niveau d'expression supérieur à celui des individus non exposés Figure 38 (D).

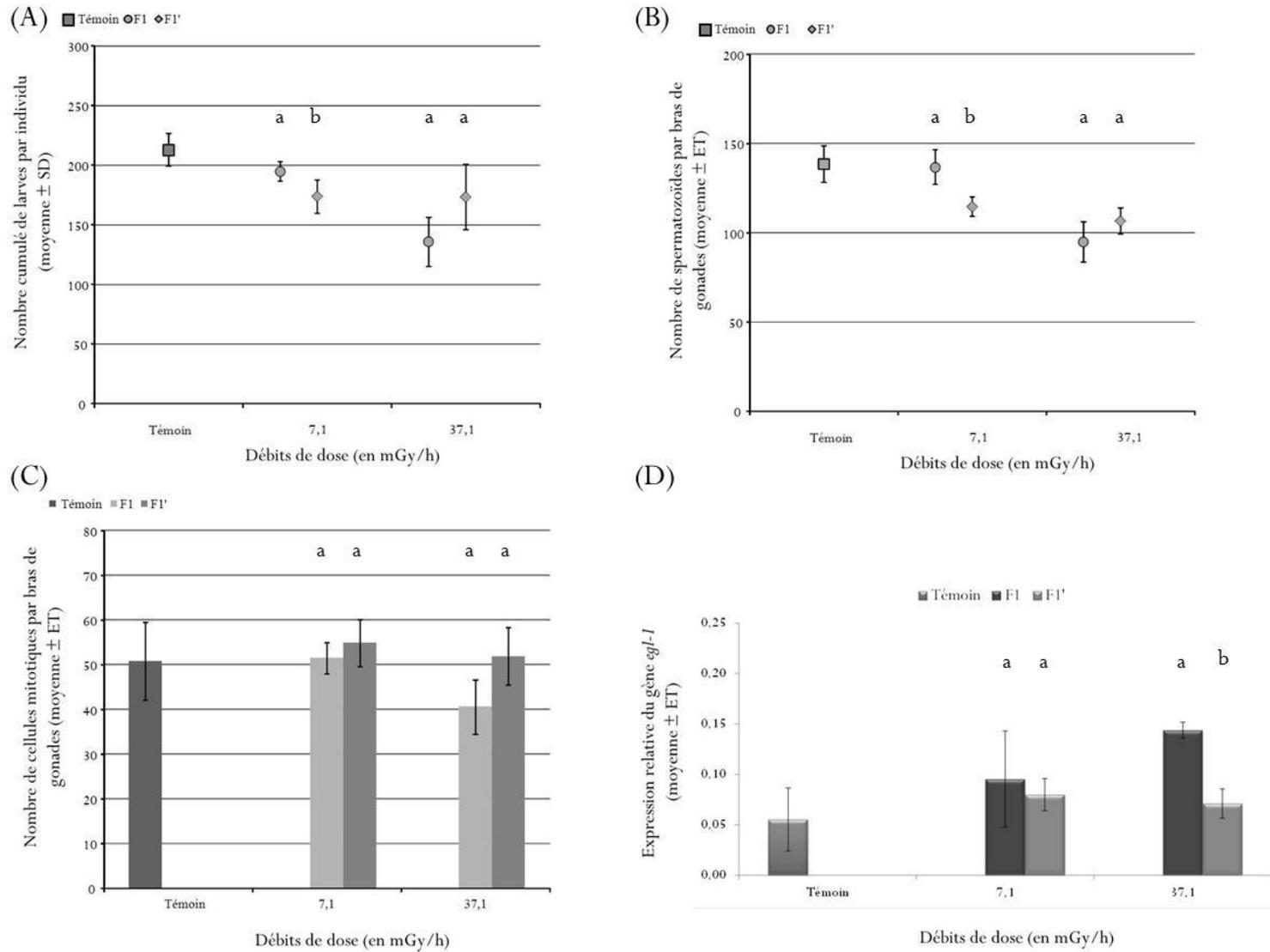


Figure 38. Comparaison entre les individus exposés et les individus non exposés à la deuxième génération (F1 et F1'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves ± écart-type avec n=20; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes ± écart-type avec n=10; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose ± écart-type avec n=7; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative ± écart-type avec n=3 (3 pools de 300 individus). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose.

11.2.4.2. Etude à la troisième génération (F2-F2')

Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans le nombre cumulé de larves entre les individus exposés et les individus non exposés à la troisième génération. Cette absence d'effet a également été retrouvée lorsque le nombre de cellules en mitose est comparé entre ces deux générations (Figure 39 (A) et (C)). Néanmoins, le nombre de spermatozoïdes présents dans la spermathèque était significativement plus faible chez les individus exposés par rapport aux individus non exposés au plus fort débit de dose (respectivement $99,4 \pm 6,8$ et $128,3 \pm 13,8$) (Figure 39 (B)). Des différences significatives entre les deux conditions d'exposition ont également été observées dans l'expression relative du gène *egl-1*. En effet, quel que soit le débit de dose étudié, le niveau d'expression relatif d'*egl-1* pour les individus exposés était significativement plus élevée que pour les individus non exposés (avec une expression relative de $0,11 \pm 0,02$ et $0,16 \pm 0,03$ à 7,1 et 37,1 mGy/h pour les individus exposés et $0,06 \pm 0,02$ et $0,09 \pm 0,04$ à 7,1 et 37,1 mGy/h pour les individus non exposés) (Figure 39 (B)).

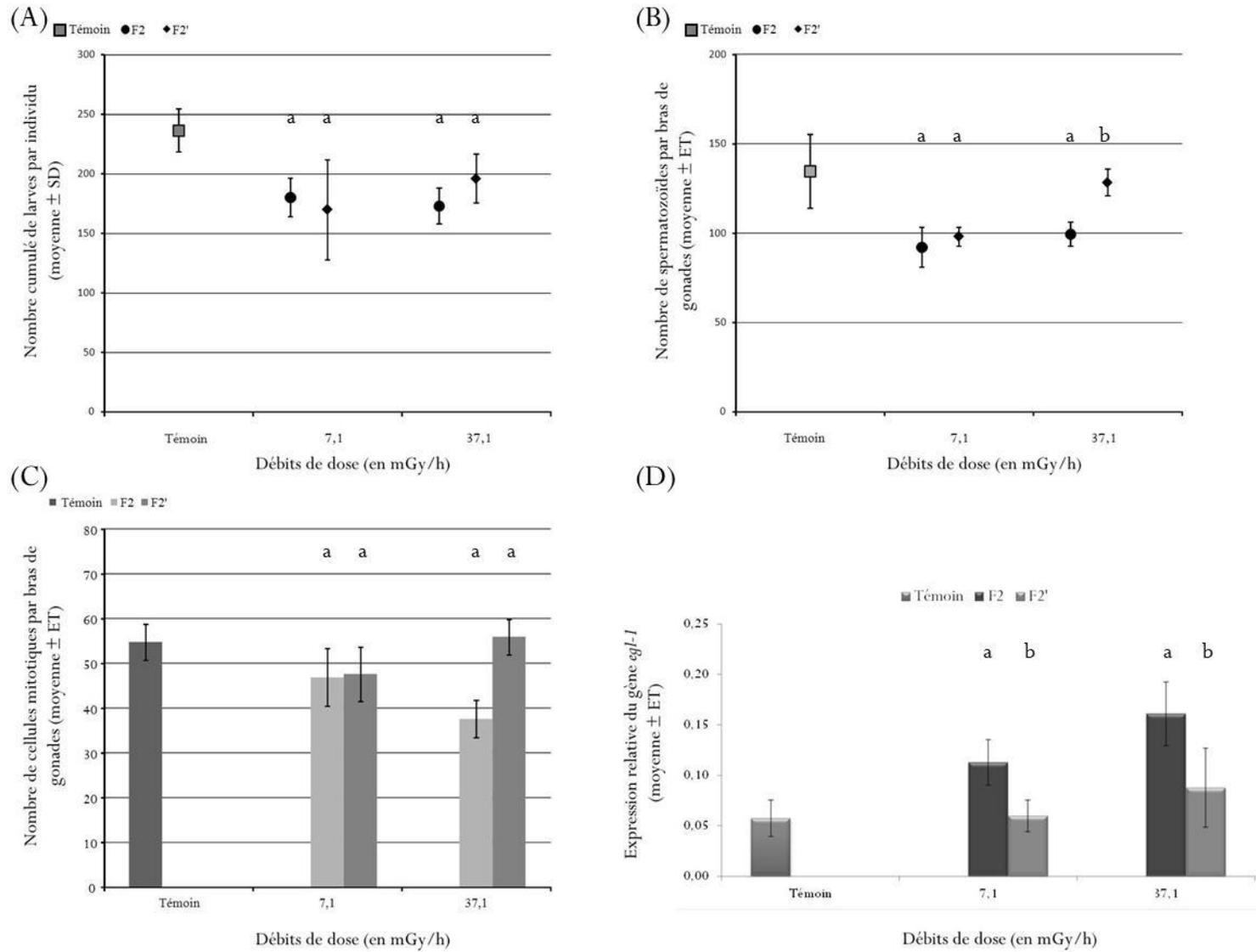


Figure 39. Comparaison entre les individus exposés et les individus non exposés à la troisième génération (F2 et F2'). (A) Nombre cumulé de larves. Chaque point représente le nombre moyen de larves ± écart-type avec n=20; (B) Nombre de spermatozoïdes par bras de gonades. Chaque point représente le nombre moyen de spermatozoïdes ± écart-type avec n=10; (C) Nombre de cellules mitotiques. Chaque point représente le nombre moyen de cellules en mitose ± écart-type avec n=7; (D) Expression relative du gène *egl-1*. Chaque histogramme représente la moyenne de l'expression relative ± écart-type avec n=3 (3 pools de 300 individus). Les lettres présentent les différences significatives entre les générations au sein d'un même débit de dose.

11.3. Discussion

Dans cette étude une approche intégrée des traits d'histoire de vie (nombre cumulé de larves) aux effets subcellulaires pouvant expliquer cet effet phénotypique (étude de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose et du stock de spermatozoïdes) a été utilisée pour étudier les effets multigénérationnels d'une exposition à l'irradiation. De plus, cette approche a été employée avec différents statuts d'exposition avec des générations continuellement exposées et des générations placées en environnement contrôle après exposition parentale.

11.3.1. Reproduction

Les données obtenues dans notre étude ont montré qu'une exposition à des débits de dose de 7,1 et 37,1 mGy/h n'avait pas d'impact sur le taux d'éclosion et la survie des larves, quelle que soit la génération étudiée. L'analyse des résultats a mis en évidence une diminution significative du nombre cumulé de larves par individu par rapport au témoin. Cette différence a été observée chez les individus exposés dès la deuxième génération au plus fort débit de dose. A la troisième génération cet effet apparaît dès 7,1 mGy/h. De plus, les deuxième et troisième générations ont produit un nombre cumulé de larves plus faible que celui de la première génération, quel que soit le débit de dose testé. Ceci suggère une augmentation de la radiosensibilité au cours des générations, ce qui est cohérent avec les données de la littérature décrites au chapitre précédent (Alonzo et al., 2008; Harrison et Anderson, 1994; Knowles et Greenwood, 1994; Marshall, 1962, 1966; Massarin et al., 2010) et avec les résultats obtenus dans l'étude précédente (Chapitre 10). Cette étude confirme également la transmission des effets maternels d'une génération exposée aux descendants non exposés, avec un retour à la normale à la troisième génération, comme cela était observé dans l'expérience précédente (Buisset-Goussen et al., 2014). Il est intéressant de noter que ces différents résultats ont été obtenus sur des individus exposés pendant 65 heures (du stade œuf au stade jeune adulte) avant d'être placés en environnement contrôle jusqu'à la fin de leur reproduction, suggérant que les stades de développement des gonades semblent être particulièrement sensibles à l'irradiation.

Toutefois, dans l'étude précédente, le seuil d'apparition des effets est plus élevé (cf. Chapitre 10). En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le témoin et les différents débits de dose et la première et deuxième génération pour un même débit de dose. Seul un effet au plus fort débit de dose (42,7 mGy/h) a été observé entre la première et la troisième génération. Cette différence pourrait être due au nombre d'individus, qui diffère entre les deux expériences. Dans la précédente expérience, les individus étaient suivis individuellement avec un nombre de réplicats contraint par le dispositif expérimental ($n=7$). Dans ce chapitre, les individus ont été poolés par condition (quatre boîtes de cinq individus), ce qui a permis de diminuer l'influence de la variabilité individuelle, mettant ainsi en évidence des effets potentiellement masqués lors de la première expérience. Une deuxième hypothèse pouvant expliquer les différences entre ces deux expérimentations est le temps d'exposition des individus. En effet, il est intéressant de noter que le seuil d'apparition de l'effet (ici une diminution du nombre cumulé de larves par individu) est plus faible lorsque les individus sont exposés 65 heures (du stade œuf au stade jeune adulte) qu'après 144 heures d'exposition (du stade œuf jusqu'à la fin de la reproduction, temps d'exposition de la précédente expérience). Lorsque les individus sont irradiés jusqu'à la fin de leur reproduction, nous pouvons supposer que les niveaux de dommages radio-induits sont suffisants pour activer des mécanismes de défense, contrairement à des individus exposés pendant 65 heures avant d'être placés en environnement contrôlé.

11.3.2. Etudes mécanistiques sur trois générations exposées

Les effets d'une irradiation chronique aux rayonnements gamma ont été étudiés au niveau cellulaire, par comptage du nombre de cellules spermatiques et de cellules mitotiques. Les données obtenues ont montré qu'un nombre fini d'environ 150 ± 10 spermatozoïdes était présent dans la spermathèque de chaque bras de gonade des témoins, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Félix et Braendle, 2010; Johnston et Dennis, 2012; Sakashita et al., 2010). Ce nombre a été significativement réduit au plus fort débit de dose à la deuxième génération et dès 7,1 mGy/h à la troisième génération, suivant le même schéma que le nombre cumulé de larves par individu. Chez le nématode *C. elegans*, les spermatozoïdes vont féconder les

oocytes, mais également produire une protéine, qui peut être assimilée à une hormone, appelée la MSP (pour major sperm protein). Cette hormone est nécessaire pour induire la maturation des oocytes mais aussi les contractions de la gaine des gonades, ce qui va faciliter l'ovulation (Han et al., 2010; Kim et al., 2013; Pazdernik et Schedl, 2013; Yang et al., 2010). Quand le stock de spermatozoïdes est épuisé, un blocage de la production d'oocytes matures et donc un arrêt de la ponte est observée. La diminution du nombre cumulé de larves par individu a été également associée à une augmentation de l'expression relative du gène *egl-1*. En effet, celle-ci a montré une surexpression de ce gène au plus fort débit de dose à la deuxième génération (3 Gy dose cumulée) et dès 7,1 mGy/h (500 mGy dose cumulée) à la troisième génération. Cette surexpression suggère une augmentation de l'apoptose dans la lignée germinale, ce qui est cohérent avec les données de la littérature disponibles en irradiation aiguë. Dans ce cas, l'exposition s'effectue au stade L4 tardif pour des doses cumulées comprises entre 7,5 et 120 Gy, où l'apoptose radio-induite est dépendante d'*egl-1* (Bailly et al., 2010; Deng et al., 2004; Gartner et al., 2004; Gartner et al., 2000; Sakashita et al., 2010; Schumacher et al., 2005). Concernant le nombre de cellules mitotiques présentes dans la partie distale du bras de la gonade, nos données ont montré qu'il était impacté uniquement au plus fort débit de dose (de 37,1 mGy/h) pour les deuxième et troisième générations, signe que les cellules mitotiques rentrent en arrêt du cycle cellulaire. Ceci expliquerait dans une moindre mesure la diminution du nombre d'embryons pondus, puisqu'aucun effet significatif sur le cycle cellulaire n'a été observé à 7,1 mGy/h. Étonnamment, ces résultats se retrouvent également dans les données de la littérature, mais pour une exposition aiguë à l'irradiation survenant au stade L4 (Bailly et al., 2010; Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005). Ces résultats ont été obtenus pour des doses cumulées comprises entre 10 et 120 Gy, doses environ trois fois supérieures à notre plus forte dose cumulée, qui est d'environ 3 Gy.

Nos résultats indiquent que la diminution du taux de ponte (diminution du nombre cumulé de larves par individu) observée après irradiation chronique est associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes, à une augmentation de l'apoptose radio-induite des cellules de la lignée germinale et dans une moindre mesure à un impact sur le cycle cellulaire des cellules mitotiques (arrêt du cycle). Ces mécanismes radio-induits sont observés en irradiation aiguë, mais pour des doses cumulées plus fortes, et sont également accompagnés d'une diminution du

nombre d'embryons. En effet, une étude menée en irradiation aiguë, sur des doses comprises entre 30 et 120 Gy a montré que le nombre d'embryons produits diminuait de 32 à 58% avec les doses. Des tests moléculaires menés en parallèle ont montré une induction du gène *egl-1* (de 7,8 à 13,8 fois supérieur au témoin) et une diminution du nombre de cellules mitotiques dans la partie distale de la lignée germinale a également été observée (de 60 cellules mitotiques à 20) (Schumacher et al., 2005).

11.3.3. Transmission d'effets maternels

Comme dans le chapitre précédent, les effets sur la reproduction ont été observés chez des individus non exposés après irradiation parentale au sein d'une même génération. Contrairement aux individus exposés, les résultats des tests moléculaires et cellulaires ont montré que seule la diminution du nombre de spermatozoïdes était associée à la diminution du taux de ponte. Le niveau d'expression relative d'*egl-1* est revenu à son état basal et aucune cellule mitotique en arrêt du cycle cellulaire n'a été observée. Les effets observés sur les générations non exposées pourraient être expliqués soit par l'exposition directe des embryons dans la mère, soit par une transmission d'effets maternels aux générations suivantes. Certaines études montrent que les rayonnements ionisants peuvent induire une instabilité génomique au sein de générations non exposées (après exposition de la génération parentale), notamment *via* des processus épigénétiques (Ilnytsky et Kovalchuk, 2011; Kovalchuk, 2013; Kovalchuk et Baulch, 2008; Vandegehuchte et Janssen, 2011; Wiley et al., 1997). Trois mécanismes sont étudiés en épigénétique : (i) la méthylation de l'ADN, (ii) la modification des histones et (iii) les brins d'ARN non codants ou ARN interférent (ARNi) (Jaenisch et Bird, 2003). La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout de groupements méthyles sur la molécule d'ADN, ce qui empêche la fixation des facteurs de transcription. Elle est de plus associée à des états de chromatine condensée (Fenoglio, 2014; Hendrich et Tweedie, 2003; Klose et Bird, 2006; Weber et Schübeler, 2007). De même, certaines modifications des histones (comme la méthylation) vont favoriser la condensation de la chromatine (Rivera et al., 2014; Weidman et al., 2007). Une chromatine condensée (appelée hétérochromatine), réduit l'accessibilité à l'ADN des éléments de transcription et est donc associée à une répression du gène. Les ARNi, quant à eux, jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes en régulant le taux d'ARN messagers traduits

(Meister et Tuschl, 2004; Montgomery et al., 1998). Chez les souris et les rats, de nombreuses études ont montré qu'après exposition des gamètes mâles aux rayonnements ionisants, les effets étaient transmis aux descendants non exposés par le biais de ces trois processus épigénétique (méthylation de l'ADN, modifications des histones et intervention d'ARNi) (Barber et al., 2009; Barber et al., 2006; Filkowski et al., 2010; Koturbash et al., 2006; Tamminga et al., 2008).

