

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

**Étude mécaniste des effets transgénérationnels
des radiations ionisantes alpha et gamma chez
*Daphnia magna***

Florian PARISOT

15 Décembre 2015

N°ISRN/IRSN-2016/188

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

THÈSE – UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE

École doctorale
ED 251 Sciences de l'environnement

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité
Océanographie

Étude mécaniste des effets transgénérationnels des radiations
ionisantes alpha et gamma chez *Daphnia magna*

Par
Florian Parisot

Thèse dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenance publique le 15 décembre 2015

Devant le jury d'examen composé de :

Dr. Olivier Geffard	Chargé de recherche, IRSTEA, Villeurbanne	Rapporteur
Dr. Hervé Seznec	Chargé de recherche, CNRS, Gradignan	Rapporteur
Dr. Élise Billoir	Chercheur, Université de Lorraine	Examineur
Pr. Jean-Paul Bourdineaud	Professeur, Université Bordeaux I	Examineur
Pr. Bernard Clément	Chercheur, ENTPE, Vaulx-en-Velin	Examineur
Pr. Jean-Christophe Poggiale	Professeur, Université Aix-Marseille	Directeur de thèse
Dr. Frédéric Alonzo	Chercheur, IRSN, Cadarache	Tuteur de thèse

Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le réseau européen STAR ainsi que l'IRSN, et plus particulièrement le SERIS, dirigé par Jacqueline Garnier-Laplace, pour avoir financé mes travaux de doctorat et pour avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de ce projet. Merci de m'avoir offert la possibilité d'assister à différents congrès scientifiques nationaux et internationaux.

Je souhaite adresser mes plus chaleureux remerciements à Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo pour votre encadrement tout au long de ces trois années de thèse. Jean-Christophe, merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité et ton soutien du premier jusqu'aux derniers jours ! Merci également de m'avoir offert la possibilité de participer au DEB Symposium et de m'avoir permis de rencontrer les nombreux chercheurs faisant partie de la communauté du DEB. Fred, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordé, ton soutien, tes encouragements, tes conseils, ton écoute et également pour ta patience devant mon perfectionnisme légendaire ou mon côté maniaque, à toi de choisir ! Je tiens sincèrement à te remercier pour le temps que tu as pu m'accorder durant les périodes expérimentales et celles de rédaction. Désolé que mes phases expérimentales aient empiétés sur tes week-ends et tes vacances d'été ! Merci à toi pour ta grande sympathie et nos petits moments d'égarements. Le jeune « Padawan » de thésard que je suis en a beaucoup appris à tes côtés ! Merci pour tout, j'ai vraiment pris du plaisir à travailler avec toi.

J'adresse mes remerciements à Olivier Geffard et Hervé Seznec d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse, ainsi qu'à Élise Billoir, Jean-Paul Bourdineaud et Bernard Clément pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance.

Je tiens tout particulièrement à remercier Jean-Paul Bourdineaud pour m'avoir accueilli à la Station Marine d'Arcachon le temps d'une expérience. Merci à toi Jean-Paul de m'avoir initié à la RAPD-PCR, pour tes conseils, nos discussions et ta grande sympathie. Je remercie également l'ensemble des personnes de la Station Marine d'Arcachon pour leur gentillesse, leur accueil chaleureux et les échanges intéressants que j'ai pu avoir avec eux. Merci à vous tous.

Un grand merci à toutes les personnes des différents laboratoires de l'IRSN que j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de ces trois années. Merci à tous pour les bons moments passés en votre compagnie, pour vos conseils et pour les discussions sérieuses et celles moins sérieuses !

Christelle, je tiens tout d'abord à te remercier pour ta disponibilité, tes conseils, ton soutien et pour l'ensemble des discussions que nous avons pu avoir autour de mon sujet de thèse. Ta porte de bureau a toujours été ouverte quand il le fallait, que ce soient pour des raisons professionnelles ou personnelles. Merci pour le soutien que tu as pu m'apporter durant les moments difficiles. C'était vraiment un plaisir de t'avoir en tant que chef de laboratoire. Pour toutes ces raisons, je souhaite sincèrement te dire un grand merci. Rodolphe, merci à toi pour ton immense gentillesse, ta générosité, ton partage de connaissances et pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eu. Je garderai un très bon souvenir de notre petit séjour à Barcelone ! Merci également à toi Jean-François pour ces petites discussions matinales et pour ta sympathie quotidienne. C'est promis, après la thèse j'arrête de fumer !

Jean-Marc, sans toi je n'aurai sans doute jamais connu l'IRSN, merci encore pour ce super stage de Master 2. Je tiens également à te remercier pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eu sur la thèse, l'avenir, la science et sur plein d'autres sujets. Merci pour tout.

Laurent, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, tes conseils et pour toutes les interactions que nous avons eues concernant les statistiques et la modélisation. Encore désolé d'avoir quelque peu déstructuré tes scripts sur R ! Je profite de l'occasion pour te remercier Claire, pour tes conseils statistiques et les nombreuses discussions que nous avons eues le temps d'une petite pause cigarette, merci à toi ! Sandrine P., je te remercie pour ta générosité, ta bonne humeur et ton aide précieuse pour la mise au point de mes analyses moléculaires. Cathy, merci pour ton soutien, ta gentillesse, ta bonne humeur et pour tes nombreux conseils. Je suis sûr que tu garderas un très bon souvenir de mes talents de comédien ! Penses-tu que je dois tenter une reconversion ? De mon côté, je garde également un très bon souvenir (hum ...) de notre passage en Angleterre et plus particulièrement à l'aéroport d'Heathrow. Ta réputation de chat noir n'a pas failli ! Laureline, je te remercie pour ta bonne humeur au quotidien, ton dynamisme, ton franc-parler et surtout pour ton humour ! Tu m'auras beaucoup fait rire au cours de ces trois années ! Sandrine F., je n'ai pas eu la chance de beaucoup te côtoyer mais tu as toujours eu le mot juste pour me faire sourire ou même rire. Juste pour cela, je tenais à te remercier ! Arnaud, j'ai eu la chance de te découvrir un peu plus lors de notre séjour à Barcelone et j'en garde de très bons souvenirs. Merci à toi pour ta gentillesse, tes conseils et nos petites discussions. Je profite de l'occasion pour remercier de nouveau Christelle, Rodolphe, Fred A. et Laureline pour ce séjour en Espagne qui restera un moment mémorable de mes trois années de thèse ! Pierre, je tiens à te remercier pour nos petits moments autour d'un café et/ou d'une cigarette à discuter de tout et de rien. Je n'oublierai jamais ta personnalité légendaire ! Olivier, merci à toi pour ta sympathie, tes conseils et tes remarques scientifiques toujours pertinentes.

Merci à Magali, Virginie et Isabelle pour leur gentillesse, leur sympathie, et leur bonne humeur quotidienne. Je vous remercie toutes les trois pour les petites discussions « détentes » que nous avons pu avoir. Elles n'ont certes pas été fréquentes mais elles m'ont fait du bien ! Nadine, je te remercie pour ton dynamisme, ta grande sympathie et ton humour ! Les nombreuses discussions que nous avons pu avoir m'ont fait un bien fou, ne change rien ! Julien, merci également à toi pour ton aide et les petits moments de détentes autour d'une discussion. Nico, je souhaite te remercier dans un premier temps pour ton aide inestimable durant mon expérience pour les calculs de dose et ton aide au laboratoire durant les week-ends. Merci mon petit poulet, pour les petits foots, les parties de cartes, les pauses cigarettes, les discussions sur le sport, les choses de la vie et celles également où l'on refaisait le monde ! Tu vas me manquer mais je suis sûr que l'on se reverra très vite. Béatrice, Sylvie, Pascale et Fred C., j'ai eu peut être un peu moins l'occasion de vous côtoyer mais je vous remercie pour votre accueil, vos conseils et les discussions agréables que nous avons également eues durant ces trois années.

Clauuuudinnne, hé non je ne t'ai pas oublié ! Mon petit rayon de soleil ☺ Merci à toi pour ton dynamisme, ta gentillesse, ton humour et ta bonne humeur permanente. Je te remercie pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant une grande partie de ces trois années, notamment lors des moments de rush pour les missions ou pour la paperasse administrative. Merci également à Clara qui a désormais repris le flambeau. Clara, je te remercie pour ta gentillesse et ton efficacité lorsque j'ai eu besoin de toi.

Et maintenant, un immense MERCI à tous les étudiants, anciens et actuels, avec lesquels j'ai eu la chance de partager des moments inoubliables. Sans vous, le quotidien de ces trois années passées à l'IRSN n'aurait sûrement pas été le même. C'était vraiment chouette de pouvoir partager tous ces moments avec vous, d'oublier tous les tracas du quotidien le temps d'un repas, d'une randonnée, d'une partie de volley ou de pétanque, d'une baignade et également bien sûr, le temps de quelques soirées bien arrosées. Merci à vous tous : Antoine T., Nico T., Félix, Elena, Starrlight, Adeline et Benoît, Adrien, Morgan, Sandrine, Iris, Audrey, Guillaume, Delphine et Vincent, Antoine L., Kewin, Candy, Loïc, Cécile, Tristan, Marie B., Hugo, Moustapha, Shin, Amine et Rym, Yvan, Laure, Florence, Sébastien, Magalie, Ingrid, Mira, Marie T., Lucie, Vanessa, Léa et Caroline. Je ne sais même pas par qui commencer. Pour ne pas faire de jaloux et de jalouses, je vais aborder « la chose » de manière chronologique. Antoine T. dit « la poche », « le sac à vin » ou encore « ce meeeeeeeeeeeec quoi », j'ai tellement de souvenirs qui me viennent en tête mais je pense qu'il serait incorrect de tous les énumérer ! Merci à toi pour nos moments de délires, pour les nombreuses soirées où le sens du mot parcimonie est devenu une vague idée, pour les soirées FIFA ou encore les soirées pokers

interminables où avec toi, le terme « j'me couche » prenait vraiment un sens. Merci également de m'avoir fait découvrir toute la culture et le savoir de cette chère région qu'est le Nord ! J'oubliais... je te remercie également pour les tempêtes de l'eeeeespaaaace !!!! En réalité, je ne sais pas si je dois te remercier pour celles-ci. On se donne rendez-vous dans le ch'Nord « jeune homme » ! Nico T., dit « Ramucho » ou « le grec ». Je sais que tu vas tellement apprécier que je t'appelle comme ça ! Je crois qu'avec toi c'est bis-répétita. J'ai également une montagne de souvenirs qui me viennent en tête. Pour faire simple, je tiens à te remercier pour toute les « spéciales » que j'ai eu la chance de vivre avec toi : Marseille, le vieux port, la cartouche, le labo, le beat-box et la voiture. Certaines d'entre elles me font encore rire, d'autres moins ... ! Pour le côté plus soft, merci à toi pour tous les petites pauses clopes, les soirées improvisées et nos inoubliables discussions de fifous ! J'espère te revoir très vite mon petit poulet mais sache une chose ... Évite pour une fois de t'habiller comme moi ou de reproduire les mêmes faits et gestes que moi ! On va vraiment finir par croire que l'on est frère :D Morgan, celle-là « c'est pour toi mon loulou ! ». Qu'est-ce qu'on a pu rire durant la fin de ta thèse sur des répliques cultes, des bouts de films et des discussions déjantées dont nous étions les seules à avoir le secret. Merci à toi pour ces grands grands grands moments de délires, nos discussions très philosophiques, nos quelques soirées salsas et également nos façons de pensées communes. Benoit et Adeline, mes petites ch'tis ! Benoit je tiens à te remercier pour m'avoir fait découvrir le petit monde de la recherche, sans toi je ne serais également pas arrivé jusque-là. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, ta gentillesse et pour les quelques soirées chez vous. Je te souhaite plein de réussite pour ton post-doc au pays du pudding ! Adeline, Adeline, Adeline ! Merci à toi pour les franches parties de rigolades, j'ai encore de nombreux souvenirs où l'on se retrouvait la larme à l'œil... Nan mais sérieusement une collègue de bureau comme ça, j'en redemande ! Merci pour tous ces petits délires quotidiens qui illuminaient mes journées, les taquineries de bureau, mais également les échanges de blagues tellement mais teeeeeellement nulles ! Sincèrement merci à vous deux. Je pense que vous garderez de très bon souvenirs de mes talents d'imitateurs, passant du roi Burgonde à Golum et allant de Carlos à Pamela Anderson. J'espère vous revoir très vite. Starrlight, je pense que tu es la personne la plus passionnée par la recherche que je connaisse. Je te remercie pour ta sympathie, ta façon très philosophique de voir les choses et également pour ton partage de connaissances. J'ai été ravi de te revoir lors du DEB Symposium et je te souhaite une pleine réussite pour les prochaines rencontres entre « DEB guys » ! Adrien, mon cher collègue de bureau qui a su endurer mon hyperactivité durant si longtemps. Merci à toi pour toutes ces petites discussions scientifiquement très enrichissantes mais également celles totalement absurdes. Je tiens à te remercier aussi pour ces moments de décompression dans le bureau où l'on se faisait quelques panier en fin de journée ☺

Je reste persuadé que tu es quand même un sacré tricheur ! PS : tu remarqueras que j'ai pris le TEMPS d'écrire les remerciements ! Delphine, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, pour ton calme et pour m'avoir transmis tout ton savoir sur ces petites bêtes que sont les daphnies. Iris, ma « papuuuuuuchhhe » ! Que dire sur toi, il y a tellement de choses... Merci à toi ma petite confidente pour ton soutien, les soirées inoubliables chez toi, les moments également où tu as été là pour moi et vice versa, pour les dévissages complets de cerveau et les fous rires quotidiens. Je crois encore que les personnes du 190 se souviennent de nous. Je rajouterais même que les murs du 190 se souviennent de toi ! Je me remémore encore toute notre théorie sur les handicapés des sentiments, les discussions sur des sujets dignes d'enfants de 6 ans (je ne rentrerais pas dans les détails), le fameux « en mode boutez », les « wakafut wakafut », les « bump », les « pr..t », les « fesses ! » et notre faculté à exploiter la moindre faille d'une discussion. Oh tiens d'ailleurs je crois que je viens de voir passer une licorne ! Merci pour tout ma papuche et pense à faire un petit bisou sur la truffe de GnioGnio ☺ Toch et Kewin, mes petits poulets... On aura formé un sacré trio magique au cours de ces trois années. En me remémorant tous les moments passés à vos côtés, je crois que je pourrais verser ma petite larme... Sérieusement, on en a fait des belles, des moches, des spéciales, des pas drôles sur le moment, mais qu'est-ce qu'on a pu se marrer après ! Je pense que l'on pourrait écrire une thèse sur nous trois ! Afin d'écourter ce paragraphe, j'ai choisi d'illustrer tous les bons moments passés ensemble par une longue liste de mots et de citations clés : les journées des thèses, la perruque rose, le labo, « fap fap fap fait la nourrice », Top spin, « Saluuuut vous ! », les spéciales « vifs d'or », Esparron, Sébastien Loeb, le pineau, le martini, la pince à saucisse, Grease, Rowenta, la fête de la musique, votre amour spontané pour un globe oculaire le temps d'une soirée, Barcelone, « par el ... », le mail de Toch à Barcelone, Toch dégouté de son état physiologique à Barcelone, les « Johnny », les cadeaux d'anniversaire agrémentés de votre touche artistique, les décors de mon bureau lorsque je partais en mission, le cylindre, les parties de foot, les tennis, les volleys, la chaussure de Toch sur le toit, le zippo, Kendjiapéro *etc.* Et j'en passe et des meilleurs. Merci pour tous ces bons moments mais également pour m'avoir soutenu lorsque que ça n'allait pas vraiment. Je ne serais vous remercier assez. Vous êtes tous les deux des mecs géniaux et au grand cœur, je vous « nem » ! Loïc ... ce mec légendaire qui un jour banale nous sortis tout droit de l'espace cette phrase fatidique « Hé les gars, une T... ? Une T... !! » Je pense que cette phrase va être écrite dans plusieurs thèses. Un mec au grand cœur et avec une énorme générosité. Merci à toi pour nos petits délires sur les joueurs de foot improbables, les petites blagounettes du jour, nos échanges musicaux, les sandwichs pendant la phase de rédaction *etc.* À quand le marathon de New-York pour la Team Casseurs Flowteurs ?! L.I.M. te salue et te remercie pour tout ce que tu as fait pour lui. Cécile, ah Cécile ... Sacré

toi ! Je crois que j'ai eu un fou rire avec toi dès ton premier jour ! Ta personnalité sans complexe, ton grain de folie, ton « il est pas bô mon gilet ?! » et ton amour pour les petits hérissons, sont juste parfait ! Ne change rien ☺ « Merde » pour ta thèse. Marie, « Oh marie si tu savais ... », rappelle-toi du chaleureux message que nous t'avions laissé, Cécile et moi, un doux soir d'été ! Merci à toi Marie, ma compagne de bureau, pour nos folles discussions sur tout, sur rien, sur des futilités, sur la vie et sur nos vies. Je crois que ta maladresse légendaire me fera toujours rire hihhi ! J'espère que tout se passera bien pour toi et pense à prendre soin de mes petites daphnies ! Au passage, fais attention à ce que tu manges, non pas pour le poids, mais concernant les potentielles dommages épigénétiques que tu pourrais subir :D Laure, je me devais d'écrire un truc sur toi et cela va se résumer en une question : As-tu fini de rédiger ta thèse ? Trêve de plaisanterie, plein de courage à toi pour la suite. Yvan, merci à toi pour tout ce que tu es, ta personnalité légendaire, le gout du dernier mot (il faut bien que je te taquine un peu) mais surtout pour ta sympathie et ta gentillesse. Ce fut vraiment chouette d'être colocs le temps d'un séminaire ! Courage à toi aussi. Seb, j'ai vraiment appris à te connaître sur la fin. Merci à toi pour ton franc-parler, ta sincérité et nos petites discussions tardives à refaire le monde, refaire la science, refaire notre science et vider notre sac. Tout ça m'a vraiment fait du bien. Un grand merci aussi à Florence, Ingrid, Mira et Vanessa pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur humour sans faille et leur générosité. Merci à toi Ingrid pour nos petits échanges sur le monde de la science lorsque j'étais en fin de contrat. Léa, j'ai appris à te découvrir à la toute fin de me contrat et le jeu en valait la chandelle. J'ai vraiment apprécié le soutien que tu as pu m'apporter à la fin de ma rédaction, nos discussions sur la science, l'écologie, l'environnement, tes conseils, ton écoute, merci pour tout. Tiens-moi au courant pour tes petits SSD, j'ai hâte de voir ce que cela donne ! Et bon courage pour votre emménagement !

J'ai également une énorme pensée à tous mes amis, toutes les personnes qui n'étaient pas liées à ce travail de recherche mais sans qui je n'aurai sûrement jamais pu venir à bout de ce doctorat. Au cours de ces trois années, nous avons sans doute pas eu l'occasion de se voir aussi souvent que nous le faisons auparavant mais vos appels, vos messages et les quelques soirées improvisées aux quatre coins de la France m'ont fait un bien fou. On se voyait moins souvent, certes, mais avec chacun d'entre vous, j'avais l'impression que nous ne nous étions jamais quittés. Rien que pour ça, c'est vraiment touchant. Merci à Damien C. : « mon petit loulou aux 400 coups », Sylvain C. : « ma vieille bique », Kevin B., Marine C., Maxou S., Pierre S., P-A, Adrian P., Léo M., Fanny T., Elise S., Teuteu dit « le baveux de commune », mon Nicho, Phung, Pipin, Bruno, Isa H., Nath H., Martin M., Fab C., Manu P., Mad (des patates ?), Tim, Sylvain R., Cocotte, Steve C., Yoann B., Adrien C., Alban S., Théo A. *etc.*

Je dois surement en oublier et j'en suis désolé. J'aurais aimé faire un petit paragraphe sur chacun d'entre mais vous savez déjà tout le bien que je pense de vous (et je n'ai pas le temps !). Merci à vous tous, on se revoit très vite !

Pour terminer, je tenais à remercier du plus profond de mon cœur ma famille. Ceux, qui ont fait la personne que je suis aujourd'hui. Vous êtes vraiment tout pour moi. Depuis quelques années je vis loin, je suis moins présent et parfois je me suis rendu moins présent mais sachez que vous êtes tout ce que j'ai de plus cher au monde. Je vous aime.

Papa, Maman, merci à tous les deux de m'avoir toujours soutenu dans mes choix et mes décisions. Si je suis amené à écrire ces quelques lignes aujourd'hui c'est grâce à vous. Vous m'avez toujours offert les meilleurs dispositions et donner la possibilité de réaliser mes souhaits les plus chers. Je ne vous remercierais jamais assez. Merci pour votre soutien, pour votre confiance, votre aide, votre patience et pour l'amour que vous me portez. Je vous dois tout. Je vous aime.

Gaëlle, ma sœur, je pourrais retranscrire également les mêmes mots mais ils ne suffiront jamais pour te témoigner tout l'amour que je te porte. Merci à toi de m'avoir écouté durant les durs moments de labeurs, merci de m'avoir redonné confiance, de m'avoir fait sourire, rire et simplement de m'avoir écouté. Merci également de m'avoir permis de voir grandir ma petite nièce grâce aux différentes prouesses technologiques. Je voulais vous remercier, Mathieu et toi, de tout ce que vous avez fait pour moi. Votre petit passage durant l'été m'a vraiment fait du bien et m'a permis de voir l'activité débordante de ma petite nièce. Merci à tous les deux

Un grand merci également à ma belle-famille : Joëlle, Pascal, Guillaume et Rachel pour votre bonne humeur, votre soutien permanent, votre gentillesse et votre humour. Les petits moments passés chez vous m'ont permis de profiter pleinement de l'instant présent. Merci pour tout.

Enfin, mon Amour, un immense merci pour m'avoir constamment soutenu, pour m'avoir écouté, pour m'avoir réconforté, pour avoir trouvé les mots justes quand il le fallait et pour avoir pris soin de moi durant les moments les plus compliqués de ce projet. Je ne te remercierais jamais assez, merci pour ce que tu es, pour ce que tu as fait et pour tous ce que tu peux m'apporter au quotidien. Sincèrement, je n'y serais jamais arrivé sans toi.

« *Derrière chaque grand homme se cache une grande femme* ». Loin de moi l'idée de me prétendre comme un grand homme, mais sache que pour tout ce que tu es, j'estime que toi mon cœur, tu es une grande femme. Je t'aime.

A celles qui m'ont quitté.

SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Liste des figures.....	xv
Liste des tableaux.....	xxiv
Liste des annexes.....	xxv
Glossaire.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
PARTIE A : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART SUR LES RADIATIONS IONISANTES.....	9
1. Généralités sur les radiations ionisantes.....	9
1.1. Nature et types de rayonnements.....	9
1.2. Voies d'exposition.....	12
1.3. Grandeurs et unités en radioprotection.....	12
1.4. Sources d'exposition.....	13
1.4.1. Sources naturelles.....	13
1.4.2. Sources artificielles.....	14
2. La problématique environnementale.....	17
2.1. Contexte.....	17
2.2. Approche mécaniste à différents niveaux d'organisation biologique.....	20
2.3. Différence d'efficacité biologique entre les types de rayonnements.....	21
3. Mécanismes d'action des radiations ionisantes chez les organismes vivants.....	22
3.1. Interactions physico-chimiques avec la matière biologique.....	22
3.2. La radiolyse de l'eau.....	22
3.3. Lésions moléculaires.....	23
3.4. Lésions cellulaires.....	26
4. Effets biologiques radio-induits chez les organismes vivants.....	28
4.1. Exposition aiguë.....	28
4.2. Exposition chronique.....	29
4.3. Exposition multigénérationnelle.....	31
4.3.1. Effets moléculaires.....	31
4.3.2. Effets sur les traits d'histoire de vie.....	32

CHAPITRE 2 : UN MODÈLE BIOLOGIQUE : LA DAPHNIE, <i>DAPHNIA MAGNA</i>	33
1. Écologie.....	33
1.1. Habitat.....	33
1.2. Morphologie.....	33
1.3. Physiologie.....	34
2. Cycle de vie.....	35
2.1. Reproduction asexuée.....	36
2.2. Reproduction sexuée.....	37
CHAPITRE 3 : <i>DAPHNIA MAGNA</i> ET L'ÉCOTOXICOLOGIE.....	39
1. Intérêt de la daphnie en écotoxicologie.....	39
2. Étude de la toxicité de divers polluants chez la daphnie.....	40
2.1. Effets sur les traits d'histoire de vie.....	40
2.1.1. Effets chroniques.....	40
2.1.2. Effets transgénérationnels.....	41
2.2. Effets subcellulaires.....	42
2.2.1. Stress oxydatif.....	42
2.2.2. Altérations de l'ADN.....	43
2.2.3. Réparation de l'ADN.....	44
3. Étude de la toxicité des radionucléides chez la daphnie.....	45
3.1. Cas de l'uranium appauvri.....	45
3.2. Cas de la contamination alpha interne.....	46
3.3. Cas de la contamination bêta interne.....	47
3.4. Cas de l'irradiation gamma externe.....	47
3.4.1. Exposition aiguë.....	47
3.4.2. Exposition chronique.....	47
4. Radiosensibilité comparée des invertébrés.....	48
CHAPITRE 4 : LA MODÉLISATION MÉCANISTE EN ÉCOTOXICOLOGIE.....	51
1. Les modèles d'effets individuels : approche Toxicocinétique – Toxicodynamique.....	51
1.1. Généralités.....	51
1.2. Toxicocinétique (TK).....	51
1.3. Toxicodynamique (TD).....	54
2. Un modèle de budget énergétique : la théorie DEB.....	58

3. Application de la théorie DEB en écotoxicologie : le modèle DEBtox.....	60
3.1. Concept.....	60
3.2. Toxicocinétique (TK).....	61
3.3. Toxicodynamique (TD).....	62
3.4. Application du modèle DEBtox.....	67
3.4.1. Exemples.....	67
3.4.2. Application chez <i>Daphnia magna</i>	67
3.4.3. Application dans le cadre d'un contexte multigénérationnel.....	68
PARTIE B : ÉTUDE DES EFFETS DE L'IRRADIATION GAMMA EXTERNE AU COURS DE TROIS GÉNÉRATIONS SUCCESSIVES DE <i>DAPHNIA MAGNA</i> : EXPÉRIMENTATION, RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	73
CHAPITRE 1 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	77
1. Conditions d'élevage des daphnies au laboratoire.....	77
2. Adaptation du dispositif d'irradiation.....	78
2.1. Dispositif.....	78
2.2. Etude dosimétrique.....	79
2.3. Conditions d'exposition.....	80
3. Design experimental.....	83
3.1. Exposition multigénérationnelle.....	83
3.2. Suivis de la survie et de la reproduction.....	84
3.3. Mesure de la croissance somatique en taille et en masse.....	84
3.4. Altérations de l'ADN.....	84
3.4.1. Choix d'un biomarqueur : la RAPD-PCR.....	84
3.4.2. Extraction de l'ADN.....	86
3.4.3. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe : la RAPD.....	87
3.4.4. Analyses des produits de PCR.....	88
3.5. Ajustements et analyses statistiques.....	91
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	93
1. Survie.....	93
2. Croissance somatique en taille et en masse.....	94
3. Reproduction.....	95
4. Altérations de l'ADN.....	99

CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	105
1. Effets transgénérationnels sur la survie, la croissance et la reproduction.....	105
2. Accumulation et transmission d'altérations de l'ADN au cours des générations.....	107
3. Lien entre les altérations ADN et les réponses individuelles au cours des générations.....	110
4. Conclusion.....	112
 PARTIE C : ÉTUDE DES EFFETS DE LA CONTAMINATION ALPHA INTERNE AU COURS DE TROIS GÉNÉRATIONS SUCCESSIVES DE <i>DAPHNIA MAGNA</i> : PRÉSENTATION DES DONNÉES ET RÉANALYSE STATISTIQUES.....	115
CHAPITRE 1 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	119
1. Conditions d'exposition.....	119
2. Démarche expérimentale.....	119
3. Bioaccumulation et débits de dose.....	121
4. Réanalyse statistique des résultats.....	122
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS.....	125
1. Bioaccumulation et débits de dose.....	125
2. Survie.....	127
3. Croissance somatique en taille et en masse.....	128
4. Reproduction.....	131
 PARTIE D : COMPARAISON MÉCANISTE DE LA RADIOTOXICITÉ GAMMA ET ALPHA DANS UN CONTEXTE MULTIGÉNÉRATIONNEL : MODES D'ACTION MÉTABOLIQUES ET EFFICACITÉ BIOLOGIQUE RELATIVE...	135
CHAPITRE 1 : APPLICATION AU MODÈLE DEB _{tox}	139
1. Formulation du modèle.....	139
1.1. Choix des hypothèses du modèle.....	139
1.2. Choix d'une métrique de référence.....	139
1.3. Cas de l'irradiation gamma externe.....	140
1.4. Cas de la contamination alpha interne.....	141

1.5. Dynamique des effets.....	144
1.5.1. Fonctions de stress.....	144
1.5.2. Choix des modes d'action.....	144
2. Ajustements de la croissance et de la reproduction.....	148
2.1. Individus non exposés.....	148
2.2. Individus exposés.....	148
3. Paramétrage du modèle.....	150
3.1. Méthode d'ajustement.....	150
3.2. Critère d'optimisation.....	150
4. Résultats.....	153
4.1. Ajustements des individus non-exposés.....	153
4.2. Ajustements des individus exposés.....	155
4.2.1. Identification du mode d'action métabolique.....	155
4.2.2. Validation graphique des ajustements.....	157
4.2.3. Paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques estimés.....	160
CHAPITRE 2 : EFFICACITÉ BIOLOGIQUE RELATIVE ALPHA.....	167
1. Explication de la démarche.....	167
2. Résultats.....	169
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	171
1. Modes d'action métaboliques des rayonnements gamma et alpha.....	171
1.1. Irradiation gamma externe.....	172
1.2. Contamination alpha interne.....	176
1.3. Paramètres TK et TD estimés entre les deux types de rayonnements.....	179
2. Comparaison de la radiotoxicité gamma et alpha.....	180
3. Conclusion.....	183
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	185
1. Conclusion générale.....	187
1.1. Explorer le lien entre les réponses moléculaire et individuelle.....	187
1.2. Donner un sens à la radiotoxicité gamma et alpha à l'aide du modèle DEBtox.....	188
2. Perspectives de recherches.....	190