La transmission d'effets maternels par des processus épigénétiques a également été décrite chez le nématode *C. elegans* et pourrait expliquer la transmission de dommages aux générations non-exposées observée dans notre étude (Cui et Han, 2007; Wenzel et al., 2011). Comme décrit par Lim et Brunet en 2013, des effets transgénérationnels sur la fertilité et la longévité ont été mis en évidence et impliquent des modifications d'une histone appelée H3K4. Ces modifications (déméthylation de l'histone) ont notamment entraîné une diminution de la taille de ponte due à des dérégulations des gènes de la spermatogénèse (Lim et Brunet, 2013). D'autres travaux ont été menés sur les ARN non codants. Une première étude a montré que la protéine PRG-1, nécessaire à l'accumulation d'ARNi particuliers (piARN), était indispensable au bon déroulement de la spermatogénèse. En effet, les mutants privés de cette fonction présentaient, en présence d'un stress thermique, des spermatocytes différenciés mais peu de spermatozoïdes matures (Wang et Reinke, 2008). De la même manière, les protéines ALG-3 et ALG-4 sont indispensables à l'activation d'un ARNi (ARN 26-G) qui exerce une influence sur la spermatogénèse et sur la transmission d'effets maternels (Conine et al., 2010; Han et al., 2009). Malheureusement, à ce jour, aucune étude n'a été menée sur l'effet des rayonnements ionisants sur les ARNi, et plus particulièrement sur les piARN.

11.4. Conclusion

Dans cette étude nous avons confirmé les résultats obtenus lors de la précédente étude multigénérationnelle, à savoir une diminution significative de la capacité de ponte des individus exposés, une augmentation de la radiosensibilité et des effets transgénérationnels. Les différents tests menés en parallèle au niveau moléculaire et cellulaire ont mis en évidence que la diminution du nombre cumulé de larves par individu était associée à une diminution du stock de spermatozoïdes, à une augmentation de l'apoptose et dans une moindre mesure à un arrêt du

cycle cellulaire (diminution du nombre de cellules mitotiques) chez les générations exposées. Concernant les générations placées en environnement contrôle après exposition parentale, seul le nombre de spermatozoïdes suit le même pattern que le nombre cumulé de larves par individu. Une transmission des dommages de la génération parentale par le biais de processus épigénétique pourrait expliquer les effets observés.

PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

12. Discussion générale

Dans le cadre de ce travail de recherche, une approche intégrée, des traits d'histoire de vie aux mécanismes moléculaires et cellulaires, a été utilisée pour la première fois pour étudier les effets multigénérationnels d'une exposition chronique à l'irradiation chez *C. elegans*.

12.1. Synthèse des résultats

Le tableau page 137 présente une synthèse des principaux résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche et les compare selon différents paramètres.

12.1.1. Cohérence des résultats

Une stratégie en deux étapes a été mise en place afin d'étudier les effets d'une exposition chronique à l'irradiation chez *C. elegans*. Tout d'abord, l'étude des effets d'une irradiation gamma chronique sur les traits d'histoire de vie de *C. elegans* a été effectuée sur une et sur trois générations (Chapitres 9 et 10). L'objectif de l'expérience multigénérationnelle était de tester l'hypothèse d'une augmentation de la sensibilité au fil des générations. Pour cela, trois générations ont été exposées à différents débits de dose. En parallèle, deux générations ont été placées en environnement « contrôle » après exposition parentale, afin de tester une possible transmission des effets maternels. Le deuxième volet de cette thèse a eu pour objectif de caractériser les différents mécanismes subcellulaires pouvant expliquer les effets observés sur les traits d'histoire de vie lors de l'exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants (Chapitre 11).

Ces différentes expériences ont montré que chez *C. elegans* le critère d'effet le plus sensible à une irradiation chronique gamma est la reproduction. Ce résultat est de plus conforté par les données de la littérature obtenues avec d'autres modèles d'invertébrés (Gilbin et al., 2008; Hertel-Aas et al., 2011; Hertel-Aas et al., 2007; Knowles et Greenwood, 1994, 1997). Chez *C. elegans*, cet effet sur la reproduction se caractérise par une diminution systématique du nombre cumulé de larves par individu (Chapitres 9, 10 et 11). En revanche, aucun effet sur le taux d'éclosion ni sur la survie des larves n'a été observé. Il est également intéressant de noter

que les individus exposés du stade œuf au stade jeune adulte (65 heures, Chapitre 11) présentent globalement les mêmes réponses face à une exposition chronique à l'irradiation que les individus exposés du stade œuf jusqu'à la fin de leur reproduction (144 heures, Chapitre 10). En effet, une diminution du nombre cumulé de larves, une augmentation de la radiosensibilité et une transmission d'effet de la génération parentale exposée aux descendants non exposés ont été observés dans les deux cas. Les impacts liés à l'exposition chronique à l'irradiation semblent donc intervenir lors des stades précoces de développement de *C. elegans*, et plus particulièrement lors de la gamétogénèse. Cependant, le seuil d'apparition de cet effet est plus faible lorsque les individus sont exposés jusqu'au stade jeune adulte que lorsque ceux-ci sont exposés jusqu'à la fin de la reproduction. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, le nombre de réplicats et le nombre d'individus utilisés dans ces deux expérimentations sont différents (Tableau 6). Lors du suivi multigénérationnel d'individus exposés jusqu'à la fin de la reproduction, les individus étaient suivis individuellement avec un nombre de réplicats contraint par le dispositif expérimental ($n=7$, Chapitre 10). Lorsque les individus ont été exposés jusqu'au stade jeune adulte, le suivi a été effectué sur des pools d'individus (quatre boîtes de cinq individus) (Chapitre 11). Ceci aurait permis de diminuer l'influence de la variabilité individuelle, mettant ainsi en évidence des effets potentiellement masqués lors de l'expérience précédente. La deuxième hypothèse pouvant expliquer les différences entre ces deux expérimentations est le temps d'exposition des individus. Nous pouvons supposer que lorsque les individus sont irradiés jusqu'à la fin de leur reproduction, les niveaux de dommages radio-induits sont suffisants pour activer des mécanismes de défense, contrairement à des individus pour lesquels l'irradiation se termine plus tôt.

12.1.2. Irradiation aiguë versus irradiation chronique

L'évaluation du risque environnemental lié à l'exposition chronique à l'irradiation repose bien souvent sur l'extrapolation de données obtenues lors d'une exposition aiguë (Copplesstone et al., 2001; Garnier-Laplace et al., 2004).

Or, il est intéressant de noter que lors d'une irradiation aiguë, le principal effet observé sur la reproduction concerne la survie de la progéniture (Bailly et Gartner, 2011; Bailly et al., 2010; Craig et al., 2012; Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005), tandis que dans nos résultats,

ni l'éclosion des œufs, ni la survie des larves ne sont impactées. De plus le taux de ponte (nombre d'œufs pondus sur une heure) diminue chez les individus exposés à de l'irradiation aiguë (Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005), ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Enfin, dans le cadre de l'irradiation aiguë de *C. elegans*, il semblerait qu'un effet sur la fertilité (qualité des descendants) soit observé, tandis que dans nos travaux l'effet concerne la fécondité (capacité à produire des gamètes viables). Ainsi, même si un impact sur la reproduction est observé dans tous les cas, la qualité de l'effet observé serait différente entre exposition chronique et exposition aiguë.

De plus, les doses pour lesquelles ces effets sur la reproduction apparaissent sont plus faibles lors d'une irradiation chronique que lors d'une irradiation aiguë. Dans le cadre de nos travaux de recherche, les nématodes ont été irradiés pour des doses cumulées comprises entre 0,95 Gy et 72,72 Gy, toutes expériences confondues. La dose la plus faible pour laquelle un effet a été observé sur le nombre cumulé de larves par individu sur une génération est de 13,99 Gy et la DDE_{50} a été estimée à environ 18,8 Gy (Chapitre 9). Lors d'une irradiation aiguë au stade L4, une dose de 60 Gy est nécessaire pour conduire à la diminution de 50% de la survie de la progéniture et une dose de 120 Gy est nécessaire pour obtenir une diminution de 60% (Bailly et Gartner, 2011; Bailly et al., 2010; Craig et al., 2012; Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2005). Il est également intéressant de signaler que certains mécanismes moléculaires et cellulaires, comme l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, sont observés à la fois lors d'une irradiation aiguë et lors d'une irradiation multigénérationnelle chronique. Cependant, l'intensité de ces effets diffère entre les deux modes d'exposition. Par exemple, l'expression d'*egl-1* est environ 3 fois supérieure à celle du témoin lors d'une irradiation chronique à 3 Gy, tandis qu'elle est 6,4 fois supérieure au témoin après une exposition aiguë à 15 Gy (dose 5 fois plus élevée que celle de l'irradiation chronique).

Nos travaux ont permis d'apporter des connaissances sur les effets phénotypiques d'une exposition chronique à l'irradiation et sur les mécanismes moléculaires et cellulaires associés. De plus, nos résultats confirment que les effets induits par une irradiation chronique diffèrent en qualité et en intensité de ceux induits par une irradiation aiguë, mettant ainsi en évidence les limites de l'extrapolation de données obtenues pour une exposition aiguë dans le but de prédire les effets d'une exposition chronique.

PARAMETRES	SUIVI SUR UNE GENERATION	SUIVI MULTIGENERATIONNEL	ETUDE MULTIGENERATIONNELLE DES MECANISMES	
Nombre de réplicats	10 boîtes x 1 individu	7 boîtes x 1 individu	4 boîtes x 5 individus	
Temps d'exposition	stade œuf → fin de la reproduction (216 heures)	stade œuf → fin de la reproduction (144 heures)	stade œuf → stade jeune adulte (65 heures)	
Croissance	Pas d'effet			
Reproduction	Diminution du nombre cumulé de larves par individu			
Effet transgénérationnel	NA	OUI Pas d'effet du débit de dose au sein des générations Différences entre F1 et F1' au plus faible débit de dose (8,1 mGy/h)	OUI Effet significatif du débit de dose (7,1 et 37,1 mGy/h) à la génération F1' et du plus faible débit de dose (7,1 mGy/h) à la génération F2' Différences entre F1 et F1' au plus faible débit de dose (7,1 mGy/h)	
Augmentation de la radiosensibilité	NA	OUI Pas d'effet du débit de dose au sein des générations Pas de différence significative entre F0 et F1 ni entre F1 et F2 Différence F0 - F2 au plus fort débit de dose (42,7 mGy/h)	OUI Différences témoins-exposés F1 au plus fort débit de dose (37,1 mGy/h) Différences témoins-exposés F2 dès le plus faible débit de dose (7,1 mGy/h) Différences F0-F1-F2 au plus fort débit de dose (37,1 mGy/h) Différence F0-F2 au plus faible débit de dose (7,1 mGy/h)	
Effets subcellulaires	NA	NA	Génération exposées	Génération placées en environnement contrôlé
			Diminution du nombre de spermatozoïdes Diminution du nombre de cellules mitotiques Augmentation de l'apoptose	Diminution du nombre de spermatozoïdes

Tableau 6. Tableau de synthèse des différents résultats obtenus dans le cadre de ce doctorat. Les différences de paramètres entre les différentes expérimentations sont présentées en rouge et les similitudes sont présentées en vert. NA signifie que le paramètre n'a pas été testé dans l'expérimentation.

12.2. Etude sur trois générations

L'exposition multigénérationnelle de *C. elegans* a été effectuée sur trois générations continuellement exposées et sur deux générations placées en environnement contrôle après exposition parentale. Comme le montrent nos résultats, l'étude des effets sur une seule génération ne peut pas être extrapolée aux générations suivantes. En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence à la première génération exposée, alors qu'une augmentation de la radiosensibilité, c'est-à-dire une aggravation des effets est observée aux générations suivantes (Chapitre 11 et 12).

Cependant, nous pouvons nous demander si le nombre de générations étudiées est pertinent d'un point de vue écologique et est suffisant pour évaluer les effets d'une irradiation chronique sur les populations. En effet, la plupart des études menées sur les populations montrent que les effets observés sur les trois premières générations sont principalement dus à des effets maternels (Dodenhoff et al., 1999; Dutilleul, 2013; Goussen, 2013; Morgan et al., 2007). Ce sont des phénomènes d'acclimatation, où la population exposée est génétiquement semblable à la population contrôle. Si le stress est arrêté, un retour à la normale est généralement observé. Au-delà de quatre générations, les effets maternels s'estompent et des phénomènes d'adaptation peuvent apparaître, entraînant des changements de génotype. Ces changements vont permettre aux individus de mieux résister au stress auquel ils sont exposés mais en contrepartie sont susceptibles de limiter la capacité à répondre efficacement à d'autres stress. Dans notre dernière étude, les individus exposés à la troisième génération au plus fort débit de dose sont significativement impactés par rapport au témoin mais pondent significativement plus que les individus de la deuxième génération (Chapitre 12), suggérant une meilleure résistance face à l'irradiation et donc un début d'adaptation. Cependant, ce résultat n'a été obtenu que dans une seule expérience et reste à confirmer.

12.3. **Evaluation du risque**

12.3.1. **Changement d'échelle**

Dans le cadre de ce projet de recherche nous avons étudié plusieurs mécanismes moléculaires susceptibles d'expliquer les effets phénotypiques observés sur trois générations (diminution du nombre cumulé de larves). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que lors d'une exposition multigénérationnelle continue, la diminution du nombre cumulé de larves est associée à (i) une diminution du nombre de cellules mitotiques, (ii) une augmentation de l'apoptose des cellules germinales et (iii) une diminution du nombre de spermatozoïdes. Il est intéressant de noter que cette observation ne semble pas s'appliquer pour les générations placées en environnement contrôle après exposition parentale, pour lesquelles seul le nombre de spermatozoïdes est diminué. Les mécanismes biologiques sont complexes et de nombreuses questions sont soulevées au regard des résultats obtenus dans cette thèse. Des travaux complémentaires doivent être entrepris afin d'expliquer la diminution du nombre de spermatozoïdes observée chez les individus exposés et les individus non-exposés. Un impact au niveau de la spermatogénèse (formation de spermatozoïdes) et/ou sur la spermiogénèse (activation des spermatozoïdes) dû à la production ou à la persistance de cassures double-brin pourrait expliquer cette diminution.

L'objectif de l'approche intégrée utilisée dans ce projet de doctorat était de cibler des mécanismes subcellulaires sous-jacents aux traits d'histoire de vie étudiés, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action d'une exposition chronique à l'irradiation, comme cela a déjà été réalisé lors d'expositions à des substances chimiques. (Swain et al., 2010; Wren et al., 2011). Cette approche devrait permettre, à terme, de faire le lien entre les mécanismes moléculaires et cellulaires précoces et sensibles et les conséquences sur la population, paramètre plus pertinent d'un point de vue écologique. L'application d'une telle approche nécessite néanmoins de travailler sur un organisme modèle dont la physiologie, les différents stades de développement, ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires associés, ont été particulièrement bien caractérisés.

12.3.2. **Pertinence et sensibilité des marqueurs utilisés**

Les marqueurs moléculaires et cellulaires étudiés dans cette thèse répondent plus précocement (65 heures) que les marqueurs phénotypiques (environ 130 heures pour avoir la reproduction totale). L'utilisation de ces marqueurs pourrait permettre de s'affranchir de la réalisation d'études sur la reproduction, plus coûteuses en temps et en matériel. Cependant, ces biomarqueurs, bien que pertinents vis-à-vis de la reproduction, semblent peu sensibles. En effet, nos résultats montrent que les seuils d'apparition d'un effet sont comparables pour les marqueurs subcellulaires et phénotypiques, voire supérieurs dans le cas de l'arrêt du cycle cellulaire. A terme, la mesure de marqueurs précoces et sensibles devrait permettre d'anticiper les conséquences d'une exposition à des substances toxiques sur l'individu et la population.

13. Perspectives

Dans le cadre de ce projet de recherche, l'utilisation d'une approche intégrée pour évaluer les effets multigénérationnels d'une exposition chronique à l'irradiation a été utilisée. Plusieurs travaux pourraient être effectués dans le but d'améliorer les connaissances sur des effets liés à ce type d'exposition.

Tout d'abord l'exploration des différentes pistes précitées pour améliorer la compréhension des mécanismes d'action qui sont sous-jacents aux effets sur la reproduction pourrait être réalisée. Cette détection peut se faire en marquant une protéine de réparation caractéristique des cassures double-brin, RAD-51, à l'aide d'anticorps spécifique à la protéine (principe de l'immunohistochimie). Etudier les phénomènes épigénétiques, tels que les ARNi jouant un rôle important dans le développement de la lignée germinale (Aravin et al., 2007; Thomson et Lin, 2009), pourrait également apporter plus de précisions sur les effets transgénérationnels. Il serait donc intéressant d'étudier plus particulièrement les ARNpi (qui jouent un rôle dans la surveillance du génome mais aussi et surtout dans le développement de la lignée germinale). Pour ce faire, il pourrait être possible soit de marquer les protéines PRG-1, ALG-3 et ALG-4, ayant une influence sur la spermatogénèse et la transmission d'effets maternels par immunohistochimie, soit d'étudier l'expression des gènes associés à ces protéines.

Par la suite, les données obtenues sur la reproduction dans le cadre de ce doctorat pourraient être intégrées dans des modèles mécanistiques. L'avantage d'utiliser un modèle mécanistique, tel que le DEBtox permettrait une description plus fine par analyse simultanée des traits d'histoire de vie liés à la croissance et à la reproduction, comme cela a été démontré avec l'uranium (Goussen, 2013). Afin d'extrapoler les effets individuels au niveau populationnel, l'utilisation de modèles de dynamique de population, de type matrice de Leslie par exemple, pourraient être utilisés (Massarin, 2010).

La pollution chronique par les radioéléments est une exposition longue, qui peut s'étendre sur plusieurs années selon l'élément radioactif (la demi-vie du césium 137 par exemple est de 30 ans). Il serait donc pertinent de réaliser des expériences sur plus de trois générations, comme cela a déjà été réalisé sur l'uranium (Goussen, 2013). De plus, les individus dans

l'environnement sont rarement en contact avec une seule source de polluant, et dans le cas d'accident nucléaire, une contamination chimique est également observée. Il pourrait être intéressant d'étudier les effets d'une irradiation couplée avec les effets d'un contaminant chimique, tel que le plomb, comme cela a déjà été réalisé avec d'autres stressseurs (Zeman, 2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, pp. 67-103.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Bourrachot, S., Floriani, M., Morello, M., Garnier-Laplace, J., 2006. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 80, 228-236.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F., Garnier-Laplace, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 87, 146-156.
- Altun, Z., Hall, D., 2005. Handbook of *C. elegans* Anatomy. WormAtlas.
- Altun, Z., Hall, D., 2009a. Epithelial system, hypodermis. WormAtlas.
- Altun, Z., Hall, D., 2009b. Epithelial system, seam cells. WormAtlas.
- Altun, Z., Hall, D., 2009c. Introduction. WormAtlas.
- Anderson, G.L., Boyd, W.A., Williams, P.L., 2001. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 833-838.
- Anderson, G.L., Cole, R.D., Williams, P.L., 2004. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1235-1240.
- Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102, 9.
- Angelo, G., Van Gilst, M.R., 2009. Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 326, 954-958.
- Araiz, C., Château, M.-T., Descamps, S., Galas, S., 2008. Génomique quantitative chez *Caenorhabditis elegans*: stratégies pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux mécanismes moléculaires chez l'homme. *IRBM* 29, 289-296.
- Aravin, A.A., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2007. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761-764.
- ASTM E2172-01, 2008. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *C. elegans*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Bailly, A., Gartner, A., 2011. *Caenorhabditis elegans* Radiation Responses, Molecular Determinants of Radiation Response. Springer, pp. 101-123.
- Bailly, A., Gartner, A., 2013. Germ cell apoptosis and DNA damage responses, Germ Cell Development in *C. elegans*. Springer, pp. 249-276.

- Bailly, A.P., Freeman, A., Hall, J., Déclais, A.-C., Alpi, A., Lilley, D.M., Ahmed, S., Gartner, A., 2010. The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS genetics* 6, e1001025.
- Barber, R.C., Hardwick, R.J., Shanks, M.E., Glen, C.D., Mughal, S.K., Voutounou, M., Dubrova, Y.E., 2009. The effects of in utero irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 664, 6-12.
- Barber, R.C., Hickenbotham, P., Hatch, T., Kelly, D., Topchiy, N., Almeida, G.M., Jones, G.D., Johnson, G., Parry, J., Rothkamm, K., 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 25, 7336-7342.
- Barbuto, M., Zullini, A., 2005. The nematode community of two Italian rivers (Taro and Ticino). *Nematology* 7, 667-676.
- Barrière, A., Félix, M.-A., 2005a. High Local Genetic Diversity and Low Outcrossing Rate in *Caenorhabditis elegans* Natural Populations. *Current Biology* 15, 1176-1184.
- Barrière, A., Félix, M.-A., 2005b. Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*.
- Baulch, J.E., Raabe, O.G., 2005. Gamma irradiation of Type B spermatogonia leads to heritable genomic instability in four generations of mice. *Mutagenesis* 20, 337-343.
- Baulch, J.E., Raabe, O.G., Wiley, L.M., 2001. Heritable effects of paternal irradiation in mice on signaling protein kinase activities in F3 offspring. *Mutagenesis* 16, 17-23.
- Becker, R.A., Borgert, C.J., Webb, S., Ansell, J., Amundson, S., Portier, C.J., Goldberg, A., Bruner, L.H., Rowan, A., Curren, R.D., 2006. Report of an ISRTP Workshop: Progress and barriers to incorporating alternative toxicological methods in the US. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46, 18-22.
- Beresford, N., Brown, J., Copplestone, D., Garnier-Laplace, J., Howard, B., Larsson, C.-M., Oughton, D., Prohl, G., Zinger, I., 2007. D-ERICA: An integrated approach to the assessment and management of environmental risk from ionising radiation. Description of purpose, methodology and application.
- Bertrand, P., Lebeau, J., Lecomte-Pradines, C., Rigaud, O., Lopez, B., 2009. Réponses au niveau cellulaire et conséquences, in: Lavoisier (Ed.), *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, p. 746.
- Biermans, G., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Saenen, E., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2015. *Arabidopsis thaliana* seedlings show an age-dependent response on growth and DNA repair after exposure to chronic γ -radiation. *Environmental and Experimental Botany* 109, 122-130.

- Blelloch, R., Anna-Arriola, S.S., Gao, D., Li, Y., Hodgkin, J., Kimble, J., 1999. The *gon-1* Gene Is Required for Gonadal Morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 216, 382-393.
- Blelloch, R., Kimble, J., 1999. Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399, 586-590.
- Boucheseiche, C., Cremille, E., Pelte, T., Pojer, K., 2002. Pollution toxique et écotoxicologique: notions de base. Guide technique.
- Box, G.E., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 211-252.
- Boxem, M., Srinivasan, D.G., van den Heuvel, S., 1999. The *Caenorhabditis elegans* gene *ncc-1* encodes a *cdc2*-related kinase required for M phase in meiotic and mitotic cell divisions, but not for S phase. *Development* 126, 2227-2239.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Brown, J.E., Alfonso, B., Avila, R., Beresford, N.A., Copplestone, D., Pröhl, G., Ulanovsky, A., 2008. The ERICA Tool. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1371-1383.
- Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Radioactivity* 137, 190-197.
- Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology* 51, 23-33.
- Cassada, R.C., Russell, R.L., 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 46, 326-342.
- Caswell-Chen, E., Chen, J., Lewis, E., Douhan, G., Nadler, S., Carey, J., 2005. Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history: ecology of longevity. *Science's SAGE KE* 2005, pe30.
- Chen, G., de Boer, T.E., Wagelmans, M., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2014. Integrating transcriptomics into triad-based soil-quality assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 900-909.
- Chen, J., Caswell-Chen, E.P., 2004. Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of nematology* 36, 107.
- Choi, J., Tsyusko, O., Unrine, J., Chatterjee, N., Ahn, J.-M., Yang, X., Thornton, L., Ryde, I., Starnes, D., Meyer, J., 2014. A micro-sized model for the in vivo studies of nanoparticle toxicity: What has *Caenorhabditis elegans* taught us? *Environmental Chemistry*.
- Clejan, I., Boerckel, J., Ahmed, S., 2006. Developmental Modulation of Nonhomologous End Joining in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 173, 1301-1317.

Committee on Developmental Toxicology, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council, 2000. Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment. The National Academies Press.

Conine, C.C., Batista, P.J., Gu, W., Claycomb, J.M., Chaves, D.A., Shirayama, M., Mello, C.C., 2010. Argonautes ALG-3 and ALG-4 are required for spermatogenesis-specific 26G-RNAs and thermotolerant sperm in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 3588-3593.

Connon, R., Hooper, H.L., Sibly, R.M., Lim, F.-L., Heckmann, L.-H., Moore, D.J., Watanabe, H., Soetaert, A., Cook, K., Maund, S.J., Hutchinson, T.H., Moggs, J., Coen, W.D., Iguchi, T., Callaghan, A., 2008. Linking Molecular and Population Stress Responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. Environmental science & technology 42, 2181-2188.

Conradt, B., Horvitz, H.R., 1998. The *C. elegans* Protein EGL-1 Is Required for Programmed Cell Death and Interacts with the Bcl-2-like Protein CED-9. Cell 93, 519-529.

Conradt, B., Xue, D., 2005. Programmed cell death.

Coppenger, C.J., Brown, S.O., 1967. The gross manifestations of continuous gamma irradiation on the prenatal rat. Radiation Research 31, 230-242.

Copplestone, D., Bielby, S., Jones, S., Patton, D., Daniel, P., Gize, I., 2001. Impact Assessment of ionising Radiation on Wildlife. Environment Agency, UK (Freshwater Biological Association), p. 222.

Copplestone, D., Hingston, J., Real, A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. Journal of Environmental Radioactivity 99, 1456-1463.

Coutellec, M.-A., Barata, C., 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. Ecotoxicology 20, 493-496.

Craig, A.L., Moser, S.C., Bailly, A.P., Gartner, A., 2012. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line. Methods Cell Biol 107, 321-352.

Crittenden, S.L., Eckmann, C.R., Wang, L., Bernstein, D.S., Wickens, M., Kimble, J., 2003. Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 358, 1359-1362.

Cui, M., Han, M., 2007. Roles of chromatin factors in *C. elegans* development.

Dallas, L.J., Keith-Roach, M., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2012. Assessing the Impact of Ionizing Radiation on Aquatic Invertebrates: A Critical Review. Radiation Research 177, 693-716.

Delacroix, D., Guerre, J.-P., Leblanc, P., 2012. Guide pratique radionucléides et radioprotection (Nelle édition): Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible et moyenne activité. EDP sciences.

Deng, X., Hofmann, E.R., Villanueva, A., Hobert, O., Capodici, P., Veach, D.R., Yin, X., Campodonico, L., Glekas, A., Cordon-Cardo, C., 2004. *Caenorhabditis elegans* ABL-1 antagonizes p53-mediated germline apoptosis after ionizing irradiation. *Nature genetics* 36, 906-912.

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

Dhawan, R., Dusenbery, D.B., Williams, P.L., 2000. A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 3061-3067.

Dodenhoff, J., Van Vleck, L.D., Gregory, K., 1999. Estimation of direct, maternal, and grandmaternal genetic effects for weaning weight in several breeds of beef cattle. *Journal of animal science* 77, 840-845.

Donà, M., Ventura, L., Macovei, A., Confalonieri, M., Savio, M., Giovannini, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A., 2013. Gamma irradiation with different dose rates induces different DNA damage responses in *Petunia x hybrida* cells. *Journal of Plant Physiology* 170, 780-787.

Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.-P., Testard, I., Cadet, J., 2006. Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *International journal of radiation biology* 82, 119-127.

Dubrova, Y.E., 2003a. Long-term genetic effects of radiation exposure. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 433-439.

Dubrova, Y.E., 2003b. Radiation-induced transgenerational instability. *Oncogene* 22, 7087-7093.

Dutilleul, M., 2013. Réponses microévolutives et coûts adaptatifs de populations de *Caenorhabditis elegans* exposées à des stress environnementaux.

Dutilleul, M., Lemaire, L., Réale, D., Lecomte, C., Galas, S., Bonzom, J.-M., 2013. Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology*, 1-7.

Ellis, R., Schedl, T., 2007. Sex determination in the germ line.

Environnement-Canada, 2005. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests (Including June 2007 Amendments), in: Scroggins, R.P. (Ed.), *Environmental Protection Series, EPS 1/RM/46*, p. 241.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.

Fedorenkova, A., Vonk, J.A., Lenders, H.R., Ouborg, N.J., Breure, A.M., Hendriks, A.J., 2010. Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations. *Environmental science & technology* 44, 4328-4333.

Félix, M.-A., Braendle, C., 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 20, R965-R969.

Fenoglio, C., 2014. Genetics and Epigenetics: Basic Concepts, Neurodegenerative Diseases. Springer, pp. 1-15.

Filkowski, J.N., Ilnytsky, Y., Tamminga, J., Koturbash, I., Golubov, A., Bagnyukova, T., Pogribny, I.P., Kovalchuk, O., 2010. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression. *Carcinogenesis* 31, 1110-1115.

Foray, N., Arlett, C.F., Malaise, E.P., 1997. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look. *Biochimie* 79, 567-575.

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, 1544-1556.

Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.

Fuma, S., Une, Y., Ihara, S., Matsui, K., Kudo, T., Tokiwa, T., Kubota, Y., Soeda, H., Ishikawa, T., Doi, K., Watanabe, Y., Yoshida, S., 2014. Effects of chronic γ -irradiation on growth and survival of the Tohoku hynobiid salamander, *Hynobius lichenatus*. *Journal of Environmental Radioactivity* 135, 84-92.

Garnier-Laplace, J., Gilek, M., Sundell-Bergman, S., Larsson, C.M., 2004. Assessing ecological effects of radionuclides: Data gaps and extrapolation issues. *Journal of Radiological Protection* 24, A139-A155.

Gartner, A., MacQueen, A.J., Villeneuve, A.M., 2004. Methods for analyzing checkpoint responses in *Caenorhabditis elegans*, *Checkpoint Controls and Cancer*. Springer, pp. 257-274.

Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., Hengartner, M.O., 2000. A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular cell* 5, 435-443.

Gault, N., n.d. Réponse précoce aux rayonnements ionisants: effets moléculaires et cellulaires.

Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling* 19, 1807-1819.

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

Geras'kin, S., Evseeva, T., Oudalova, A., 2013. Effects of long-term chronic exposure to radionuclides in plant populations. *Journal of Environmental Radioactivity* 121, 22-32.

- Geras'kin, S., Oudalova, A., Dikareva, N., Spiridonov, S., Hinton, T., Chernonog, E., Garnier-Laplace, J., 2011. Effects of radioactive contamination on Scots pines in the remote period after the Chernobyl accident. *Ecotoxicology* 20, 1195-1208.
- 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.
- Golden, J.W., Riddle, D.L., 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental biology* 102, 368-378.
- Goussen, B., 2013. Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactif. AgroParisTech.
- Goussen, B., Parisot, F., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Péry, A.R., Bonzom, J.-M., 2013. Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*, 1-10.
- Greenstein, D., 2005. Control of oocyte meiotic maturation and fertilization.
- Guo, X., Sun, J., Bian, P., Chen, L., Zhan, F., Wang, J., Xu, A., Wang, Y., Hei, T.K., Wu, L., 2013. Radiation-Induced Bystander Signaling from Somatic Cells to Germ Cells in *Caenorhabditis elegans*. *Radiation Research* 180, 268-275.
- Hall, D.H., Winfrey, V.P., Blaeuer, G., Hoffman, L.H., Furuta, T., Rose, K.L., Hobert, O., Greenstein, D., 1999. Ultrastructural Features of the Adult Hermaphrodite Gonad of *Caenorhabditis elegans*: Relations between the Germ Line and Soma. *Developmental biology* 212, 101-123.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press.
- Han, S.M., Cottee, P.A., Miller, M.A., 2010. Sperm and oocyte communication mechanisms controlling *C. elegans* fertility. *Developmental dynamics* 239, 1265-1281.
- Han, T., Manoharan, A.P., Harkins, T.T., Bouffard, P., Fitzpatrick, C., Chu, D.S., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, J.K., 2009. 26G endo-siRNAs regulate spermatogenic and zygotic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18674-18679.
- Handy, R.D., Cornelis, G., Fernandes, T., Tsyusko, O., Decho, A., Sabo-Attwood, T., Metcalfe, C., Steevens, J.A., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., 2012. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 15-31.
- Hansen, D., Wilson-Berry, L., Dang, T., Schedl, T., 2004. Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. *Development* 131, 93-104.

Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1994. Effects of acute irradiation on reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiation Research* 137, 59-66.

Hart, A.C., 2006. Behavior (July 3, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1.

Hartman, P.S., Herman, R.K., 1982. Somatic damage to the X chromosome of the nematode *Caenorhabditis elegans* induced by gamma radiation. *Molecular and General Genetics* MGG 187, 116-119.

Hayashi, M., Chin, G.M., Villeneuve, A.M., 2007. *C. elegans* Germ Cells Switch between Distinct Modes of Double-Strand Break Repair During Meiotic Prophase Progression. *PLoS Genet* 3, e191.

Hendrich, B., Tweedie, S., 2003. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends in Genetics* 19, 269-277.

Hertel-Aas, T., Brunborg, G., Jaworska, A., Salbu, B., Oughton, D.H., 2011. Effects of different gamma exposure regimes on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Science of the total environment* 412, 138-147.

Hertel-Aas, T., Oughton, D.H., Jaworska, A., Bjerke, H., Salbu, B., Brunborg, G., 2007. Effects of Chronic Gamma Irradiation on Reproduction in the Earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiation Research* 168, 515-526.

Hinton, T.G., Coughlin, D., Yi, Y., Glenn, T., Zimbrick, J., 2012. Reproductive Effects from Chronic, Multigenerational, Low Dose Rate Exposures to Radiation. *Radiobiology and Environmental Security*, 219-232.

Hirschmann, H., 1951. Die Nematoden der Wassergrenze mittelfränkischer Gewässer.

Hitchcock, D., Black, M., Williams, P., 1997. Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing. *Archives of environmental contamination and toxicology* 33, 252-260.

Hiyama, A., Nohara, C., Kinjo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A., Otaki, J.M., 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly, *Scientific reports*, p. 10.

Hodgkin, J., Partridge, F.A., 2008. *Caenorhabditis elegans* meets microsporidia: the nematode killers from Paris. *PLoS biology* 6, e1000005.

Hope, I.A., 1999. Background in *Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*: a practical approach. Oxford University Press pp. 1-15.

Höss, S., Jansch, S., Moser, T., Junker, T., Römbke, J., 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1811-1818.

HPA Advisory Group on Ionising Radiation (AGIR), 2013. Evidence for Transgenerational Effects Following Exposure to Ionising Radiation. A briefing note prepared by a subgroup of the Advisory Group on Ionising Radiation.

Hsu, S.-M., Yeh, S.-H., Lin, M.-S., Chen, W.-L., 2006. Comparison on characteristics of radiophotoluminescent glass dosimeters and thermoluminescent dosimeters. *Radiation Protection Dosimetry* 119, 327-331.

Hubbard, E.J.A., Greenstein, D., 2005. Introduction to the germ line.

Hyodo-Taguchi, Y., Etoh, H., 1986. Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka: II. Diminished Reproductive Capacity Following Embryonic Exposure. *Radiation Research* 106, 321-330.

ICRP, 1977. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 26. *Annals of the ICRP* 1.

Ilnytsky, Y., Kovalchuk, O., 2011. Non-targeted radiation effects—An epigenetic connection. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 714, 113-125.

Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Esserméant, L., Ferard, J.-F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45, 659-669.

ISO, 2010. Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO/DIS 10872. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33, 245-254.

Jager, T., Álvarez, O., Kammenga, J., Kooijman, S., 2005. Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Functional Ecology* 19, 136-144.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 1-17.

Johnston, W.L., Dennis, J.W., 2012. The eggshell in the *C. elegans* oocyte-to-embryo transition. *genesis* 50, 333-349.

Junot, C., Prat, O., Malard, V., Adam-Guillermin, C., Sauvaigo, S., Douki, T., Ravanat, J.L., Petitot, F., 2009. Nouveaux outils de détection et d'analyse: indicateurs de génotoxicité, toxicogénomique, protéomique, métabolomique, in: Lavoisier (Ed.), *Toxicologie nucléaire et environnementale*, p. 746.

Kalogeropoulos, N., Christoforou, C., Green, A.J., Gill, S., Ashcroft, N.R., 2004. *chk-1* is an Essential Gene and is Required for an S-M Checkpoint During Early Embryogenesis. *Cell Cycle* 3, 1194-1198.

Kessin, R.H., Gundersen, G.G., Zaydfudim, V., Grimson, M., 1996. How cellular slime molds evade nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 4857-4861.

Kim, S., Spike, C., Greenstein, D., 2013. Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*, *Germ Cell Development in C. elegans*. Springer, pp. 277-320.

Kimble, J., White, J., 1981. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 81, 208-219.

Klose, R.J., Bird, A.P., 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* 31, 89-97.

Knowles, J., Greenwood, L., 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (polychaeta, dorvilleidae). *Marine Environmental Research* 38, 207-224.

Knowles, J., Greenwood, L., 1997. A comparison of the effects of long-term β - and γ -irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *Journal of Environmental Radioactivity* 34, 1-7.

Koturbash, I., Baker, M., Loree, J., Kutanzi, K., Hudson, D., Pogribny, I., Sedelnikova, O., Bonner, W., Kovalchuk, O., 2006. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability *in vivo*. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 66, 327-330.

Kovalchuk, I., Molinier, J., Yao, Y., Arkhipov, A., Kovalchuk, O., 2007. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 624, 101-113.

Kovalchuk, O., 2013. Epigenetic Effects of Ionizing Radiation, *Environmental Epigenomics in Health and Disease*. Springer, pp. 99-126.

Kovalchuk, O., Arkhipov, A., Barylyak, I., Karachov, I., Titov, V., Hohn, B., Kovalchuk, I., 2000. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 449, 47-56.

Kovalchuk, O., Baulch, J.E., 2008. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects—is there a link? *Environmental and molecular mutagenesis* 49, 16-25.

Kovalchuk, O., Burke, P., Besplug, J., Slovack, M., Filkowski, J., Pogribny, I., 2004. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 548, 75-84.

- L'Hernault, S., 1997. Spermatogenesis, in: Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B. (Eds.), *C. elegans* II, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 417-500.
- Lance, E., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., 2012. Modelling population-level consequences of chronic external gamma irradiation in aquatic invertebrates under laboratory conditions. *Science of the total environment* 429, 206-214.
- Lant, B., Derry, W.B., 2014. Induction of Germline Apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Protocols 2014, pdb. prot080192.
- Larsson, C.-M., 2008. An overview of the ERICA Integrated Approach to the assessment and management of environmental risks from ionising contaminants. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1364-1370.
- Larsson, C.M., 2004. The FASSET Framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems—an overview. *Journal of Radiological Protection* 24, A1.
- Lee, S.-J., Yook, J.-S., Han, S.M., Koo, H.-S., 2004. A Werner syndrome protein homolog affects *C. elegans* development, growth rate, life span and sensitivity to DNA damage by acting at a DNA damage checkpoint. *Development* 131, 2565-2575.
- Lemmens, B.B., Johnson, N.M., Tijsterman, M., 2013. COM-1 promotes homologous recombination during *Caenorhabditis elegans* meiosis by antagonizing Ku-mediated non-homologous end joining. *PLoS genetics* 9, e1003276.
- Lemmens, B.L.G., Tijsterman, M., 2011. DNA double-strand break repair in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* 120, 1-21.
- Leonard, A., Delpoux, M., Meyer, R., Decat, G., Leonard, E., 1985. Effect of an enhanced natural radioactivity on mammal fertility. *Science of the total environment* 45, 535-542.
- Leung, M.C., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological sciences* 106, 5-28.
- Lim, J.P., Brunet, A., 2013. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends in Genetics* 29, 176-186.
- Lints, R., Hall, D., 2009a. Reproductive system, overview. WormAtlas.
- Lints, R., Hall, D.H., 2009b. Reproductive system, germline. WormAtlas.
- Lopez-Contreras, A., Fernandez-Capetillo, O., 2012. Signalling DNA Damage.
- Lui, D.Y., Colaiácovo, M.P., 2013. Meiotic development in *Caenorhabditis elegans*, Germ Cell Development in *C. elegans*. Springer, pp. 133-170.