Valorisation scientifique.....	193
Références bibliographiques.....	195
Annexes.....	221

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique du vivant et leur pertinence écologique et toxicologique (d'après Fedorenkova <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figure 2. Exemple d'une chaîne de désintégration avec émission de rayonnements spontanés alpha (α) et bêta (β) : l'Uranium-238 et son élément stable, le Plomb 206.....	9
Figure 3. Pouvoir pénétrant des différents types de rayonnements (Delacroix <i>et al.</i> , 2012).....	11
Figure 4. Particule alpha.....	10
Figure 5. Particule bêta.....	10
Figure 6. Rayon gamma.....	10
Figure 7. Représentation schématique des événements de Transfert d'Énergie Linéique (TEL) des différents types de rayonnements (α , β et γ) passant dans un volume de matière.....	11
Figure 8. Doses annuelles de radioactivité naturelle reçues en moyenne par les organismes terrestres supérieurs (Beyer et Meador, 2011).....	14
Figure 9. Comparaison des dépôts radioactifs de césium-137 (en Bq.m ²) entre le site de Fukushima et de Tchernobyl (Brumfiel, 2011).....	15
Figure 10. Illustration des relations biologiques allant de l'exposition aux rayonnements ionisants jusqu'à la qualité de l'écosystème. (Adaptée de Jha, 2008).....	20
Figure 11. Schéma synthétisant les différentes étapes de la radiolyse de l'eau radio-induite.....	23
Figure 12. Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (Goodhead, 1999).....	25
Figure 13. Voies de réparation et conséquences cellulaires suite à une exposition aux rayonnements ionisants.....	27
Figure 14. Gamme de doses létales de radiations ionisantes pour différents groupes d'organismes, mettant en évidence leurs différences de radiosensibilité (Coppstone <i>et al.</i> , 2001).....	28
Figure 16. Cycle de vie de <i>Daphnia magna</i> (Ebert, 2005).....	35
Figure 17. Reproduction parthénogénétique de <i>Daphnia magna</i>	36
Figure 18. Photographie d'un mâle de 21 jours (A) et d'une éphippie issue de la reproduction sexuée (B) (Zeman, 2008).....	37
Figure 19. Schéma conceptuel résumant les approches Toxicocinétiques - Toxicodynamiques (TKTD) en modélisation écotoxicologique (d'après Jager et Zimmer, 2013).....	52
Figure 20. Schéma résumant l'internalisation et l'élimination d'un composé toxique dans un organisme vivant. Avec C_e la concentration externe, C_i la concentration interne, k_a et k_e les taux respectifs d'accumulation et d'élimination du composé toxique.....	53
Figure 21. Schéma conceptuel résumant les principales approches Toxicocinétiques - Toxicodynamiques (TKTD) en modélisation écotoxicologique. Les différents processus intervenant dans ces deux compartiments au cours du temps y sont sommairement détaillés..	57

Figure 22. Concept de la théorie de Budget d’Energie Dynamique avec les principaux processus métabolique (Kooijman, 2010).....	58
Figure 23. Organisation conceptuelle des flux d’énergie dans un modèle DEB standard (Kooijman, 2010).....	59
Figure 24. Courbes de croissance et de reproduction théoriques en conditions optimales. Avec, L : Taille ; L_b : Taille à la naissance ; L_p : Taille à la puberté ; L_m : Taille maximale, r_B : Taux de croissance de von Bertalanffy ; R_{cum} : Reproduction cumulée en nombre de descendants....	60
Figure 25. Concepts Toxicocinétique et Toxicodynamique d’un modèle DEBtox simplifié : comment un contaminant est internalisé au cours du temps dans un organisme (à gauche) et comment cette internalisation induit un stress toxique dans l’organisme (à droite). Avec C_i^* : la concentration interne normalisée, σ : le stress toxique, b : la pente d’intensité de stress et NEC : la concentration sans effet du toxique.....	62
Figure 26. Organisation conceptuelle des flux d’énergie dans un modèle DEB standard (Kooijman, 2010) et modes d’actions métabolique du modèle DEBtox simplifié (Jager et Zimmer, 2012). Modes d’action (1) : réduction de l’assimilation, (2) : augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité, (3) : augmentation des coûts de croissance et de maturation ; (4) : mortalité pendant l’ovogenèse et (5) : augmentation des coûts de production d’un œuf.....	63
Figure 27. Représentation schématique des évènements toxicocinétiques et toxicodynamiques d’un modèle DEBtox simplifié, menant à partir d’une exposition initiale à un toxique, à des effets finaux sur la reproduction, la croissance (et la survie) d’un organisme de taille « l ».....	66
Figure 28. Insertion d’un compartiment de dommages supplémentaire dans le cadre d’une approche TK-TD classique. Le niveau de dommage est utilisé comme métrique de référence en alternative à la concentration interne ou externe du contaminant (Jager et Zimmer, 2013).....	68
Figure 29. Représentation des effets de l’uranium appauvri (U appauvri) au cours de deux générations (F0 et F1), avec A) Une internalisation similaire de l’U appauvri dans les générations F0 et F1, nécessitant C) des valeurs de NEC (<i>No Effect Concentration</i>) distinctes entre les générations F0 et F1 pour décrire (sans expliquer) les effets observés au fil des générations (Massarin et al., 2011) et B) une accumulation transgénérationnelle de dommages, donnant D) une valeur unique de NED (<i>No Effect Damage</i>) dans les générations F0 et F1 pour expliquer l’aggravation des effets au fil des générations (Alonzo et al., 2014).....	70
Figure 30. Photographie de l’élevage de daphnies (A) et des cultures d’algues (B).....	77
Figure 31. Dispositif d’irradiation de l’installation MIRE (IRSN). Photographie d’une chambre thermostatique ventilée avec son mur de plomb (A) et d’une source de Cs-137 solide ouverte avec son plateau métallique permettant d’accueillir les unités expérimentales (B).....	78
Figure 32. Présentation du type d’unité expérimentale utilisé durant l’expérience d’irradiation.....	80
Figure 33. Dispositif expérimental utilisé durant l’expérience d’irradiation gamma externe. Vingt-quatre unités expérimentales (U.E.) ont été disposées le long d’un cercle externe autour des sources liquides S4, S3 et S2. Vingt-quatre (12 +12) unités expérimentales ont été disposées le long de deux cercles externes et internes autour des sources solides S1A et S1B. Des	

dosimètres Radio Photo Luminescent (a) ont été placés sur les faces avant et arrière des unités expérimentales afin de valider les débits de dose nominaux durant l'expérience.....	81
Figure 34. Dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL) utilisés lors de l'expérimentation.....	82
Figure 35. Design expérimental de l'irradiation gamma externe multigénérationnelle.....	83
Figure 36. Synthèse de l'extraction d'ADN sur les échantillons de daphnies adultes et néonates avec une étape de lyse, de liaison sur la membrane des colonnes, de lavage et d'éluion.....	86
Figure 37. Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR) : illustration d'un cycle de PCR.....	88
Figure 38. Courbes de températures de fusion théoriques de l'ADN. Les courbes et les pics de couleurs différentes correspondent à l'analyse de deux échantillons différents.....	89
Figure 39. Courbes d'amplification théoriques de l'ADN représentant l'amplification de deux échantillons d'ADN différents dont les deux courbes dépassent le bruit de fond (courbe en pointillé noir) de l'intensité de fluorescence.....	90
Figure 40. Proportion de daphnies survivantes ($n = 10$) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ . Aucune différence statistique significative avec le témoin. Les barres d'erreur ont été retirées pour une meilleure lisibilité.....	93
Figure 41. Taille du corps des daphnies (mm) en fonction de leur âge (jours) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ . Les données expérimentales et les courbes de croissance de von Bertalanffy (ajustées avec l'équation (1.4), Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Différences statistiques significatives avec le témoin (Tests multiples de Holm) : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; $n = 19$	94
Figure 42. Masse sèche des daphnies (μg) en fonction de leur taille (mm) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ . Les données expérimentales et les courbes (Equation (1.6), Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Aucune différence statistique significative; $n = 19$	95
Figure 43. Production de néonates cumulée par daphnie en fonction de leur âge (jours) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ . Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; Tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticales et les différences significatives d'âge au moment de la libération des pontes par rapport au témoin (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par des astérisques horizontales : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; $n = 10$	96
Figure 44. Masse sèche des œufs (μg) en fonction de la taille des mères (mm) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ . Les données expérimentales et les courbes (Equation (1.7),	

Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Aucune différence statistique significative; $n = 19$	97
Figure 45. Schéma illustrant (A) l'apparition des dommages moléculaires et l'initiation des processus de réparation en fonction de la dose d'irradiation et (B) les répercussions de ces différents processus sur les cinétiques d'effets à l'échelle de l'organisme (d'après <i>Burlakova et al., 1998</i>).....	108
Figure 46. Synthèse des effets de l'irradiation γ entre les échelles moléculaire et individuelle.....	113
Figure 47. Design expérimental de l'exposition multigénérationnelle à l'Am-241.....	120
Figure 48. Bioaccumulation de l'Américium (kBq.mL^{-1}) dans les tissus des daphnies (A) et dans leurs cuticules (B) en fonction des concentrations et de leurs âges, correspondant aux dépôts des différentes pontes (B1 : ponte 1, B3 : ponte 3 et B6 : ponte 6) au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Les symboles † indiquent les mesures non réalisées pour cause de mortalité. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types ($n=3$).....	125
Figure 49. Proportion de daphnies survivantes et reproductrices ($n=10$) aux concentrations d'Am-241 de $0,4 \text{ Bq.mL}^{-1}$ (A), $4,0 \text{ Bq.mL}^{-1}$ (B) et 40 Bq.mL^{-1} (C) en fonction du stade de vie (Néo : Néonates, B1 : libération de la ponte 1, B5 : libération de la ponte 5) dans les trois générations successives F0, F1 et F2. La somme des adultes reproducteurs et non reproducteurs représentent les daphnies survivantes. L'apparition de mâles est indiquée par le symbole ♂. 128	128
Figure 50. Tailles des daphnies (mm) en fonction de leur âge (en jours) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de $0,4$; $4,0$ et 40 Bq.mL^{-1} . Les symboles représentent les données expérimentales de chaque condition et les courbes représentent les meilleurs ajustements estimés avec le modèle de croissance de von Bertallanfy (Eq. 2.1. Tableau 14). Différences significatives avec le témoin (tests multiples de Holm) : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; $n = 12$	129
Figure 51. Masse sèche des daphnies (μg) en fonction de leurs tailles (mm) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de $0,4$; $4,0$ et 40 Bq.mL^{-1} . Les données expérimentales ($n = 12$) et les meilleurs ajustements associés sont représentés respectivement par les points et les courbes (Eq. 2.2. Tableau 14). Aucune différence statistique significative.....	129
Figure 52. Nombre cumulé de néonates par daphnie en fonction de leurs âges (en jours) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de $0,4$; $4,0$ et 40 Bq.mL^{-1} . Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; Tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticales et les différences significatives d'âge au moment de la libération des pontes par rapport au témoin (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par des astérisques horizontales : * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; $n = 11$	131
Figure 53. Masse sèche des œufs en fonction de la taille du corps des daphnies adultes au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de $0,4$; $4,0$ et 40 Bq.mL^{-1} . Les données expérimentales ($n = 12$) et les meilleurs ajustements associés	

sont représentés respectivement par les points et les courbes (Eq. 2.3. Tableau 14). Aucune différence statistique significative.....	132
Figure 54. Synthèse des effets de la contamination alpha interne à l'échelle individuelle.....	133
Figure 55. Irradiation gamma externe constante au cours du temps.....	140
Figure 56. Contamination alpha interne convertie en $DR\alpha$ au cours du temps.....	141
Figure 57. Représentation des variations de Coefficients de Conversion de Dose (DCC, $mGy.h^{-1}.Bq^{-1}.mL$) en fonction de la taille des daphnies (mm), utilisés pour convertir la concentration d'Am-241 ($Bq.mL^{-1}$) en débit de dose alpha ($DR\alpha$, $mGy.h^{-1}$) dans les différents compartiments (tissus, cuticule et milieu).....	143
Figure 58. Représentation des modèles DEBtox utilisés pour analyser les données des expériences d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne. Seuls les modes d'action testés au cours des analyses sont représentés sur la figure.....	147
Figure 59. Ajustements des données de croissance (A) et de reproduction (B) des individus témoins de l'expérience multigénérationnelle (F0, F1 et F2) d'irradiation gamma externe. Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.....	153
Figure 60. Ajustements des données de croissance (A) et de reproduction (B) des individus témoins de l'expérience multigénérationnelle (F0, F1 et F2) de contamination alpha interne. Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.....	154
Figure 61. Ajustements DEBtox aux données de croissance et de reproduction provenant de l'expérience d'irradiation gamma externe, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de croissance et de maturation, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.....	158
Figure 62. Ajustements DEBtox aux données de croissance et de reproduction provenant de l'expérience de contamination alpha interne, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de maintenance, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.....	159
Figure 63. Ajustements DEBtox aux données de bioaccumulation de l'Am-241 dans les tissus et la cuticule provenant de l'expérience de contamination alpha interne, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de maintenance, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.....	160
Figure 64. Courbes prédites des niveaux de dommages transgénérationnels D_1^* et D_2^* (lignes continues) normalisés par le débit de dose gamma (lignes discontinues) estimé durant l'expérience d'irradiation gamma externe. Les niveaux de dommages D_1^* et D_2^* sont respectivement associés à une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de croissance et de maturation.....	164
Figure 65. Courbes prédites des niveaux de dommages transgénérationnels D_1^* et D_2^* (lignes continues) normalisés par le débit de dose alpha (lignes discontinues) estimé durant l'expérience de contamination alpha interne. Les niveaux de dommages D_1^* et D_2^* sont	

respectivement associés à une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts maintenance.....	165
Figure 66. Prédiction DEBtox des niveaux de stress des différents modes d'action associées à la radiotoxicité gamma et alpha. Les niveaux de stress σ sont présentés en fonction de la dose cumulée alpha et gamma au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) d'exposition et pour un débit de dose de même intensité ($\sim 11,3 \text{ mGy.h}^{-1}$).....	166
Figure 67. Représentation graphique de l'évolution des effets sur la croissance (en %) des daphnies exposées aux rayonnements alpha (Am-241) et gamma (Cs-137) de la génération F2 en fonction de la dose cumulée (en Gy). Exemple d'une comparaison avec les conditions d'exposition à 40 Bq.mL^{-1} et $35,4 \text{ mGy.h}^{-1}$ pour respectivement le rayonnement alpha et gamma où un niveau d'effet identique de 5% est observé. <i>Dtest</i> et <i>Dref</i> correspondent aux doses cumulées (en Gy) reçues par les daphnies, respectivement exposées à l'Am-241 et au Cs-137 pendant trois générations successives.....	168
Figure 68. Schéma illustrant les répercussions modulées des dommages moléculaires (Stress oxydatifs et dommages ADN) et de l'allocation d'énergie investie dans les mécanismes de réparation (enzymes antioxydantes et réparation de l'ADN) en réponse à une irradiation gamma (d'après Won <i>et al.</i> , 2014).....	175
Figures 69. Synthèse des principaux effets observés lors d'une exposition de daphnies à l'irradiation gamma externe (Cs-137) au cours de trois génération successives (F0, F1 et F2) associés aux modes d'action métaboliques prédits par les analyses DEBtox.....	183
Figures 70. Synthèse des principaux effets observés lors d'une contamination alpha interne de daphnies à l'Am-241 au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2) associés aux modes d'action métaboliques prédits par les analyses DEBtox.....	184
Figure 71. Représentation des dépôts d'énergie des particules gamma lors d'une simulation numérique. Les zones tendant vers une couleur orange-rouge sont les zones où les dépôts d'énergie sont les plus denses (N.Dubourg/IRSN).....	228
Figure 72. Mesure de la taille du corps d'une daphnie.....	233

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Valeurs seuils de référence (en débits de doses, $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) proposées par de nombreux organismes internationaux comme étant pertinentes pour la protection des populations terrestre et aquatique. Le sens et l'usage des valeurs diffèrent selon les groupes d'organismes.....	19
Tableau 2. Synthèse de la radiotoxicité des rayonnements alpha (α), beta(β) et gamma (γ) chez plusieurs espèces d'invertébrés en fonction du temps (heures ou jours) et du régime d'exposition (quantité : en $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $\text{Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$; débit de dose : en $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ou $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$).....	49
Tableau 3. Paramètres d'un modèle DEBtox simplifié avec leurs symboles, leurs interprétations et leurs unités (# pour les nombres, l pour la taille de l'organisme, L pour l'étendue du paramètre, t pour le temps et [-] pour un paramètre sans dimension).....	65
Tableau 4. Débits de dose délivrés aux daphnies au centre des unités expérimentales, estimés avec les calculs de Monte Carlo N-Particle (MCNP) et mesurés avec des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL), selon l'activité de la source (en Bq) et la position des unités expérimentales dans la chambre d'irradiation. Les valeurs représentent les moyennes \pm plage de variation calculée entre les parois proximales et distales des unités expérimentales. L'erreur relative est la différence (en %) entre les débits de doses nominaux et mesurés.....	82
Tableau 5. Équations et paramètres de taille des daphnies associés aux changements de la masse sèche des adultes et des œufs en accord avec la théorie DEB (Kooijman, 2010).....	91
Tableau 6. Paramètres estimés pour la croissance en taille, la fécondité cumulée sur cinq pontes et l'âge au moment de la libération des pontes 1,3 et 5 pour les daphnies exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Différences statistiques significatives avec le témoin : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. L_m : Taille maximale du corps, L_b : taille du corps à la naissance et r_B : le taux de croissance de von Bertalanffy (j^{-1}). Fécondité cumulée : Moyenne \pm SD (<i>Standard Deviation</i>).....	98
Tableau 7. Nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPA9 (à partir des résultats des <i>Ct</i>) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2 ' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats sont les moyennes \pm SEM (multipliées par 10^3 pour faciliter la lecture). Les différences significatives avec le témoin (Test U de Mann-Whitney): * $p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates.....	101
Tableau 8. Nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPB10 (à partir des résultats des <i>Ct</i>) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2 ' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats sont les moyennes \pm SEM (multipliées par 10^3 pour faciliter la lecture). Les différences significatives avec le témoin (Test	

U de Mann-Whitney): $*p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates..... 102

Tableau 9. Fréquence d'apparition des produits de PCR avec l'amorce OPA9 en fonction de la température de fusion (T_m fréquence par intervalle de température) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes provenant des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Différences significatives avec le témoin (Table 2x2 de contingence avec simulation Monte Carlo): $*p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates..... 103

Tableau 10. Fréquence d'apparition des produits de PCR avec l'amorce OPB10 en fonction de la température de fusion (T_m fréquence par intervalle de température) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes provenant des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Différences significatives avec le témoin (Table 2x2 de contingence avec simulation Monte Carlo): $*p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates..... 104

Tableau 11. Synthèse des résultats RAPD-PCR. Altérations de l'ADN significativement détectées avec les amorces OPA9 et OPB10 entre les daphnies témoins et celles exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137), (A) dans les générations P, F0, F1, F2 et F3 : néonates (à l'éclosion), B1 et B5 (adultes au moment de la libération des pontes 1 et 5) ; et (B) dans les générations F1', F2' et F3' : néonates de la ponte 1 (à l'éclosion). La génération P = parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats des amorces OPA9 et OPB10 sont respectivement référencées à gauche et à droite des barres obliques (avec, OPA9/OPB10) : une seule astérisque ($[\star/ \]$ ou $[/ \star]$) indique la détection de différences significatives soit sur les Ct ou soit sur les T_m de l'amorce considérée ($p \leq 0,05$); une double astérisque ($[\star\star / \]$ ou $[/ \star\star]$) indique la détection de différences significatives à la fois sur les Ct et les T_m de l'amorce considérée ($p \leq 0,05$) ; une barre oblique sans astérisques $[/]$ indique qu'aucune altérations de l'ADN n'a été détectées (avec les deux amorces)..... 100

Tableau 12. Débits de dose les plus faibles (en $mGy.h^{-1}$) induisant des effets observables (*LOEDR*, « *Lowest Observed Effect Dose Rates* ») sur l'ADN, la survie, la croissance et la reproduction des daphnies exposées à l'irradiation gamma au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) : Néo (néonates à l'éclosion), B1 et B5 (adultes au moment de la libération des pontes 1 et 5). Seuls les *LOEDR* sur l'ADN, la croissance et la reproduction des daphnies représentent des effets significatifs de l'irradiation gamma par rapport au témoin. Les *LOEDR* sur la survie représentent uniquement une tendance d'effet statistiquement non significative. Les astérisques indiquent qu'aucune différence significative sur la croissance et la reproduction des daphnies n'a été détectée aux débits de dose intermédiaires (de 0,070 à 4,70 $mGy.h^{-1}$) de la génération F0. NE = Aucun effet observé ; - = mesures non applicables..... 110

Tableau 13. Coefficients de conversion de dose (DCCs) utilisés pour estimer les débits de dose (en mGy.h ⁻¹) délivrés aux daphnies en fonction de leurs tailles (en mm) et de la concentration en Am-241 dans les tissus internes, la cuticule et le milieu d'exposition (Alonzo <i>et al.</i> , 2008).....	122
Tableau 14. Équations et paramètres de taille des daphnies associés aux changements de la masse sèche des adultes et des œufs en accord avec la théorie DEB (Kooijman, 2010).....	123
Tableau 15. Débits de dose moyens (mGy.h ⁻¹) délivrés aux daphnies au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2) en fonction des différentes conditions d'exposition d'Am-241, de la contribution des tissus et de la cuticule des daphnies.....	126
Tableau 16. Paramètres estimés pour la croissance en taille, la fécondité cumulée sur cinq pontes et l'âge au moment de la libération des pontes 1,3 et 5 pour les daphnies exposées aux concentrations d'Am-241 de ,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL ⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Différences statistiques significatives avec le témoin : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. L_m : Taille maximale du corps, L_b : taille du corps à la naissance et r_B : le taux de croissance de von Bertallanfy (j ⁻¹). Fécondité cumulée : Moyenne \pm SD (<i>Standard Deviation</i>).....	130
Tableau 17. Combinaisons de modes d'action testées pour les rayonnements gamma et alpha. Les modes d'action affectant directement la reproduction correspondent à une augmentation des coûts de production d'un œuf (<i>Modèle Coûts</i>) et une mortalité pendant l'ovogenèse (<i>Modèle Hasard</i>). Les modes d'action affectant indirectement la croissance et la reproduction, correspondent à une augmentation des coûts de croissance et de maturation (<i>Modèle Croissance</i>), et une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (<i>Modèle de Maintenance</i>).....	145
Tableau 18. Équations et hypothèses communes ou distinctes entre les analyses DEBtox menées sur l'irradiation gamma externe et la contamination alpha interne.....	146
Tableau 19. Liste des paramètres DEBtox utilisés dans les équations.....	149
Tableau 20. Paramètres physiologiques des individus témoins estimés pour chaque expérience (gamma et alpha) et chaque génération (F0, F1 et F2).....	155
Tableau 21. Sommes des moindres carrés pondérées ($wRSS$) et leurs composantes non pondérées pour la croissance et la reproduction, respectivement $RSS_{(croissance)}$ et $RSS_{(reproduction)}$, obtenues pour les différentes combinaisons de modes d'action testées sur les données d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne.....	155
Tableau 22. Paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques des modèles DEBtox donnant les meilleurs ajustements (meilleurs $wRSS$) parmi toutes les combinaisons de modes d'action testées pour les expériences d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne. Les paramètres k_a , k_e et $k_{s/v}$ sont communs aux deux modes d'action testés pour le rayonnement alpha. Les valeurs entre crochets concernent la cinétique d'internalisation de l'Am-241.....	161
Tableau 23. Valeurs de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma calculée pour un même niveau d'effet (en %) sur la croissance, la reproduction et la survie des daphnies en fonction de la dose accumulée au cours des trois générations successives. Les valeurs d'EBR présentées correspondent au rapport entre la dose	

absorbée par les daphnies (en Gy) entre le rayonnement gamma (Cs-137) et le rayonnement alpha (Am-241).	169
Tableau 24. Valeurs de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma calculée pour un même niveau d'effet (en %) sur la croissance, la reproduction et la survie des daphnies en fonction de la dose accumulée au cours de la génération F2. Les valeurs d'EBR présentées correspondent au rapport entre la dose absorbée par les daphnies (en Gy) entre le rayonnement gamma (Cs-137) et le rayonnement alpha (Am-241).....	170
Tableau 25. Préparation du milieu M4 à pH 8.....	223
Tableau 26. Préparation de la solution mère I.....	224
Tableau 27. Préparation de la solution de vitamines.....	224
Tableau 28. Composition et proportion des solutions stock utilisées pour la préparation du milieu HSM.....	225
Tableau 29. Résultats de l'expérience préliminaire visant à évaluer la quantité d'ADN contenue dans une daphnie adulte (n=1) et leurs néonates (n=25) au moment des ponte 1 et ponte 5.....	231
Tableau 30. Paramètres estimés pour la masse sèche des adultes et la masse sèche des œufs, chez les daphnies exposées au rayonnement gamma externe (Cs-137) aux débits de dose de 0 ; 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h ⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Aucune différence significative avec le témoin; n = 19 pour la masse sèche des adultes et n = 19 pour la masse sèche des œufs. δ : coefficient de forme ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$); β : pente de régression linéaire ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}$); ω : interception de régression linéaire (μg).....	235
Tableau 31. Paramètres estimés pour la masse sèche des adultes et la masse sèche des œufs, chez les daphnies exposées aux concentrations de contamination alpha interne (Am-241) de 0 ; 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL ⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Aucune différence significative avec le témoin; n = 12 pour la masse sèche des adultes et n = 12 pour la masse sèche des œufs. δ : coefficient de forme ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$); β : pente de régression linéaire ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}$); ω : interception de régression linéaire (μg).....	236

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Préparation du milieu d'élevage.....	223
Annexe 2. Préparation du milieu de culture d'algues.....	225
Annexe 3. Dosimétrie.....	227
Annexe 4. Étude préliminaire.....	231
Annexe 5. Mesure de la taille des daphnies.....	233
Annexe 6. Résultats expérimentaux de masse sèche.....	235
Annexe 7. Article scientifique.....	237

GLOSSAIRE

ADN (Acide désoxyribonucléique) : constitue la molécule du support de l'information génétique héréditaire.

Apoptose : processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un stress ou à un contaminant.

Biomarqueurs : indicateur permettant d'évaluer une réponse biologique d'un organisme face à stress ou à un contaminant.

Cellule germinale : cellule reproductrice susceptible de former les gamètes.

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

CEx : concentration à partir de laquelle x% d'effet sur le paramètre considéré est observé.

CLx : concentration à partir de laquelle x% de mortalité est observée.

DEBtox : modèle mécaniste décrivant le Budget d'Énergie Dynamique appliqué à la toxicologie.

Écotoxicologie : étude des effets des facteurs chimiques, physiques et biologiques sur l'ensemble des êtres vivants.

Effets déterministes : effets se produisant à partir d'une dose seuil de radioactivité. Ils se déclarent de manière précoce et sont proportionnels à la dose absorbée.

Effets stochastiques : effets se produisant aléatoirement. Ils se déclarent à de très faibles doses et apparaissent tardivement après l'exposition (semaines, mois, années).

Efficacité Biologique Relative (EBR) : valeur calculée sur la base du rapport de doses requises entre deux types de rayonnement pour provoquer le même niveau d'effet.

Épigénétique : ensemble des mécanismes pouvant potentiellement réguler l'expression de certains gènes suite à un stress. Ces mécanismes peuvent être héréditaires sans pour autant changer la séquence d'ADN de l'organisme.

Gène : unité de base d'hérédité contrôlant un caractère particulier. Cet élément génétique correspond à un segment d'ADN situé à un endroit bien précis sur un chromosome.

Génotoxicité : étude des changements induits par un polluant au niveau du matériel génétique des organismes vivants.

Histoire de vie : ensemble de caractères biologiques (dit « traits ») définissant le cycle de vie d'un organisme et contribuant à sa survie et à sa reproduction.

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

Métrique : qui a rapport aux mesures auxquelles il sert de base.

RAPD (« Random amplified Polymorphic DNA » ou « Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe ») : test permettant de détecter les lésions primaires de l'ADN, basé sur l'amplification aléatoire de fragment d'ADN.

INTRODUCTION

Les activités anthropiques liées à la production d'énergie nucléaire, ainsi que la multiplicité des usages du nucléaire dans les domaines industriels, médicaux ou militaires, ont contribué et contribuent encore à des rejets continus de radionucléides dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Aarkrog, 2003). Bien que ces rejets soient actuellement hautement régulés et contrôlés, de larges quantités d'éléments radioactifs ont pu se retrouver dans l'environnement suite aux accidents nucléaires de Tchernobyl en 1986 ou encore celui de Fukushima-Daiichi en 2011. Face à la demande croissante d'énergie dans le monde, l'impact environnemental des radiations ionisantes est devenu une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure au cours des dernières décennies (ICRP, 1991, 2007; Pentreath *et al.*, 2015). De nombreux organismes nationaux et internationaux ont développé des cadres de recherches afin de fournir des critères et des approches méthodologiques pour la protection de l'environnement (Williams, 2004; Larsson, 2008; Howard *et al.*, 2010; Hinton et Février, 2011). Ces différentes approches ont notamment permis de prédire des niveaux d'exposition en deçà desquels aucune répercussion n'est attendue pour les populations animales et végétales. Cependant, il existe encore un manque considérable de données concernant : les expositions chroniques à faibles doses, les effets à différents niveaux d'organisation biologique ainsi que les effets des différents types de rayonnements (alpha, bêta et gamma) présents dans l'environnement.

Les polluants, incluant les contaminants radioactifs, ont la capacité d'agir à tous les niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la cellule, de l'individu à la population et des communautés aux écosystèmes (Adam-Guillermin *et al.*, 2012; Dallas *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2014; Fuller *et al.*, 2015). Suite à une exposition à un polluant, les réponses biologiques induites à une échelle donnée peuvent avoir des répercussions en cascades sur les autres niveaux d'organisation biologique (Figure 1). Si les mécanismes d'action toxique des radiations ionisantes sont relativement bien décrits aux niveaux moléculaire et cellulaire, les conséquences délétères sur l'individu, et jusqu'aux écosystèmes, restent complexes et en majorité méconnues sur le long terme. Comprendre comment les polluants peuvent affecter les espèces naturelles à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur en écotoxicologie et en radioécologie. Dans ce contexte, une compréhension mécanistique des liens unissant les différentes perturbations observées est nécessaire pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes. Ces processus, écologiquement pertinents, permettront d'extrapoler les effets observés de l'individu jusqu'à la cible d'intérêt de la radioprotection environnementale : la population (Forbes et Calow, 1999; Stark *et al.*, 2004).