Lüning, K., Frölen, H., Nilsson, A., 1976. Dominant lethal tests of male mice given ²³⁹Pu salt injections. *Biological and environmental effects of low level radiation* 1, 39-49.

Marshall, J.S., 1962. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. *Ecology* 43, 598-607.

Marshall, J.S., 1966. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress. *Ecology*, 561-571.

Martin, J.S., Winkelmann, N., Petalcorin, M.I.R., McIlwraith, M.J., Boulton, S.J., 2005. RAD-51-Dependent and -Independent Roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-Related Protein during DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 25, 3127-3139.

Massarin, S., 2010. Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Aix Marseille 2.

Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.-C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 99, 309-319.

Maupas, E., 1901. Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie expérimentale et générale* 8, 463-624.

McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T., Schedl, T., 1997. Soma–Germ Cell Interactions in *Caenorhabditis elegans*: Multiple Events of Hermaphrodite Germline Development Require the Somatic Sheath and Spermathecal Lineages. *Developmental biology* 181, 121-143.

McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T., Schedl, T., 1999. On the Control of Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 205, 111-128.

McVey, K., Mink, J., Snapp, I., Timberlake, W., Todt, C., 2012. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model System for Pesticide Neurotoxicity. *J Environment Analytic Toxicol S* 4, 2161-0525.

Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.

Ménager, M.-T., Garnier-Laplace, J., Goyffon, M., 2009. Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. Paris: Lavoisier. Editions Tec & Doc.

Mengert, H., 1953. Nematoden und Schnecken. *Z. Morph. u. Okol. Tiere* 41, 311-349.

Menzel, R., Swain, S.C., Hoess, S., Claus, E., Menzel, S., Steinberg, C.E., Reifferscheid, G., Stürzenbaum, S.R., 2009. Gene expression profiling to characterize sediment toxicity—a pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *BMC genomics* 10, 160.

Merrifield, M., Kovalchuk, O., 2013. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Frontiers in genetics* 4.

Miller, D.M., Shakes, D.C., 1995. Chapter 16 Immunofluorescence Microscopy, in: Henry, F.E., Diane, C.S. (Eds.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 365-394.

Mimitou, E.P., Symington, L.S., 2009. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA repair* 8, 983-995.

Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P.-M., Cotellet, S., Ferard, J.-F., 2005. Assessment of the genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *Journal of Environmental Radioactivity* 81, 143-153.

Miracle, A.L., Ankley, G.T., 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive Toxicology* 19, 321-326.

Monteiro, L., Brinke, M., dos Santos, G., Traunspurger, W., Moens, T., 2014. Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. *European Journal of Soil Biology* 62, 1-7.

Montgomery, M.K., Xu, S., Fire, A., 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15502-15507.

Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental science & technology* 41, 1085-1096.

Morgan, W.F., 2003. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiation Research* 159, 581-596.

Muramatsu, S., Sugahara, T., Tsuchiya, T., Okazawa, Y., 1964. Effects of chronic low-dose irradiation for three successive generations on the breeding behaviour of mice. *International journal of radiation biology* 8, 523-531.

NERH, 2011. Government of Japan: Report of the Japanese Government to the IAEA Ministerial Conference on Nuclear Safety—The accident at TEPCO's Fukushima Nuclear Power Stations, 7 June.

Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan, N., Xue, L.Y., 1987. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *The British journal of cancer*. Supplement 8, 135.

Pazdernik, N., Schedl, T., 2013. Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*, *Germ Cell Development in C. elegans*. Springer, pp. 1-16.

Pepper, A.S.-R., Lo, T.-W., Killian, D.J., Hall, D.H., Hubbard, E., 2003. The establishment of *Caenorhabditis elegans* germline pattern is controlled by overlapping proximal and distal somatic gonad signals. *Developmental biology* 259, 336-350.

Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2831-2837.

Petalcorin, M.I.R., Galkin, V.E., Yu, X., Egelman, E.H., Boulton, S.J., 2007. Stabilization of RAD-51–DNA filaments via an interaction domain in *Caenorhabditis elegans* BRCA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8299-8304.

Plaire, D., 2013. Etude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de *Daphnia magna*.

Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Ceron, J., 2011. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, e4019-e4019.

R Development Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (Austria).

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie: Fondements et applications. Lavoisier.

Ranogajec-Komor, M., Knežević, Ž., Miljanić, S., Vekić, B., 2008. Characterisation of radiophotoluminescent dosimeters for environmental monitoring. *Radiation measurements* 43, 392-396.

Real, A., Sundell-Bergman, S., Knowles, J., Woodhead, D., Zinger, I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *Journal of Radiological Protection* 24, A123.

Relyea, R., Hoverman, J., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9, 1157-1171.

Riddle, D.L., 1988. 12 The Dauer Larva.

Ritu Dhawan, D.B.D.P.L.W., 1999. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 58, 451-462.

Rivera, C., Gurard-Levin, Z.A., Almouzni, G., Loyola, A., 2014. Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*.

Robbens, J., van der Ven, K., Maras, M., Blust, R., De Coen, W., 2007. Ecotoxicological risk assessment using DNA chips and cellular reporters. *Trends in biotechnology* 25, 460.

Roh, J.-y., Sim, S.J., Yi, J., Park, K., Chung, K.H., Ryu, D.-y., Choi, J., 2009a. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environmental science & technology* 43, 3933-3940.

- Roh, J.Y., Lee, J., Choi, J., 2009b. Assessment of stress related gene expression in the heavy metal exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2946-2956.
- Rose, K.L., Winfrey, V.P., Hoffman, L.H., Hall, D.H., Furuta, T., Greenstein, D., 1997. The POU Gene *ceh-18* Promotes Gonadal Sheath Cell Differentiation and Function Required for Meiotic Maturation and Ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 192, 59-77.
- Ryabokon, N.I., Goncharova, R., 2006. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiation and environmental biophysics* 45, 167-177.
- Saito, T.T., Youds, J.L., Boulton, S.J., Colaiácovo, M.P., 2009. *Caenorhabditis elegans* HIM-18/SLX-4 Interacts with SLX-1 and XPF-1 and Maintains Genomic Integrity in the Germline by Processing Recombination Intermediates. *PLoS Genet* 5, e1000735.
- Sakashita, T., Takanami, T., Yanase, S., Hamada, N., Suzuki, M., Kimura, T., Kobayashi, Y., Ishii, N., Higashitani, A., 2010. Radiation Biology of *Caenorhabditis elegans*: Germ Cell Response, Aging and Behavior. *Journal of Radiation Research* 51, 107-121.
- Sanchez, B.C., Ralston-Hooper, K., Sepúlveda, M.S., 2011. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 274-282.
- Sarapultseva, E.I., Gorski, A.I., 2013. Low-Dose γ -Irradiation Affects the Survival of Exposed *Daphnia* and their Offspring. *Dose-Response* 1, 1-9.
- Scandalios, J., 2002. Oxidative stress responses - what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 3, reviews1019.1011 - reviews1019.1016.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98, 255-262.
- Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.-H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, R., Hengartner, M., Schedl, T., Gartner, A., 2005. Translational Repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 Regulates DNA Damage-Induced Apoptosis. *Cell* 120, 357-368.
- Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., Tuck, S., Mitani, S., Gartner, A., Conradt, B., Shaham, S., 2004. *C. elegans* ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 12, 153-161.
- Searle, A., Beechey, C., Green, D., Howells, G., 1980. Comparative Effects of Protracted Exposures to ^{60}Co γ -radiation and ^{239}Pu α -radiation on Breeding Performance in Female Mice. *International journal of radiation biology* 37, 189-200.
- Seydoux, G., Schedl, T., Greenwald, I., 1990. Cell-cell interactions prevent a potential inductive interaction between soma and germline in *C. elegans*. *Cell* 61, 939-951.

- Shaham, S., 2006. WormBook: Methods in Cell Biology (January 02, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.49.1.
- Sheppard, S.C., Guthrie, J.E., Thibault, D.H., 1992. Germination of seeds from an irradiated forest: Implications for waste disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 23, 320-327.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.
- Smith, G.C.M., Jackson, S.P., 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Development* 13, 916-934.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143-154.
- Sochová, I., Hofman, J., Holoubek, I., 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environment International* 32, 374-383.
- Sochová, I., Hofman, J., Holoubek, I., 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International* 33, 798-804.
- Soetaert, A., Vandenbrouck, T., van der Ven, K., Maras, M., van Remortel, P., Blust, R., De Coen, W.M., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquatic Toxicology* 83, 212-222.
- Spector, D.L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A., 1998. *Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spitz, D.R., Azzam, E.I., Jian Li, J., Gius, D., 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 311-322.
- Staniland, L., 1957. The swarming of rhabditid eelworms in mushroom houses. *Plant Pathology* 6, 61-62.
- Stergiou, L., Hengartner, M.O., 2003. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ* 11, 21-28.
- Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1.
- Streffer, C., 2006. Transgenerational transmission of radiation damage: genomic instability and congenital malformation. *Journal of Radiation Research* 47, B19-B24.
- Strome, S., Wood, W.B., 1982. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 1558-1562.

- Sudhaus, W., Kiontke, K., 1996. Phylogeny of Rhabditis subgenus *Caenorhabditis* (Rhabditidae, Nematoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 34, 217-233.
- Sulston, J.E., Horvitz, H.R., 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 56, 110-156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 100, 64-119.
- Sutphin, G.L., Kaeberlein, M., 2009. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Swain, S., Wren, J.F., Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., Jager, T., Jonker, M.J., Hankard, P.K., Svendsen, C., Owen, J., 2010. Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Systems Biology* 4, 32.
- Takanami, T., Mori, A., Takahashi, H., Higashitani, A., 2000. Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single recA-like gene in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research* 28, 4232-4236.
- Tammaing, J., Koturbash, I., Baker, M., Kutanzi, K., Kathiria, P., Pogribny, I.P., Sutherland, R.J., Kovalchuk, O., 2008. Paternal cranial irradiation induces distant bystander DNA damage in the germline and leads to epigenetic alterations in the offspring. *CELL CYCLE-LANDES BIOSCIENCE*- 7, 1238.
- Thein, M.C., McCormack, G., Winter, A.D., Johnstone, I.L., Shoemaker, C.B., Page, A.P., 2003. *Caenorhabditis elegans* exoskeleton collagen COL-19: An adult-specific marker for collagen modification and assembly, and the analysis of organismal morphology. *Developmental dynamics* 226, 523-539.
- Thomson, T., Lin, H., 2009. The biogenesis and function PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 355.
- Ura, K., Kai, T., Sakata, S., Iguchi, T., Arizono, K., 2002. Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of health science* 48, 583-586.
- Valentin, J., 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103.
- Van den Brink, P.J., 2008. Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environmental science & technology* 42, 8999-9004.
- van der Voet, M., Lorson, M.A., Srinivasan, D.G., Bennett, K.L., van den Heuvel, S., 2009. *C. elegans* mitotic cyclins have distinct as well as overlapping functions in chromosome segregation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 4091.

- Vance, M., Baulch, J., Raabe, O., Wiley, L., Overstreet, J., 2002. Cellular reprogramming in the F3 mouse with paternal F0 radiation history. *International journal of radiation biology* 78, 513-526.
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 607-624.
- Vandenhove, H., Vanhoudt, N., Cuypers, A., van Hees, M., Wannijn, J., Horemans, N., 2010. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 778-786.
- Vandenhove, H., Vanhoudt, N., Wannijn, J., Van Hees, M., Cuypers, A., Vandenhove, H., Vanhoudt, N., Wannijn, J., Van Hees, M., Cuypers, A., 2009. Effect of low-dose chronic gamma exposure on growth and oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana*. *Radioprotection* 44, 487-491.
- Wang, G., Reinke, V., 2008. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, Regulates 21U-RNAs during Spermatogenesis. *Current Biology* 18, 861-867.
- Warne, M.S.J., van Dam, R., 2008. NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 14, 1.
- Weber, M., Schübeler, D., 2007. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current opinion in cell biology* 19, 273-280.
- Weidman, J.R., Dolinoy, D.C., Murphy, S.K., Jirtle, R.L., 2007. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *The Cancer Journal* 13, 9-16.
- Wenzel, D., Palladino, F., Jedrusik-Bode, M., 2011. Epigenetics in *C. elegans*: facts and challenges. *genesis* 49, 647-661.
- West, S.C., 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 435-445.
- Whicker, F., Bedford, J., 1995. Protection of the natural environment from ionizing radiation. Are specific criteria needed?, *Environmental impact of radioactive releases. Proceedings of an international symposium.*
- Whicker, F.W., 1997. Impacts on plant and animal populations, *Health Impacts of Large Releases of Radionuclides, Ciba Foundation Symposium*, pp. 74-88.
- Wicky, C., Alpi, A., Passannante, M., Rose, A., Gartner, A., Müller, F., 2004. Multiple Genetic Pathways Involving the *Caenorhabditis elegans* Bloom's Syndrome Genes him-6, rad-51, and top-3 Are Needed To Maintain Genome Stability in the Germ Line. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5016-5027.

- Wiley, L.M., Baulch, J.E., Raabe, O.G., Straume, T., 1997. Impaired cell proliferation in mice that persists across at least two generations after paternal irradiation. *Radiation Research* 148, 145-151.
- Williams, P.L., Dusenbery, D.B., 1990. Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 1285-1290.
- Wilson, M.J., Kakouli-Duarte, T., 2009. Nematodes as environmental indicators. CABI.
- Wolkow, C.A., Hall, D.H., 2011. The Dauer Cuticle. *WormAtlas*.
- Wood, W.B., 1987. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Woodhead, D., 2003. A possible approach for the assessment of radiation effects on populations of wild organisms in radionuclide-contaminated environments? *Journal of Environmental Radioactivity* 66, 181-213.
- Wren, J.F., Kille, P., Spurgeon, D.J., Swain, S., Sturzenbaum, S.R., Jager, T., 2011. Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicology* 20, 397-408.
- Wurgler, F., Kramers, P., 1992. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis* 7, 321-327.
- Yablokov, A.V., Nesterenko, V.B., Nesterenko, A.V., 2009. Atmospheric, water, and soil contamination after Chernobyl. *Chernobyl: Consequences of the Catastrophe for People and the Environment*, 223-236.
- Yang, Y., Han, S.M., Miller, M.A., 2010. MSP hormonal control of the oocyte MAP kinase cascade and reactive oxygen species signaling. *Developmental biology* 342, 96-107.
- Zaka, R., Chenal, C., Misset, M., 2004. Effects of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. *Science of the total environment* 320, 121-129.
- Zeman, F., 2008. Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*.
- 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.
- Zullini, A., 1989. Ecology of the Lambro River. *Rivista de Idrobiologia RIIDBN* 27.

ANNEXES

Annexe A

Composition du Nematode Growth Medium (NGM) (donnée pour un litre)

PRODUITS	POIDS OU VOLUME
Eau ultra-pure	975 mL
Agar	20 g
NaCl	3 g
CaCl ₂ 1M	1 mL
MgSO ₄ 1M	1 mL
KPO ₄ 1M	25 mL
Cholestérol (5 mg/mL de cholestérol dans de l'éthanol)	1 mL

Annexe B

Protocole utilisé lors des étapes de bleaching

1. Préparer les différentes solutions :

PREPARATION DE MILIEU M9	
Produits	Quantités
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	5 g
H ₂ O	1 L
Autoclaver, puis laisser refroidir jusque 50°C	
MgSO ₄ 1M	1 mL

SOLUTION DE BLEACH	
Produits	Volume
H ₂ O	5,5 mL
NaOH (5N)	7,5 mL
Bleach (10%)	2 mL

2. Laver la boîte de nématodes avec du milieu M9 et récupérer le liquide (contenant les nématodes et les bactéries) dans un Falcon en verre
3. Centrifuger à 400 g pendant 2 minutes et retirer le surnageant
4. Ajouter 5 mL de milieu M9
5. Secouer et centrifuger à 400 g pendant 2 minutes
6. Retirer le surnageant et répéter les étapes 4 et 5
7. Retirer le surnageant et ajouter la solution de Bleach
8. Lancer le chronomètre et agiter fortement les Falcon (à la main, puis au vortex) pendant 30 secondes
9. Toutes les minutes, agiter et vortexer
10. Au bout de 4 minutes et 30 secondes, regarder les nématodes à la loupe binoculaire à travers le Falcon. Dès que les nématodes se dissolvent, arrêter le chronomètre (en général, 6 minutes après le lancement).
11. Centrifuger à 500 g pendant 1 minute
12. Retirer le surnageant et rincer en ajoutant 6 mL de milieu M9
13. Centrifuger à 2000 g pendant 3 minutes
14. Répéter les étapes 12 et 13 deux fois
15. Retirer le surnageant et laisser environ 1 mL de solution
16. Sortir les boîtes de Petri avec le NGM et les OP50 pour déposer les œufs

17. Remettre le culot en suspension avec une pipette Pasteur
18. Déposer les œufs (1 goutte avec la pipette Pasteur, le volume déposé est à ajuster en fonction de la densité en œufs)

Annexe C

Résultats complémentaires chapitre 9 :

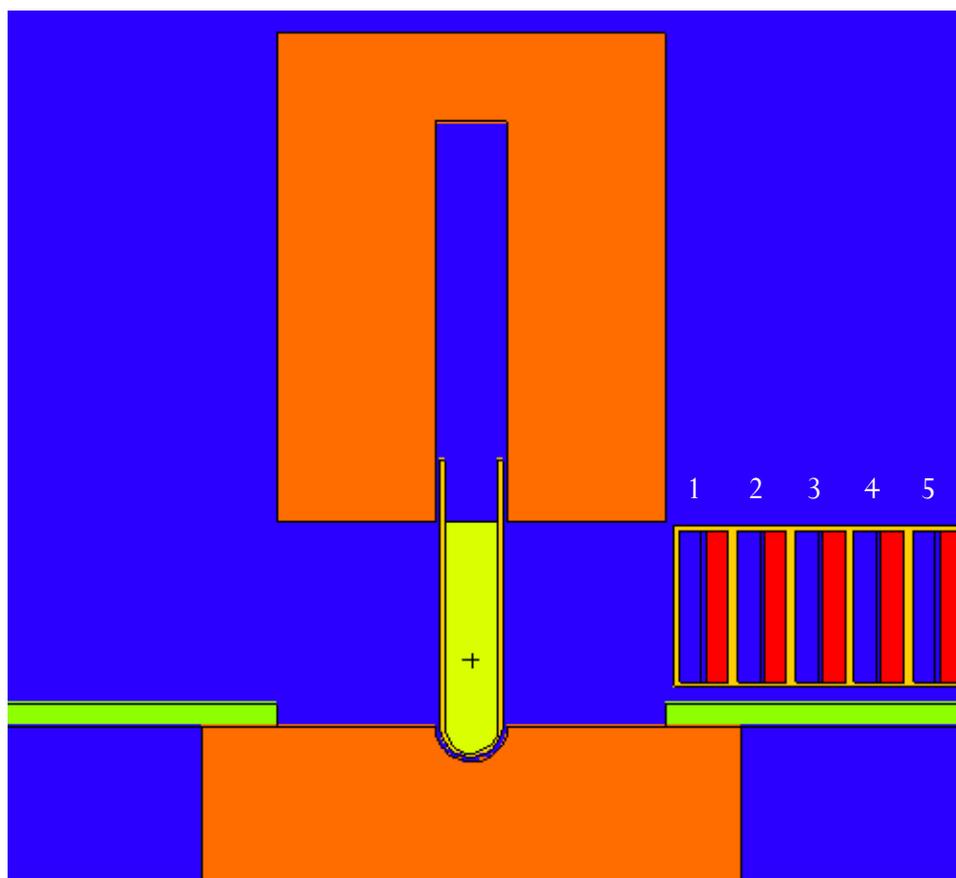
Expérience préliminaire sur une génération avec 20 débits de dose

Matériel et méthodes

Cette pré-expérimentation s'est déroulée sur le site de Cadarache, avec les irradiateurs mis à disposition par l'IRSN. Des étapes de mise au point du dispositif expérimental ont été nécessaires et sont présentées Annexe D.

Le schéma ci-dessous présente une vue schématique de l'intérieur d'un irradiateur. Au centre de l'irradiateur est placé un plateau métallique (en vert) posé sur un socle de plomb (en orange). Au milieu de ce socle de plomb est insérée une source de césium 137 (en jaune). Un château de plomb amovible placé au-dessus de la source (en orange) permet, quand il est baissé, d'atténuer les rayonnements gamma pour permettre les interventions. Lors de l'irradiation, celui-ci est relevé afin de découvrir la source radioactive (comme présenté dans le schéma ci-dessous).

Les boîtes de Petri (en jaune) avec du NGM (en rouge) sont placées verticalement face à la source. Comme montré sur le schéma ci-dessous, c'est ainsi 5 unités expérimentales qui ont été placées face à la source.



Le tableau ci-dessous présente les différents débits de dose absorbés selon l'irradiateur utilisée (et l'activité de la source associée) et la distance par rapport à celle-ci.

DÉBIT DE DOSE ABSORBÉ DANS LE VOLUME ÉTUDIÉ (mGy/h) SELON L'IRRADIATEUR UTILISÉ ET LA DISTANCE PAR RAPPORT A LA SOURCE						
IRRADIATEURS	DISTANCES	4,6 cm	5,9 cm	7,2 cm	8,5 cm	9,8 cm
SOURCE ACTIVITÉ A= 1.59E+09 Bq		42,7	28,1	19,4	13,7	10,5
		4,6 cm	5,9 cm	7,2 cm	8,5 cm	9,8 cm
SOURCE ACTIVITÉ A= 1.79E+08 Bq		4,7	3,0	2,0	1,4	1,0
		4,6 cm	5,9 cm	7,2 cm	8,5 cm	9,8 cm
SOURCE ACTIVITÉ A= 1.8E+07 Bq		0,5	0,3	0,2	0,2	0,1
		4,6 cm	5,9 cm	7,2 cm	8,5 cm	9,8 cm
SOURCE ACTIVITÉ A= 1.79E+06 Bq		0,04	0,03	0,02	0,014	0,01

Résultats

Quels que soient les débits de dose, 98% des embryons pondus par les nématodes ont éclos. Comme le montrent la Figure 1 page 175 et la Figure 2 page 176, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les individus témoins et les différents débits de dose, que ce soit pour les trois paramètres de croissance ou le nombre cumulé de larves par individu.

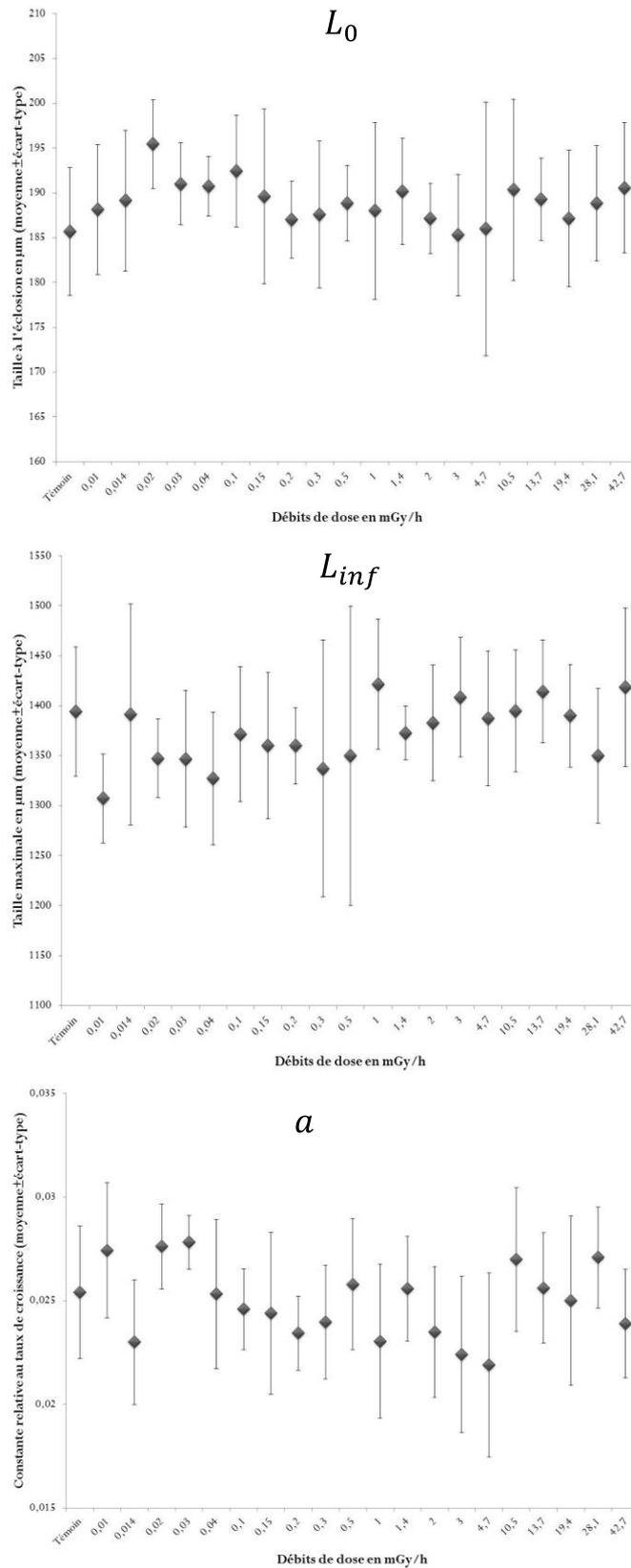


Figure 1. Paramètres de croissance (taille à l'éclosion (L_0), taille maximale (L_{inf}) et constante relative au taux de croissance (a)) en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente la moyenne des paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance avec $n=7$.

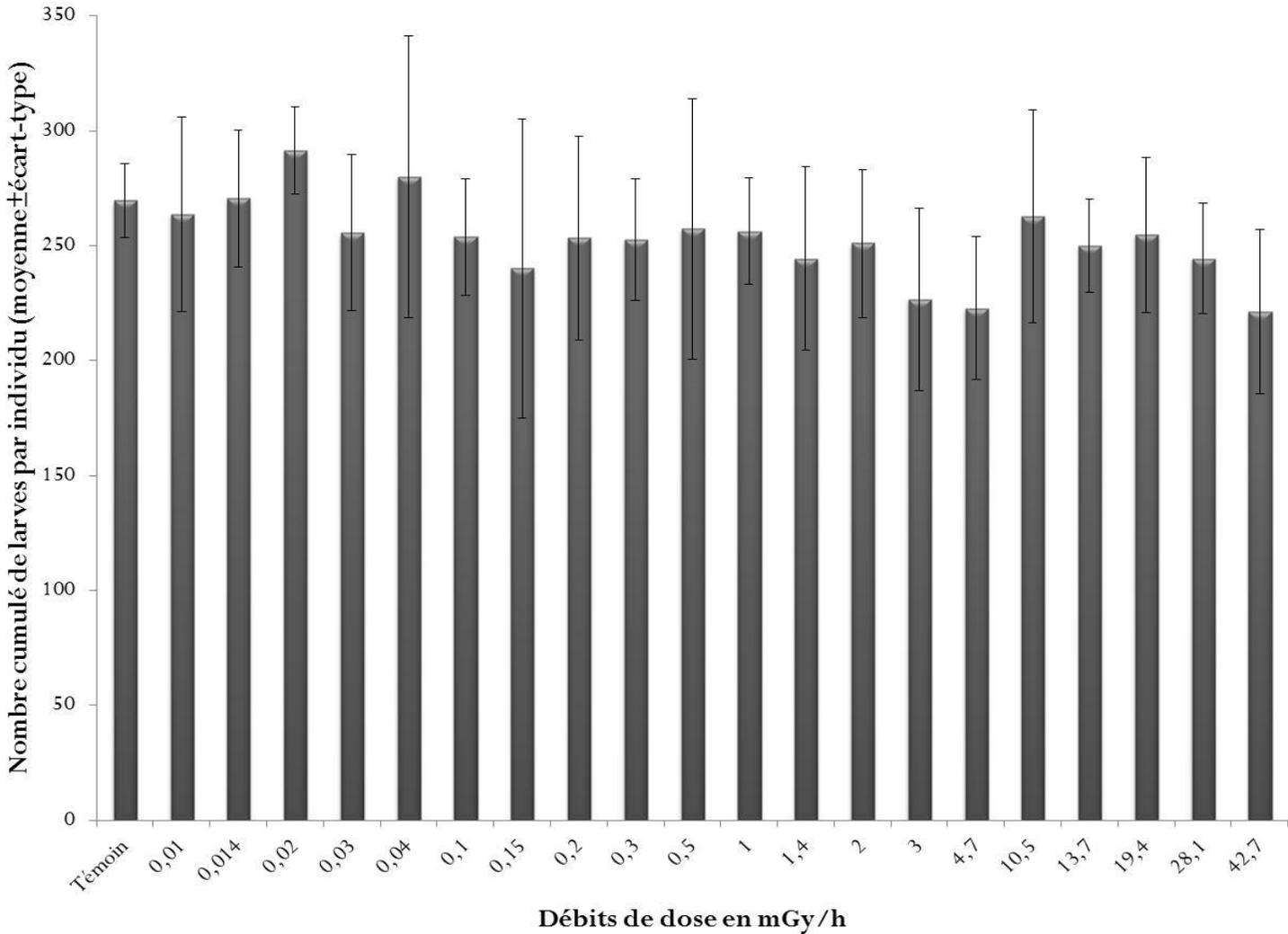


Figure 2. Nombre cumulé de larves en fonction des différents débits de dose. Chaque point représente le nombre moyen de larves ± écart-type avec n=7.

Annexe D

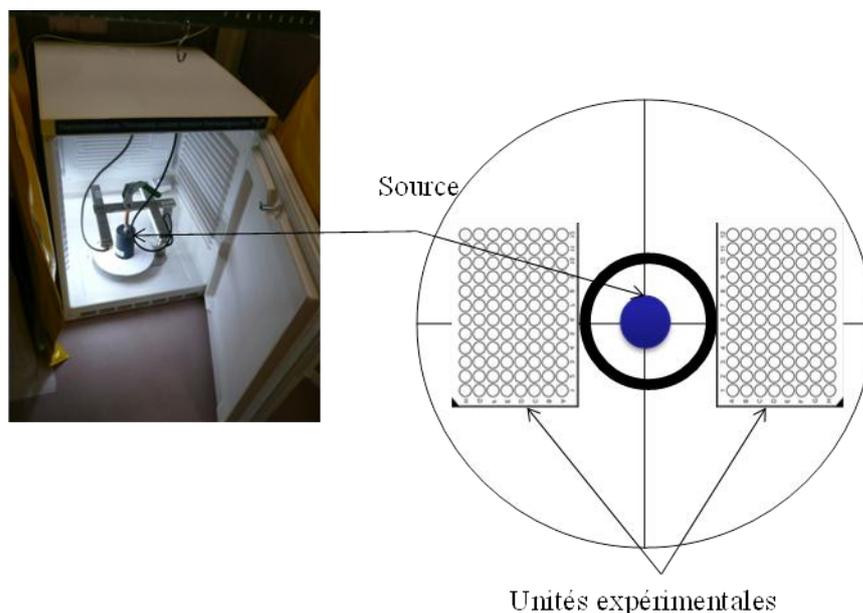
Matériel et méthodes complémentaires à l'annexe C et au chapitre 10 :

Mise au point sur les irradiateurs de l'IRSN

Dans le but de pouvoir exposer les nématodes aux irradiations en limitant les variations des débits de dose reçus, plusieurs dispositifs expérimentaux ont été testés. Dans un premier temps, il a été décidé d'utiliser des plaques 96 puits.

Expérimentations en plaque 96 puits

La figure ci-dessous présente le dispositif d'irradiation avec des plaques 96 puits : six plaques peuvent être placées dans les irradiateurs (deux plaques sont placées face à la source et trois plaques peuvent être empilées). En fonction de la distance des différents puits par rapport à la source, une large gamme de débits de dose peut ainsi être obtenue (Figure a).



Incubateurs	Activité source	Débit de dose
1	1.79e+06 Bq	8 $\mu\text{Gy/h}$ – 42 $\mu\text{Gy/h}$
2	1.8e+07 Bq	83 $\mu\text{Gy/h}$ – 417 $\mu\text{Gy/h}$
3	1.79e+08 Bq	792 $\mu\text{Gy/h}$ – 4375 $\mu\text{Gy/h}$
4-5	1.59e+09 Bq	6250 $\mu\text{Gy/h}$ – 38750 $\mu\text{Gy/h}$

Figure a. Présentation du dispositif d'irradiation avec des plaques 96 puits et de la gamme de débits de dose obtenue selon l'activité de la source.

Plus précisément, 11 débits de dose peuvent être testés à l'aide de ce dispositif. La Figure b présente les différents débits de dose choisis et le nombre de répliquats associés. Un exemple de la répartition des débits de dose (en $\mu\text{Gy/h}$) selon les puits utilisés est également donné.

Débits de dose	Répliquats
Contrôle	12
8 $\mu\text{Gy/h}$	12
42 $\mu\text{Gy/h}$	12
208 $\mu\text{Gy/h}$	12
1042 $\mu\text{Gy/h}$	12
4375 $\mu\text{Gy/h}$	12
10417 $\mu\text{Gy/h}$	12
21667 $\mu\text{Gy/h}$	12
26667 $\mu\text{Gy/h}$	12
30 000 $\mu\text{Gy/h}$	12
34167 $\mu\text{Gy/h}$	12
38750 $\mu\text{Gy/h}$	12

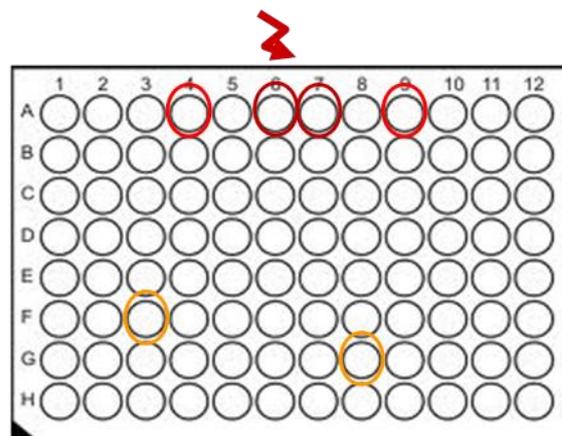


Figure b. Débits de dose obtenus pour chaque irradiateur et nombre de répliquats associés. Présentation des débits de dose obtenus selon le puits utilisé (38750 $\mu\text{Gy/h}$ pour les puits A6 et A7, entourés en rouge sombre ; 34167 $\mu\text{Gy/h}$ pour les puits A4 et A9, entourés en rouge ; 10417 $\mu\text{Gy/h}$ pour les puits F3 et G8, entourés en orange).

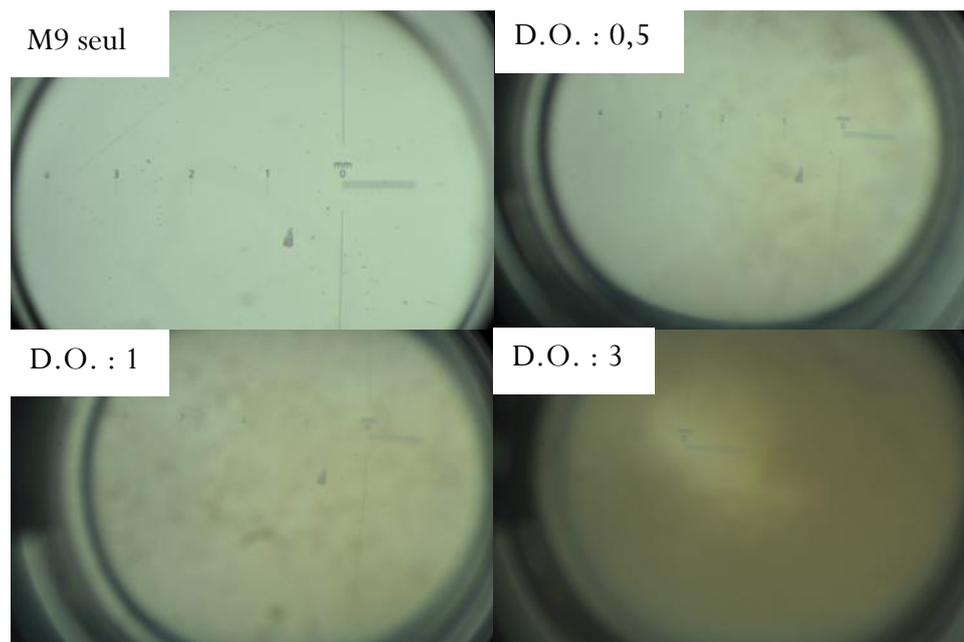
A partir de ce dispositif expérimental, différents milieu de culture ont été étudiés.

• Essais en milieu liquide

Différents milieu liquide peuvent être utilisés (S medium, SSPW...). Dans le cadre de nos travaux de recherche, il a été décidé de se servir du milieu M9, milieu déjà utilisé lors des étapes de transfert et de bleaching (Annexe B). Différents tests ont été menés afin de sélectionner la dilution en bactéries permettant (i) d'apporter suffisant de ressources aux nématodes pour que ceux-ci se développent normalement et (ii) de visualiser les nématodes tout au long de l'expérimentation (Tableau ci-dessous).

Conditions	M9 HEPES	M9 HEPES+Bactéries
Sans bactéries	200 μL	●
1/20^e de bactéries (D.O. :0,5)	190 μL	10 μL
1/10^e de bactéries (D.O. :1)	180 μL	20 μL
1/6^e de bactéries (D.O. :3)	166,7 μL	33,3 μL
1/2 de bactéries (D.O. :5)	100 μL	100 μL
Saturé en bactéries (D.O. :10)		

Les photos ci-dessous ont été réalisées pour différentes conditions (M9 seul, D.O. : 0,5, 1 et 3) avec une lame micrométrique. Les deux dernières conditions (D.O. : 5 et 10) ne sont pas présentées car la lame micrométrique n'est plus visible.



De la même manière, l'observation des nématodes est difficile dès qu'il y a plus d' $1/10^8$ de bactéries dans la solution (photos ci-dessous, les nématodes sont entourés en rouge).



De plus, il a été observé que, quelle que soit la concentration de bactéries utilisée, le suivi quotidien des individus, de leur éclosion jusqu'à la fin de l'expérimentation était difficile et nécessitait de sacrifier des individus à des pas de temps donnés (24h, 48h, 72h).

- **Essais en milieu solide**

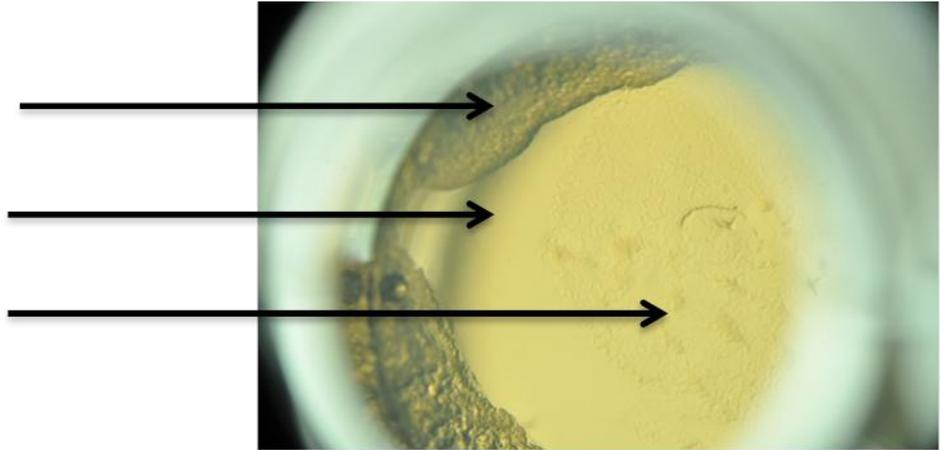
Il a donc été décidé de travailler en milieu gélifié, milieu identique à celui présenté en Annexe A. Dans chaque puits, 200 μ L de NGM sont déposés et laissés sécher sur la paillasse, la boîte 96 puits fermée par un couvercle. Par la suite, 5 μ L de solution de NaCl+bactéries sont déposés.