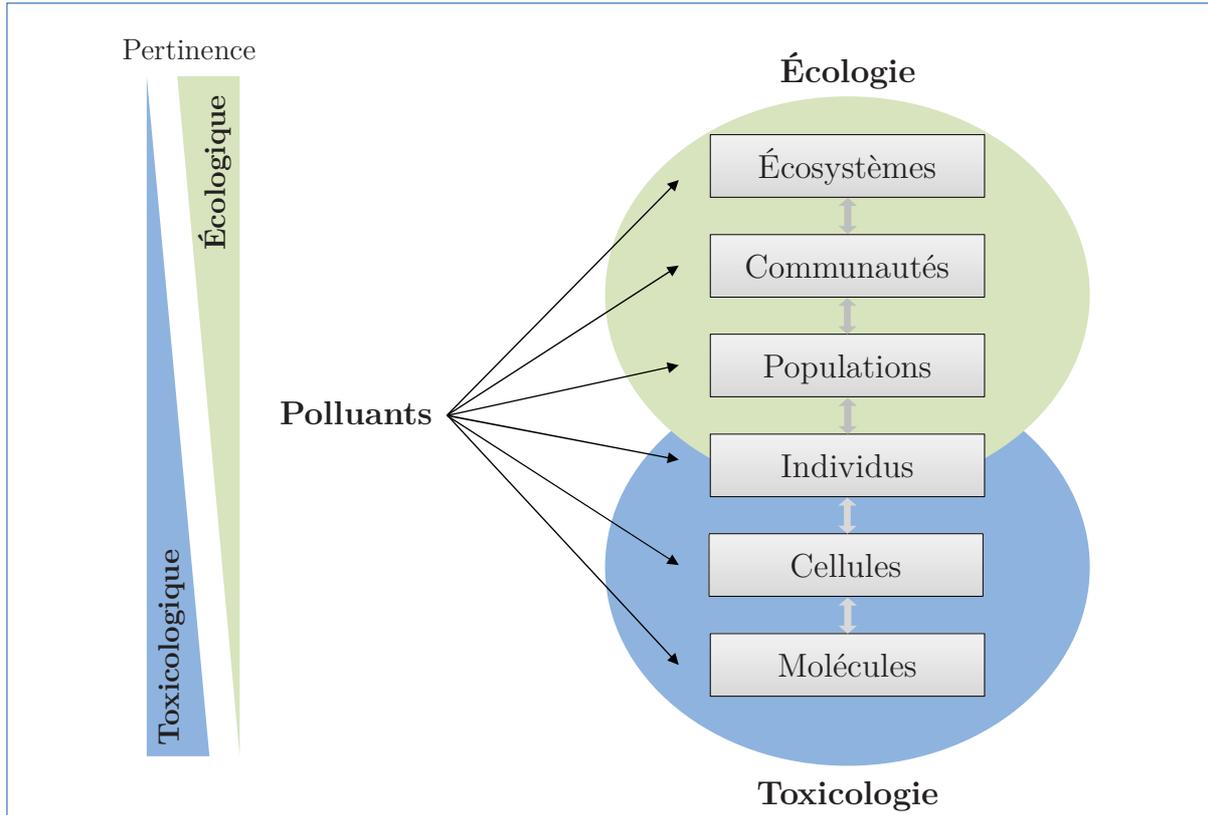


Figure 1. Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique du vivant et leur pertinence écologique et toxicologique (d'après Fedorenkova *et al.*, 2010).

Cependant, les scénarios d'exposition dans lesquels les effets sont analysés en laboratoire sont rarement représentatifs des conditions environnementales auxquelles les populations naturelles sont réellement exposées. D'une part, les effets des radiations ionisantes sont fréquemment étudiés lors d'expositions limitées à une seule génération ou à un stade de vie spécifique. Or, dans l'environnement, les temps d'exposition dépassent largement la longévité des individus et impliquent plusieurs générations. D'autre part, les niveaux d'exposition étudiés sont bien souvent trop éloignés des recommandations fixées par les normes de radioprotection. Plusieurs études évaluant les effets à long terme des radiations ionisantes, montrent que les observations dans la première génération ne sont pas représentatives des effets dans les générations suivantes (Alonzo *et al.*, 2008; Hiyama *et al.*, 2012; Plaire *et al.*, 2013; Buisset-Goussen, 2014).

Dans ce contexte, l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) a contribué au cours des dernières années à éclaircir cette facette dans le cadre du programme ENVIRHOM (Radioprotection de l'ENVIRONNEMENT à l'HOMME) et par l'intermédiaire du réseau d'excellence européen en radioécologie STAR (STRATEGY for Allied Radioecology). Leurs objectifs étaient d'apporter de nouvelles connaissances scientifiques dans la compréhension des mécanismes de toxicité des radiations ionisantes en conditions d'exposition réalistes.

Plusieurs études expérimentales et de modélisation ont été menées dans le cadre du WorkPackage 5 (WP5) du réseau d'excellence STAR afin: (i) d'identifier les mécanismes d'action des radiations ionisantes à faibles doses, (ii) de comparer les effets entre les types de rayonnements (alpha et gamma), (iii) de prédire les conséquences à l'échelle des populations et (iii) de tester la robustesse des normes de radioprotection en vigueur sur des espèces représentatives des écosystèmes. Une exposition multigénérationnelle a récemment été réalisée afin d'étudier les effets toxiques de l'uranium appauvri chez la daphnie, *Daphnia magna* au cours de plusieurs générations (Plaire *et al.*, 2013). Les résultats montrent une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies au fil des générations en parallèle d'une accumulation transgénérationnelle des dommages à l'ADN. Une approche mécaniste, basée sur la théorie du Budget d'Énergie Dynamique appliquée à la toxicologie (DEBtox), a ensuite été mise au point à partir des données multigénérationnelles. Ce modèle a permis d'identifier les modes d'action physiologiques impliqués dans l'aggravation des effets sur les traits d'histoire de vie de la daphnie au cours des générations (Alonzo *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, les travaux réalisés dans la présente thèse visent à apporter de nouvelles connaissances relatives aux effets des radiations ionisantes à faibles doses au cours d'une exposition multigénérationnelle de la daphnie, *D. magna*. La daphnie est un micro-crustacé d'eau douce vivant dans les eaux stagnantes et couramment utilisée en écotoxicologie. Avec une petite taille, un cycle de vie court et une reproduction clonale, cette espèce est particulièrement intéressante pour évaluer la toxicité des polluants au cours de plusieurs générations.

Afin de répondre à cet objectif, une stratégie en deux étapes a été mise en place. Tout d'abord, une irradiation gamma externe à des doses pertinentes du point de vue environnemental a été réalisée sur *D. magna* pendant trois générations successives. Les objectifs de cette démarche étaient les suivants : (i) examiner si de faibles débits de dose d'irradiation gamma induisent une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies au cours des générations, (ii) tester s'il existe une accumulation et une transmission d'altérations à l'ADN au fil des générations et (iii) comparer les réponses radiotoxiques entre les échelles moléculaire et individuelle. Dans un second temps, un modèle DEBtox a été mis au point pour analyser les données multigénérationnelles d'irradiation gamma externe ainsi que les données d'une étude antérieure de contamination alpha interne menée sur *D. magna* au cours de trois générations successives (Alonzo *et al.*, 2008). Les objectifs de cette démarche étaient les suivants : (i) ré-analyser statistiquement les données de contamination alpha pour pouvoir les implémenter dans le modèle DEBtox, (ii) identifier le ou les modes d'action physiologiques impliqués lors d'expositions gamma et alpha et (iii) d'estimer l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha interne par rapport au rayonnement gamma externe.

Ce document s'articule en 4 grandes parties :

- La partie A correspond à l'étude bibliographique. Dans cette partie, un chapitre est consacré à l'état de l'art sur les radiations ionisantes. Le second chapitre concerne le modèle biologique, *Daphnia magna*. Le troisième chapitre concerne *Daphnia magna* et l'écotoxicologie. Enfin, le dernier chapitre de cette partie s'intéresse à la modélisation mécaniste en écotoxicologie.
- La partie B concerne l'étude des effets de l'irradiation gamma externe sur *D. magna* au cours de trois générations successives. Le premier chapitre détaille les matériels et les méthodes. Le second chapitre est consacré aux résultats de l'expérience. Le dernier est une discussion générale des résultats.
- La partie C correspond à l'étude des effets de la contamination alpha interne sur *D. magna* au cours de trois générations successives. Un premier chapitre détaille les matériels et les méthodes. Le second chapitre est consacré aux résultats.
- La partie D présente la comparaison mécaniste de la radiotoxicité alpha interne et gamma externe à l'aide du modèle DEBtox. Le premier chapitre traite de l'application du modèle DEBtox avec les méthodes de modélisation et les résultats. Le second chapitre concerne l'estimation de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha, avec l'explication de la démarche et les résultats.
- Le manuscrit se termine par une conclusion générale et les perspectives découlant de ces travaux de recherche.

PARTIE A

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

ÉTAT DE L'ART SUR LES RADIATIONS IONISANTES

En 1895, Konrad Röntgen découvre par hasard des rayons possédant la propriété de pouvoir traverser la matière opaque, qu'il nomme alors « rayons X » du fait de leur nature inconnue. En 1896, le physicien français Henri Becquerel s'intéresse à la découverte de Konrad Röntgen. Il constate alors que des sels d'uranium sont capables d'émettre des « rayonnements spontanés » ayant comme propriété de noircir les plaques photographiques. Cette découverte marqua le début de l'histoire de la radioactivité. En 1898, Pierre et Marie Curie réussissent à isoler d'autres éléments radioactifs jusqu'à présent inconnus : le polonium et le radium. Ils constatent alors que ces deux éléments sont eux aussi capables d'émettre spontanément des rayonnements. Marie Curie comprend que ces rayonnements sont liés aux propriétés générales des atomes, elle nomme ce phénomène la « radioactivité ».

1. Généralités sur les radiations ionisantes

1.1. Nature et types de rayonnements

Un atome est composé d'un noyau de protons et de neutrons autour duquel gravitent un ou plusieurs électrons. Dans la nature, certains noyaux atomiques sont stables, d'autres sont instables. Les atomes dont le noyau est instable sont qualifiés d'isotopes radioactifs. Cette instabilité peut être due soit à un excès de protons ou de neutrons, soit à un déséquilibre entre protons et neutrons. Pour retrouver leur stabilité, ces isotopes modifient la structure interne de leur noyau en se désintégrant. Ces désintégrations forment d'autres noyaux, pouvant eux-mêmes être radioactifs et se désintégrer à leur tour, jusqu'à arriver à un élément stable. Les désintégrations spontanées des atomes sont toujours accompagnées d'une libération d'énergie « en excès » émise sous forme d'un rayonnement (Figure 2).

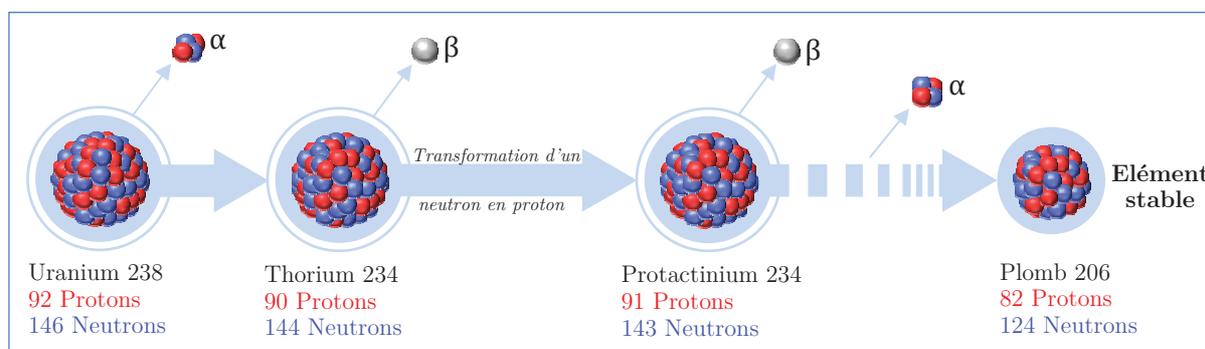


Figure 2. Exemple d'une chaîne de désintégration avec émission de rayonnements spontanés alpha (α) et bêta (β) : l'Uranium-238 et son élément stable, le Plomb 206.

Un rayonnement est dit « ionisant » lorsque celui-ci est capable de déposer assez d'énergie dans la matière qu'il traverse pour créer une ionisation : c'est-à-dire, lui arracher un ou plusieurs électrons. On distingue deux grands types de rayonnements ionisants : les rayonnements particulaires, tels que les particules alpha (α) ou bêta (β), et les rayonnements électromagnétiques tels que les rayons gamma (γ) et les rayons X. Ces types de rayonnements diffèrent essentiellement par leur nature et leur pouvoir de pénétration dans l'air ou la matière :

(i) Le rayonnement particulaire alpha (α) est émis par des atomes possédant un trop grand nombre de protons ou de neutrons. Pour retrouver leur stabilité, ils émettent un atome d'hélium, composé de deux protons et de deux neutrons : la particule α . Ces particules interagissent fortement avec la matière, ce qui leur donne un faible pouvoir pénétrant. Une simple feuille de papier suffit à les arrêter (Figure 3). Les particules α sont notamment émises par l'Uranium-238 (U-238) ou l'Américium-241 (Am-241) (Figure 4).



Figure 4. Particule alpha

(ii) Le rayonnement particulaire bêta (β) est émis par des atomes possédant un écart important entre leur nombre de protons et de neutrons. Pour retrouver leur stabilité, ils émettent un électron négatif ou positif : la particule β^- ou la particule β^+ . Ces particules sont plus pénétrantes que les particules α car elles interagissent moins avec la matière. Une feuille d'aluminium de quelques centimètres suffit à les arrêter (Figure 3). Les particules β sont notamment émises par le Tritium (H-3) ou le Nickel-60 (Ni-60) (Figure 5).

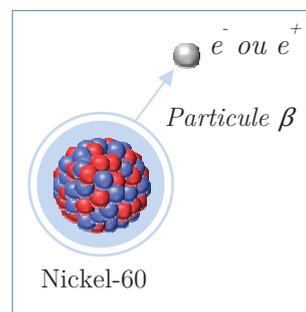


Figure 5. Particule bêta

(iii) Le rayonnement électromagnétique gamma (γ) est émis par des atomes possédant un trop plein d'énergie. Il s'agit d'une onde électromagnétique de nature photonique, comme la lumière du visible ou les rayons X, mais dotée d'une énergie beaucoup plus importante. Ces rayonnements sont émis lors du réarrangement des noyaux après la désintégration, β^- ou β^+ . En raison de leurs faibles interactions avec la matière, les rayonnements γ pénètrent d'avantage que les rayonnements α ou β . Une importante épaisseur de plomb ou de béton est nécessaire pour les arrêter (Figure 3). Les rayonnements électromagnétiques γ sont notamment émis par le Cobalt-60 (Co-60) ou le Césium-137 (Cs-137) (Figure 6).

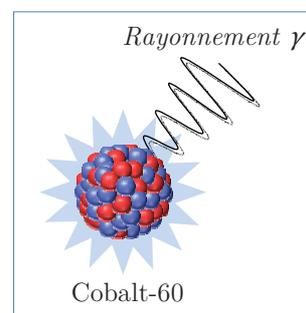


Figure 6. Rayon gamma

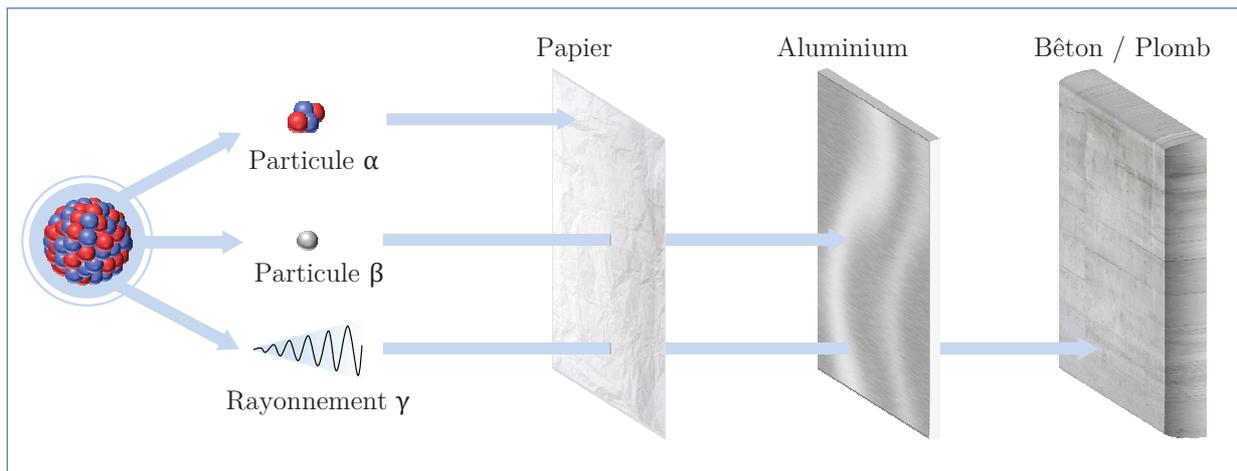


Figure 3. Pouvoir pénétrant des différents types de rayonnements (Delacroix *et al.*, 2012).

Ainsi, le pouvoir de pénétration de chaque type de rayonnement dépend de sa perte d'énergie dans la matière. Cette perte d'énergie est définie par la notion du Transfert d'Énergie Linéique (TEL). Le TEL caractérise la quantité d'énergie cédée d'un rayonnement par unité de longueur (Figure 7). Il s'exprime en électronvolt par micromètre ($\text{eV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Plus la perte d'énergie du rayonnement est importante, plus la distance parcourue par ce dernier est courte. Ainsi, un rayonnement avec un fort TEL ($> 10 \text{ MeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) perd de grande quantité d'énergie sur une courte distance, alors qu'un rayonnement avec un faible TEL ($< 1 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) perd de petite quantité d'énergie sur une grande distance.

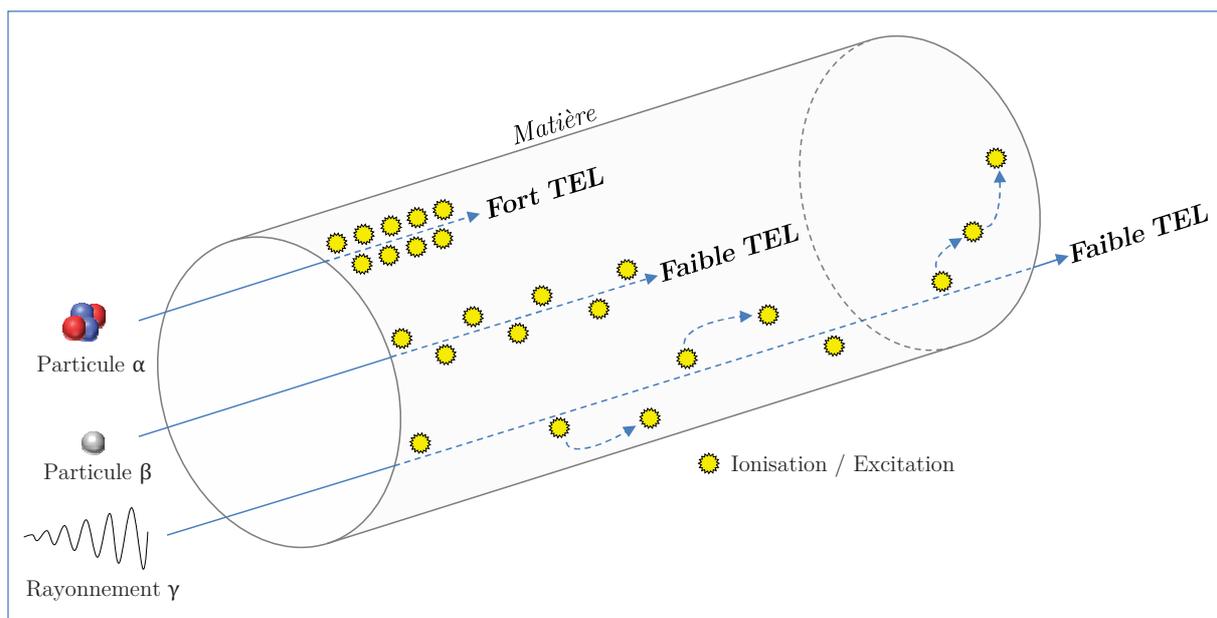


Figure 7. Représentation schématique des événements de Transfert d'Énergie Linéique (TEL) des différents types de rayonnements (α , β et γ) passant dans un volume de matière.

1.2. Voies d'exposition

L'exposition des organismes aux rayonnements ionisants peut être interne ou externe.

L'exposition interne, aussi appelée contamination interne, concerne les radionucléides qui pénètrent à l'intérieur de l'organisme, le plus souvent par ingestion ou par inhalation. Une fois entrés à l'intérieur de l'organisme, ces radionucléides provoquent une irradiation interne. C'est notamment par cette voie que les rayonnements alpha peuvent potentiellement impacter la matière vivante. Une fois internalisé, ces rayonnements très ionisants ont la capacité de délivrer localement leur énergie. Ce type de contamination peut se révéler particulièrement dangereuse si les particules alpha interagissent avec les organes vitaux de l'organisme.

L'exposition externe, quant à elle, concerne les sources d'exposition se situant à l'extérieur de l'organisme. Elle peut être de deux types : avec contact, il y a alors dépôt de matières radioactives à la surface du corps, ou sans contact, on la qualifie alors d'irradiation externe. L'exposition externe peut concerner tout l'organisme ou seulement une partie de celui-ci. Elle cesse dès que l'organisme quitte la trajectoire des rayonnements. L'irradiation externe peut être relativement dangereuse dans le cas des rayonnements très pénétrants, tels que les rayonnements gamma. Les rayonnements gamma ont la capacité de diffuser leur énergie dans l'ensemble de l'organisme et peuvent impacter potentiellement les organes situés en profondeur (Delacroix *et al.*, 2012).

1.3. Grandeurs et unités en radioprotection

Pour quantifier la radioactivité et évaluer les effets biologiques des rayonnements ionisants, différentes unités de grandeur sont utilisées en radioprotection environnementale. Il s'agit de l'activité radioactive, de la dose absorbée et du débit de dose absorbée.

L'activité d'une source radioactive se définit par le nombre de désintégration radioactive par unité de temps. Elle s'exprime en Becquerel (Bq). Un Becquerel équivaut à une désintégration par seconde. L'activité radioactive peut être rapportée à une unité de masse (Bq.kg^{-1}), de volume (Bq.L^{-1} ou Bq.m^{-3}) ou de surface (Bq.m^{-2}).

La dose absorbée correspond à la quantité d'énergie cédée par unité de masse et s'exprime en Gray (Gy). Un Gray correspond à un Joule d'énergie absorbée pour un kilogramme de matière (1 J.kg^{-1}).

Le débit de dose est la dose absorbée par unité de temps. Cette unité de grandeur peut être exprimée par heure (Gy.h^{-1}), par jour (Gy.j^{-1}) ou par an (Gy.an^{-1}).

Les effets biologiques d'un rayonnement ionisant vont non seulement dépendre de la dose absorbée, mais également de la nature du rayonnement (alpha, bêta ou gamma) et du temps d'exposition. Prendre en compte les variations d'efficacité biologique entre les différents types de rayonnements est nécessaire pour une meilleure évaluation du risque environnemental. Pour les prendre en compte, le concept d'Efficacité Biologique Relative (EBR) est couramment utilisé dans le domaine de la radioprotection. L'EBR est une valeur calculée sur la base du rapport de doses requises entre deux types de rayonnement pour provoquer le même niveau d'effet. L'efficacité biologique du rayonnement étudié est caractérisée par rapport à celle d'un rayonnement de référence selon la formule suivante :

$$EBR = \frac{\text{Dose du rayonnement de référence nécessaire pour produire un niveau d'effet «X»}}{\text{Dose du rayonnement étudié nécessaire pour produire le même niveau d'effet «X»}} \quad (1.1)$$

L'efficacité biologique du rayonnement étudié peut être déterminée par rapport à n'importe quel type de rayonnement. Classiquement, l'EBR est utilisée pour caractériser l'efficacité biologique d'un rayonnement ayant un fort TEL ($> 10 \text{ MeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) tel que le rayonnement alpha, par rapport à un rayonnement de référence ayant un faible TEL, comme par exemple, le rayonnement gamma ($< 1 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) ou X ($\sim 3,5 \text{ KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) (Barendsen, 1994).

1.4. Sources d'exposition

1.4.1. Sources naturelles

La radioactivité est un phénomène naturel qui existe depuis la naissance de la Terre, lorsque les atomes se sont formés, il y a maintenant des milliards d'années. Ainsi, partout dans le monde, chaque être vivant est exposé aux rayonnements ionisants d'origine naturelle. Les principales sources d'exposition naturelles peuvent être :

- Terrestres : rayonnements telluriques émis par la croûte terrestre,
- Cosmiques : rayonnements photoniques de haute énergie provenant de l'espace,
- Atmosphériques : émanation de radon - sous forme gazeuse - provenant du sol,
- Aquatiques : eaux naturellement radioactives en raison du lessivage en surface,
- Intrinsèques au Vivant : dépendant du mode de vie de chaque être vivant (ingestion d'éléments radioactifs naturels via l'eau et les aliments).

La radioactivité naturelle est donc présente dans tous les compartiments de la biosphère : l'eau, l'air et le sol.

La dose de radioactivité naturelle reçue par les organismes terrestres supérieurs est estimée à $3,11 \text{ mGy}\cdot\text{an}^{-1}$, dont 17,4 % résulte de sources externes et 82,6 % de sources internes (Beyer et Meador, 2011) (Figure 8). La dose annuelle de radioactivité reçue par les organismes aquatiques d'eau douce varie de $0,02$ à $2,6 \text{ mGy}\cdot\text{an}^{-1}$ (Hoffman *et al.*, 2002). La dose de radioactivité naturelle peut varier en fonction de nombreux facteurs géologiques et géographiques. A titre d'exemple, cette dose peut atteindre la valeur de $826 \text{ mGy}\cdot\text{an}^{-1}$ dans le Bassin de Lodève (Massif Central) en raison de la haute altitude (rayonnements cosmiques) et d'un sol riche en argile et en grès (rayonnements telluriques) (Delpoux *et al.*, 1996; UNSCEAR, 2000a).

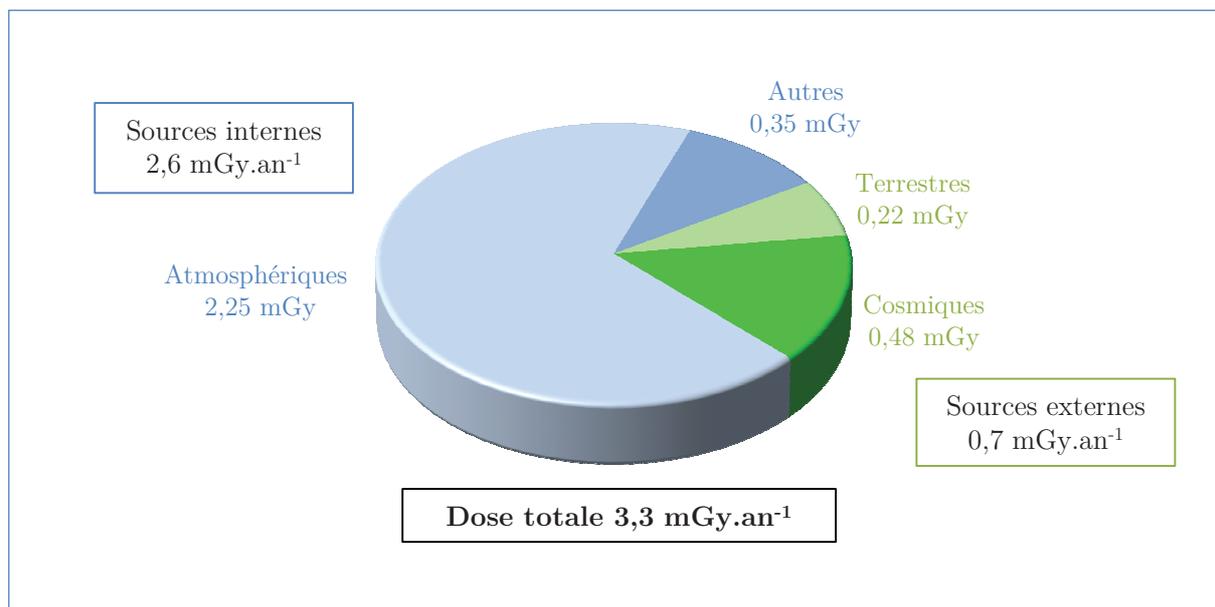


Figure 8. Doses annuelles de radioactivité naturelle reçues en moyenne par les organismes terrestres supérieurs (Beyer et Meador, 2011).

1.4.2. Sources artificielles

A cette radioactivité naturelle, vient s'ajouter la radioactivité artificielle. Depuis le début du XX^{ème} siècle, de nombreuses sources artificielles ont été générées par les activités humaines et viennent constamment alimenter le fond radiologique naturel de l'environnement. La radioactivité artificielle a deux origines bien distinctes : les sources artificielles liées aux activités humaines régulières et les sources artificielles à caractère exceptionnel.

Les sources artificielles liées aux activités humaines régulières sont représentées par des rejets autorisés et réglementés. Ces rejets sont réalisés par les installations nucléaires (en fonctionnement normal), par les activités de médecine (déchets issus d'examen radiologiques et

de traitements médicaux), par les usines de retraitements, et également par des rejets ponctuels de certains pesticides radioactifs issus de l'agriculture. En France, l'exposition des organismes aquatiques due aux rejets contrôlés d'une centrale nucléaire n'excède pas $0,01 \text{ mGy}\cdot\text{an}^{-1}$ (IRSN, 2011). En termes de quantités par exemple, l'usine de traitements des déchets radioactifs de la Hague a rejeté moins de $4 \times 10^{12} \text{ Bq}$ de tritium liquide dans la mer de la manche durant l'année 2000 (Devos, 2013).