Afin de limiter les déplacements des individus dans les puits et de les garder au milieu (facilité de repiquage et de prise de photos), de l'acide palmitique a été déposé tout autour de la gélose à l'aide d'une pointe de pipette (photo ci-dessous).

« Anneau » d'acide
palmitique

Gélose

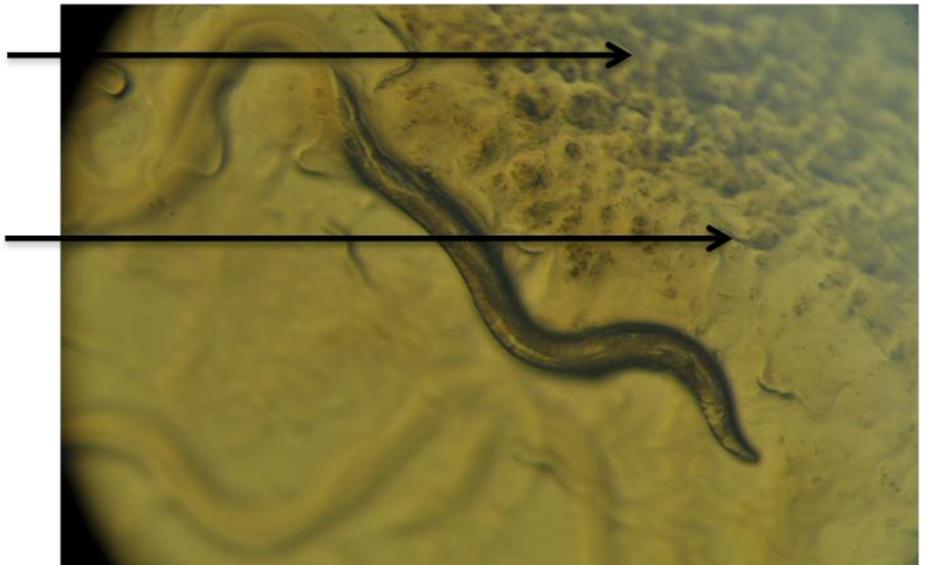
Tapis bactérien



Cependant, de nombreuses pertes d'individus ont été observées avec ce dispositif expérimental. En effet, malgré une humidité de 80% dans les incubateurs, des phénomènes de séchage et de rétraction de la gélose ont été observés. De nombreux individus ont ainsi été perdus. De plus, il s'est avéré difficile (i) de transférer les individus dans les puits à l'aide d'un fil de platine, surtout pour les puits situés au milieu de la plaque et de (ii) compter les larves, surtout lorsque le nématode avait pondu près du bord de l'anneau d'acide palmitique (photo).

« Anneau » d'acide
palmitique

Larves



Conclusion

Ces différents tests ont permis de mettre en évidence la difficulté de suivi des individus tout au long de l'expérimentation sur des plaques 96 puits. C'est à la suite de ces tests qu'il a été décidé de travailler en boîtes de Petri 3 cm, en les plaçant verticalement face à la source, comme décrit plus en détail dans la présentation du dispositif d'irradiation du chapitre 10 de la thèse.

Annexe E

Article

**Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using
*Caenorhabditis elegans***



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Radioactivity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvrad

Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*



Adeline Buisset-Goussen^{a,*}, Benoit Goussen^{a,b}, Claire Della-Vedova^c, Simon Galas^d,
Christelle Adam-Guillermin^a, Catherine Lecomte-Pradines^a

^a Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

^b Unité Modèles pour l'écotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

^c Magelis, 6 rue Frédéric Mistral, 84160 Cadenet, France

^d Université Montpellier1, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Toxicologie, 15, Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 March 2014
Received in revised form
8 July 2014
Accepted 10 July 2014
Available online

Keywords:
Caenorhabditis elegans
Ionizing radiation
Chronic exposure
Multigenerational study

ABSTRACT

The effects of chronic exposure to ¹³⁷Cs gamma radiation (dose rate ranging from 6.6 to 42.7 mGy h⁻¹) on growth and reproductive ability were carried out over three generations of *Caenorhabditis elegans* (F0, F1, and F2). Exposure began at the egg stage for the first generation and was stopped at the end of laying of third-generation eggs (F2). At the same time, the two subsequent generations from parental exposure were returned to the control conditions (F1* and F2*). There was no radiation-induced significant effect on growth, hatchability, and cumulative number of larvae within generations. Moreover, no significant differences were found in growth parameters (hatching length, maximal length, and a constant related to growth rate) among the generations. However, a decrease in the cumulative number of larvae across exposed generations was observed between F0 and F2 at the highest dose rate (238.8 ± 15.4 and 171.2 ± 13.1 number of larvae per individual, respectively). Besides, the F1* generation was found to lay significantly fewer eggs than the F1 generation for tested dose rates 6.6, 8.1, 19.4, and 28.1 mGy h⁻¹. Our results confirmed that reproduction (here, cumulative number of larvae) is the most sensitive endpoint affected by chronic exposure to ionizing radiation. The results obtained revealed transgenerational effects from parental exposure in the second generation, and the second non-exposed generation was indeed more affected than the second exposed generation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Emission of ionizing radiations into the environment is a natural and ubiquitous phenomenon, which may be enhanced by human activities (e.g., releases from nuclear power plants (NPPs) under normal functioning or after an accident, nuclear medicine, etc.). For example, following the nuclear accident caused by the earthquake-induced tsunami at the NPP of Fukushima Daiichi, one of the major radionuclides released into the atmosphere, ¹³⁷Cs, was estimated to be 1.5 × 10¹⁶ Bq by the Japanese Nuclear and Industrial Safety Agency (NISA) (NERH, 2011). However, the environmental risk assessment of chronic exposure to ionizing radiation is currently hampered by a lack of knowledge, and hence, is often based on extrapolation from data obtained for acute exposure (Coppelstone

et al., 2001), leading to uncertainties as response to ionizing radiations may differ between chronic and acute exposure both in the quality and intensity of effects (Kovalchuk et al., 2000; Pereira et al., 2011; Schwartz et al., 2000). In the last decade, there has been an increase in the number of studies on the effects of ionizing radiations on non-human biota. Nevertheless, these studies have been focused on plants, aquatic invertebrates, fish, and mammals, and data for other wildlife groups, such as soil invertebrates, are very scarce (Adam-Guillermin et al., 2012; Dallas et al., 2012; Real et al., 2004). Moreover, most of these ecotoxicological studies have focused only on partial lifecycles of organisms and on one generation, whereas it is known that pollutants acting on both survival and reproduction could also lead to changes occurring across generations (Dutilleul et al., 2013). Some laboratory studies have shown generational effects on radiosensitivity which mean that the subsequent generations are more radiosensitive than the parental generation (Harrison and Anderson, 1994; Knowles and Greenwood, 1994; Marshall, 1962, 1966). This effect was also

* Corresponding author.
E-mail address: adeline.buisset@gmail.com (A. Buisset-Goussen).

observed on the blue pale butterfly after the Fukushima nuclear accident. This study revealed that some abnormalities were not necessarily noted in the parental generation, but appeared with more severe intensity in the second exposed generation (Hiyama et al., 2012).

Therefore, it is important to assess how the populations are affected by stressors by conducting multigenerational studies. These studies may include either a continuous exposure of successive generations or only a parental exposure with subsequent non-exposed generations (recovery experiments). The latter type of experiments were carried out on mice at molecular/cellular level, and it was concluded that non-exposed generations were affected by parental exposure (Barber et al., 2006; Baulch and Raabe, 2005; Baulch et al., 2001; Streffer, 2006). A similar conclusion was made in another study concerning survival of *Daphnia magna* offspring (Sarapultseva and Gorski, 2013). However, one study led in the earthworm *Eisenia fetida* showed no effects on reproduction of non-exposed progeny after parental exposure (Hertel-Aas et al., 2011). To the best of our knowledge, no study has been carried out to observe the effect of gamma irradiation on growth across recovery generations after parental exposure.

The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1901) is a relevant biological model for studying multigenerational effects because of its short lifecycle, small size, and high fecundity, making this organism easy to culture under laboratory conditions (Brenner, 1974; Byerly et al., 1976). *C. elegans* has therefore emerged as an important animal model in various fields such as environmental toxicology (Leung et al., 2008). Standardized methods for laboratory soil toxicity quality tests, using *C. elegans* have been published in the America Society for Testing and Materials (ASTM) Guide E2172-01 (2008). Thus, *C. elegans* appears to be a suitable test organism for testing the toxicity of field-collected soils using these methods (Höss et al., 2009). With regard to the effects of ionizing radiation, the nematode *C. elegans* has been used as a model organism to study acute radiation effects and their consequence on germline development, aging and behavior (Sakashita et al., 2010). However, there is a lack of knowledge regarding the effects of chronic gamma irradiation on ecological endpoints such as growth and reproduction of this organism.

In the present study, *C. elegans* were chronically and individually exposed to a range of gamma irradiation dose rates over three generations. Subsequently, the evolution of growth and reproduction was compared within and between the generations of *C. elegans* subjected to different exposure statuses: (i) three generations continuously exposed (F0, F1, and F2) and (ii) parental generation (F0) and the following generations (F1' and F2') placed in recovery. Based on this background, we initially expected an increase in radiosensitivity, i.e., an increase in the effects of gamma irradiation on growth and reproduction across the exposed generations. In the same way, we predicted that the effects on growth and reproduction of the parental generation will be transmitted to the following non-exposed generations.

2. Materials and methods

2.1. Strain and maintenance conditions

The wild-type N2 strain of *C. elegans* provided by the Caenorhabditis Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resources) was used in this study. The populations were maintained on 6-cm Petri dishes with nematode growth medium (NGM) seeded with *Escherichia coli* strain OP50 at 20 °C and 80% relative humidity (Brenner, 1974; Byerly et al., 1976; Stiernagle, 2006). *Escherichia coli* OP50 was grown in L-Broth medium at 37 °C overnight. The Petri dishes were seeded with 250 µl of

saturated culture and were then exposed to UV for 20 min (Bio-Link Crosslinker, $\lambda = 254$ nm; intensity = 200 $\mu\text{W m}^{-2}$) to kill the bacteria and avoid any food heterogeneity among the dishes.

2.2. Experimental design

The effects of ionizing radiation were evaluated by two different experimental designs: (i) three generations continuously exposed (F0, F1, and F2) and (ii) parental generation exposed (F0) and the two following generations (F1' and F2') placed in recovery (Fig. 1). Gravid worms were randomly selected from the stock population and placed on a 6-cm Petri dish at $t = 0$ (about 100 gravid worms). After 1 h, the adults were removed and the released fertilized embryos were considered to be age-synchronized. These embryos represented the first generation (F0). Three embryos were placed per experimental unit (3-cm Petri dishes filled with 5 ml of NGM and 75 µl of bacterial culture) to ensure at least one larvae per experimental unit at the beginning of the experiment. The next day, the supernumerary larvae were removed. After 4 days of exposure, the adult worms from F0 were transferred on to a new experimental unit, replaced in the irradiator, and left for 1 h for embryo collection and preparation of the next generation (F1 and F1'), as previously described for F0. The same method was again repeated to obtain the third generation (F2 and F2'). All nematodes were cultured at 20 °C and 80% relative humidity.

2.3. Irradiation

For each generation, irradiation began at the embryos stage. For irradiation, the experimental units containing embryos were placed in containers perpendicular to the source to allow homogeneous exposure of the surface of each experimental unit (i.e., the same distance to the source) (Fig. 2(A)) to different dose rates. External gamma irradiation was provided by a ^{137}Cs source (1.55 GBq) contained in an inox capsule and placed in an incubator, where the temperature and humidity were controlled with data loggers. Seven dose rates (excluding the control) of 6.6, 8.1, 10.5, 13.7, 19.4, 28.1, and 42.7 mGy h^{-1} were tested, determined by the distance between the source and the organism. Seven replicates (containers) for each dose rates were placed around the source (Fig. 2(B)), and 10 replicates were placed in a container and kept in a control incubator.

All dose rates were first calculated with a Monte Carlo N-Particle model (MCNP). Before the beginning of the experiment, radio photo luminescent (RPL) dosimeters were placed on the Petri

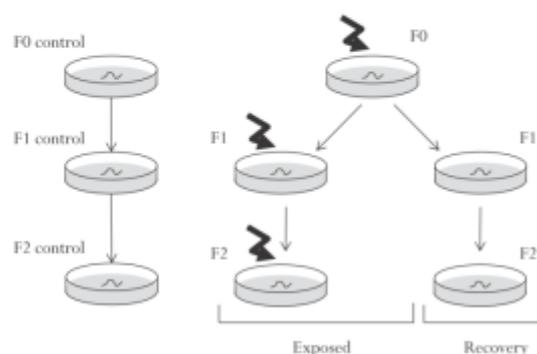


Fig. 1. Exposure scenarios. F1 and F2 were continuously exposed to the same dose rate as F0 whereas F1' and F2' were placed in recovery.

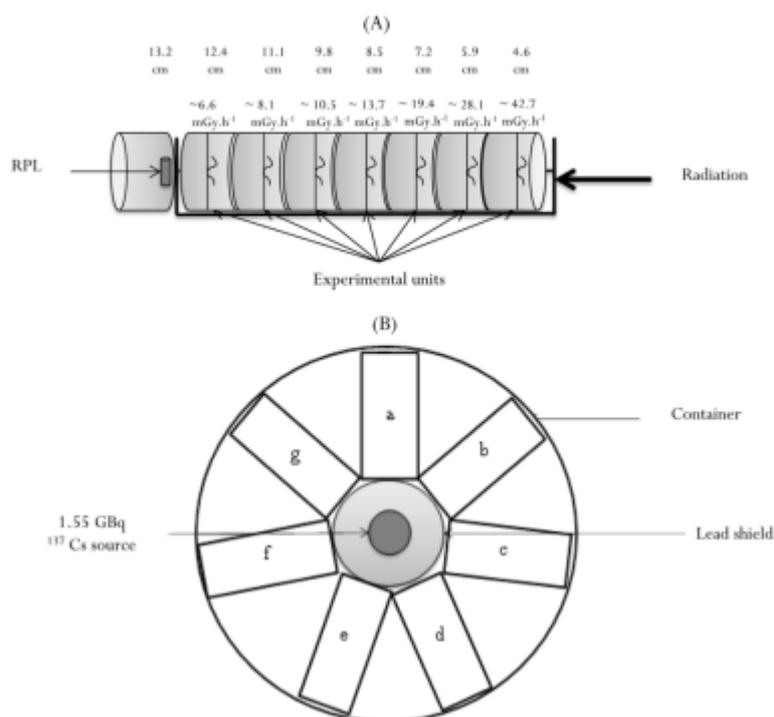


Fig. 2. Experimental units (3 cm Petri dishes) were placed vertically in a container. Each container had 7 plates (corresponding to the 7 dose rates). The different dose rates were given by the distance between the source and the organism (in cm). One RPL was placed on the back of container to check the stability of dose rate during the experimentation (A). Each container corresponded to a replicate (from 'a' to 'g'), that was positioned around the source and was replaced randomly each day (view from above). The source was placed in an incubator where temperature and humidity were controlled with data logger (B).

dishes filled with NGM at the spot where the nematodes were placed (following experimental design as described earlier) to validate the model. One RPL dosimeter was placed on the back of the container to check the stability of the dose rate during the experiment (Fig. 2(A)). Radio photo luminescent (RPL) dosimeters were used for their several advantages, such as a good reproducibility of readout value, a long-term stability, a low energy dependence and a better dose linearity. Moreover, RPL glass dosimeter system is applicable for measurement of radiation dose of X-rays and gamma rays by using a silver-activated phosphate glass (Hsu et al., 2006; Ranogajec-Komor et al., 2008). All analyses of the RPLs were performed using the DOSE-ACE FGDS-1000 reader (Chiyoda technol corporation; detection limits from 1 μ Gy to 10 Gy, with a reproducibility of 5% for 100 μ Gy or less and a reproducibility of 2% for 1 mGy or more). For calibration, a standard glass irradiated with gamma rays at 6 mGy (air kerma) of ^{137}Cs was used (controlled by the Institute of Radiation Measurements, Japan). 21 RPL dosimeters (7 replicates \times 3 generations) were used in this study. Each generation was exposed for 6 days (time needed to obtain the maximal length and achieve the total cumulative number of larvae).

2.4. Life history measurements

Reproduction and body length were observed daily. To monitor brood size, the worms were transferred into individual Petri dishes every day since the onset of spawning. The Petri dishes with eggs

were placed at 20 °C overnight to allow the hatchability. The hatched progeny and unhatched eggs were counted the day after. By using this method, the measured endpoints were cumulative brood size and hatchability. Body length was measured twice a day from hatching to maturity, and then once a day until the end of exposure. For the measurement of body length, the nematodes were photographed using a stereomicroscope (ZEISS SteREO Discovery V20, \times 240 for juveniles and \times 160 for adults) coupled with a computer-connected camera (Nikon D5000). The pictures were then analyzed with the software ImageJ[®] and a micrometer scale measure.

2.5. Data analysis

2.5.1. Growth

Growth data were first modeled by fitting a Gompertz model:

$$L = L_{inf} \times \exp\left(-\exp\left(\frac{L_0}{L_{inf}}\right) \times \exp^{-a}\right)$$

where L_{inf} is the maximal length (μm), L_0 is the hatching length (μm), and a is a constant related to growth rate. Then, for each generation (F0, F1, F1', F2, and F2'), the effect of gamma radiation on the estimated Gompertz model parameters (L_{inf} , L_0 , and a) was assessed using one-way ANOVA. When a significant dose effect was found, a Dunnett test was used. Dunnett's test is a multiple

comparison procedure common and widely employed for comparing all treatments with a control. Moreover we used step-wise extension of the single test procedure (Bretz et al., 2010) to improve its power.

Next, for each dose rate, the means of the estimated Gompertz model parameters of the exposed generations (F0, F1, and F2) were globally compared using one-way ANOVA. When a significant dose effect was found, Tukey test was used for all the pairwise comparisons. This procedure permits as well to adjust *p*-values for multiplicity. In order to increase the power of this test we also used Westfall procedure (Bretz et al., 2010).

For ANOVA analysis, normality and homogeneity assumptions were visually assessed on residuals by quantile–quantile plot and standardized residuals vs. fitted value plot, respectively.

2.5.2. Reproduction

Reproduction was studied through the cumulative number of larvae. The same strategy of analyses described previously was employed to analyze these data, except that generalized linear models were employed (because cumulative number of larvae is count data) with quasi-Poisson error to take into account over-dispersion of the data. All statistical analyses were performed with the statistical computing software R (R Development Core Team, 2013). A significant difference was considered if the *p*-value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Dose rates

Before the experiment, we observed less than 15% difference between the dose rates estimated by MCNP and those measured by RPL dosimeter (Table 1, first part), highlighting the good predictive capacity of the MCNP. During the experiment, the mean measured dose rate value was $4.6 \text{ mGy h}^{-1} \pm 0.1$, as expected based on MCNP (Table 1, second part). The low standard deviation indicated that the dose rates were constant for all the replicates and generations. Table 2 presents the exposure time and cumulative doses at the end of the experiment for each generation.

3.2. Model fitting

The Gompertz model provided a relevant fit of individual growth data (example shown in Fig. 3) (Goussen et al., 2013).

Table 1

Dose estimates from Monte Carlo calculations (MCNP) and radiophotoluminescent (RPL) dosimeters. The top of the table showed doses rates given by numerical simulation and doses rates measured (mean \pm SD) before the experimentation by placing RPL on the medium. Only one RPL was used to control the lowest dose rate. Relative error is the difference (%) between theoretical dose rates and measured dose rates. The bottom table showed dose rate given by numerical simulation and dose rate measured during the experimentation by placing RPL on the back of the container.

Theoretical dose rate (MCNP) (mGy h^{-1})	Measured dose rate (mGy h^{-1})	Relative error (%)
Before experimentation		
6.6	6.7	1
8.1	8.4 ± 0.2	4
10.5	10.2 ± 0.1	3
13.7	13.6 ± 0.2	1
19.4	17.1 ± 0.7	14
28.1	26.1 ± 2.4	7
42.7	40.2 ± 2.6	6
During experimentation		
4.7	4.6 ± 0.1	3

Table 2

Accumulated dose for all generations. Dose rates are theoretical dose rates given by MCNP. Accumulated dose were calculated by using dose rate multiplied by the hours of exposure.

Dose rate (mGy h^{-1})	Accumulated dose (Gy)
	F0, F1 and F2 144h
6.6	0.95
8.1	1.16
10.5	1.51
13.7	1.97
19.4	2.79
28.1	4.05
42.7	6.15

Indeed, the R^2 values were greater than 0.9 in 99% of the cases. Moreover, the estimated parameters were consistent with the observed data and literature (Araiz et al., 2008; Byerly et al., 1976; Jager et al., 2005).

3.3. Continuous exposure from F0 to F2

3.3.1. Growth parameters

Comparison of the hatching length, maximal length, and constant related to growth rate within the exposed generations (F0, F1, and F2) showed no significant difference between the control and tested dose rates (Fig. S1). No significant difference was observed among the generations when the dose rates were tested separately (data not shown).

3.3.2. Reproduction

Hatchability remained unaffected irrespective of the generation and tested dose rates (data not shown). No significant difference in the cumulative number of larvae per individual was found between the control and tested dose rates within the generations by Dunnett post-hoc test (Fig. 4). When the dose rates were tested separately, F2 exhibited significant decrease in the cumulative number of larvae than F0 at the highest dose rate (171.2 ± 13.1 and 238.8 ± 15.4 , respectively; Tukey post-hoc test, $p < 0.05$). As the cumulative number of larvae in the controls of the three generations was not different (232.6 ± 15.2 for F0, 216.2 ± 14.7 for F1, and 225 ± 15.1 for F2; mean \pm SD) (Fig. 4), this decrease between F0 and F2 could be due to an increase in radiosensitivity.

3.4. Recovery generations (F1' and F2') from exposed F0

3.4.1. Growth parameters

A significant difference was observed in the hatching length between the control and 19.4 mGy h^{-1} F1' (Dunnett post-hoc test, $p < 0.05$; Fig. S2 (A)), indicating that the nematodes from parents exposed to 19.4 mGy h^{-1} of radiation were significantly longer than the control. No significant difference was observed in maximal length and in constant relative to a growth rate between the control and tested dose rates (Fig. S2 (B), (C)). Moreover, no significant difference was found between the control and tested dose rates corresponding to parental exposure in F2' with respect to the growth parameters.

3.4.2. Reproduction

With regard to the exposed generations, no impact on hatchability was observed (data not shown). Statistical analyses showed no significant difference between the control and dose rates corresponding to parental exposure within the recovery generations (Fig. 5). As for growth parameters, statistical analyses showed no

194

A. Buiset-Goussen et al. / Journal of Environmental Radioactivity 137 (2014) 190–197

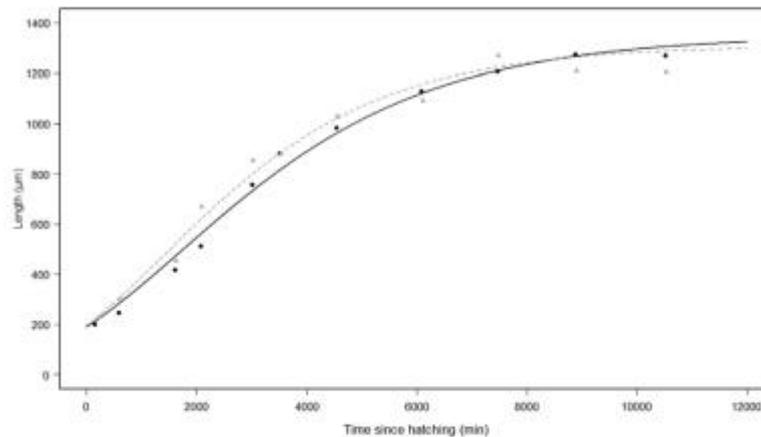


Fig. 3. Two examples of *Caenorhabditis elegans* length (μm) in relation to time since hatching (min). Observed data are represented by dark and gray points and the Gompertz model is represented by the regression lines. The dark points and regression line correspond to data obtained with a control nematode with the following estimated parameters values: maximal length (L_{inf}) = 1350 μm , hatching length (L_0) = 190 μm and constant related to growth rate (a) = 0.0232. The gray points and regression line correspond to data obtained with a nematode exposed to 42.7 mGy h^{-1} with the following estimated parameters values: maximal length (L_{inf}) = 1310 μm , hatching length (L_0) = 196 μm and growth rate (a) = 0.0268.

significant difference between the control and dose rates corresponding to parental exposure in F2'.

3.5. Exposed (F1 and F2) versus recovery (F1' and F2') subsequent generations from parental exposure (F0)

No significant difference was observed between F1 and F1' with regard to all growth parameters (L_0 , L_{inf} , and a). Regarding to reproduction, F1' produced significantly fewer eggs than F1 exposed to 6.6 mGy h^{-1} of radiation (Tukey post-hoc test, $p < 0.05$), 8.1 mGy h^{-1} of radiation (Tukey post-hoc test, $p < 0.01$),

19.4 mGy h^{-1} of radiation (Tukey post-hoc test, $p < 0.01$), and 28.1 mGy h^{-1} of radiation (Tukey post-hoc test, $p < 0.01$) (Fig. 6).

No significant difference was observed between F2 and F2' with regard to all growth parameters (L_0 , L_{inf} , and a) and to reproduction.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to focus on the effects of chronic exposure to gamma radiation on growth and reproduction of the nematode *C. elegans*. The effects were examined within and between three exposed generations (F0, F1, and F2) and within and between two recovery generations (F1' and F2').

4.1. Growth parameters and reproduction within the generations of *C. elegans*

In our experiment, we found a significant difference in hatching length between the control and 19.4 mGy h^{-1} F1'. As this difference was not observed with respect to other tested dose rates or growth parameters, it can be assumed that it might be an artifact. Apart from this particular case, no significant difference was observed in the growth parameters between the control and tested dose rates in all generations. These results are consistent with other published laboratory studies available on the effects of chronic gamma radiation on invertebrates. For example, lifetime chronic exposure of two generations of earthworm *E. fetida* to ^{60}Co showed no significant difference in the weight of worms irrespective of the dose rate tested (from 0.19 to 43 mGy h^{-1}) (Hertel-Aas et al., 2007). Similarly, Knowles and Greenwood (1994) observed no significant difference between the control and doses tested on seven generations of the marine polychaete *Ophryotrocha diadema* exposed to an external ^{137}Cs source from 1.7 to 13.7 mGy h^{-1} . Furthermore, Gilbin et al. (2008) studied the effects of chronic external gamma irradiation on the growth of the aquatic invertebrate *D. magna* by exposing the organism to different dose rates (from 0.4 to 31 mGy h^{-1}) over a 23-day period, and found that gamma radiation did not cause changes in somatic growth.

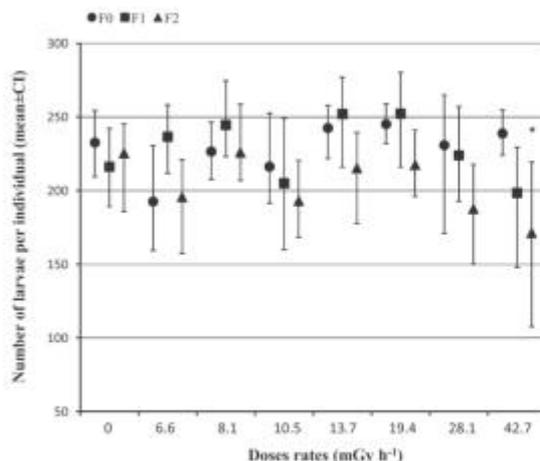


Fig. 4. Cumulative number of larvae in the successive generations exposed to ionizing radiations (F0, F1 and F2). Each point represents the mean number of larvae \pm confidence interval (Poisson confidence intervals), $n = 10$ for control; $n = 7$ for exposure condition. Asterisks indicate significant differences between F0 and F2 generations (p -value < 0.05).

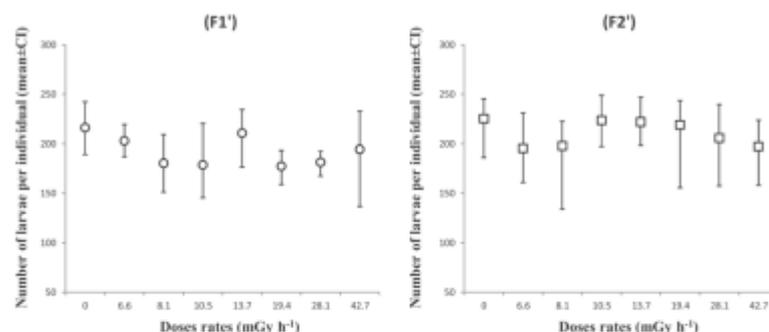


Fig. 5. Cumulative number of larvae in recovering generations (F1' and F2'). Each point represents the mean number of larvae \pm confidence interval (Poisson confidence intervals with $n = 10$ for control and $n = 7$ for exposure conditions). Dose rates for F1' and F2' correspond to parental exposure dose rates.

In the present study, we showed that exposure to dose rates ranging from 6.6 to 42.7 mGy h⁻¹ did not affect hatchability and survival of larvae. Moreover, we did not observe any significant impact on the cumulative number of larvae per individual within each generation. These results are in contrast with those reported in other studies. Indeed, studies on *D. magna* showed a reduction in brood size at the highest dose rate (31 mGy h⁻¹; accumulated dose: 11 Gy) (Gilbin et al., 2008). Similarly, in the marine invertebrate *O. diadema*, significant decreases in the number of egg sacs, eggs, and larvae were observed following exposure to dose rates of 7.3 and 13.7 mGy h⁻¹. Furthermore, the survival of eggs to larvae was also affected, but not significantly (Knowles and Greenwood, 1994, 1997). In another study, lifetime exposure of *Neanthes arenaceo-centata* to chronic irradiation led to a significant decrease in the mean number of embryos from the F1 females exposed to 17 mGy h⁻¹ (accumulated dose: 54 Gy) of radiation (Harrison and Anderson, 1994). Similar effects of gamma radiation have also been observed on soil invertebrates such as *E. fetida*, in which the hatchability of the cocoons was significantly reduced at a dose rate

of 43 mGy h⁻¹ (accumulated dose: 20 Gy) (Hertel-Aas et al., 2007). In the present study, the absence of significant effects could be explained by the radioresistance of the *C. elegans*. However, only few studies addressed the impact on acute exposure on survival data. Indeed it has been reported that for embryos, the LD90 value is approximately 25 Gy (Hartman and Herman, 1982). Another study showed that exposure of L1 larvae to 90 Gy induced 90% mortality in embryos of the next generation. But, when L4 nematodes were exposed to 120 Gy, the number of survival embryos produced was only decreased by 40% (Bailey et al., 2010). To the best of our knowledge, no previous study has examined the impact of acute or chronic exposure on growth and reproduction of *C. elegans*.

The difference between the data obtained in the present study and those from the literature may also be explained by the physiological characteristics of *C. elegans*, particularly, its short lifecycle (3 days). The higher cumulative dose rate is 6 Gy for the entire exposure time (144 h). But, spermatozoa are generated during L4 (-45 h after hatching) and oocytes are produced at the beginning of adult life (nematodes begin to lay eggs at about 54 h and stop laying eggs at about 117 h after they hatch) (Stiernagle, 2006). Consequently, the exposure time and the corresponding accumulated dose rates (~4 Gy for the highest dose rate) that could affect reproduction are lesser than those reported in other studies with longer lived animals.

4.2. Decrease in the reproductive ability across generations

Previous studies on multigenerational exposure to ionizing radiation with a range of invertebrates revealed that the succeeding generation is more radiosensitive than the parental generation (Alonzo et al., 2008; Harrison and Anderson, 1994; Knowles and Greenwood, 1994; Marshall, 1962, 1966; Massarin et al., 2010). Same effect was observed in the present study in the third exposed generation (F2). We found a significant decrease in the cumulative number of larvae between the third and first generation following exposure to the highest dose rate (42.7 mGy h⁻¹; accumulated dose: 6 Gy). The effects on reproduction noted between these two generations could be explained by the genetic effects resulting from complex events occurring in previous generations. Transgenerational transmission (epigenetic events and mutations) of the effects induced in previous generations is added to the "direct" response of generations, as noted in mice examined several generations after Chernobyl accident (Ryabokon and Goncharova, 2006). More recently, the biological impacts of the Fukushima nuclear accident on pale grass blue butterfly revealed that the second generation presented abnormalities that were not observed in the first

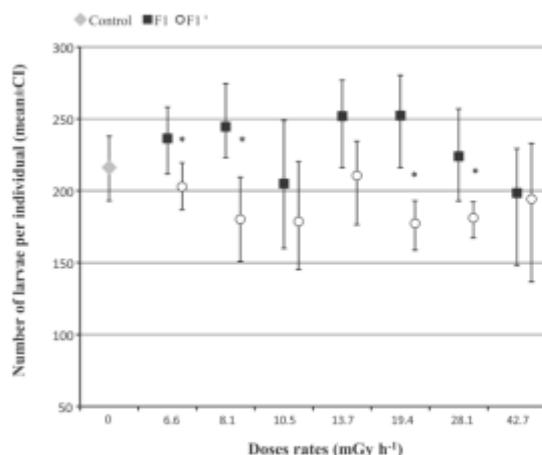


Fig. 6. Cumulative number of larvae in F1 and F1'. Each point represents the mean number of larvae \pm confidence interval (Poisson confidence intervals with $n = 10$ for control and $n = 7$ for exposure conditions (exposed or recovery). Control is identical for both exposure conditions. Dose rates for F1' correspond to parental exposure dose rates. Asterisks indicate significant differences between F1 and F1' (p -value < 0.05).

generation (Hiyama et al., 2012). In the present study, the most sensitive phenotypic change was the cumulative number of larvae. As no impact on hatchability was observed, a decreased number of larvae produced per adult was considered to be associated with a decrease in the number of eggs laid. Ionizing radiation is well known to affect the DNA by inducing double-strand breaks (DSB), which can lead to germ cell apoptosis in *C. elegans* (Craig et al., 2012; Gartner et al., 2000). In the case of whole-body irradiation, germ cell apoptosis may result from the direct effects of ionizing radiations on germ cells, as suggested by Guo et al. (2013) (Guo et al., 2013). Therefore, we assumed that an impact on gametes with loss of oocytes production might result from the increase in apoptosis and cell cycle arrest (due to DNA damage). However, further molecular and cellular analysis of the germline is necessary to test this hypothesis.

4.3. Difference between F1 and F1': transgenerational effects of parental irradiation?

The effects on reproduction were also observed in the present study in the same generation subjected to different exposure statuses (exposed (F1) or recovery (F1')). Surprisingly, the non-exposed generation (F1') laid fewer eggs than the exposed generation (F1). To the best of our knowledge, no published studies have reported this effect.

The effects observed in F1' generation (decreasing trend of brood size) could be explained by the transmission of the biological effects of parental radiation exposure to the non-exposed progeny through the germline, which is consistent with those reported in published studies. A study carried out on the effect of low-dose gamma radiation on *D. magna* showed that the survival of the non-exposed progeny from exposed generation was significantly affected (Sarapultseva and Gorski, 2013). However, transgenerational sublethal effects of parental irradiation have mostly been studied in mammals (Barber et al., 2006; Baulch and Raabe, 2005; Streffer, 2006), where ionizing radiation induced genomic instability. The exact molecular mechanisms of transgenerational effects are nevertheless poorly understood (Kovalchuk, 2013). Only one study showed effects in contrast with these results. Indeed, Hertel-Aas et al. showed in 2011 that the second non-exposed progeny from exposed generation presented no significant difference from the control with regard to the reproduction capacity.

In the present study, the phenotypic change observed in F1' was not inherited by F2', suggesting a return to control condition, which is in contrast to the findings reported in previous studies on mice, in which the heritable effects of paternal irradiation were found to persist for two generations (Baulch and Raabe, 2005; Baulch et al., 2001; Vance et al., 2002). However, these studies focused on the molecular changes and not on the phenotypic effects. Baulch et al. (2001) studied the effect of multigenerational gamma exposure on higher level of biological organization (mean liver weight, mean body weight, or mean ratios of liver weight) and observed no significant differences between animals from paternal irradiation and the control (Baulch et al., 2001).

The transmission of maternal effect observed in F1' could have been offset in F1 by the stimulation of resistance mechanisms induced when the organisms were exposed to ionizing radiation. We can assume that mismatch repair (essential in homologous recombination pathways to repair DNA damage) could play an important role in rendering protection against radiation-induced damage and lead to resistance to gamma radiation. We assume that these repair systems are no longer stimulated in the absence of stress, which could be the reason for F1' to lay fewer eggs than F1.

5. Conclusion

In the present study, no significant effect of gamma irradiation on the growth parameters of *C. elegans* was observed. We found a significant decrease in the egg laying capacity between the first and third generations from samples exposed to the highest dose rate (42.7 mGy h⁻¹; accumulated dose rate: 6 Gy). Furthermore, reproduction (cumulative number of larvae) was observed to be the most sensitive endpoint affected by multigenerational exposure to ionizing radiation. The results obtained revealed transgenerational effects from parental exposure in the second generation, and the second non-exposed generation was indeed more affected than the second exposed generation. In future studies, molecular and cellular effects of chronic exposure to ionizing radiation need to be examined to explain the mechanisms underlying the observed effects.

Acknowledgments

We are particularly grateful to Nicolas Dubourg for technical support for MCNP calculation and measurement with RPL dosimeters, and Laurent Garcia-Sanchez for statistical validation and discussion. We also thank Rodolphe Gilbin and Adrien Margerit for devoting their time (including weekends) for this study. This work was part of the Environhom-Eco research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.07.014>.

References

- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. In: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, pp. 67–103.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F., Garnier-Laplace, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 87, 146–156.
- Araiz, C., Château, M.-T., Descamps, S., Galas, S., 2008. Génomique quantitative chez *Caenorhabditis elegans*: stratégies pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux mécanismes moléculaires chez l'homme. *IRBM* 29, 289–296.
- ASTM E2172-01, 2008. Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *C. elegans*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Bailey, A.P., Freeman, A., Hall, J., Déclais, A.-C., Alpi, A., Lilley, D.M., Ahmed, S., Gartner, A., 2010. The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolves links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS Genet.* 6, e1001025.
- Barber, R.C., Hickenbotham, P., Hatch, T., Kelly, D., Topchy, N., Almeida, G.M., Jones, G.D., Johnson, G., Parry, J., Rothkamm, K., 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 25, 7336–7342.
- Baulch, J.E., Raabe, O.G., 2005. Gamma irradiation of Type B spermatogonia leads to heritable genomic instability in four generations of mice. *Mutagenesis* 20, 337–343.
- Baulch, J.E., Raabe, O.G., Wiley, L.M., 2001. Heritable effects of paternal irradiation in mice on signaling protein kinase activities in F3 offspring. *Mutagenesis* 16, 17–23.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Bretz, F., Hothorn, T., Westfall, P., 2010. *Multiple Comparisons Using R*. CRC Press.
- Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.* 51, 23–33.
- Copplestone, D., Bielby, S., Jones, S., Patton, D., Daniel, P., Gize, I., 2001. Impact Assessment of Ionising Radiation on Wildlife. Environment Agency, UK (Freshwater Biological Association), p. 222.
- Craig, A.L., Moser, S.C., Bailey, A.P., Gartner, A., 2012. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Methods Cell Biol.* 107, 321–352.