Les sources artificielles à caractère exceptionnel concernent les retombées atmosphériques d'anciens essais militaires nucléaires et les rejets provenant de catastrophes nucléaires telles que l'accident de Tchernobyl (Ukraine) en 1986, et plus récemment, celui de Fukushima-Daiichi (Japon) en 2011, où une grande diversité et de grandes quantités de radionucléides ont été rejetées dans l'environnement. Par exemple, les quantités de radionucléides libérées dans l'environnement suite à l'accident de Tchernobyl sont comprises entre $9,35 \times 10^{18}$ à $1,24 \times 10^{19}$ Bq (composées principalement d'iode-131, de césium-137 (Cs-137), de strontium-90 (Sr-90) et de plutonium-241 (Pu-241)) (Yablokov *et al.*, 2009) (Figure 9). L'accident de Fukushima a quant à lui rejeté près de $2,4 \times 10^{15}$ Bq d'iode (Iode-131) et de césium (Cs-134 et Cs-137) dans l'environnement (Morino *et al.*, 2013) (Figure 9).

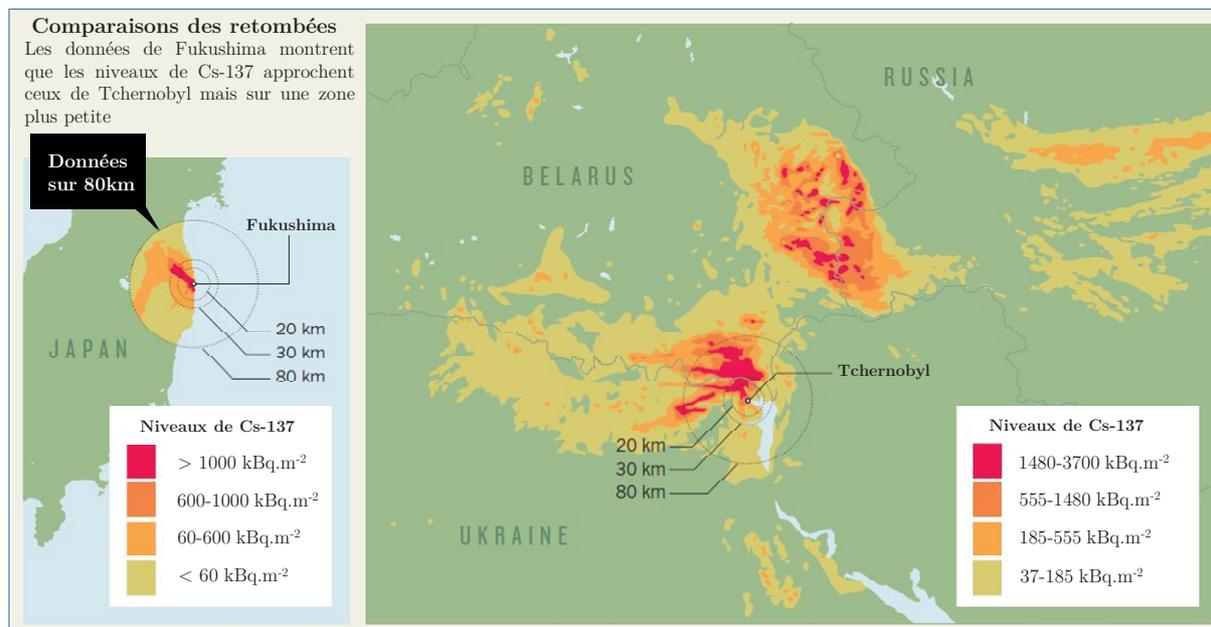


Figure 9. Comparaison des dépôts radioactifs de césium-137 (en $\text{kBq}\cdot\text{m}^{-2}$) entre le site de Fukushima et de Tchernobyl (Brumfiel, 2011).

Vingt jours après l'accident nucléaire de Tchernobyl, les retombées radioactives atmosphériques sur les surfaces végétales et terrestres ont délivré un débit de dose externe ambiant pouvant aller jusqu'à $20 \text{ Gy}\cdot\text{j}^{-1}$ (UNSCEAR, 2008a). Malgré la décroissance radioactive, la zone d'exclusion de Tchernobyl présente encore un fond résiduel radioactif impacté par les retombées radioactives. Ce fond radioactif est principalement associé aux Cs-137 persistant, Sr-90, Pu-90 ainsi que de son isotope, l'Am-241. Aujourd'hui, les débits de dose externes dans ces zones varient de $0,1 \text{ }\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ à $10 \times 10^3 \text{ }\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ en addition du bruit de fond naturel (Garnier-Laplace *et al.*, 2013). Dans cette zone, l'exposition interne représenterait en moyenne près de 70% de la dose totale absorbée par les organismes (rats, grenouilles, poissons, invertébrés *etc.*) (Beresford *et al.*, 2005; Vives i Batlle *et al.*, 2011). Dans la plupart des cas, les émetteurs alpha et bêta contribuent majoritairement à la dose de radioactivité interne reçue par les organismes. A titre d'exemple, Gilhen *et al.* (2003) montrent que les rayonnements alpha et bêta contribueraient respectivement entre 7% à 27% et entre 35% à 47% à la dose totale de radioactivité (allant de 569 à $1938 \text{ }\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) reçue par les invertébrés présents dans les sols contaminés de Tchernobyl.

Concernant l'accident nucléaire de Fukushima, les zones impactées par les retombées radioactives impliquent principalement les écosystèmes côtiers proches de la centrale nucléaire. Trente jours après l'accident, il a été estimé que le débit de dose (interne et externe) absorbé par la faune benthique (poissons, crustacés, mollusques *etc.*) avoisinerait les $2600 \text{ mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ (Garnier-Laplace *et al.*, 2011a).

Dans les situations naturelles, les débits dose et la dose totale de radioactivité reçue par les organismes résultent à la fois de l'irradiation externe et de la contamination interne (*via* l'absorption, l'ingestion et l'inhalation de substance radioactives). La variabilité spatio-temporelle des organismes (utilisation de l'habitat, utilisation de différentes ressources alimentaires, différents types de comportement en fonction de l'espèce *etc.*) associée à l'hétérogénéité de la contamination radioactive sur le terrain et dans l'organisme, rendent les estimations de débits dose relativement difficiles (Hinton *et al.*, 2015). Il est par conséquent complexe de déterminer à quels niveaux d'exposition les organismes sont réellement exposés dans l'environnement et de définir comment chaque type d'exposition (interne ou externe) et chaque type de rayonnements (α , β et γ) peut impacter les populations naturelles.

2. La problématique environnementale

Aujourd'hui, en raison de leur utilisation de plus en plus répandue à l'échelle mondiale, les radiations ionisantes et leurs risques sanitaires et écologiques associés émergent comme une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure pour la protection de l'Homme et de son environnement (ICRP, 1991, 2001, 2007).

2.1. Contexte

Historiquement, l'une des principales préoccupations a été de protéger l'Homme contre les effets potentiellement néfastes des radiations ionisantes. Dans les années 1970, les normes définies par la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) stipulaient que : « *si l'homme est protégé de manière adéquate contre les radiations ionisantes, alors tous les êtres vivants sont également susceptibles d'être suffisamment protégés* » (ICRP, 1977). Au cours du temps, l'insuffisance de démonstrations scientifiques et l'absence de méthodes éprouvées ont conduit à remettre en cause ce postulat (ICRP, 1991; Whicker et Bedford, 1995; Pentreath, 1998). Ainsi, les autorités internationales ont reconnu qu'il était nécessaire de développer un système de radioprotection propre aux espèces non-humaines, en supplément des normes de radioprotection déjà établies pour l'Homme.

En conséquence, un certain nombre d'organismes nationaux et internationaux ont été développés, tels que les programmes européens FASSET¹, ERICA² et PROTECT³ (Williams, 2004; Larsson, 2008; Howard *et al.*, 2010), afin de fournir des approches méthodologiques pour évaluer les risques des radiations ionisantes pour les écosystèmes et dériver des critères de radioprotection pour l'environnement. Leurs mises en place ont donné lieu à la mise à jour de la base de données FREDERICA regroupant les informations de la littérature scientifique concernant les effets des rayonnements ionisants sur de nombreux groupes d'espèces (Coppstone *et al.*, 2008). L'exploitation de cette base de données a permis de dériver un débit de dose sans effet de 10 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ (PNEDR pour « *Predicted No Effect Dose Rate* ») en addition au bruit de fond naturel, en dessous duquel aucun effet délétère n'est attendu pour les écosystèmes terrestres et aquatiques (Garnier-Laplace *et al.*, 2010).

¹ FASSET: Framework for the assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems.

² ERICA: Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management.

³ PROTECT: Protection of the Environment from Ionising Radiation in a Regulatory Context.

Cependant, les valeurs de protection estimées à l'échelle internationale, les méthodologies appliquées et les interprétations proposées varient d'un pays à l'autre. Par exemple, la NCRP⁴, l'IAEA⁵ et l'UNSCEAR⁶ estiment qu'un débit de dose inférieur à 400 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ne présenterait aucun danger pour les populations d'organismes aquatiques d'eaux douces, alors que le projet ERICA⁷ préconise une valeur seuil de 10 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ pour ces mêmes organismes (Tableau 1) (NCRP, 1990; IAEA, 1992; Larsson, 2008; UNSCEAR, 2008b). A l'heure actuelle, il n'existe pas de concept transparent et uniforme de radioprotection à l'échelle internationale (Pentreath *et al.*, 2015).

En parallèle, la grande majorité de ces programmes de recherche ont également mis en évidence que la plupart des données disponibles faisaient référence à des paramètres biologiques, des groupes d'espèces, des débits de dose et des temps d'exposition généralement très éloignés des objectifs initiaux de la radioprotection (Williams, 2004; Larsson, 2008). Ces objectifs sont de veiller à la conservation des fonctions et des structures des écosystèmes dans un contexte réaliste. Les données disponibles sont raisonnablement abondantes concernant les poissons, les mammifères et les plantes, mais restent rares, voire inexistantes pour d'autres groupes taxonomiques (Woodhead, 2003). De même, l'essentiel des données concerne les effets létaux résultant d'expositions aiguës, tandis que les données sur les effets en situation d'exposition chronique à faibles débits de dose ($<1 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) restent manquantes (Real *et al.*, 2004). Les situations d'exposition chroniques à faibles débits de dose sont reconnues comme étant représentatives des conditions environnementales réelles ($<100 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) dans lesquelles les organismes sont actuellement exposés (UNSCEAR, 1996). La question est de savoir si ces faibles débits de dose présentent un danger à long terme pour l'environnement.

Aujourd'hui encore, l'ampleur des risques à faibles doses reste controversée en raison du manque de preuves scientifiques, que ce soit dans le domaine de la radioprotection humaine ou dans le domaine de la radioprotection environnementale (Bréchignac et Paquet, 2013; Morgan et Bair, 2013; Mothersill et Seymour, 2013). Face à ce constat, il est maintenant largement admis que l'évaluation des risques liés à la présence de radionucléides dans l'environnement a besoin d'être appréhendée : (i) à des doses pertinentes, (ii) à des temps d'exposition pertinents et (iii) sur des espèces écologiquement pertinentes (Garnier-Laplace *et al.*, 2011b).

⁴ NCRP : National Council on Radiation Protection and Measurements (Organisme Américain).

⁵ IAEA : International Atomic Energy Agency (Organisme International).

⁶ UNSCEAR : United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (Organisme International).

⁷ ERICA : Environmental Risk from Ionising Contaminants: Assessment and Management (Organisme Européen).

Tableau 1. Valeurs seuils de référence (en débits de dose, $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) proposées par de nombreux organismes internationaux comme étant pertinentes pour la protection des populations terrestres et aquatiques. Le sens et l'usage des valeurs diffèrent selon les groupes d'organismes.

	NCRP (1990)	IAEA (1992)	Environment Canada (2003)	UNSCEAR (2008)	ICRP (2008)	ERICA (2008)	PROTECT (2010)
$\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$							
TERRESTRE							10
<i>Plantes</i>		400	100	400		10	
Arbres					4-40		
Herbes					40-400		
<i>Animaux</i>		40		40 - 100	400-4000	10	
Invertébrés Terrestre			200				
<i>Oiseaux</i>							
Communs (canard <i>etc.</i>)					4-40		
<i>Mammifères</i>							
Supérieurs (chien <i>etc.</i>)					4-40		
AQUATIQUE							10
<i>Organismes d'eaux douces</i>	400	400		400		10	
Algues			100				
Invertébrés Benthiques			200				
Amphibiens					40-400		
Poissons			20		40-400		
<i>Organismes marins</i>	400			400		10	
Crustacés					400-4000		
Poissons plats					40-400		
Algues brunes					400-4000		
<i>Organismes de fond marins</i>		1000				10	

2.2. Approche mécaniste à différents niveaux d'organisation biologique

Des avancées scientifiques ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires radio-induits (Morgan et Bair, 2013). Aujourd'hui, comprendre comment les radiations ionisantes peuvent altérer les populations naturelles à l'échelle moléculaire, cellulaire, physiologique, individuelle et populationnelle est un enjeu majeur en radioécologie. Même si ce type d'approche reste relativement complexe et chronophage, la compréhension mécaniste des processus reliant les niveaux d'exposition et les effets observés à différents niveaux biologique d'organisation biologiques est essentielle pour permettre de protéger adéquatement l'environnement (Jha, 2008) (Figure 10).

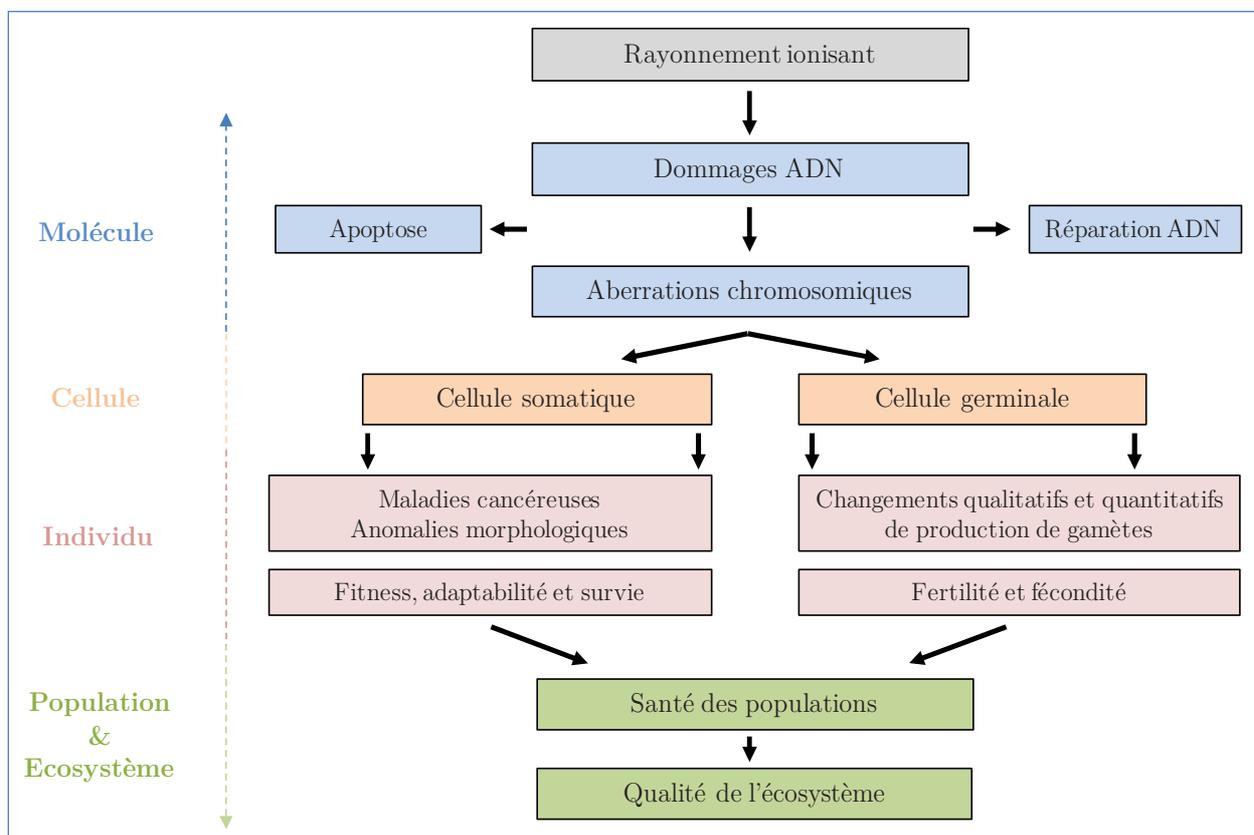


Figure 10. Illustration des relations biologiques allant de l'exposition aux rayonnements ionisants jusqu'à la qualité de l'écosystème (Adaptée de Jha, 2008).

2.3. Différence d'efficacité biologique entre les types de rayonnements

Dans l'environnement, les populations naturelles sont exposées à différents radionucléides, émettant différents types de rayonnements (alpha, bêta et gamma). En radioprotection, il est indispensable de prendre en compte les variations d'efficacité biologique entre types de radiations ionisantes (dues aux différences d'interaction avec la matière) pour une meilleure évaluation du risque environnementale.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont tenté d'estimer des valeurs d'Efficacité Biologique Relative (EBR) sur les espèces non-humaines. Celles focalisés sur le rayonnement alpha ont principalement mis en évidence de considérables incertitudes d'estimations, avec des valeurs d'EBR alpha allant de 1 à 377, illustrant toute la complexité de déterminer précisément l'efficacité biologique d'un rayonnement (SNIFFER, 2002; FASSET, 2003; Hofmann *et al.*, 2004; Chambers *et al.*, 2006; UNSCEAR, 2008; Priest et Hoel, 2010; Franken *et al.*, 2012; Mothersill *et al.*, 2013). L'EBR dépend de plusieurs facteurs, incluant par exemple le système biologique étudié, le débit de dose, le temps d'exposition et les conditions expérimentales. Par conséquent, déterminer expérimentalement une valeur d'EBR robuste relève du défi. De plus, les études publiées mettent en évidence de nombreuses approximations (voire même des absences) d'estimation de la dose de radioactivité reçue par les organismes, en particulier concernant les faibles débits de dose et surtout pour le cas des émetteurs internes (Salomaa *et al.*, 2013). L'utilisation de la modélisation pourrait être une alternative pour remédier à ces problèmes, et notamment en permettant (i) d'estimer précisément les débits de dose reçues par les organismes, (ii) de rendre les effets biologiques comparables entre les différents types de rayonnements et (iii) d'extrapoler les effets entre différents scénarios d'exposition.

3. Mécanismes d'action des radiations ionisantes chez les organismes vivants

3.1. Interactions physico-chimiques avec la matière biologique

Les mécanismes d'action des radiations ionisantes résultent de processus en cascades, passant de phénomènes physiques à des phénomènes biochimiques, pour finir à des phénomènes biologiques (Favier, 2003). Avant de produire une réponse quelconque à l'échelle de l'organisme, les rayonnements interagissent physiquement avec la matière *via* des processus d'ionisation et d'excitation des molécules. Ces phénomènes physiques initiaux aboutissent à la dégradation des biomolécules constitutives et essentielles à la survie des cellules et *in fine*, à des répercussions observables à l'échelle de l'organisme (Darby et Doll, 1987). Les effets biologiques des rayonnements ionisants peuvent intervenir par action indirecte (dans 80% des cas) ou directe (dans 20% des cas). L'action est dite directe lorsque le rayonnement ionise et excite directement les cibles moléculaires. L'action est dite indirecte lorsque le rayonnement interagit avec l'eau qui est présente dans les cellules, on parle alors de radiolyse de l'eau.

3.2. La radiolyse de l'eau

Cette radiolyse, conduit à la production de radicaux libres (espèces chimiques puissamment oxydantes) et aboutit à la dégradation de certaines macromolécules telles que les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques (Spitz *et al.*, 2004). Les organismes vivants étant constitués majoritairement d'eau, la radiolyse de l'eau va jouer un rôle prépondérant dans l'apparition des dommages biologiques radio-induits. Ce mode d'action indirecte serait responsable d'une grande majorité des dommages biologiques observés chez les organismes vivants (Bernhard et Close, 2003). Sous l'effet des radiations, les molécules d'eau peuvent soit subir un processus d'excitation, soit un processus d'ionisation (Figure 11).

L'ionisation de l'eau engendre la dissociation de la molécule d'eau (H_2O) en une molécule d'eau cationique (H_2O^+) et d'un électron (e^-) (1) (Figure 11). L'eau cationique perd rapidement un proton, formant ainsi un radical libre $\text{OH}\cdot$. L'excitation quant à elle, va venir dissocier la molécule d'eau et produire les radicaux libres $\text{OH}\cdot$ et $\text{H}\cdot$ (2) (Figure 11). Le radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ est considéré comme étant l'un des plus puissants oxydants chimiques. C'est donc une espèce chimique relativement agressive envers les molécules qui l'entourent (Halliwell, 2012). Les radicaux $\text{OH}\cdot$ (oxydant) et $\text{H}\cdot$ (réducteur) génèrent de manière aléatoire des espèces radicalaires secondaires (3), telles que le radical superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le radical perhydroxyde ($\text{HO}_2\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 11). Ces produits finaux de la radiolyse de l'eau sont appelés « les espèces réactives de l'oxygène » (ou *ROS* en anglais pour « *Reactive Oxygen Species* »).

De par leur fort pouvoir oxydatif, ces *ROS* provoquent un stress oxydatif quasi instantané dans les cellules vivantes. Le stress oxydatif engendré aurait alors des répercussions considérables dans l'induction du vieillissement cellulaire et de l'apoptose, ayant pour origine la dégradation des protéines, des acides nucléiques (ADN) et des lipides cellulaires (Afonso *et al.*, 2007; Ishii, 2007).

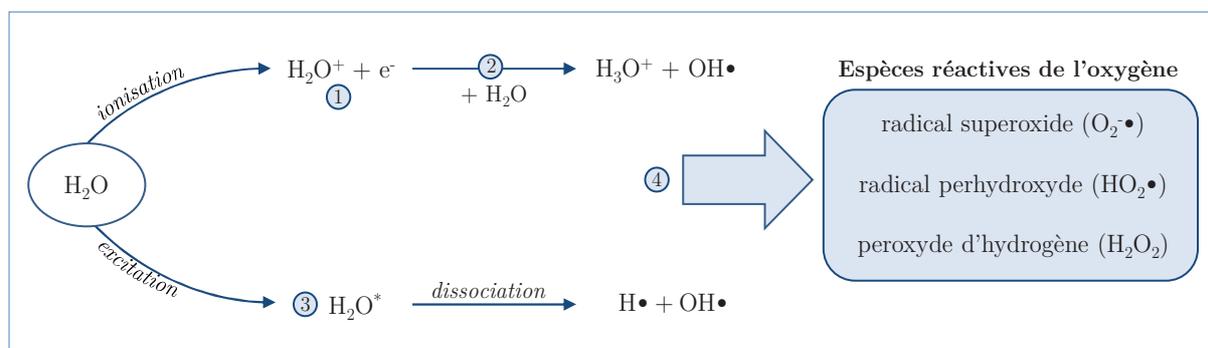


Figure 11. Schéma synthétisant les différentes étapes de la radiolyse de l'eau radio-induite.

Pour pallier ces phénomènes de déséquilibres oxydatifs, les organismes vivants possèdent une batterie de mécanismes de défense, appelés antioxydants. Leur rôle est de maintenir l'équilibre entre oxydants et antioxydants. Parmi ces mécanismes de défense, on peut référencer les enzymes antioxydantes telles que la catalase et la peroxydase, les molécules antioxydantes exogènes ou encore les molécules antioxydantes produites naturellement par l'organisme telles que les vitamines C et E (Ames *et al.*, 1993).

3.3. Lésions moléculaires

Si de nombreuses biomolécules sont sensibles aux radiations ionisantes, l'acide désoxyribonucléique (ADN) reste la cible cellulaire critique des radiations ionisantes (Goodhead, 1994). L'ADN est composé d'une succession de nucléotides (l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine). Cette macromolécule se trouve dans le noyau de toutes les cellules vivantes, en interaction directe avec un groupe de protéines histones avec lesquelles elles forment une structure appelée la chromatine. La molécule d'ADN est essentielle à la vie, puisqu'elle contient toute l'information génétique de l'organisme qui est transmise de génération en génération. Les dommages induits à l'encontre de cette molécule peuvent non seulement déclencher des effets à court terme tels qu'une mortalité cellulaire et tissulaire, mais également des modifications génétiques qui pourront être accumulées et transmises à la descendance telles que des mutations, et provoquer, à terme, de l'instabilité génétique et une perte de diversité biologique dans les populations (Thompson et Schild, 2002; Bertrand, 2009).

Les radiations ionisantes se distinguent de tous les autres agents toxiques par la diversité et la multiplicité des altérations qu'elles créent dans l'ADN. Ces altérations de l'ADN peuvent être classées selon quatre grandes catégories :

- Les altérations de bases correspondent principalement à des modifications chimiques des bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (cytosine et thymine) constitutives de l'ADN. Ces modifications chimiques sont induites par les radicaux libres, en particulier le radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$, provenant de la radiolyse de l'eau. Parmi ces bases, la guanine possède le potentiel d'ionisation le plus fort et constitue donc la principale cible des radicaux libres devant l'adénine, puis la thymine et la cytosine (Dizdaroglu, 1992). Les bases puriques sont donc plus radiosensibles que les bases pyrimidiques. Les altérations de bases radio-induites sont estimées à environ 2000 par cellule eucaryote et par Gy pour un rayonnement de faible TEL. Toutes ces modifications sont dans la plupart des cas non-létales pour la cellule et réparées par des mécanismes d'excision et de réparation de bases (*BER* pour « *Base Excision Repair* ») faisant intervenir endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases. Dans le cas d'une non-réparation, il y a apparition d'une mutation.

- Les pontages résultent de l'apparition de liaisons covalentes supplémentaires entre l'ADN et les histones ou d'autres protéines environnantes de la cellule. Sous l'effet des rayonnements ionisants, c'est une nouvelle fois le radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ qui est à l'origine de ce type de dommages (Gajewski *et al.*, 1988). Ces dommages radio-induits restent assez rares, 1 Gy d'irradiation provoque en moyenne 30 pontages ADN-protéines par cellule eucaryote pour un rayonnement de faible TEL. Les pontages ADN-protéines sont pris en charge par des mécanismes d'excision de nucléotides (*BER*).

- Les cassures simples brins résultent de la rupture de la chaîne sucre-phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. Ce type de cassure est particulièrement fréquent lors d'une irradiation gamma (faible TEL) (Tubiana *et al.*, 1986). Par exemple, 1 Gy d'irradiation gamma induit en moyenne 1000 cassures simples brins par cellule. Ces cassures varient linéairement avec la dose et sont moins importantes lorsque le TEL du rayonnement augmente. Elles sont rapidement réparables (en moins d'une heure) par excision de nucléotides (*NER* pour « *Nucleotides Excision Repair* »). Ces types de dommages n'ont que peu d'impact en matière de létalité cellulaire.

- Les cassures doubles brins résultent de la rupture des deux chaînes de l'ADN. Ce type de cassure est rare (1 Gy de faible TEL induit en moyenne 40 cassures doubles brins) mais est sans doute l'altération la plus délétère que peut subir l'ADN. Ces cassures peuvent être létales

pour la cellule si elles ne sont pas ou mal réparées. Elles sont reconnues comme étant la première cause de létalité chez les mammifères suite à une irradiation (Tubiana *et al.*, 1997). Les cassures doubles brins sont réparées soit par recombinaison homologue (*HR* pour « *Homologous Recombinaison* »), soit par jonction d'extrémités non-homologues (*NHEJ* pour « *Non-Homologous End-Joining* »). Le processus de réparation *HR* fait intervenir un chromosome homologue pour reconstruire à l'identique et sans erreur le double brin d'ADN lésé. La réparation n'engendre pas d'erreurs de réparation, et est qualifiée de « fidèle ». Le processus de réparation *NHEJ* va simplement reformer les liaisons chimiques cassées entre les bases. Ainsi, ce mécanisme de réparation ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN et engendre une perte de l'information génétique. De par ses caractéristiques et sa faculté à introduire des erreurs, ce mécanisme de réparation est alors qualifié d'« infidèle ».

- Les sites à dommages multiples (*MDS* pour « *Multiple Damaged Sites* ») (Ward, 1988), se forment lorsqu'il y a une combinaison de deux ou plusieurs types de dommages sur une courte distance (1-4 nanomètres). Les lésions accumulées sur cette courte distance peuvent être des bases oxydées ou des cassures simple et double brin. Les lésions à l'intérieur d'un site à dommages multiples sont plus difficiles à réparer (Brenner et Ward, 1992). Ce type de dommages peut avoir une importance cruciale pour le devenir de la cellule. Par exemple, si deux cassures simple brin se produisent au même endroit sur l'ADN, les conséquences pour la cellule sont identiques à celles d'une cassure double brin, c'est-à-dire létale.

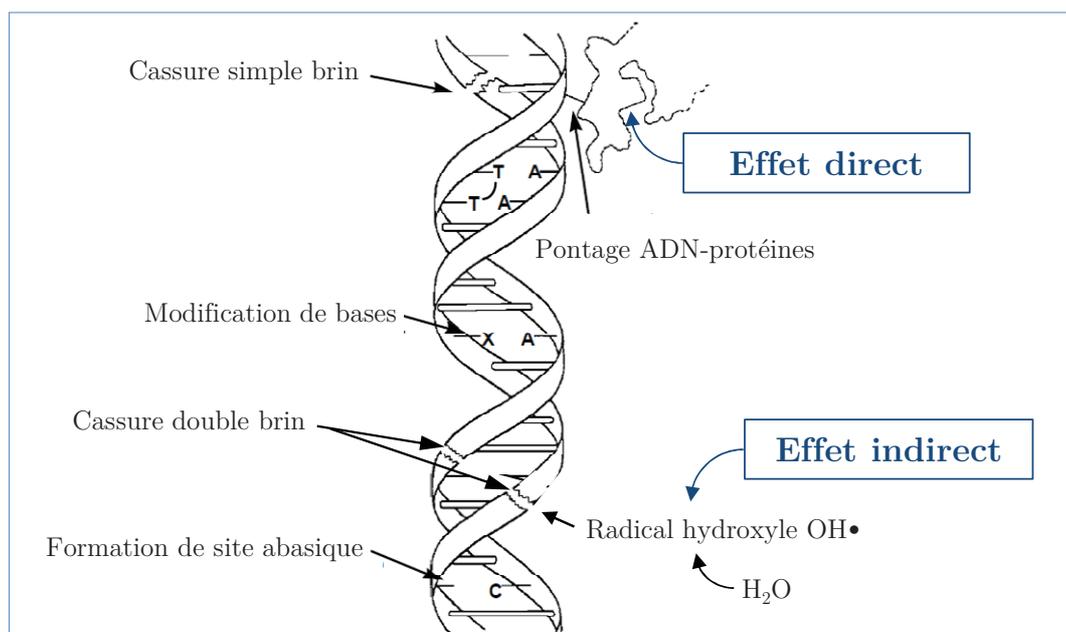


Figure 12. Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (Goodhead, 1999).

3.4. Lésions cellulaires

Face aux nombreuses lésions moléculaires induites par les radiations ionisantes, la cellule est capable de mettre en place de nombreux processus de réparation plus ou moins efficaces. Les mécanismes de réparation conditionnent l'état de santé et le devenir de la cellule. Les cellules peuvent répondre à ces dommages radio-induits selon différentes voies (Figure 13). Ces voies sont les suivantes :

- Une réparation intégrale des lésions (1). Le génome conserve son intégrité, la cellule peut continuer sa division cellulaire et sa survie est assurée (Figure 13).

- Une réparation partielle ou inexistante des lésions (2). Le nombre de lésions est trop important pour être réparé, ces lésions sont létales pour la cellule (Figure 13). De manière générale, la mort de la cellule n'intervient qu'après la division cellulaire. Tant que la division cellulaire n'a pas été réalisée, la cellule reste vivante et fonctionnelle : on parle alors de mort retardée ou différée. Ce processus est rare, il n'apparaît que lorsque la dose reçue est très forte ou lorsque les lésions sont directement létales pour la cellule. On parle d'effets déterministes ou obligatoires (Figure 12).

- Une réparation fautive des lésions (3). La cellule a réparé ou tenté de réparer un certain nombre de lésions mais a également introduit quelques erreurs de réparation, dites mutations. Dans un premier cas, la réparation fautive peut engendrer la mort de la cellule (4) (Figure 13). Cette mortalité est induite soit par l'apparition d'une mutation létale issue d'un défaut de réparation, soit la cellule a tenté de réparer la lésion mais n'a pas réussi. La cellule va alors provoquer sa propre mort juste après la division cellulaire, on parle alors de mort cellulaire programmée ou apoptose. Dans un second cas, la réparation fautive n'entraîne pas la mort de la cellule, on parle alors de mutations sub-létales ou non-létales (5) (Figure 13). Ce type de mutations peut induire le développement de tumeurs cancéreuses (cellule somatique) ou transmettre des anomalies génétiques à la descendance (cellule germinale) telles que des malformations et des retards de croissance. Ces mutations sont fréquentes lors d'une irradiation à faible dose. Les effets biologiques associés aux processus de mutations non-létales sont aléatoires, tardifs et dépendants de la nature des mutations. On parle alors d'effets stochastiques ou aléatoires (Figure 13).

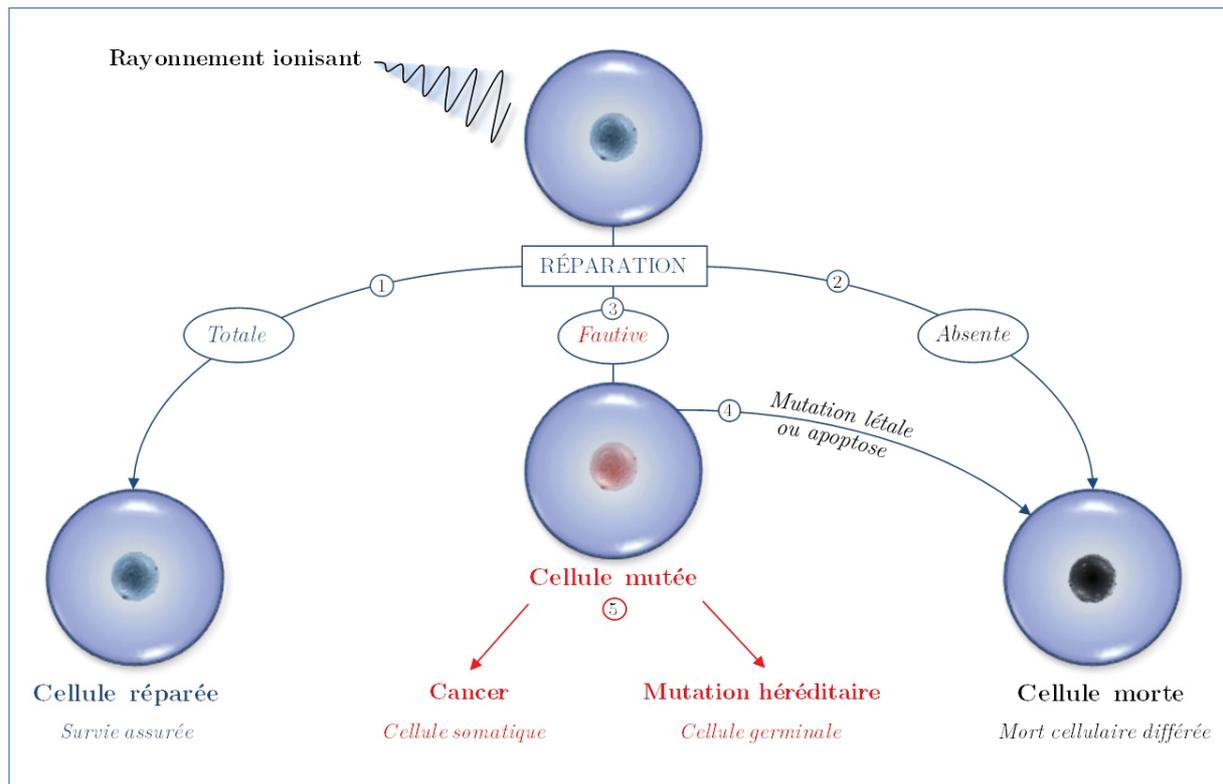


Figure 13. Voies de réparation et conséquences cellulaires suite à une exposition aux rayonnements ionisants.

La plupart des altérations moléculaires sont réversibles, mais celles résultant d'un rayonnement ionisant dense (particule alpha, par exemple) sont en général plus difficilement réparables que celles d'un rayonnement moins ionisant (rayon gamma, par exemple). Ainsi, les rayonnements à forte densité d'ionisation (avec un TEL élevé) ont ordinairement une Efficacité Biologique Relative (EBR) supérieure à celle des rayonnements à faibles densité d'ionisation (avec un TEL faible) (Goodhead, 1999). Aujourd'hui, bien que l'ADN soit reconnue pour jouer un rôle important dans la transmission d'effets à la descendance, la notion de phénomènes épigénétiques remet cependant en cause cette image classique de la transmission génétique, en donnant de l'importance à d'autres molécules (Seymour et Mothersill, 2004 ; Weidmann *et al.*, 2007). De même, au cours des dernières années, d'autres hypothèses et modèles ont été proposés en alternative à la vision classique où l'ADN est la cible privilégiée des rayonnements ionisants. On parle notamment d'« effets non-dirigés » des rayonnements ionisants. Dans le cadre des effets des radiations à faibles doses, cette notion peut, par exemple, être représenté par de l'instabilité génomique, des réponses adaptatives ou encore des effets « *bystander* » (ou effets de proximité) (Morgan, 2003ab, Morgan et Bair, 2013).

4. Effets biologiques radio-induits chez les organismes vivants

4.1. Exposition aiguë

La grande majorité des travaux sur les effets des radiations ionisantes concerne des données acquises lors d'expositions aiguës à forte dose, c'est-à-dire, des expositions allant de quelques minutes à quelques heures et dépassant souvent 1 Gray (Gy). Ces travaux, principalement axés sur les effets d'une irradiation gamma externe (Cs-137 ou Co-60 par exemple), visaient à déterminer les doses d'exposition entraînant 50% de mortalité chez les organismes étudiés (DL_{50} pour Dose Létale) (Rose, 1991). Ce genre d'informations peut être utile pour classer les groupes taxonomiques en fonction de leur radiosensibilité : une faible valeur de DL_{50} indiquant une forte radiosensibilité. La Figure 14 présentée ci-dessous référence les principaux groupes taxonomiques en fonction de leur radiosensibilité vis-à-vis du rayonnement gamma externe.

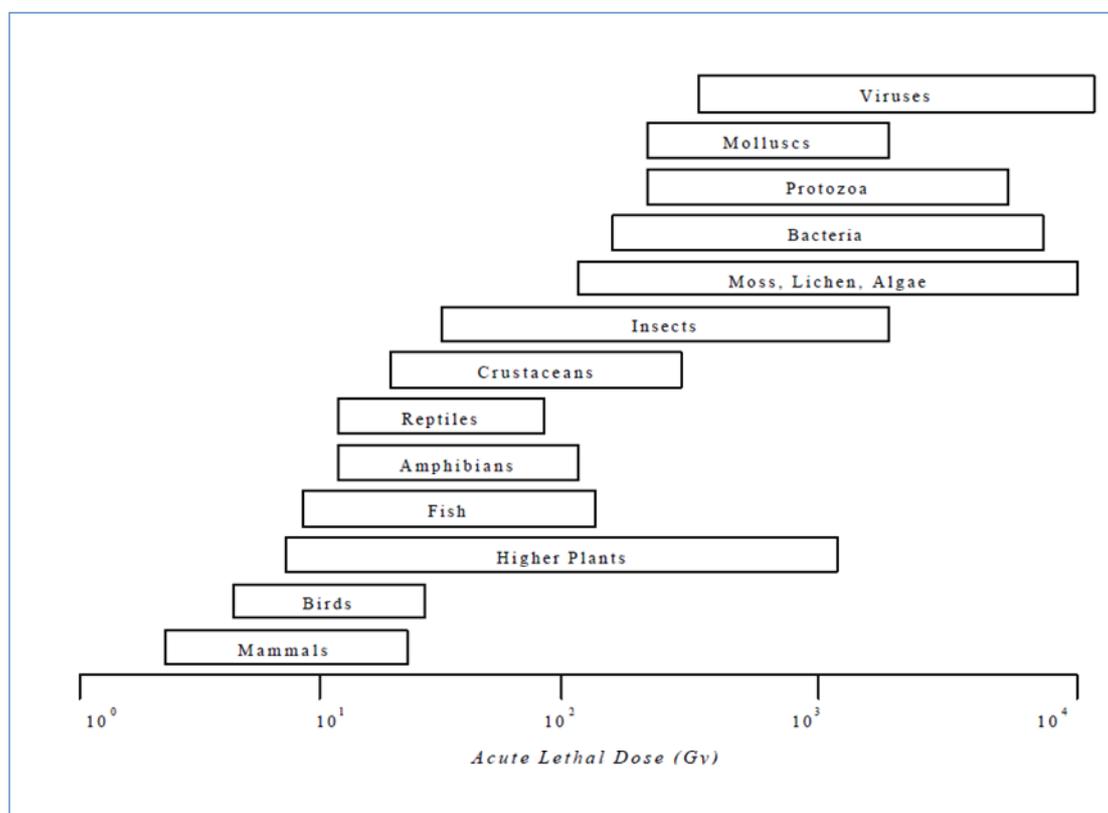


Figure 14. Gamme de doses létales de radiations ionisantes pour différents groupes d'organismes, mettant en évidence leurs différences de radiosensibilité (Copplesstone *et al.*, 2001).

D'une manière générale, les mammifères semblent être les organismes les plus radiosensibles des espèces animales, suivis par les oiseaux, les poissons, les reptiles, les crustacés et les

insectes. Les plantes chevauchent, quant à elles, une grande partie des groupes taxonomiques, leur radiosensibilité variant fortement selon le stade de vie étudié.

Par exemple, la DL_{50} des graines de pin (en dormance) varie de 5 à 63 Gy, alors que le pin en phase de développement possède une DL_{50} variant de 3,5 à 4 Gy (UNSCEAR, 2000b). De même, chez la souris, l'adulte possède une valeur de DL_{50} de 6,4 Gy, alors que celle d'un embryon est inférieure à 1 Gy (Copplestone *et al.*, 2001). Une différence de radiosensibilité en fonction du stade vie est également observée chez des individus moins complexes, tels que les invertébrés. Par exemple, une valeur de DL_{50} de 1-2 Gy est constatée chez les embryons de drosophiles ou de guêpes, alors que celle des adultes varie de 20-3000 Gy (Woodhead, 1998). Il paraît donc nécessaire de réaliser des expositions chroniques, tenant compte de tous les stades critiques du cycle de vie d'un organisme, pour une meilleure évaluation du risque environnemental des radiations ionisantes.

4.2. Exposition chronique

À ce jour, un nombre plus restreint d'études s'est intéressé aux effets chroniques des radiations ionisantes, bien qu'elles soient représentatives des conditions environnementales dans lesquelles les organismes sont réellement exposés. Là encore, la grande majorité de ces études s'est focalisée sur les effets d'une irradiation gamma externe, mettant en évidence le manque de données disponibles concernant les effets des rayonnements alpha et bêta interne.

Dans le cadre d'expositions chroniques, les principaux critères d'effets biologiques étudiés sont : la morbidité, la reproduction, et dans une moindre mesure, la survie et le taux de mutation (Real *et al.*, 2004; Copplestone *et al.*, 2008). Les paramètres de survie, de morbidité et de reproduction jouent des rôles importants dans le maintien et la dynamique des populations animales. Ils sont donc pertinents pour une meilleure évaluation du risque environnemental (Woodhead, 2003).

La morbidité, est définie comme étant l'ensemble des perturbations venant affecter les processus biologiques d'un organisme, causant ainsi une diminution de la valeur sélective des populations (capacité à se reproduire ou même survivre) (Dallas *et al.*, 2012). La reproduction définit le succès reproducteur d'une population, c'est-à-dire sa fécondité (capacité à se reproduire) et sa fertilité (capacité à produire une descendance viable et abondante). La reproduction est par conséquent un paramètre clé assurant la croissance et la survie d'une population, et *in fine*, permettant le maintien et la pérennité des écosystèmes (Stearns, 1992).

La plupart des études de chronicité menées en radioprotection ont identifié la reproduction comme étant le paramètre biologique le plus radiosensible, quelle que soit l'espèce considérée. Par exemple, chez les végétaux supérieurs, des études ont montré que le pin et certaines espèces herbacées, présentaient une réduction de la production de graines et de la germination après avoir été chroniquement exposées à des doses d'irradiation gamma externe comprises entre 0,01 et 10 Gy (UNSCEAR, 1996; Whicker, 1997; Kal'chenko et Fedotov, 2001; Minouflet *et al.*, 2005; Geras'kin *et al.*, 2008; 2013). Chez les organismes aquatiques, des diminutions de poids, de gonades, de taux d'éclosion, de nombre d'œufs et de larves ont été observées chez plusieurs espèces de poissons (médaka, guppy *etc.*) et d'invertébrés (polychètes aquatiques) exposées à de faibles doses de rayonnement gamma ou bêta (Cooley et Miller, 1971; Ichikawa et Suyama, 1974; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986; Knowles et Greenwood, 1994; Knowles et Greenwood, 1997). Les débits de dose et les temps d'exposition de ces études variaient respectivement de 0,0024 à 2,5 Gy.h⁻¹ et de 3 à 194 jours. Pour finir, chez les mammifères (rat et cochon), l'exposition chronique aux rayonnements gamma induit une diminution du nombre de cellules germinales, du poids des ovaires et une perturbation de leurs capacités reproductrices, pour des débits de dose compris entre 100 à 1000 µGy.h⁻¹ (Erickson et Martin, 1976; Erickson, 1978; Erickson et Martin, 1984).

Les effets chroniques radio-induits sur la morbidité sont, quant à eux, principalement représentés par des perturbations du développement et des réductions de taille et de masse des individus. Par exemple, des réductions de taille et de masse (racines et feuilles) ont été observées chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Vandenhove *et al.*, 2009; 2010; Biermans *et al.*, 2015). De même, plusieurs études ont montré que le rayonnement gamma induisait à long terme un retard de croissance chez la truite arc en ciel, *Oncorhynchus mykiss*, une perturbation du développement chez le copépode marin, *Tigriopus japonicus* et une diminution de la masse du cerveau chez le rat. (Real *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2014; Oujifard *et al.*, 2015). Les débits de dose de ces études variaient entre 3 µGy.h⁻¹ et 100 mGy.h⁻¹. Dans le cas d'une contamination interne, des anomalies de développement et de la mortalité ont été décelées chez le stade larvaire de la moule marine, *Mytilus edulis*, dès 2 µGy.h⁻¹ après une exposition chronique à de l'eau de mer tritiée (H-3, émetteur β) (Hagger *et al.*, 2005).

Ces études chroniques permettent de déceler des effets à des débits de dose < 100 µGy.h⁻¹ chez certains groupes taxonomiques (Erickson et Martin, 1976; 1984; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986; Hagger *et al.*, 2005). En effet, certaines perturbations, comme les mutations, ont besoin d'être accumulées au cours du temps avant d'induire un effet observable à l'échelle de l'organisme (Morgan, 2003). A titre d'exemple, une accumulation progressive de dommages

ADN avec en parallèle une réduction de la viabilité des œufs ont été observées chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, lors d'une exposition chronique au rayonnement gamma externe. Les auteurs suggèrent que les dommages ADN radio-induits pourraient potentiellement avoir un impact sur le succès reproducteur du poisson et être transmis dans les générations de descendants (SNIFFER, 2002).

4.3. Exposition multigénérationnelle

4.3.1. Effets moléculaires

Les études évaluant les effets des radiations ionisantes à faibles doses sur les organismes vivants pendant plusieurs générations permettent de détecter des effets à long terme. Ces études se rapprochent ainsi un peu plus des situations naturelles. En effet, dans la nature, les populations animales sont bien souvent exposées à des contaminants pendant plusieurs semaines, plusieurs mois, voire même plusieurs années, dépassant ainsi leurs durées de vie et impliquant plusieurs générations. Malgré les avantages et les pertinences écologiques qu'elles dégagent, les études multigénérationnelles restent toutefois rares dans le domaine de la radioprotection environnementale.

Les mécanismes moléculaires jouent des rôles prépondérants dans les effets transgénérationnels radio-induits. Les avancées scientifiques dans le domaine de la médecine ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents, notamment sur des organismes modèles tels que la souris et le rat. (Morgan, 2003ab; Dauer *et al.*, 2010). De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une irradiation parentale induisait des effets sur les générations de descendants, alors même que ces dernières n'avaient pas été exposées (Dubrova *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2002; Barber et Dubrova, 2006; Barber *et al.*, 2006). Ces différentes études démontrent que l'irradiation parentale conduit en grande majorité à la transmission de dommages ADN et à de l'instabilité génomique chez les générations suivantes non-exposées. Suite à cela, le domaine de la radioprotection environnementale s'est inspiré de ces avancées scientifiques. De nombreuses études ont alors été lancées pour évaluer les effets génotoxiques transgénérationnels des radiations ionisantes à faibles doses chez de nombreux groupes d'espèces. Par exemple, chez les organismes aquatiques, la génotoxicité transgénérationnelle suite à une irradiation gamma externe, comprend des cassures double brin de l'ADN et de l'instabilité génomique chez le poisson médaka, *Oryzias latipes*, des aberrations chromosomiques chez le polychète marin, *Neanthes arenaceodentata*, de l'apoptose dans les ovocytes de l'artémie, *Artemia salina* et du stress oxydatif chez les nouveaux nés de saumon royal, *Oncorhynchus tshawytscha* (Iwasaki, 1973; Harrison *et al.*, 1983; Dowling *et al.*, 2005; Tsyusko *et al.*, 2007; Grygoryev *et al.*, 2013).

4.3.2. Effets sur les traits d'histoire de vie

La plupart des études disponibles tendent à démontrer que les effets à l'échelle de l'organisme diffèrent d'une génération à l'autre, en mettant en évidence une augmentation de la sensibilité des organismes au fil des générations. Par exemple, Knowles et Greenwood (1994) ont mis en évidence que de faibles débits de doses (de 1,7 - 3,2 - 7,7 à 13,7 mGy.h⁻¹) d'irradiation gamma externe (Cs-137) induisaient une réduction progressive de la reproduction chez le polychète marin, *Ophryotrocha diadema*, lorsqu'il était exposé pendant 7 générations successives. Dans la première génération, seul le plus fort débit de dose de 13,7 mGy.h⁻¹ induisait une diminution de la production des œufs, alors que dans les deuxième et troisième générations, tous les paramètres de reproduction (nombres et survie des œufs, taux d'éclosion etc.) ont été affectés dès 1,7 mGy.h⁻¹. Une étude menée sur un autre polychète marin (*Neanthes arenaceodentata*) a également mis en évidence que l'irradiation gamma externe (Co-60) induisait une diminution du succès reproducteur au fil des générations, quel que soit le débit de dose testé (0,19 - 2,1 et 17 mGy.h⁻¹) (Harrison et Anderson, 1994). Dans cette lignée, une étude récente menée sur le nématode *Caenorhabditis elegans*, exposé pendant trois générations successives à l'irradiation Cs-137 externe, a permis de mettre en évidence qu'une augmentation de l'apoptose, une diminution du nombre de spermatozoïdes et une diminution du nombre de cellules mitotiques expliqueraient l'aggravation des effets observés sur la reproduction au bout de la troisième génération (Buisset-Goussen, 2014).

La pertinence écologique des réponses moléculaires et cellulaires reste controversée (Forbes et al., 2006). L'enjeu est de déterminer à partir de quel niveau de dommages les réponses moléculaires et cellulaires peuvent potentiellement impacter les grandes fonctions biologiques d'un organisme telles que sa survie, sa croissance et sa reproduction. Dans le but de répondre aux objectifs de la radioprotection environnementale, il paraît maintenant nécessaire de réaliser des approches intégrées afin d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu à différents niveaux d'organisation biologique (cellulaire, moléculaire, individuel et populationnel), et à terme, pouvoir protéger adéquatement l'environnement.

CHAPITRE 2

UN MODÈLE BIOLOGIQUE : LA DAPHNIE, *DAPHNIA MAGNA*

La daphnie, *Daphnia magna* (Straus, 1820), est un microcrustacé d'eau douce, de l'ordre des cladocères. Comme de nombreux invertébrés aquatiques, la daphnie occupe une place importante dans les chaînes alimentaires des écosystèmes aquatiques. Consommatrice d'algues phytoplanctoniques et d'autres petits organismes, elle peut être à son tour, la proie des poissons et de nombreux animaux aquatiques carnivores tels que les larves de demoiselles et de libellules. Cette espèce est très utilisée en tant qu'organisme modèle dans le domaine de la recherche écologique, toxicologique et la biosurveillance des écosystèmes.

1. Écologie

1.1. Habitat

Daphnia magna vit principalement dans les plans d'eaux stagnants tels que les lacs, les étangs ou les mares temporaires. Sa répartition géographique s'étend de l'Est Américain jusqu'au nord de l'Europe occidentale. Bien que les daphnies puissent vivre dans des milieux où la qualité de l'eau varie fortement en fonction des saisons, cette espèce préfère les eaux relativement tempérées (18-22°C) et neutres (pH de 7,2 - 8,5). La daphnie participe à l'équilibre écologique des zones pélagiques en épurant naturellement l'eau, en participant au brassage de la colonne d'eau, en régulant le phytoplancton et en étant la proie préférentielle de nombreux organismes aquatiques.

1.2. Morphologie

Comme chez tous les crustacés, le corps de la daphnie est recouvert d'une cuticule à double paroi constituée essentiellement de chitine et de polysaccharides. Deux replis latéraux forment une cavité ouverte ventralement dans laquelle se trouve cinq paires d'appendices thoraciques, appelés phyllopoies et permettant aux daphnies de filtrer la nourriture (Figure 15). Des antennes biramées situés sur la capsule céphalique des daphnies leur permettent de nager. La nage caractéristique des daphnies, par petits sauts successifs, leur vaut notamment l'appellation de « puces d'eau ». La longueur de leur corps varie de 0,5 mm à 6 mm, suivant le sexe et le stade de développement.

Les juvéniles possèdent deux ébauches d'œil brunâtre qui fusionnent au cours de leur développement, donnant ainsi chez les adultes, un œil unique de taille importante. A l'âge adulte, les mâles se distinguent des femelles par une taille plus petite, des antennes plus longues, et des appendices thoraciques munis d'un crochet servant à étreindre les femelles. La carapace des juvéniles, des mâles et des femelles est terminée par une épine caudale (Figure 15) (Ebert, 2005).

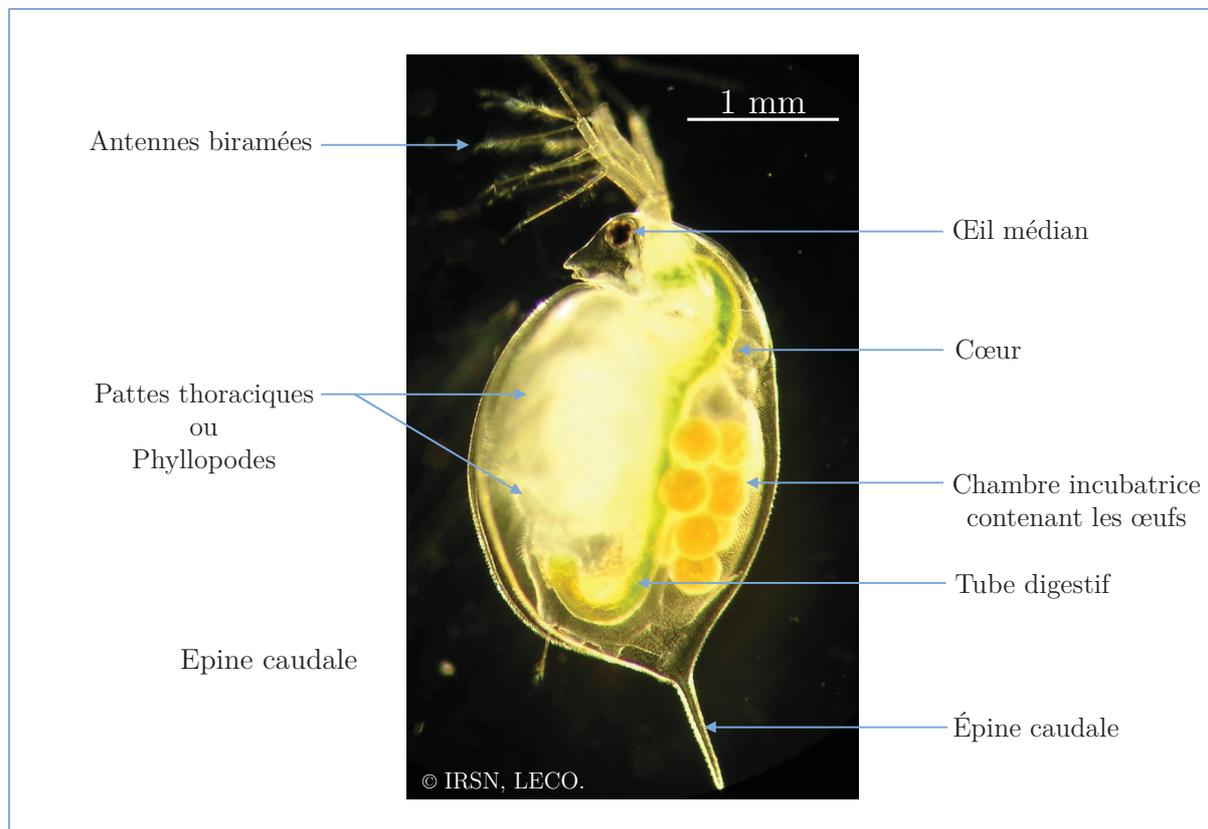


Figure 15. Anatomie d'une femelle adulte *Daphnia magna* (photo : F.Zeman ®)

1.3. Physiologie

Les daphnies se nourrissent en filtrant les petites particules en suspension dans la colonne d'eau. Les particules de nourriture sont collectées par les appendices thoraciques, puis acheminées jusqu'à leur bouche. Une fois ingérées, ces particules sont progressivement transférées vers le tube digestif, composé successivement de l'œsophage, de la partie médiane et de la partie terminale. Alors que l'œsophage assure le transport de la nourriture dans l'intestin, les parties médianes et terminales assurent la digestion *via* la production de fluides intestinaux, et l'assimilation *via* l'absorption des nutriments par les microvillosités. La partie terminale du tube digestif assure également l'excrétion des fécès grâce à des mouvements péristaltiques (Ebert, 2005).

Les daphnies se nourrissent principalement d'algues phytoplanctoniques, qualifiant ainsi cette espèce de consommateur phytophage. Cependant, elles peuvent également se nourrir de bactéries et de champignons. Selon les types de nourriture ingérés les daphnies peuvent avoir une teinte verte, jaune, blanche ou même rose. Lorsque la source de nourriture est absente, les daphnies deviennent totalement translucides.

Les daphnies possèdent une circulation sanguine ouverte. Le cœur se situe dorsalement dans la partie antérieure de la chambre incubatrice (Figure 15). Le transport de l'oxygène est pris en charge par la protéine respiratoire d'hémoglobine. Lorsque que le taux d'oxygène dans l'eau diminue, la daphnie est capable d'augmenter la production d'hémoglobine, lui permettant ainsi de résister à des conditions défavorables. Le système nerveux des daphnies est caractérisé par des ganglions cérébraux se situant à proximité des yeux et du tube digestif.

2. Cycle de vie

Le cycle de vie des daphnies est caractérisé par deux modes de reproduction : asexué et sexué (Figure 16).