- Dallas, L.J., Keith-Roach, M., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review. *Radiat. Res.* 177, 693–716.
- Dutilleul, M., Lemaire, L., Réale, D., Lecimite, C., Galas, S., Bonzom, J.-M., 2013. Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology*, 1–7.
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., Hengartner, M.O., 2000. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage–induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell.* 5, 435–443.
- Gilbin, R., Alonzo, F., Garnier-Laplace, J., 2008. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J. Environ. Radioact.* 99, 134–145.
- Goussen, B., Parisot, F., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Péry, A.R., Bonzom, J.-M., 2013. Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*, 1–10.
- Guo, X., Sun, J., Bian, P., Chen, L., Zhao, F., Wang, J., Xu, A., Wang, Y., Hei, T.K., Wu, L., 2013. Radiation-induced bystander signaling from somatic cells to germ cells in *Caenorhabditis elegans*. *Radiat. Res.* 180, 268–275.
- Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1994. Effects of acute irradiation on reproductive success of the polychaete worm, *Nereis acmeosolenaria*. *Radiat. Res.* 137, 59–66.
- Hartman, P.S., Herrman, R.K., 1982. Somatic damage to the X chromosome of the nematode *Caenorhabditis elegans* induced by gamma radiation. *Mol. Gen. Genet.* 187, 116–119.
- Hertel-Aas, T., Brunborg, G., Jaworska, A., Salbu, B., Oughton, D.H., 2011. Effects of different gamma exposure regimes on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Sci. Total Environ.* 412, 138–147.
- Hertel-Aas, T., Oughton, D.H., Jaworska, A., Bjerke, H., Salbu, B., Brunborg, G., 2007. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiat. Res.* 168, 515–526.
- Hiyama, A., Nohara, C., Kiryo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A., Otaki, J.M., 2012. The Biological Impacts of the Fukushima Nuclear Accident on the Pale Grass Blue Butterfly. *Scientific Reports*, p. p. 10.
- Höss, S., Jänsch, S., Moser, T., Junker, T., Römble, J., 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1811–1818.
- Hsu, S.-M., Yeh, S.-H., Lin, M.-S., Chen, W.-L., 2006. Comparison on characteristics of radiophotoluminescent glass dosimeters and thermoluminescent dosimeters. *Radiat. Prot. Dosim.* 119, 327–331.
- Jager, T., Álvarez, O., Kammenga, J., Kooijman, S., 2005. Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Funct. Ecol.* 19, 136–144.
- Knowles, J., Greenwood, L., 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (polychaeta, dorvilleidae). *Mar. Environ. Res.* 38, 207–224.
- Knowles, J., Greenwood, L., 1997. A comparison of the effects of long-term β - and γ -irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *J. Environ. Radioact.* 34, 1–7.
- Kovalchuk, O., 2013. Epigenetic Effects of Ionizing Radiation, *Environmental Epigenetics in Health and Disease*. Springer, pp. 99–126.
- Kovalchuk, O., Arkhipov, A., Barylyak, I., Karachov, I., Titov, V., Hohn, B., Kovalchuk, L., 2000. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 449, 47–56.
- Leung, M.C., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 106, 5–28.
- Marshall, J.S., 1962. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. *Ecology* 43, 598–607.
- Marshall, J.S., 1966. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress. *Ecology*, 561–571.
- Massari, S., Alonzo, F., García-Sánchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.-C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 99, 309–319.
- Maupas, E., 1901. Modes et formes de reproduction des nematodes. *Arch. Zool. Expérimentale Générale* 8, 463–624.
- NERH, 2011. Government of Japan: Report of the Japanese Government to the IAEA Ministerial Conference on Nuclear Safety. The accident at TEPCO's Fukushima Nuclear Power Stations, 7 June.
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalle, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2831–2837.
- R Development Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (Austria).
- Ranogajec-Komoc, M., Knezevic, Z., Miljanić, S., Vekić, B., 2008. Characterisation of radiophotoluminescent dosimeters for environmental monitoring. *Radiat. Meas.* 43, 392–396.
- Real, A., Sundell-Bergman, S., Knowles, J., Woodhead, D., Zinger, I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Prot.* 24, A123.
- Ryabokon, N.I., Goshcharova, R., 2006. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiat. Environ. Biophys.* 45, 167–177.
- Sakashita, T., Takahashi, T., Yanase, S., Hamada, N., Suzuki, M., Iijima, T., Kobayashi, Y., Ishii, N., Higashitani, A., 2010. Radiation biology of *Caenorhabditis elegans*: germ cell response, aging and behavior. *J. Radiat. Res.* 51, 107–121.
- Sarapultseva, E.I., Gorski, A.L., 2013. Low-dose γ -irradiation affects the survival of exposed *Daphnia* and their offspring. *Dose-Response* 1, 1–9.
- Schwartz, J.L., Jordan, R., Sun, J., Ma, H., Hsie, A.W., 2000. Dose-dependent changes in the spectrum of mutations induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 153, 312–317.
- Stiemsag, T., 2006. In: Wormbook (Ed.), Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006). The *C. elegans* Research Community, Wormbook doi/10.1895/wormbook.1.101.1.
- Streffer, C., 2006. Transgenerational transmission of radiation damage: genomic instability and congenital malformation. *J. Radiat. Res.* 47, B19–B24.
- Vance, M., Baulch, J., Raabe, O., Wiley, L., Overstreet, J., 2002. Cellular reprogramming in the F3 mouse with paternal F0 radiation history. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 513–526.

Annexe F

Photos de la partie distale de gonades (cellules mitotiques) prise au microscope à épifluorescence

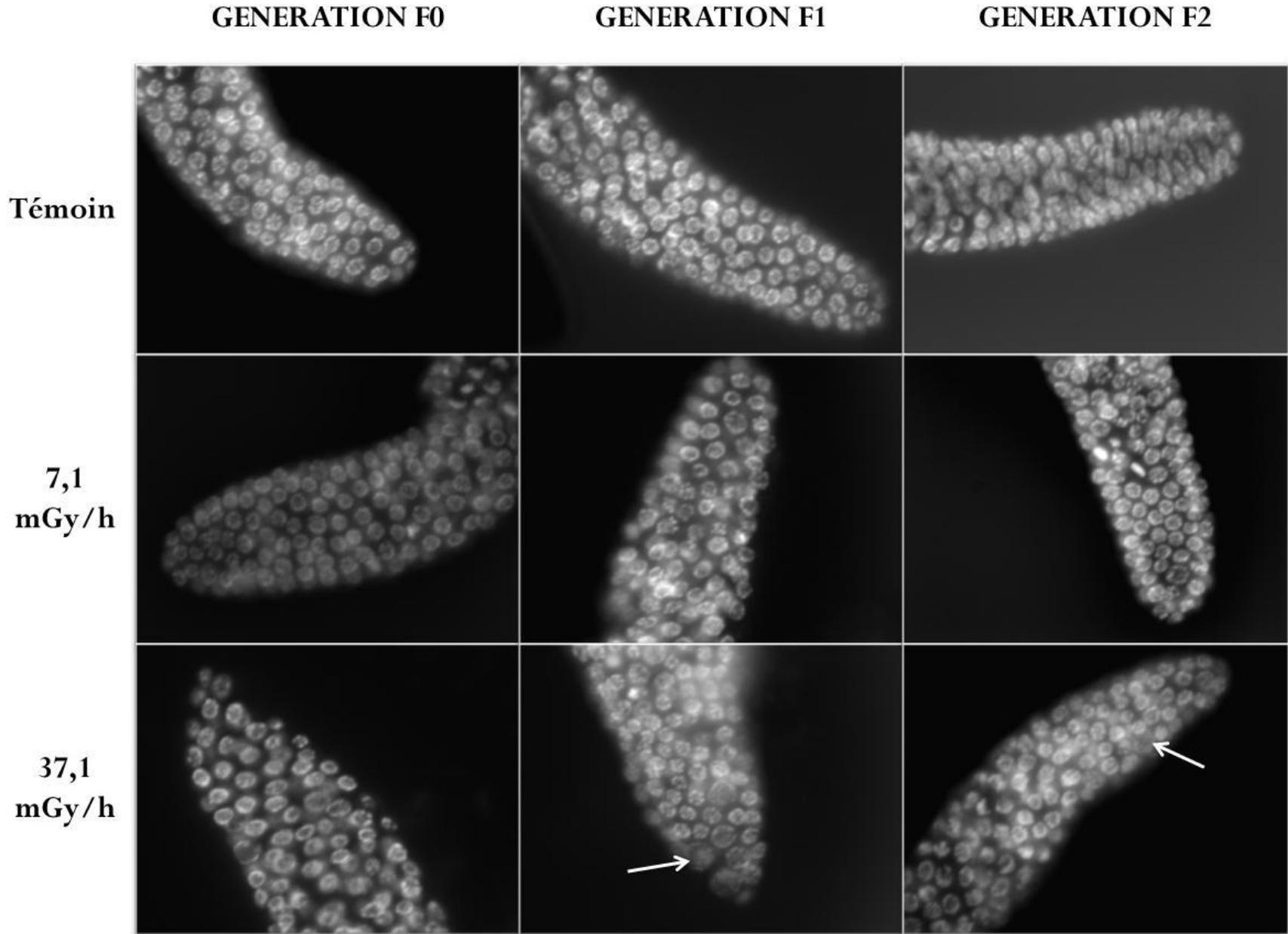


Figure S 1. Photos de la partie distale des gonades (cellules mitotiques) de *C. elegans* sur les trois générations exposées (objectif x100). Les flèches blanches présentent des exemples de cellules en arrêt du cycle cellulaire.

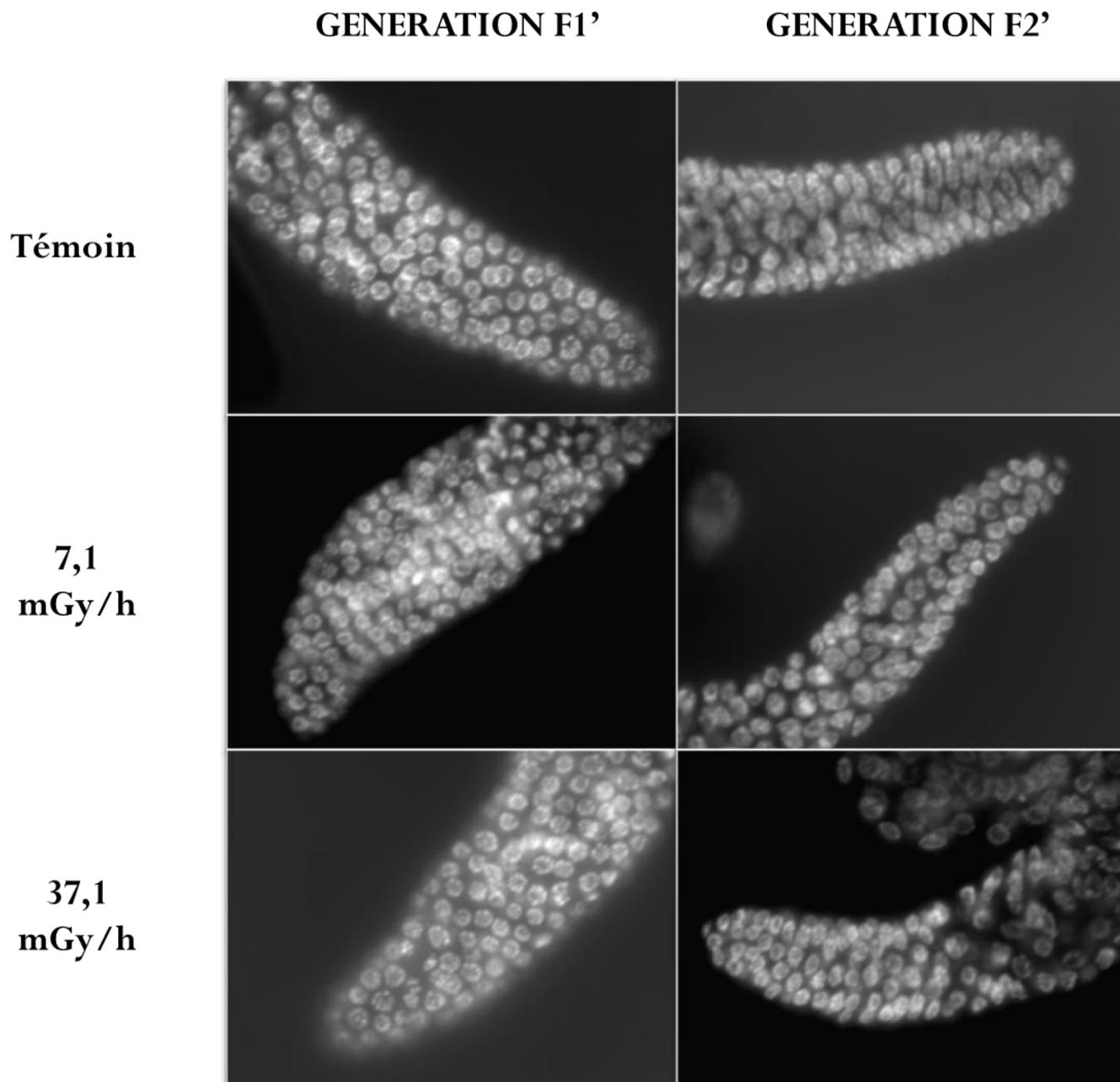


Figure S 2. Photos de la partie distale des gonades (cellules mitotiques) de *C. elegans* sur les deux générations placées en environnement contrôlé après exposition parentale (objectif x100). Les débits de dose correspondant à ceux de la génération parentale exposée.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES DE LA THESE

Publications scientifiques

- **Buisset-Goussen A.**, Bailly A., Adam-Guillermin C., Galas S., Lecomte-Pradines C. Multigenerationnal DNA damage responses to chronic gamma irradiation on *Caenorhabditis elegans*. *En préparation*.
- **Buisset-Goussen A.**, Goussen B., Della-Vedova C., Galas S., Adam-Guillermin C., and Lecomte-Pradines C. 2014. Effects of chronic gamma irradiation : A multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *Paru*.
Journal of Environmental Radioactivity 137 : 190–197.
DOI 10.1016/j.jenvrad.2014.07.014
- Goussen B., Beaudouin R., Dutilleul M., **Buisset-Goussen A.**, Bonzom J.-M., and Péry A.R.R. 2014. DEBtox modelling applied to *Caenorhabditis elegans* : a case study on uranium. *Accepté dans Chemosphere*.
- Goussen B., Parisot F., Beaudouin R., Dutilleul M., **Buisset-Goussen A.**, Péry A.R.R., and Bonzom J.-M. 2013. Consequences on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity of multi-generation exposure to uranium. *Paru*.
Ecotoxicology 22(5) :869–878. DOI 10.1007/s10646-013-1078-5

Communications orales et internationales

- **Buisset-Goussen A.**, Goussen B., Della-Vedova C., Galas S., Adam-Guillermin C., and Lecomte-Pradines C. 2014. Effects of chronic gamma irradiation : A multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. SETAC Bâle. Bâle, Suisse.
- **Buisset-Goussen A.**, Lecomte-Pradines C. et Poggiale J-C. 2014. Etude des effets multi-générationnels des rayonnements ionisants sur un organisme modèle : le nématode *Caenorhabditis elegans*. Congrès des Doctorants en Sciences de l'Environnement, Europôle de l'Arbois, Aix-en-Provence.
- Goussen B., Beaudouin R., Parisot F., Dutilleul M., **Buisset-Goussen A.**, Bonzom J.-M., and Péry A.R.R. 2013 Evaluating effects of a multi-generation pollution on *Caenorhabditis elegans*' population. SETAC Glasgow. Glasgow, UK.

- Goussen B., Parisot F., Péry A.R.R., Beaudouin R., **Buisset A.**, Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2012. Evaluation des effets de la pollution sur la dynamique de population de *Caenorhabditis elegans* à travers une approche de type bioénergétique. Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA). Lyon, France.

Résumé

L'évaluation de l'impact écologique d'une exposition aux rayonnements ionisants (phénomène naturel et ubiquiste enrichi par les activités humaines) est devenue une préoccupation majeure. Peu d'études relatives aux expositions chroniques sur plusieurs générations existent à ce jour, connaissances pourtant indispensables pour mieux comprendre les perturbations liées aux rayonnements ionisants et leurs conséquences possibles sur la population. De plus, il est devenu nécessaire de comprendre les mécanismes liés aux perturbations engendrées par les rayonnements ionisants à l'échelle moléculaire et cellulaire. Sans cette compréhension mécanistique, il est difficile d'extrapoler les effets observés d'une part entre les différents niveaux d'organisation biologique et d'autre part entre les différentes espèces. L'objectif de ce doctorat était d'étudier les effets multigénérationnels d'une irradiation gamma chronique selon une approche intégrée, des traits d'histoire de vie aux mécanismes subcellulaires chez un organisme modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*. Pour ce faire, une stratégie en deux étapes a été mise en place. Tout d'abord, l'étude des effets d'une irradiation gamma chronique sur les traits d'histoire de vie de *C. elegans* a été effectuée. L'objectif de cette expérience était de tester l'hypothèse d'une augmentation de la sensibilité en fonction des générations. Pour cela, trois générations ont été exposées à différents débits de dose. En parallèle, deux générations ont été placées en environnement « contrôle » après exposition parentale, afin de tester une possible transmission des effets maternels. Le deuxième volet de cette thèse a eu pour objectif de caractériser les différents mécanismes subcellulaires pouvant expliquer les effets observés sur les traits d'histoire de vie lors de l'exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants. Les résultats obtenus ont mis en évidence (i) que le nombre cumulé de larves était le critère d'effet le plus sensible à l'irradiation gamma, (ii) qu'une augmentation de la radiosensibilité était observée sur trois générations exposées et (iii) que les effets de la génération parentale étaient transmis aux générations non-exposées. Une augmentation de l'apoptose, une diminution du stock de spermatozoïdes et, dans une moindre mesure une diminution du nombre de cellules mitotiques, semblent expliquer la diminution de la reproduction observée dans les générations exposées. Seule une diminution du nombre de spermatozoïdes a été observée en parallèle d'une diminution du nombre cumulé de larves dans les générations placées en environnement contrôle après exposition parentale. D'autres processus, notamment des processus épigénétiques, pourraient également intervenir et expliquer l'effet observé sur la reproduction dans ces générations. Ce projet de recherche nous a permis d'apporter des connaissances sur les effets multigénérationnels d'une irradiation gamma et montre l'intérêt d'utiliser une approche intégrée afin de mieux comprendre les mécanismes d'action liés à l'action d'un polluant et d'améliorer l'évaluation des risques environnementaux.

Mots clés : exposition chronique, effets multigénérationnels, effets transgénérationnels, approche intégrée, *Caenorhabditis elegans*, irradiation gamma

Abstract

The environmental risk assessment of chronic exposure to ionizing radiation (natural and ubiquitous phenomenon enhanced by human activities) has become a major concern. Few studies relating to chronic exposure over several generations - essential knowledge to better understand the disruption caused by ionizing radiation and its possible consequences on the population - exist. In addition, it has become necessary to understand the mechanisms of disturbances related to ionizing radiation at the molecular and cellular level. Without this mechanistic understanding, it is difficult to extrapolate the effects observed between the different levels of biological organization and between different species. The aim of this PhD was to study the multigenerational effects of chronic gamma radiation in an integrated manner (to the life history traits from the subcellular mechanisms) in a model organism, the nematode *Caenorhabditis elegans*. A two-step strategy was implemented. First, studying the effects of chronic gamma radiation on the life history traits of *C. elegans* was performed. The objective of this experiment was to test the hypothesis of an increase of the sensitivity according generations. For that, three generations have been exposed to different dose rates. In parallel, two generations have been placed in "control" environment after parental exposure to test a possible transmission of maternal effects. The second part of this thesis aimed to characterize the different subcellular mechanisms that could explain the observed effects on the life history traits after multigenerational exposure. The results showed that (i) the cumulative number of larvae was the most sensitive endpoint to gamma radiation, (ii) an increase in radiosensitivity was observed over three exposed generations and (iii) the effects of the parental generation were transmitted to the non-exposed generations. An increase in apoptosis, a reduction in the stock of sperm, and to a lesser extent, a decrease in the number of mitotic cells, could explain the observed decrease in the number of laid eggs for the exposed generations. Only a decrease in sperm number was observed in parallel with a reduction in the cumulative number of larvae in the non-exposed generations. Other processes, including epigenetic processes, could also explain the observed effect on reproduction in these generations. This research contributes to our knowledge on the multigenerational effects of gamma irradiation and shows the importance of an integrated approach to better understand the mechanisms of action related to the action of a pollutant and improve the environmental risk assessment.

Keywords: chronic exposure, multigenerational effects, transgenerational effects, integrated approach, *Caenorhabditis elegans*, gamma radiation