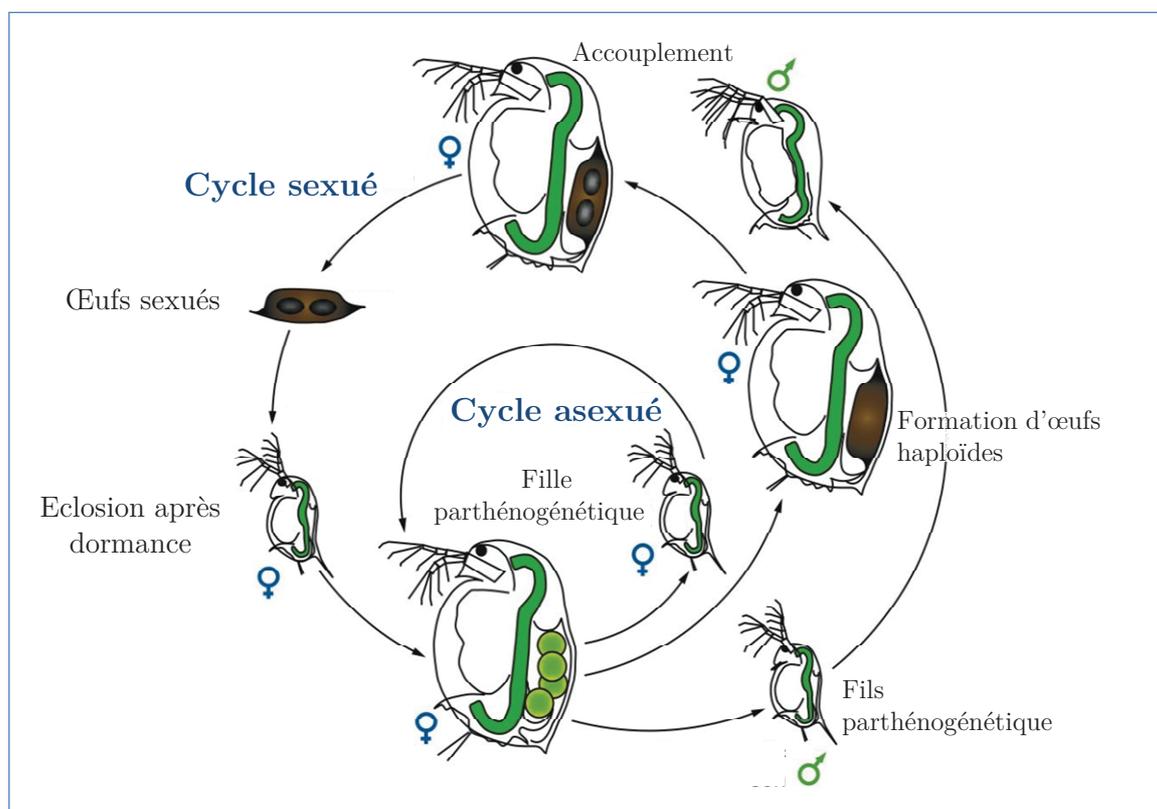


Figure 16. Cycle de vie de *Daphnia magna* (Ebert, 2005).

2.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée apparaît chez les daphnies lorsque les conditions de vie dans le milieu leur sont favorables. Lors de ces périodes, les populations de daphnies sont essentiellement composées de femelles. Sans aucune fécondation par l'autre sexe, les femelles adultes produisent des œufs génétiquement identiques, aussi bien entre eux qu'avec leur mères. On parle alors de reproduction « parthénogénétique ». La première ponte d'œufs d'une femelle adulte se produit après 6-7 jours de vie, lorsqu'elle a atteint sa maturité. Les œufs sont déposés dans la chambre incubatrice des femelles, localisée dorsalement sous la cuticule. Les embryons éclosent après un jour mais restent dans la chambre incubatrice, afin de terminer leur développement. Au bout de 3-4 jours, les daphnies adultes libèrent les juvéniles par flexions ventrales. Ces juvéniles sont qualifiées de « néonates » suivant l'anglicisme « *neonates* », signifiant nouveau-nés. Avant de devenir à leur tour capable de se reproduire, les néonates passent successivement par plusieurs périodes développement. Ces périodes sont appelées « *instars* » et correspondent à la période qui sépare deux événements de mue. En conditions optimales, le cycle de vie de *D. magna* est divisé en trois stades différents : embryonnaire (3 jours), juvéniles (6 jours) et adulte (jusqu'à leur mort). A 20°C, une daphnie adulte libère sa première ponte au bout de 9 jours et de nouvelles pontes sont successivement libérées tous les 2-3 jours jusqu'à leur mort (Figure 17). Ces pontes cycliques se produisent après chaque événement de mue. La taille des pontes varie de 10 à 40 œufs selon l'âge de la mère. En conditions optimales, les femelles peuvent vivre un peu plus de deux mois. Les générations parthénogénétiques se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables.

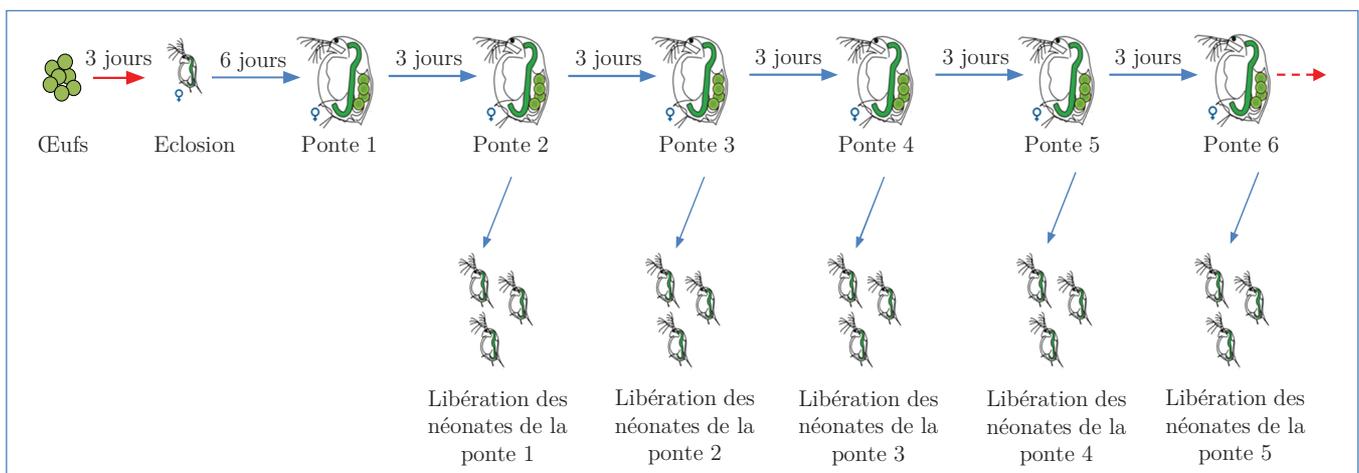


Figure 17. Reproduction parthénogénétique de *Daphnia magna*.

2.2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée apparaît chez les daphnies lorsque les conditions de vie dans le milieu leurs sont défavorables (manque de nourriture, densité importante, baisse de température, stress chimique *etc.*). Lors de ces périodes, les populations de daphnies donnent naissance à une génération bisexuée composée de mâles et de femelles (Figure 18A). Les femelles sont fécondées par les mâles, et produisent deux œufs de résistance issus de chaque ovaire. Ces œufs de résistance (haploïdes) sont encapsulés dans une structure protectrice appelée « éphippium ». On nomme l'ensemble l'éphippie (Figure 18B). L'éphippie est libérée lors des périodes de mue, et permet aux œufs de résister aux conditions défavorables. Ces œufs de résistance n'éclosent que lorsque les conditions de vie sont de nouveaux favorables. Les individus issus de ces œufs donnent naissance à une population génétiquement différente des daphnies mères.

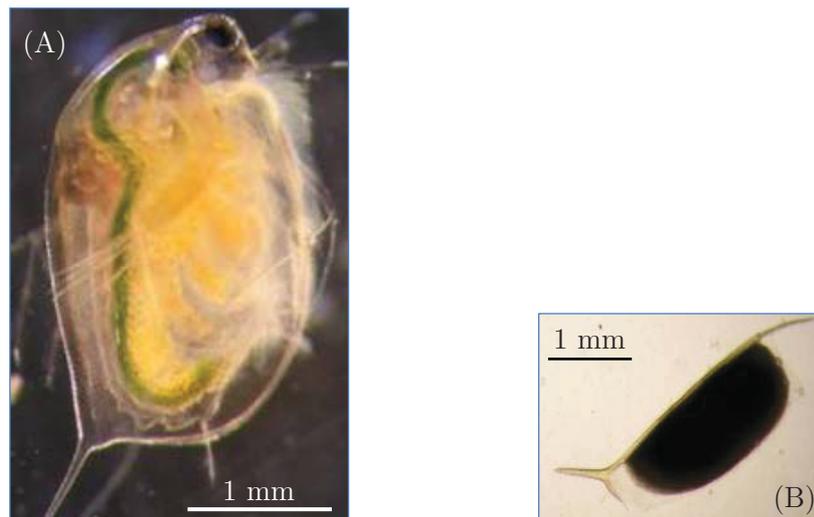


Figure 18. Photographie d'un mâle de 21 jours (A) et d'une éphippie issue de la reproduction sexuée (B) (Zeman, 2008).

CHAPITRE 3

DAPHNIA MAGNA ET L'ÉCOTOXICOLOGIE

Les connaissances biologiques et physiologiques acquises chez *D. magna* ont contribué au choix de cette espèce comme modèle biologique de référence dans les domaines de la toxicologie et de l'écotoxicologie, en particulier, concernant la gestion des risques environnementaux liés aux produits chimiques. Aujourd'hui, *D. magna* est recommandée en tant qu'espèce standard dans différents tests d'écotoxicité (ASTM, 1998; OECD, 2004, 2008).

1. Intérêt de la daphnie en écotoxicologie

La daphnie possède une longue histoire dans l'évaluation toxicologique. Les premiers travaux toxicologiques réalisés sur *D. magna* datent du début du XX^{ème} siècle (Warren, 1900; Buijtendijk, 1918). Cette espèce a réellement émergé comme un modèle biologique de référence suite à la publication des travaux de Naumann (1934), intitulée « Application de *Daphnia magna* (Straus) comme animal d'essai à des fins expérimentales » (Naumann, 1934). À la suite de cette publication, l'utilisation de *D. magna* dans le domaine des essais toxicologiques et écotoxicologiques n'a cessé de grandir (Shaw *et al.*, 2008). Aujourd'hui, cette espèce représente 8% de l'ensemble des données aquatiques expérimentales retrouvées dans la littérature (Denslow *et al.*, 2007). Le choix de la daphnie tient à sa petite taille, son cycle de vie court, sa reproduction parthénogénétique (individus génétiquement identiques), sa fécondité élevée et sa sensibilité à une large gamme de produits chimiques (Colbourne *et al.*, 2011). Toutes ces caractéristiques font de la daphnie un organisme relativement facile à maintenir en laboratoire et particulièrement adapté pour évaluer les effets toxiques et génotoxiques de divers polluants au cours de plusieurs générations.

Grâce à ses caractéristiques particulières, la daphnie a également attiré d'autres domaines. On la retrouve utilisée dans le domaine de la biologie évolutive, l'écologie, la modélisation écologique et toxicologique, la radioprotection, la génétique et l'épigénétique (Ringelberg, 1964; Koivisto, 1995; De Meester, 1996; Kooijman et Bedaux, 1996; Atienzar et Jha, 2004; Hooper *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2008; Zeman *et al.*, 2008; Preuss *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2012). La daphnie, *D. magna*, fait actuellement l'objet d'un consortium visant à séquencer entièrement son génome (Shaw *et al.*, 2008). La transversalité de ces thématiques contribue à améliorer constamment la compréhension des mécanismes de toxicité à différentes échelles (moléculaire cellulaire, individuelle, populationnelle) chez *D. magna*.

2. Étude de la toxicité de divers polluants chez la daphnie

Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps la toxicité de divers polluants sur les traits d'histoire de vie de la daphnie (survie, croissance et reproduction), en donnant quelques exemples succincts d'exposition chronique et multigénérationnelle. Nous nous intéresserons ensuite aux effets induits par les toxiques au niveau subcellulaire, en ciblant principalement ceux qui sont caractéristiques des radiations ionisantes (stress oxydatif, dommages ADN et processus de réparation). Pour finir, nous présenterons les seules connaissances disponibles relatives aux effets des radiations ionisantes sur la daphnie.

2.1. Effets sur les traits d'histoire de vie

2.1.1. Effets chroniques

Pour évaluer la toxicité chronique d'une substance chez *D. magna*, les tests standards sont classiquement réalisés sur 21 jours. Lors de ces tests normalisés (OECD, 2008), les daphnies sont exposées à une gamme de concentrations et plusieurs paramètres peuvent être suivis (survie, croissance et reproduction). Il existe une multitude de travaux évaluant la toxicité des polluants sur la daphnie. Selon le toxique considéré les effets sur la survie, la croissance et la reproduction peuvent considérablement varier.

A titre d'exemple, une exposition au zinc (Zn) pendant 21 jours, induit une réduction de la survie et de la masse des daphnies (Muysen *et al.*, 2006). Les auteurs associent ces effets à une réduction du taux de filtration et des réserves énergétiques. De même, lors d'une contamination chronique de la nourriture au cuivre (Cu), les individus présentent des réductions de la croissance (en masse) et de la reproduction (diminution du nombre de néonates et retard de libération de pontes) (De Schamphelaere *et al.*, 2007). Ces effets semblent être les conséquences d'une augmentation des coûts métaboliques et une inhibition des processus de mues. Des perturbations morphologiques (déformation de la cuticule, des antennes, de la tête) ont été détectées chez des daphnies exposées pendant 21 jours à des nanoparticules de cuivre (CuO) (de OF Rossetto *et al.*, 2014). Ces auteurs suggèrent que les déformations observées pourraient expliquer les effets sur la croissance et la reproduction des daphnies. Plus récemment, Inthasen (2015) a mis en évidence que des doses environnementales d'insecticides (le Pirimicarb et le Malathion) provoquaient des réductions de la taille des daphnies et des retards dans la production des premières pontes.

2.1.2. Effets transgénérationnels

Chez la daphnie, de nombreuses études évaluant la toxicité de contaminants ont démontré que les réponses pouvaient différer d'une génération à l'autre. Les organismes peuvent présenter à long terme, soit une augmentation de la résistance aux polluants, soit une augmentation de la sensibilité aux polluants.

Par exemple, Ward et Robinson (2005) démontrent, chez *D. magna*, une augmentation de la résistance au cadmium au bout de huit générations, illustré par une augmentation de la DL₅₀ de 26 µg.L⁻¹ à 120 µg.L⁻¹ entre la première et huitième génération. Les auteurs suggèrent que cette acquisition de résistance est en partie due à une adaptation génétique. De même, des daphnies exposées au zinc (Zn) pendant plusieurs générations, révèlent une augmentation de tolérance au cours des générations (Muysen et Janssen, 2001). Ces auteurs constatent que les daphnies plus résistantes présentent des tailles plus grandes et produisent plus de néonates que les daphnies non-exposées. Récemment, Kim *et al.* (2014) ont également montré une augmentation de tolérance chez des daphnies exposées à la tétracycline. D'après ces deux précédentes études (Muysen et Janssen, 2001; Kim *et al.*, 2014), ces processus d'acquisition de tolérance ne seraient pas dus à une adaptation génétique, mais plutôt liés à une acclimatation résultant de la plasticité phénotypique des individus. Ces phénomènes d'acquisition de résistance ou de tolérance résultant d'acclimatation peuvent également disparaître au cours des générations successives (Muysen et Janssen, 2004).

Dans d'autres cas, les organismes peuvent présenter une augmentation de la sensibilité au travers des générations. Par exemple, Brausch et Salice (2011) montrent que des doses environnementales de pesticides induisent une diminution progressive de la taille des daphnies au fil des générations. De même, Chen *et al.* (2014) étudient les effets potentiels d'un composé présent dans les herbicides, le pentachlorophénol. Cette étude met en évidence que de très faibles concentrations (0,002 µmol.L⁻¹) de ce composé, induisent des effets de plus en plus prononcés sur la survie, la taille et le nombre de descendants au cours de trois générations successives de daphnies. Jacobasch *et al.* (2014) se sont intéressés aux effets des nanoparticules de dioxyde de titane sur des populations *D. magna* exposées pendant six générations. Ces auteurs constatent des effets croissants sur la mortalité, la masse et la reproduction des individus au fil des générations exposées. La plus forte concentration de 1,78 mg.L⁻¹ provoque notamment une extinction totale de la population au bout de la cinquième génération. Les auteurs de ces différents travaux lient l'aggravation des effets observée avec divers mécanismes de toxicité tels que des dommages du tube digestif, des réductions du taux de nutrition, des perturbations de la nage *etc.* (Brausch et Salice, 2011; Chen *et al.*, 2014; Jacobasch *et al.*, 2014).

D'autres auteurs démontrent que l'aggravation des effets serait en partie liée aux différences d'exposition entre les générations (Villaruel *et al.*, 2000; Sobral *et al.*, 2001; Arndt *et al.*, 2014). En effet, la plupart des expériences débutent avec des néonates fraîchement éclos, de moins de 24 heures. Ces expériences ignorent l'exposition durant l'embryogenèse de la première génération et les potentiels transferts des toxiques entre les mères et leurs œufs. Par conséquent, les temps d'exposition entre la première génération et la seconde sont différents, et les incidences sur les générations futures peuvent être elles aussi différentes. Van Leeuwen *et al.* (1985) démontrent que les réponses de daphnies exposées à un toxique à partir de leur stade embryonnaire donnent une meilleure estimation de la toxicité d'un polluant à long terme.

Des effets beaucoup plus contrastés peuvent également être observés. Dietrich *et al.* (2010) étudient, chez *D. magna*, les effets de plusieurs produits pharmaceutiques (la carbamazépine, le diclofénac, l'éthinylestradiol et le métoprolol) au cours de six générations d'exposition. Dans cette étude, des effets sur la croissance et la reproduction sont détectés dans la première génération. Ces effets disparaissent dans les générations suivantes, puis finissent par réapparaître à la sixième génération. Ils suggèrent alors que les produits pharmaceutiques agiraient sur les daphnies avec des modes d'action différents au cours du temps. La complexité des processus toxiques mis en jeu au fil des générations ne permet toutefois pas aux auteurs de tirer des conclusions précises vis-à-vis des mécanismes de toxicité de ces produits pharmaceutiques. Ils suggèrent alors qu'il serait nécessaire de réaliser de plus amples recherches, dans le but d'élucider les potentiels mécanismes moléculaires mis en jeu au fil des générations.

2.2. Effets subcellulaires

La daphnie a la capacité de produire parthénogénétiquement des clones, limitant ainsi la variabilité génétique entre les individus. Par conséquent, cette espèce est un modèle intéressant pour étudier les effets des toxiques à l'échelle subcellulaire et permettre ainsi une meilleure compréhension des mécanismes induits par les substances toxiques (Shaw *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2012).

2.2.1. Stress oxydatif

Pour rappel, le stress oxydatif est généré par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur élimination par les systèmes de défenses antioxydants. Chez la daphnie, plusieurs études se sont penchées sur ce phénomène.

Une étude montre que le cuivre (Cu), même à très faibles concentrations (0,63 μM), induit une augmentation significative de la quantité de ROS chez *D. magna* (Xie *et al.*, 2006). L'exposition à une autre substance, les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2), augmente l'activité des enzymes antioxydantes : la catalase, la glutathionine peroxydase et la glutathionine-S-transférase, de manière concentration dépendante (Kim *et al.*, 2010). Cette constatation indique que la toxicité des nanoparticules chez les daphnies est attribuable à la production de ROS. De même, Gómez-Oliván *et al.* (2014), démontrent que l'acide acétylsalicylique, aussi connu sous le nom d'aspirine, provoque une augmentation de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines, ainsi que des altérations de l'activité des enzymes antioxydantes. Ils détectent également une augmentation significative des altérations de l'ADN. Ces auteurs concluent que cette substance chimique induit du stress oxydatif et des dommages ADN chez les daphnies exposées.

2.2.2. Altérations de l'ADN

Chez *Daphnia magna*, de nombreux travaux se sont intéressés, d'une part, aux altérations de l'ADN causées par des agents toxiques, et d'autre part, aux conséquences de ces altérations sur les traits d'histoire de vie des daphnies et de leur descendance.

A titre d'exemple, Lee *et al.* (2009) mettent en évidence que des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2) induisent des effets génotoxiques chez *D. magna*. En réalisant un test des comètes, ils montrent une augmentation significative des cassures double brin de l'ADN en fonction des concentrations. Des cassures double brin sont également détectées chez des daphnies exposées à des nanoparticules d'argent (AgNP), avec en parallèle un effet sévère sur la mortalité (Park et Choi, 2010). Les auteurs supposent que l'effet observé sur la mortalité serait dû à une accumulation de dommages à l'ADN. Certaines études arrivent clairement à établir un lien entre les effets observés à l'échelle moléculaire et ceux observés à l'échelle de l'individu. Par exemple, des daphnies exposées à des concentrations de cuivre (Cu) allant de 90 à 120 $\mu\text{G.L}^{-1}$ présentent une réduction de croissance et de reproduction (Atienzar *et al.*, 2001). En parallèle, les auteurs détectent des changements de profils génétiques à ces mêmes concentrations, *via* la méthode de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Ce constat leur permet de lier clairement les altérations moléculaires avec les effets néfastes mesurés à l'échelle individuelle.

Avec cette même technique, une transmission d'altérations à l'ADN transgénérationnelle (de la mère aux descendants) est observée chez des daphnies exposées au benzo[a]pyrène (Atienzar et Jha, 2004). Les auteurs suggèrent alors que les modifications de l'ADN se produisent dans les cellules germinales (cellules reproductrices), expliquant ainsi le caractère héréditaire de ces modifications. Toutefois, ces effets disparaissent lorsque les daphnies sont placées dans un environnement non contaminé, suggérant l'intervention de mécanisme d'élimination ou de réparation des dommages moléculaires.

D'autres études s'intéressent aux changements d'expression de gènes suite à une exposition toxique. Soetaert *et al.* (2007) testent le potentiel génotoxique du cadmium chez *D. magna* à l'aide de puces à ADN. Les analyses révèlent que les voies moléculaires touchées par le cadmium seraient associées à des perturbations de la digestion, du transport de l'oxygène, du métabolisme cuticulaire et du développement de l'embryon. Les altérations de ces voies expliqueraient les effets observés sur la croissance des daphnies. De même, différents profils d'expression de gènes sont identifiés chez des daphnies exposées à des nanoparticules de zinc, suggérant différents modes d'action tels que du stress oxydatif, des réductions de la reproduction et des perturbations de la respiration cellulaire (Poynton *et al.*, 2010).

2.2.3. Réparation de l'ADN

Très peu d'études se sont penchées sur les voies de réparation de l'ADN chez les daphnies.

Par exemple, Connelly *et al.* (2009) tente d'évaluer les effets des rayons ultraviolets (UV-B) sur les dommages ADN, en comparant la capacité de réparation des daphnies en fonction de la température du milieu (10°C ou 20°C). Le genre *Daphnia sp.* possède deux voies spécifiques pour réparer les dommages ADN induits par les rayonnements UV. Il s'agit des processus de réparation photo-enzymatique (*PER*) et d'excision de nucléotide (*NER*) (Rautio et Tartarotti, 2010). L'étude de Connelly *et al.* (2009) révèle que des daphnies exposées aux rayons UV-B à 10°C présentent moins de dommages ADN que celles maintenues à 20°C. En parallèle, la survie des daphnies maintenues à 10°C est nettement supérieure à celles des daphnies à 20°C. Les auteurs montrent alors que ce phénomène est lié à une plus grande efficacité des processus réparation *PER* à 10°C alors que l'efficacité des *NER* reste constante à 10 et 20°C.

Une autre étude s'intéresse à la capacité de réparation du stade néonate (< 24h) et adulte (7 jours) de la daphnie, suite à une exposition au benzo[a]pyrène et au dichromate de sodium (David, 2009). Des analyses transcriptomiques sont réalisées sur plusieurs gènes d'intérêt. Chez

les néonates non exposés, la plupart des gènes exprimés sont liés à des processus de synthèse de cuticule et de libération de mue. Chez les adultes non-exposés, les gènes exprimés sont liés à des processus de reproduction, de maturation et également à des processus de réparation tels que des réponses face au stress oxydatif ou aux dommages ADN. Lors de l'exposition aux contaminants, les gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN et de réponses au stress oxydatif sont surexprimés chez les adultes mais pas chez les néonates. Cette étude démontre que les capacités de réparation des daphnies peuvent varier considérablement en fonction du stade de vie, les adultes (7 jours) possédant une meilleure capacité à réparer les dommages face à un stress chimique que les néonates (<24h) (David *et al.*, 2011).

3. Étude de la toxicité des radionucléides chez la daphnie

La daphnie est l'un des seuls invertébrés aquatiques pour lesquels les effets des trois types de rayonnements (alpha, bêta et gamma) sont disponibles dans la littérature.

3.1. Cas de l'uranium appauvri

Métal très majoritairement chimiotoxique (malgré sa nature d'émetteur α), l'uranium appauvri (U appauvri) a fait l'objet de plusieurs études sur *D. magna* (Poston *et al.*, 1984; Antunes *et al.*, 2007; Zeman *et al.*, 2008; Massarin, 2010; Plaire, 2013). Parmi ces études, Zeman *et al.* (2008) mettent en évidence qu'une exposition à l'U appauvri pendant 21 jours induit une réduction significative de la croissance et de la reproduction des daphnies, dès 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Des altérations du tube digestif sont également observées à 50 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, suggérant que l'uranium perturbe l'acquisition et l'assimilation de la nourriture. D'autres travaux ont étudié les effets d'une exposition à l'U appauvri (10 - 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$) au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2) (Massarin, 2010). Les auteurs démontrent une aggravation de la sévérité des effets au fil des générations, avec un effet dès 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur la croissance somatique à partir de la première génération (F0), sur le taux d'ingestion à partir de la seconde génération (F1) et sur la reproduction au bout de la troisième génération (F2). Les débits de dose de radioactivité estimés au cours de cette étude ($\leq 20 \mu\text{Gy.h}^{-1}$) conduisent les auteurs à conclure que les effets sont dus à la chimiotoxicité de l'U appauvri. Une approche mécaniste utilisant la théorie de Budget d'Énergie Dynamique appliquée à la toxicologie (DEBtox) suggère que le principal mode d'action de l'U appauvri chez *D. magna* est une perturbation de l'assimilation, mode d'action confirmé par les analyses de l'assimilation du carbone.

Cependant, ce mode d'action ne peut pas expliquer à lui seul l'aggravation des effets au fil des générations. On peut alors émettre l'hypothèse que cette aggravation serait la conséquence de la différence d'exposition entre la génération F0 et les générations suivantes. En effet, dans l'étude de Massarin (2010), l'exposition débute avec des néonates fraîchement éclos (< 24h) en F0, alors que les stades embryonnaires des générations suivantes (F1 et F2) sont exposés. Une étude plus récente a exposé des daphnies à l'U appauvri au cours de deux générations successives, afin de tester l'influence d'une exposition du stade embryonnaire dans l'aggravation des effets au fil des générations (Plaire, 2013). En parallèle, cette étude a évalué les effets génotoxiques de l'uranium appauvri à l'aide de la méthode *RAPD-PCR*, afin d'évaluer si les dommages ADN pourraient jouer un rôle dans l'aggravation des effets au fil des générations. Cette étude révèle que les dommages ADN sont transmis et accumulés au fil des générations en parallèle d'une augmentation de la sensibilité des organismes à l'U appauvri. Les auteurs concluent que les effets sur les traits d'histoire de vie sont plus importants lorsque l'exposition débute dès le stade embryonnaire.

3.2. Cas de la contamination alpha interne

L'américium-241 (Am-241), émetteur α fortement radiotoxique, a également fait l'objet de deux études chez *Daphnia magna* (Alonzo *et al.*, 2006; 2008). Alonzo *et al.* (2008), ont exposé des daphnies à des concentrations d'Am-241 allant de 0,4 à 40 Bq.mL⁻¹ pendant trois générations successives (F0, F1 et F2). Cette contamination interne a conduit les daphnies à être exposées à un débit de dose alpha interne allant de 0,3 à 15 mGy.h⁻¹. Les résultats de cette étude démontrent que les effets de l'irradiation alpha interne sur la survie, la croissance et la reproduction s'aggravent de la génération F0 à F2. Les effets, limités à une réduction de la croissance (taille et masse) dans la génération F0, deviennent de plus en plus importants dans les générations F1 et F2 : mortalité précoce, retard et réduction de la croissance et de la reproduction.

Avec les mêmes concentrations d'exposition, l'étude antérieure d'Alonzo *et al.* (2006), où les daphnies étaient exposées pendant 23 jours à l'Am-241, a également mis en évidence une augmentation de la respiration des organismes exposés aux plus fortes concentrations. En parallèle, une réduction de la résistance des néonates à jeun a été observée à toutes les concentrations d'Am-241 testées par rapport aux daphnies témoins.

3.3. Cas de la contamination bêta interne

A ce jour, seule une étude concerne les effets de l'émetteur β chez *D. magna*. Gudkov et Kipnis (1996), démontrent qu'une exposition de daphnies à des concentrations de tritium (allant de 5×10^2 à 5×10^8 Bq.L⁻¹) pendant cinq générations induit une réduction de la durée de vie, de la croissance et de la reproduction (nombre de pontes et d'œufs par femelle). Ces effets semblent s'aggraver à partir de la deuxième génération d'exposition. Les débits de dose bêta internes délivrés aux daphnies au cours de cette expérience n'ont pas été calculés.

3.4. Cas de l'irradiation gamma externe

3.4.1. Exposition aiguë

Sarapultseva et Gorski (2013) ont exposé *D. magna* pendant une génération à des doses aiguës d'irradiation gamma externe (10, 100, 1000 mGy avec une source de Cs-137 délivrant un débit de dose allant de 0,17 à 1 Gy.min⁻¹). Les auteurs ont principalement démontré une réduction de la durée de vie des organismes à partir de 100 mGy. Récemment, Nascimento *et al.* (2015) ont étudié les effets seuls et combinés de plusieurs concentrations de fluoranthène (FA) (20, 40, 80 et 160 µg.L⁻¹) et de plusieurs doses d'irradiation gamma externe (25, 50, 100, et 200 Gy avec une source de Cs-137 délivrant un débit de dose 6,7 Gy.min⁻¹). Ces auteurs ont démontré que les daphnies exposées seulement aux césium-137 présentaient : (i) une diminution significative du taux d'ingestion à 200 Gy avec une CE₅₀ de 146 ± 15 Gy, une diminution significative de l'assimilation de carbone à partir de 100 Gy avec une CE₅₀ de 109 ± 54 Gy et une tendance à la réduction de la mobilité à 200 Gy. Aucun effet n'a toutefois été constaté sur la croissance des organismes.

3.4.2. Exposition chronique

Marshall (1962) a exposé *Daphnia pulex* pendant environ une génération (~ 25 jours) à des débits de dose d'irradiation gamma externe (Cobalt-60) allant de 230 à 700 mGy.h⁻¹. Cette étude a montré que l'irradiation externe induisait une réduction du taux de naissance des daphnies à environ 300 mGy.h⁻¹ et une augmentation de la mortalité à environ 420 mGy.h⁻¹. Lors d'une expérience multigénérationnelle (~ 385 jours), ce même auteur a constaté que l'irradiation provoquait l'extinction de certaines populations de daphnies à partir de 170 mGy.h⁻¹ (Marshall, 1966). Cependant, au cours de ces études, de nombreux facteurs confondant semblent sublimer les effets de l'irradiation (compétition pour la nourriture, surdensité, obscurité *etc.*) (Marshall, 1962; 1966).

A notre connaissance seuls les travaux de [Gilbin *et al.* \(2008\)](#) se sont intéressés aux effets chronique de l'irradiation gamma externe à faibles débits de dose chez *Daphnia magna*. Cette étude a consisté à exposer des daphnies pendant 21 jours à une gamme de débits de dose d'irradiation gamma allant de 0,4 à 31 mGy.h⁻¹. Les résultats de cette étude ont montré que les daphnies exposées à 31 mGy.h⁻¹ présentaient une réduction de la fécondité à partir de 15 jours d'exposition, menant à une réduction de la fécondité totale d'environ 21% à 21 jours. Une réduction du taux de respiration a également été démontrée à ce même débit de dose. En l'absence de nourriture, les néonates provenant de mères exposées ont montré une diminution significative de leur résistance dès 0,4 mGy.h⁻¹ par rapport au néonates témoins. Les potentielles conséquences de l'irradiation à faibles débits de dose sur la descendance n'ont à ce jour jamais été testées sur plusieurs générations de *D. magna*.

4. Radiosensibilité comparée des invertébrés

Afin de fournir une vision plus approfondie des effets des différents types de rayonnement, une synthèse des études d'exposition chronique à faibles débits de dose retrouvées dans la littérature chez les invertébrés est présentée [Tableau 2](#).

Tableau 2. Synthèse de la radiotoxicité des rayonnements alpha (α), bêta(β) et gamma (γ) chez plusieurs espèces d'invertébrés en fonction du temps (heures ou jours) et du régime d'exposition (quantité : en Bq.kg⁻¹ ou Bq.mL⁻¹ ; débit de dose : en μ Gy.h⁻¹ ou mGy.h⁻¹).

Source de rayonnement	Espèces	Temps d'exposition	Régime d'exposition	Effets biologiques	Référence
Rayonnement α					
Américium-241 (Am-241)	<i>Daphnia magna</i>	70 jours (3 générations)	0,3 - 15 mGy.h ⁻¹	Réduction de la croissance au fil des générations Réduction de la fécondité au fil des générations	Alonzo et al., (2008)
Polonium-210 (Po-210)	<i>Perna perna</i>	365 jours	\approx 8 μ Gy.h ⁻¹	Pas de mutations Pas d'altérations de l'ADN	Godoy et al., (2008)
Radium-226 (Ra-226)	<i>Hediste diversicolor</i>	28 jours	30 - 6000 Bq.kg ⁻¹	Bioaccumulation confirmée Aucun effets sur le stress oxydatif	Grung et al. (2009)
Strontium-90 (Sr-90) Polonium-210 (Po-210) Plutonium-238 (Pu-238) Américium-241 (Am-241)	<i>Mytilus edulis</i>	Etude de terrain (inconnu)	0,61 μ Gy.h ⁻¹	Altérations ADN Voies de réparation altérées	Alamri et al., (2012)
Américium-241 (Am-241)	<i>Crassostrea gigas</i>	15 jours	56 Bq.mL ⁻¹	Pas d'effets sur la mortalité Pas d'effets sur la croissance	Devos (2013)
Rayonnement β					
Eau Tritiée (HTO)	<i>Pollicipes polymerus</i>	32 jours	< 62,5 μ Gy.h ⁻¹	Perturbation des périodes de mues	Abbott et Mix, (1979)
Eau Tritiée (HTO)	<i>Mytilus edulis</i>	\approx 24 h	< 2 μ Gy.h ⁻¹ < 1,21 mGy.h ⁻¹	Dommages cytogénétiques Mortalité et anomalies du développement	Hagger et al., (2005)
Eau Tritiée (HTO)	<i>Mytilus edulis</i>	\approx 96 h	12 - 485 μ Gy.h ⁻¹	Augmentation de la fréquence des micronoyaux Cassure simple brin de l'ADN	Jha et al., (2005)
Rayonnement γ					
Cobalt-60 (Co-60)	<i>Uca puligator</i>	40 jours	\approx 32 mGy.h ⁻¹	DL ₅₀ = 2,1 - 6 Gy	Engel (1973)
Cobalt-60 (Co-60)	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	\approx 125 jours (2 générations)	0,19 - 17 mGy.h ⁻¹	Diminution de la fécondité	Harrison et Anderson (1994)
Cobalt-60 (Co-60)	<i>Ophryotrocha diadema</i>	\approx 250 jours (7 Générations)	1,7 - 13,7 mGy.h ⁻¹	Embryons anormaux Réduction de la fécondité au fil des générations	Knowles et Greenwood (1994)
Cobalt-60 (Co-60)	<i>Ophryotrocha diadema</i>	77 jours	4,2 mGy.h ⁻¹	Effets sur la reproduction (Nombre d'œufs, nombre de larves ...)	Knowles et Greenwood (1997)
Cobalt-60 (Co-60)	<i>Eisenia foetida</i>	182 jours (2 générations)	0,18 - 43 mGy.h ⁻¹	Réduction de la fécondité au fil des générations	Hertel-Aas et al., (2007)
Cesium-137 (Cs-137)	<i>Daphnia magna</i>	21 jours	0,41 - 31 mGy.h ⁻¹	Réduction de la taille des pontes Reduction de la survie des néonates à jeun	Gilbin et al., (2008)

CHAPITRE 4

LA MODÉLISATION MÉCANISTE EN ÉCOTOXICOLOGIE

La modélisation mécaniste est un outil mathématique conceptuel qui permet d'organiser, de structurer et donner un sens aux observations expérimentales. En soi, un modèle est une représentation simplifiée, une abstraction de la réalité permettant de synthétiser, de décrire et comprendre des phénomènes biologiques, écologiques ou physiques non-mesurés. À terme, il permet de prédire des phénomènes à des échelles de temps supérieures, à des niveaux d'organisation supérieurs et inférieurs, ou encore, d'extrapoler ces prédictions dans des scénarios jusqu'alors non-testés (Vindimian, 2000). Un modèle est réfutable par l'expérience et ne cherche pas à représenter fidèlement la réalité, il permet simplement de compiler nos connaissances et de tester des hypothèses :

« *All models are false, but some are useful* » (Box, 1976).

1. Les modèles d'effets individuels : approche Toxicocinétique – Toxicodynamique

1.1. Généralités

Traditionnellement, l'une des principales voies pour étudier la toxicité d'une substance repose sur une description d'effets après une période spécifique d'exposition, dans des conditions de tests spécifiques et sur des organismes spécifiques (Jager et Zimmer, 2013). Dans le cadre de l'évaluation des risques, ces tests écotoxicologiques consistent à prédire une NOEC (*No Observed Effect Concentration*) ou à déterminer une concentration d'effet EC_x ($x\%$ *Effect Concentration*). Ces valeurs sont ensuite utilisées pour caractériser une PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) en dessous de laquelle, on considère que la substance donnée n'engendrera aucun risque pour l'environnement. Cependant, ces valeurs peuvent dépendre de nombreux facteurs. Par exemple, Alda Álvarez *et al.* (2006) démontre que les EC_x estimées chez le nématode, *C. elegans* exposé au carbendazime ou au pentachlorobenzène, varient considérablement en fonction du composé toxique, du critère d'effet sélectionné (survie, croissance ou reproduction), du temps d'exposition et du stade de vie de l'organisme. Cette exemple illustre bien qu'il est difficile de comparer et d'extrapoler ces valeurs descriptives entre les expériences, les espèces biologiques, leur stade de vie et les contaminants (Alda Álvarez *et al.*, 2006; Jager *et al.*, 2006; Jager et Zimmer, 2013). Pour ces raisons, l'utilité des EC_x et des NOEC est bien souvent remise en question (Chapman *et al.*, 1996; Warne et van Dam, 2008; Jager, 2011).

La modélisation mécaniste, quant à elle, va non seulement permettre de répondre à ces problèmes mais va également apporter des informations sur le mécanisme d'action du contaminant. En se basant sur des hypothèses et des concepts simples, la modélisation écotoxicologique décrit les processus qui, à partir d'une exposition initiale à un composé toxique, conduisent à des répercussions à l'échelle de l'organisme. Tous les événements entre l'exposition et l'apparition des effets peuvent être divisés en deux étapes: les processus Toxicocinétiques (TK) et les processus Toxicodynamiques (TD) (Figure 19).

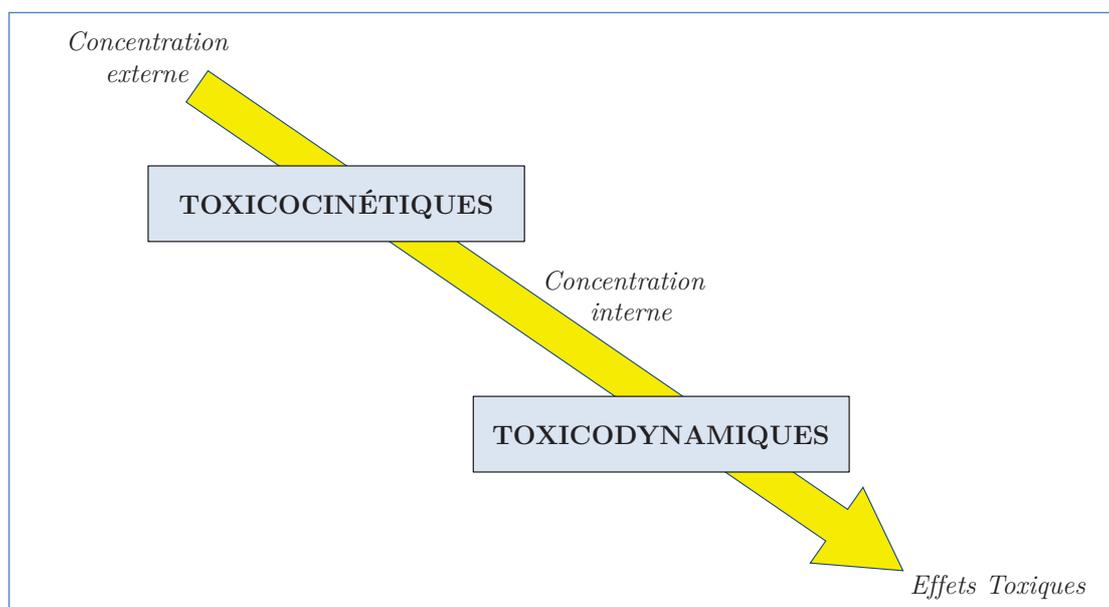


Figure 19. Schéma conceptuel résumant les approches Toxicocinétiques - Toxicodynamiques (TKTD) en modélisation écotoxicologique (d'après Jager et Zimmer, 2013).

Les processus Toxicocinétiques (TK) prennent en compte la dynamique d'internalisation du composé toxique au cours du temps, en décrivant tous les processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'élimination (passive) du toxique dans l'organisme (Rozman et Doull, 2000; Ashauer et Brown, 2008). Les processus Toxicodynamiques (TD) prennent en compte la dynamique des dommages causés par le composé toxique internalisé, avec d'éventuelles réparations. Cette étape consiste à décrire l'interaction du composé toxique avec les sites biologiques cibles de l'organisme tout en caractérisant les principaux processus biologiques responsables de la toxicité observée sur la survie, la croissance et la reproduction de l'organisme (Péry *et al.*, 2001; Ashauer *et al.*, 2006). En d'autres termes, les processus TK décrivent « ce que fait l'organisme du composé toxique » et les processus TD « ce que fait le composé toxique sur l'organisme ».

Les approches Toxicocinétiques - Toxicodynamiques (TKTD) facilitent la comparaison des effets entre différentes substances, modèles biologiques, stades de vie, conditions d'expositions et paramètres mesurés. Contrairement aux tests d'écotoxicologie classiques, les effets décrits sur l'organisme résultent de la concentration interne et non plus de la concentration externe. *In fine*, ces approches TKTD permettent de définir une NEC (*No Effect Concentration*), qui contrairement au ECx et NOEC, est indépendante du temps d'exposition et prend en compte à la fois les effets sur la survie, la croissance et la reproduction des individus (Kooijman et Bedaux, 1996; Jager *et al.*, 2004; 2006).

1.2. Toxicocinétique (TK)

D'une manière générale, une substance toxique a besoin d'être internalisée à l'intérieur d'un organisme et transportée sur des sites cibles avant qu'elle ne puisse produire un effet décelable à l'échelle de l'organisme. Au cours de ce transport, la substance va également pouvoir être transformée en d'autres composés et sera finalement éliminée au cours du temps par l'organisme (Ashauer *et al.*, 2006). L'organisme est alors considéré comme un compartiment unique dans lequel une simple cinétique (Loi de diffusion de Fick) est utilisée pour décrire l'internalisation et l'élimination de la substance (Figure 20).

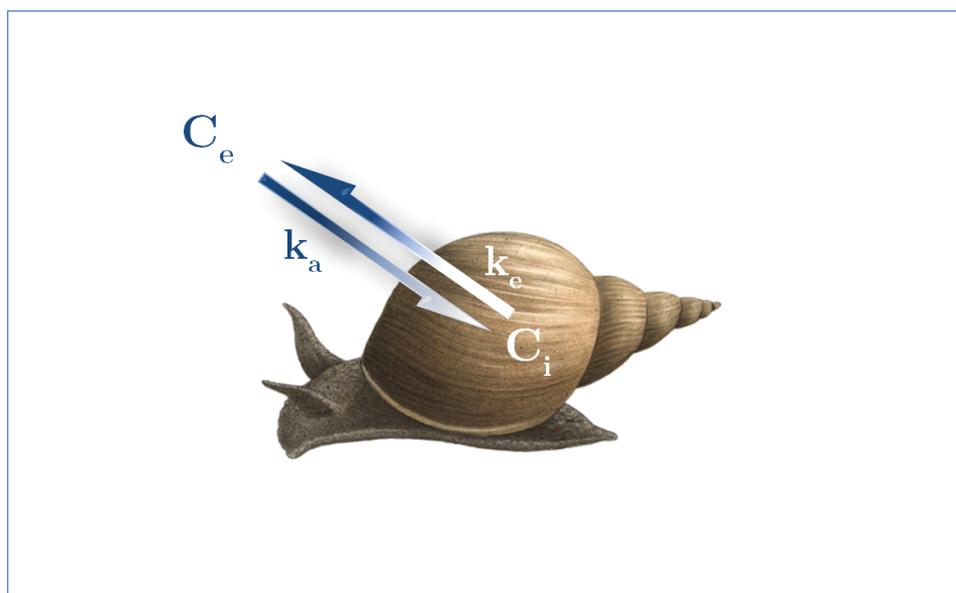


Figure 20. Schéma résumant l'internalisation et l'élimination d'un composé toxique dans un organisme vivant. Avec C_e la concentration externe, C_i la concentration interne, k_a et k_e les taux respectifs d'accumulation et d'élimination du composé toxique.

Tous les processus d'accumulation, de distribution interne, de biotransformation et d'élimination sont décrits au cours du temps par l'approche Toxicocinétique (TK). L'équation de premier ordre fréquemment utilisée dans cette approche est la suivante :

$$\frac{dC_i}{dt} = k_a C_e - k_e C_i \quad (4.1)$$

avec C_i la concentration interne du toxique, C_e la concentration du toxique dans le milieu ou concentration externe, k_a le taux d'accumulation du toxique et k_e le taux d'élimination du toxique.

Bien qu'il existe d'autres types de modèle, le modèle TK à un compartiment est à ce jour l'un des plus couramment utilisé en pharmacologie et en écotoxicologie (Sijm et van der Linde, 1995; Mackay et Fraser, 2000; Barber, 2003). Celui présenté dans cette partie ne prend cependant pas en charge le phénomène de dilution de la concentration interne liée à la croissance de l'organisme au cours du temps.

1.3. Toxicodynamique (TD)

L'approche Toxicodynamique va, quant à elle, lier la concentration interne au cours du temps à des effets observables à l'échelle de l'organisme. Il existe quatre principales approches pour aborder les processus toxicodynamiques. Deux de ces approches modélisent les perturbations au niveau moléculaire et cellulaire, et deux autres approches modélisent les perturbations bioénergétiques des organismes.

La première approche est un modèle basé sur l'équation de Hill (1910). Ce modèle log-logistique est utilisé pour décrire l'interaction entre le toxique et le récepteur moléculaire cible à l'intérieur de l'organisme. L'équation du modèle est la suivante :

$$p = \frac{C_i^{nH}}{k_d + C_i^{nH}} \quad (4.2)$$

où p est la proportion de récepteurs liés à un toxique, C_i la concentration interne du toxique, k_d la constante de dissociation et nH le nombre de Hill.

D'après cette équation, les effets sont supposés être proportionnels à la fraction de récepteurs moléculaires liés au toxique (Vindimian, 2000). Ce type de modèle est largement utilisé dans le domaine de la pharmacologie et la toxicologie (Goutelle *et al.*, 2008). Il permet notamment d'établir des courbes dose-réponse de la substance d'intérêt. Cependant, ce modèle ne permet pas de décrire précisément le cas d'effets complexes tels que des perturbations du taux de croissance, des retards ou des réductions de reproduction *etc.* Par conséquent, les modèles de Hill sont plutôt adaptés pour fournir une concentration de toxique responsable d'un certain degré d'effets (EC_x). Pour toutes les raisons énoncées au début de ce chapitre, l'utilisation de ce type de modèle et les EC_x qui en découlent reste problématique dans l'évaluation du risque environnemental (De Bruijn et van Leeuwen, 1996).

La seconde approche est le « Damage Assessment Model » (DAM) (Lee *et al.*, 2002; Lee et Landrum, 2006). Ce modèle tente de prendre en compte la faculté de récupération des organismes, c'est-à-dire leur faculté à réparer les dommages causés par une substance toxique. Avec ce modèle, les effets sont supposés être proportionnels aux dommages accumulés au cours du temps. La vitesse d'apparition des dommages est proportionnelle à la concentration du toxique internalisée dans l'organisme. L'équation de ce modèle est la suivante :

$$\frac{dD}{dt} = k_d C_i - k_r D \quad (4.3)$$

où D est le niveau de dommages accumulé au cours du temps, C_i est la concentration interne en toxique, k_d est le taux d'accumulation des dommages, et k_r le taux de réparation de ces dommages.

L'avantage de cette approche est de ne pas obliger les effets à être réversibles. Par exemple, avec l'équation ci-dessus, si le taux de réparation (k_r) est supérieur à 0, les dommages peuvent être réparés, les effets sont alors réversibles. Au contraire, si le taux de réparation (k_r) est strictement égale à 0, les dommages seront accumulés de manière croissante au cours du temps, les effets sont alors irréversibles pour l'organisme. Ce type de modèle peut être utile lorsque l'expérimentateur connaît, *a priori*, la cinétique des effets moléculaires au cours du temps. Cependant, tout comme les modèles de Hill, les modèles DAM supposent que l'effet au niveau de l'individu est linéaire par rapport à l'effet moléculaire ou cellulaire. Ce postulat est risqué dans la mesure où les organismes sont capables de réguler de petites perturbations cellulaire et moléculaire, sans même qu'elles n'atteignent les grandes fonctions physiologiques de l'organisme (Kooijman et Bedaux, 1996; Kooijman, 2000, 2010).

La troisième et dernière approche est basée sur les perturbations des flux d'énergie au sein d'un organisme, on parle de modèles bioénergétiques. Ces modèles fournissent un cadre de recherche écologiquement et biologiquement pertinent dans l'analyse et l'interprétation de données écotoxicologiques (Jager et Zimmer, 2012). De par leur nombreux avantages, ces approches offrent la possibilité : (i) de décrire fidèlement les processus physiologiques d'une grande variété d'espèces animales, (ii) d'analyser simultanément des données de croissance et de reproduction, (iii) d'identifier le ou les modes d'action associés aux effets du toxique, (iv) d'extrapoler les effets à l'échelle de la population, ou encore d'interpréter les effets à l'échelle moléculaire (Kooijman et Bedaux, 1996; Nisbet *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2004; Kooijman, 2010; Beaudouin *et al.*, 2012). A ce jour, il existe deux grandes approches bioénergétiques, l'une est basée sur la théorie MTE (Théorie Métabolique de l'Écologie) (Brown *et al.*, 2004) et l'autre sur la théorie DEB (Budget d'Énergie Dynamique) (Kooijman, 2010). Ces deux théories sont fondées sur des descriptions simples et réalistes de l'acquisition et de l'utilisation de l'énergie par les organismes.

Bien que la théorie MTE soit reconnue comme étant la plus populaire des deux théories, elle repose sur des hypothèses beaucoup trop simplistes (Delius, 2015). Dans la théorie MTE, Brown *et al.* (2004) posent l'hypothèse que les taux métaboliques des organismes varient essentiellement en fonction de la température et de la masse de l'organisme. Ces taux métaboliques permettraient de prédire tous les processus écologiques allant de l'individu à la biosphère. La théorie MTE suppose également que toutes les espèces animales, quels que soient leurs cycles de vie, ont un taux métabolique qui après correction par la masse et la température, est identique (van der Meer, 2006). Ces hypothèses simplifient indéniablement le modèle, mais aujourd'hui l'ampleur du coût de ces simplifications fait souvent débat (Price *et al.*, 2012; Humphries et McCann, 2014). *A contrario*, le modèle DEB fournit une approche en se basant sur des paramètres physiologiques propres au cycle de vie de l'espèce étudiée. Avant toute utilisation, ces paramètres sont expérimentalement vérifiés. Aujourd'hui, les données et les paramètres disponibles pour les modèles DEB couvrent près de 400 espèces, allant des simples cnidaires jusqu'aux organismes plus complexes, comme par exemple les mammifères supérieurs⁸.

⁸ Les informations sur la théorie DEB peuvent être retrouvées sur : <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/>
La base de données relative au modèle DEB peut être trouvée sur :
http://www.bio.vu.nl/thb/deb/deblab/add_my_pet_old/add_my_pet_portal.html

Un schéma conceptuel décrivant synthétiquement les différentes approches TKTD abordées au cours cette partie est présenté ci-dessus (Figure 21).

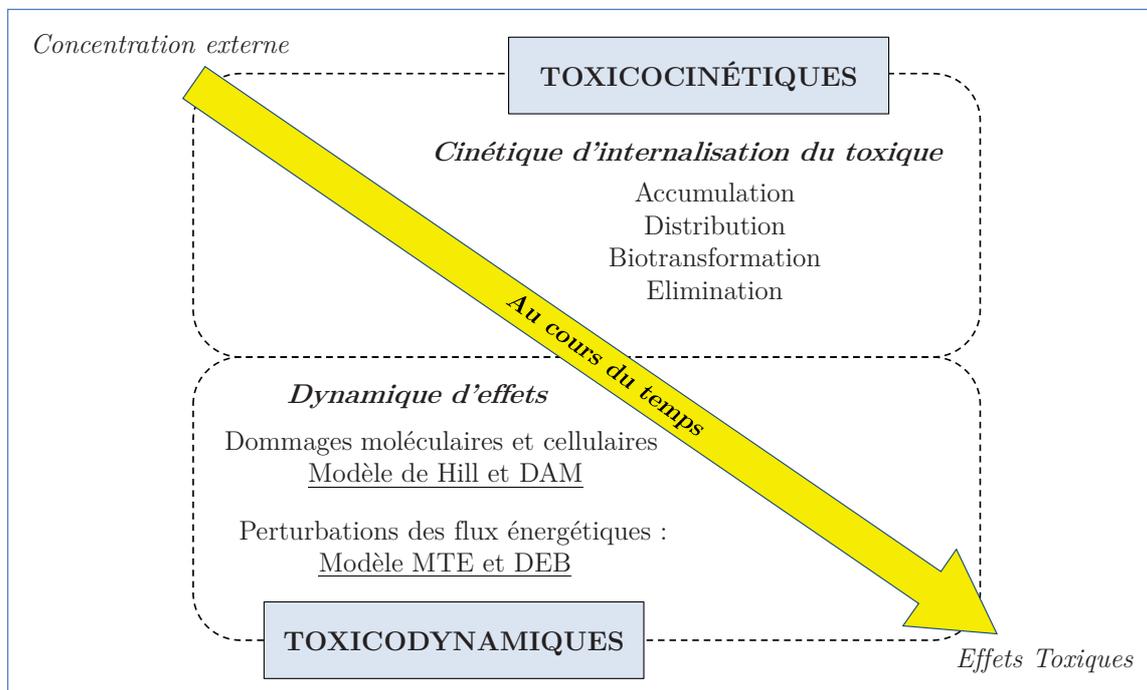


Figure 21. Schéma conceptuel résumant les principales approches Toxicocinétiques - Toxicodynamiques (TKTD) en modélisation écotoxicologique. Les différents processus intervenant dans ces deux compartiments au cours du temps y sont sommairement détaillés.

2. Un modèle de budget énergétique : la théorie DEB

La théorie du Budget d'Énergie Dynamique (DEB) a été développée par S.A.L.M. Kooijman au cours des trois dernières décennies (Kooijman, 1986, 2000, 2010). Cette théorie a pour objectif de relier les processus métaboliques d'un organisme au sein d'un même cadre conceptuel. Cette approche décrit quantitativement et simplement, les grandes fonctions biologiques des organismes, telles que la croissance et la reproduction, à l'aide de modèles mathématiques mécanistiques. La représentation schématique de la théorie DEB est présentée Figure 22.

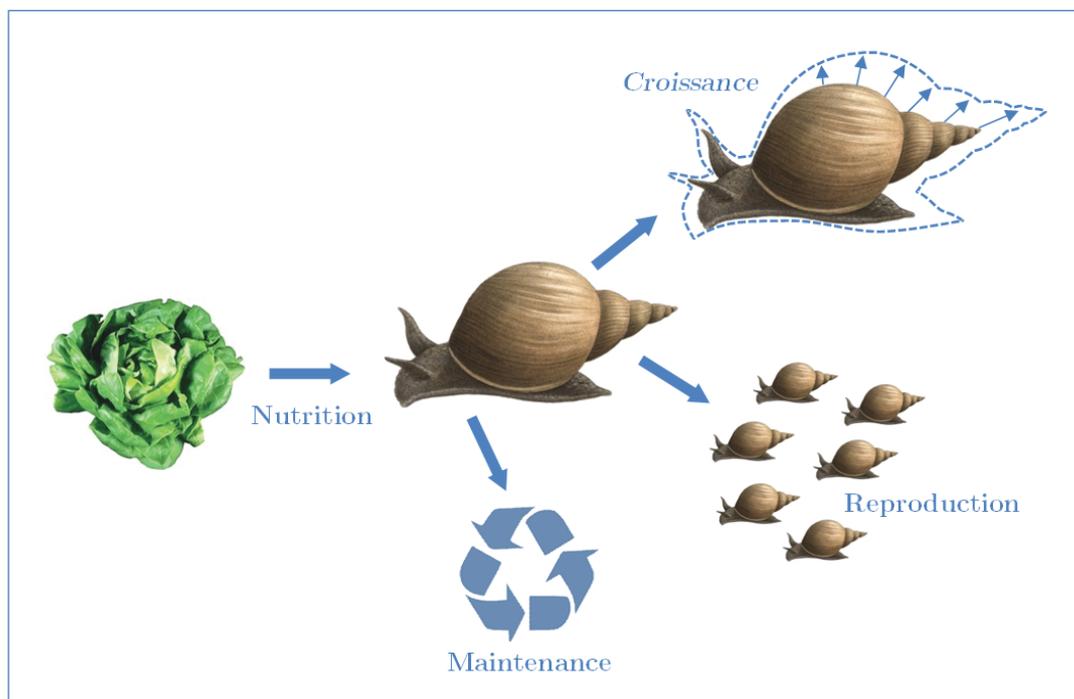


Figure 22. Concept de la théorie de Budget d'Énergie Dynamique avec les principaux processus métaboliques (Kooijman, 2010).

Le modèle DEB décrit les flux d'énergie au sein de l'organisme (Figure 23) et permet de déterminer comment l'énergie acquise par la nourriture est utilisée pour les processus biologiques majeurs de maintenance, croissance, maturation et reproduction de l'organisme (Kooijman, 2010). Le modèle suppose que l'énergie issue de la nourriture est assimilée à travers la surface du tube digestif avec un taux proportionnel à la surface de l'organisme. L'énergie assimilée est immédiatement stockée dans un compartiment de réserves. L'énergie mobilisée dans les réserves est redistribuée pour assurer les grandes fonctions biologiques de l'organisme via deux flux continus reposant sur la loi dite « loi κ (*kappa*) ». Ainsi, une fraction κ de l'énergie est allouée à la maintenance somatique et à la croissance. L'autre fraction $(1 - \kappa)$, est allouée à la maturation et à la reproduction (Figure 23). Lorsque la nourriture est constante, la fraction κ est constante et caractéristique du stade de vie de l'individu.

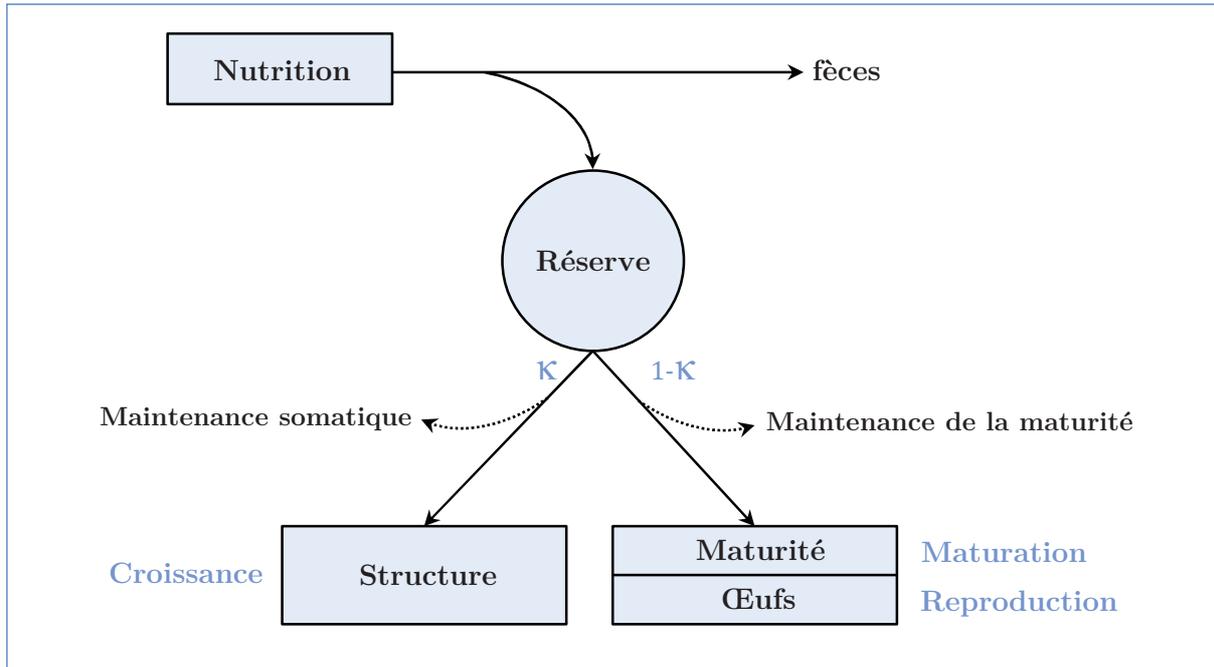


Figure 23. Organisation conceptuelle des flux d'énergie dans un modèle DEB standard (Kooijman, 2010).

Dans cette théorie, le cycle de vie est divisé en trois stades, on distinguera : (i) le stade embryonnaire où les individus ne se nourrissent pas et vivent grâce à leurs réserves (œufs) (ii) le stade juvénile où la nutrition débute mais la puberté n'est pas encore atteinte, et (iii) le stade adulte dans lequel les individus ont atteint la puberté et se reproduisent.

Le modèle DEB fournit des prédictions de croissance et de reproduction (Figure 24). A partir d'une longueur à la naissance (L_b), la taille des organismes augmente au cours du temps. La croissance de l'organisme induit une augmentation de l'assimilation qui est proportionnelle à la surface de l'organisme. La croissance de l'organisme augmente la taille de la structure et conduit à une augmentation de la maintenance somatique. La maintenance somatique est proportionnelle au volume de la structure et recouvre tous les processus biologiques ayant besoin d'énergie pour assurer le maintien de l'intégrité de la structure de l'organisme. L'organisme grandit jusqu'à ce qu'il atteigne sa taille maximale (L_m). Une fois cette taille atteinte, la totalité de la fraction κ est dévolue à la maintenance somatique. La croissance ne peut alors plus se poursuivre, faute d'énergie disponible. La reproduction, quant à elle, se produit lorsque les individus ont investi assez d'énergie de la fraction $1-\kappa$ dans la maturité (qui inclut, entre autres, la formation des gonades). Les organismes atteignent la puberté, leur permettant de se reproduire. Celle-ci intervient à une taille précise, il s'agit de la taille à la puberté (L_p).

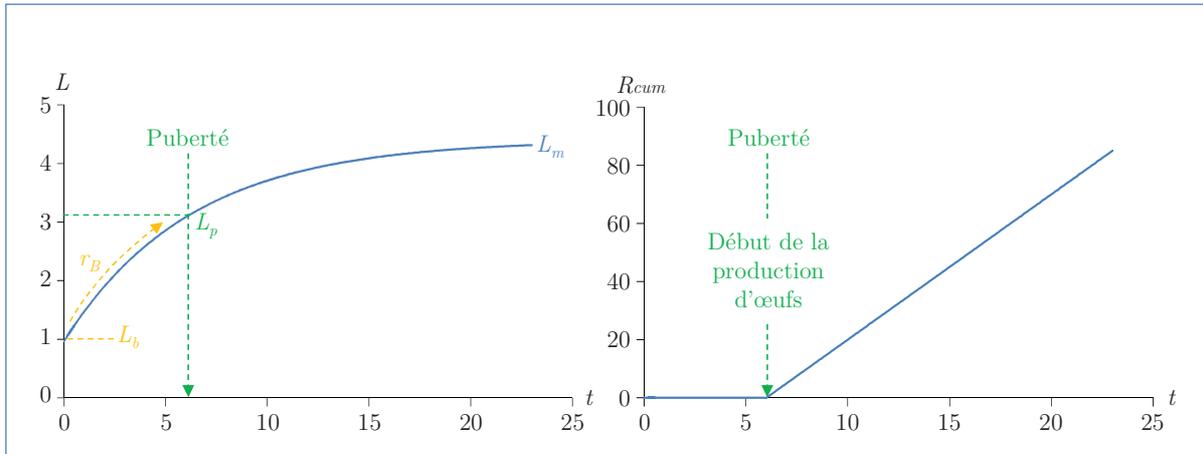


Figure 24. Courbes de croissance et de reproduction théoriques en conditions optimales. Avec, L : Taille ; L_b : Taille à la naissance ; L_p : Taille à la puberté ; L_m : Taille maximale, r_B : Taux de croissance de von Bertalanffy ; R_{cum} : Reproduction cumulée en nombre de descendants.

3. Application de la théorie DEB en écotoxicologie : le modèle DEBtox

La théorie DEB appliquée à l'étude des données toxicologiques et écotoxicologiques (DEBtox) a été proposée pour la première fois par Kooijman et Bedaux (1996). Depuis, ce modèle TKTD a été corrigé par Billoir *et al.* (2008) et récemment remanié par Jager et Zimmer (2012). Le modèle DEBtox permet généralement une description robuste des effets au cours du temps et fait partie des modèles les plus utiles pour appréhender les effets des substances toxiques sur les organismes (Ashauer *et al.*, 2006; Péry, 2006).

3.1. Concept

Les modèles DEBtox (Dynamic Energy Budget applied to toxicology) permettent de faire le lien entre les perturbations métaboliques causées par un toxique (TK) et leurs conséquences sur la croissance, la reproduction et la survie des organismes (TD). Ce modèle TKTD couple ainsi la cinétique d'internalisation du toxique et la dynamique des effets au cours du temps.

3.2. Toxicocinétique (TK)

Contrairement aux approches classiques (Eq. (4.1)), le modèle TK utilisée dans le DEBtox prend en charge le phénomène de dilution de la concentration interne liée à la croissance de l'individu au cours du temps (Kooijman et Bedaux, 1996). Ainsi, l'internalisation et l'élimination du composé toxique sont proportionnelles à la surface de l'organisme et, respectivement à la concentration externe et interne, selon :

$$\frac{dC_i}{dt} = C_e \frac{k_a}{l} - C_i \left(\frac{k_e}{l} + \frac{d}{dt} \ln l^3 \right) \quad (4.4)$$

où C_i la concentration interne du toxique, C_e la concentration externe du toxique, k_a et k_e les taux respectifs d'accumulation d'élimination du toxique et $\frac{d}{dt} \ln l^3$ correspondant à la dilution par la croissance, avec l la taille normalisée par la taille maximale de l'organisme selon : $l = \frac{L}{L_m}$.

Dans la plupart des cas, la concentration interne du toxique est inconnue (*e.g.* pas de mesure expérimentale). Pour simplifier l'équation, la concentration interne du toxique C_i , est normalisée par le facteur de bioconcentration (BCF), correspondant au ratio entre la concentration interne maximale et la concentration externe. La cinétique est ainsi représentée par l'équation suivante :

$$\frac{dC_i^*}{dt} = C_e \frac{k_e}{l} - C_i^* \left(\frac{k_e}{l} + \frac{d}{dt} \ln l^3 \right) \quad (4.5)$$

où C_i^* est la concentration interne normalisée par le BCF selon : $C_i^* = \frac{k_e}{k_a} C_i$.

Ce modèle TK, où la concentration interne est normalisée par le facteur de bioconcentration, permet d'estimer le paramètre k_e (taux d'élimination) sans aucune mesure de bioaccumulation de la substance au préalable. Cette estimation est acquise seulement grâce aux données expérimentales de croissance et de reproduction. Il a l'avantage d'être le plus simple des modèles TK disponibles et permet, avec très peu de paramètres, de décrire les tendances générales d'internalisation et d'élimination du composé toxique dans l'organisme (Ashauer *et al.*, 2006). Une version plus complexe de ce modèle peut également être utilisée mais nécessite l'acquisition de données expérimentales sur la cinétique d'internalisation de la substance (Ashauer *et al.*, 2007).

3.3. Toxicodynamique (TD)

Une fois la substance toxique internalisée dans l'organisme (TK), les processus toxicodynamique (TD) du DEBtox supposent que les effets apparaissent à l'échelle de l'organisme lorsque la concentration interne en toxique dépasse un seuil appelé la NEC pour « *No Effect Concentration* » (Concentration sans effet). Au-delà de la NEC (Figure 25), les effets sont supposés être proportionnels à l'excès de contaminants. Ainsi le niveau de stress dans l'organisme est défini par :

$$\begin{cases} \sigma(C_i^*) = 0 & \text{si } C_i^* < NEC \\ \sigma(C_i^*) = b \times (C_i^* - NEC) & \text{si } C_i^* > NEC \end{cases} \quad (4.6)$$

$$\begin{cases} \sigma(C_i^*) = b \times (C_i^* - NEC) & \text{si } C_i^* > NEC \end{cases} \quad (4.7)$$

avec σ l'intensité du stress qui est fonction de la concentration interne normalisée C_i^* (Eq. 4.5), b est la pente d'intensité de stress et NEC est la concentration sans effet.

La NEC est un paramètre commun aux différentes mesures de croissance et de reproduction, et a l'avantage d'être indépendante du temps d'exposition, contrairement aux paramètres de NOEC et EC_x qui dépendent des conditions expérimentales (critère d'effet mesuré, durée d'exposition *etc.*) (Billoir *et al.*, 2008a).

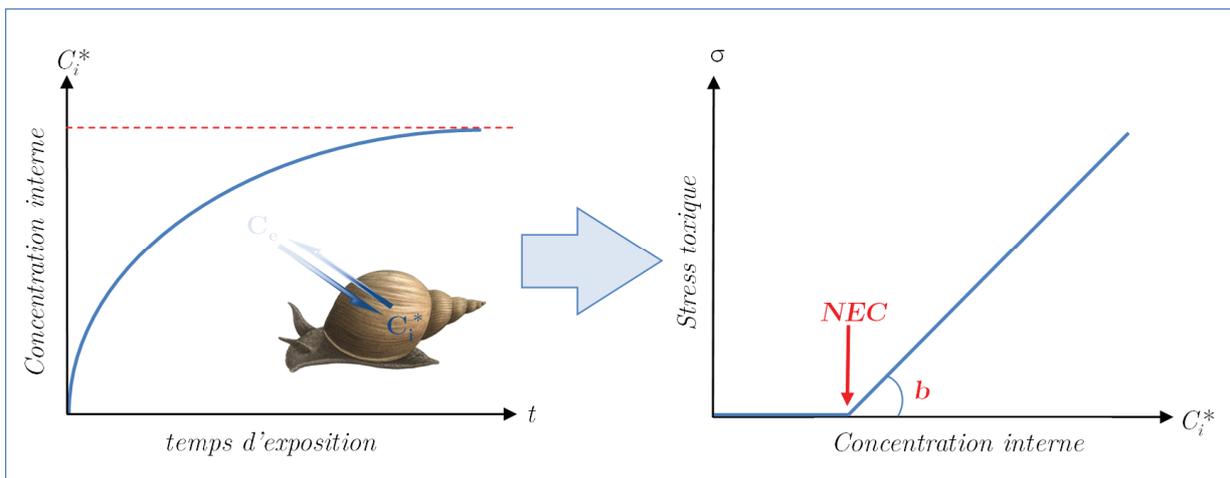


Figure 25. Concepts Toxicocinétique et Toxicodynamique d'un modèle DEBtox simplifié : comment un contaminant est internalisé au cours du temps dans un organisme (à gauche) et comment cette internalisation induit un stress toxique dans l'organisme (à droite). Avec C_i^* : la concentration interne normalisée, σ : le stress toxique, b : la pente d'intensité de stress et NEC : la concentration sans effet du toxique.

Cinq modes d'action sont proposés pour interpréter les effets d'un toxique (Kooijman et Bedaux, 1996). Trois affectent à la fois la croissance et la reproduction, deux affectent uniquement la reproduction (Figure 26). Pour les trois modes d'action affectant indirectement la croissance et la reproduction, le toxique induit soit : (i) une réduction de l'assimilation (*Modèle Assimilation*), (ii) une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (*Modèle de Maintenance*) ou (iii) une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle de Croissance*). Concernant les deux modes d'action directs sur la reproduction, le toxique induit soit : (i) une mortalité durant l'ovogenèse (*Modèle Hasard*) ou (ii) une augmentation des coûts de production d'un œuf (*Modèle de Coûts*).

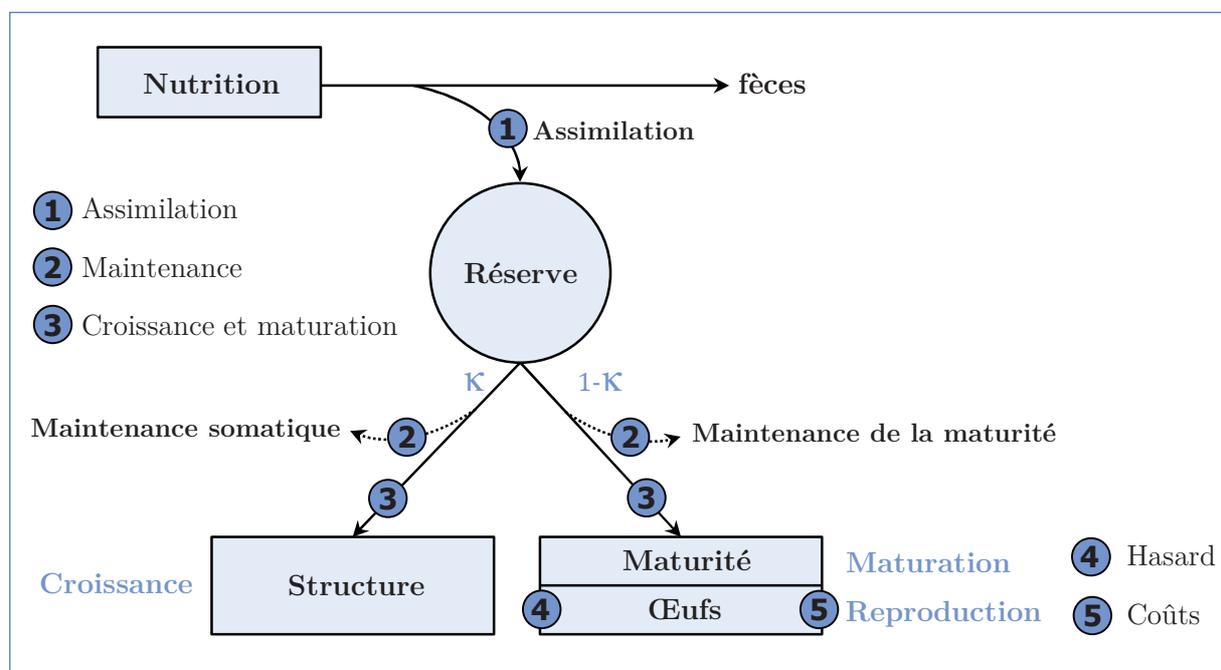


Figure 26. Organisation conceptuelle des flux d'énergie dans un modèle DEB standard (Kooijman, 2010) et modes d'actions métabolique du modèle DEBtox simplifié (Jager et Zimmer, 2012). Modes d'action (1) : réduction de l'assimilation, (2) : augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité, (3) : augmentation des coûts de croissance et de maturation ; (4) : mortalité pendant l'ovogenèse et (5) : augmentation des coûts de production d'un œuf.

Les équations associées à ces modes d'action métaboliques sont les suivantes (d'après Billoir *et al.*, 2008a):

A partir de $l(0) = b$ et $R(0) = 0$ et avec $R(l) = 0$ si $l < l_p$

Modèle Assimilation :

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f(1-\sigma(C_i^*)) + g} (f(1-\sigma(C_i^*)) - l) \quad (4.8)$$

$$R(l) = \frac{R_m}{1-l_p^3} \left[f(1-\sigma(C_i^*)) l^2 \left(\frac{g+l}{g+f(1-\sigma(C_i^*))} \right) - l_p^3 \right] \quad (4.9)$$

Modèle Maintenance :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l(1 + \sigma(C_i^*))) \quad (4.10)$$

$$R(l) = \frac{R_m}{1-l_p^3} (1 + \sigma(C_i^*)) \left[fl^2 \left(\frac{g(1 + \sigma(C_i^*))^{-1} + l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] \quad (4.11)$$

Modèle Croissance :

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f+g(1+\sigma(C_i^*))} (f-l) \quad (4.12)$$

$$R(l) = \frac{R_m}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1+\sigma(C_i^*)) + l}{g(1+\sigma(C_i^*)) + f} \right) - l_p^3 \right] \quad (4.13)$$

Modèle Hasard :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (4.14)$$

$$R(l) = \frac{R_m}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma(C_i^*)} \quad (4.15)$$

Modèle de Coûts :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (4.16)$$

$$R(l) = \frac{R_m}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma(C_i^*))^{-1} \quad (4.17)$$

Les différents paramètres du modèle DEBtox utilisés sont présentés dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3. Paramètres d'un modèle DEBtox simplifié avec leurs symboles, leurs interprétations et leurs unités (# pour les nombres, l pour la taille de l'organisme, L pour l'étendue du paramètre, t pour le temps et [-] pour un paramètre sans dimension).

Symbole	Unité	Interprétation
f	[-]	Réponse nutritive fonctionnelle
g	[-]	Ratio de l'investissement de l'énergie
L_m	l	Taille maximale
L_b	l	Taille à la naissance
L_p	l	Taille à la puberté
l	l	Taille normalisée par la taille maximale
l_b	l	Taille à la naissance normalisée par la taille maximale
l_p	l	Taille à la puberté normalisée par la taille maximale
r_B	t^{-1}	Taux de croissance de von Bertalanfy
R	$\#.t^{-1}$	Taux de reproduction journalier
R_{cum}	$\#.t^{-1}$	Taux de reproduction maximum
C_e	$\#.L^{-3}$	Concentration externe
C_i	$\#.L^{-3}$	Concentration interne
C_i^*	$\#.L^{-3}$	Concentration interne normalisée par le facteur de bioconcentration
k_a	t^{-1}	Taux d'accumulation du toxique
k_e	t^{-1}	Taux d'élimination du toxique
σ	[-]	Fonction de stress
NEC	$\#.L^{-3}$	Concentration sans effet (No Effet Concentration)
b	$\#.L^{-3}$	Pente de la fonction de stress

Dans le but de synthétiser les différentes notions abordées au cours de cette partie, la Figure 27 proposée dans la section suivante résume schématiquement les différents processus toxicocinétiques (TK) et toxicodynamiques (TD) d'un modèle DEBtox simplifié.

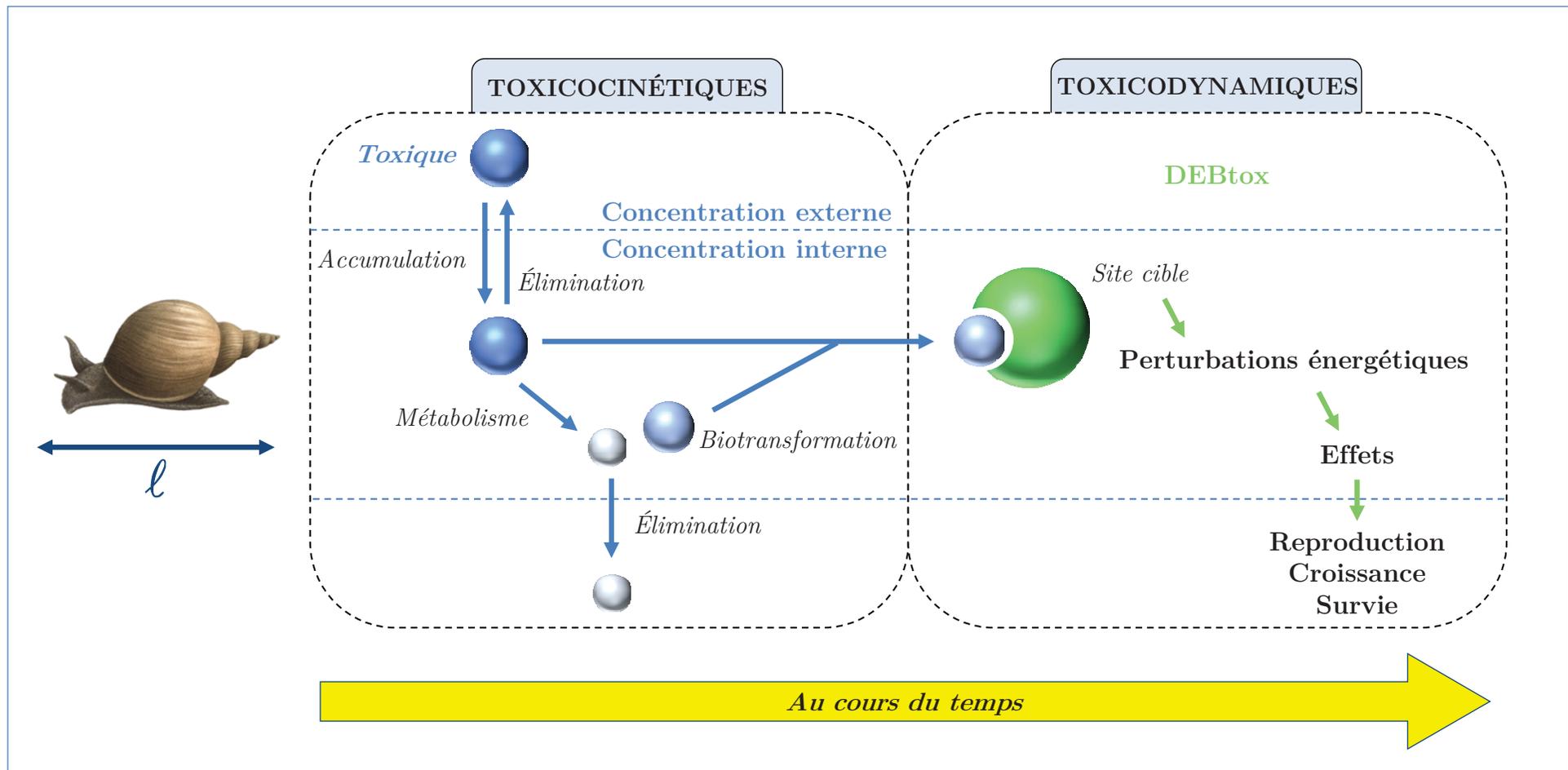


Figure 27. Représentation schématique des événements toxicocinétiques et toxicodynamiques d'un modèle DEBtox simplifié, menant à partir d'une exposition initiale à un toxique, à des effets finaux sur la reproduction, la croissance (et la survie) d'un organisme de taille « l ».

3.4. Application du modèle DEBtox

3.4.1. Exemples

De par leurs caractéristiques, les modèles DEBtox sont des outils particulièrement puissants pour analyser les effets d'un composé toxique sur les organismes. Ils permettent généralement d'avoir une représentation robuste des effets, tout en caractérisant le mode d'action métabolique responsable des effets observés à l'échelle de l'organisme. Ces modèles TKTD ont été utilisés avec succès pour analyser les effets dans différents scénarios d'exposition, en particulier dans le cadre d'exposition pulsées (Péry *et al.*, 2002; Ashauer *et al.*, 2007, 2010) ou encore de contaminants en mélange (Baas *et al.*, 2010; Jager *et al.*, 2010; Jager *et al.*, 2014), et peuvent également faciliter les comparaisons entre différentes substances (Baas et Kooijman, 2015), conditions environnementales (Heugens *et al.*, 2003; Pieters *et al.*, 2006) et espèces (Kretschmann *et al.*, 2012). Tout d'abord développé sur la daphnie, *D. magna* (Kooijman et Bedaux, 1996), le DEBtox a fait l'objet de plusieurs travaux sur cette espèce (Billoir *et al.*, 2008ab; Kretschmann *et al.*, 2011; Massarin *et al.*, 2011; Zaldívar et Baraibar, 2011; Biron *et al.*, 2012; Tan et Wang, 2012). Ce modèle est maintenant utilisé sur d'autres organismes incluant, des mollusques (Zimmer, 2013; Barsi *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2014), des micro-invertébrés (Swain *et al.*, 2010; Wren *et al.*, 2011; Klok *et al.*, 2012; Ardestani *et al.*, 2014; Galic *et al.*, 2014; Jager *et al.*, 2014; Klok *et al.*, 2014; Goussen *et al.*, 2015) et des poissons (Augustine, 2012; Klok *et al.*, 2014).

3.4.2. Application chez *Daphnia magna*

Les modèles DEBtox appliqués chez *Daphnia magna* ont été utilisés dans le cadre de contaminations diverses. Dans les travaux de Kooijman et Bedaux (1996), le modèle prédit que l'exposition au cadmium induit une mortalité pendant l'ovogenèse (*Modèle de Coûts*). Dans ces mêmes travaux, une exposition à deux produits chimiques, le 3,4-dichloroaniline et le phénol, induit chez les daphnies une réduction de l'assimilation (*Modèle d'Assimilation*), une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (*Modèle de Maintenance*) et une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle de Croissance*). Le modèle développé s'ajustait aussi bien au modèle d'assimilation, qu'aux modèles de la maintenance ou de la croissance. Les auteurs ne sont donc pas parvenus à déterminer un mode d'action spécifique pour ces contaminants. Pieters *et al.* (2006) ont développé un modèle DEBtox pour prédire les effets d'une exposition pulsée à un insecticide, le fenvalarate. Ils mettent en évidence que ce composé chimique induit une réduction de l'assimilation (*Modèle Assimilation*), ce qui expliquerait la réduction du taux de filtration et de la croissance chez les daphnies exposées.

Dans la même lignée, le modèle développée par Jager et Zimmer (2012) prédit qu'une exposition au fluoranthène induit un effet direct sur la reproduction des daphnies par l'intermédiaire d'une augmentation des coûts de production des œufs (*Modèle de Coûts*).

3.4.3. Application dans le cadre d'un contexte multigénérationnel

Dans le cas d'un contaminant chimique, l'intensité du stress sur le DEB est classiquement corrélée la fraction internalisée du polluant. Cependant, dans certaines situations, la fraction internalisée du composé chimique ne permet pas d'expliquer totalement l'intensité des effets observés au cours du temps. C'est le cas, par exemple, lorsque la concentration interne mesurée ne suit pas la même cinétique que les effets observés à l'échelle de l'organisme (Jager et Kooijman, 2009; Ashauer et Escher, 2010). Dans d'autres situations, l'intensité des effets peut tout aussi bien être corrélée à la concentration externe du composé chimique. C'est le cas notamment, lorsque les cinétiques d'internalisation du toxique sont très rapides ou lorsque le stress est causé par la simple présence du contaminant à la surface du corps de l'organisme (Massarin *et al.*, 2011).

Pour résoudre ces situations, l'alternative consiste à un introduire un compartiment supplémentaire : le compartiment de dommages (Figure 28).

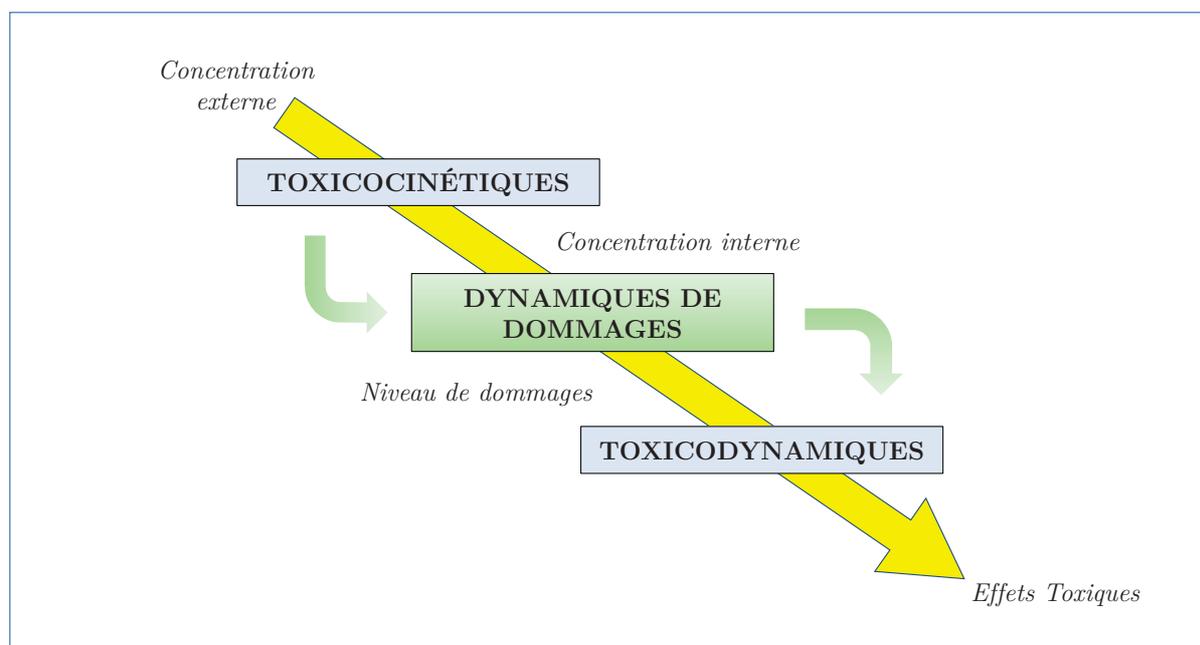


Figure 28. Insertion d'un compartiment de dommages supplémentaire dans le cadre d'une approche TK-TD classique. Le niveau de dommages est utilisé comme métrique de référence en alternative à la concentration interne ou externe du contaminant (Jager et Zimmer, 2013).

Le concept du compartiment de dommages a été défini par (Jager *et al.*, 2011) dans le cadre du modèle GUTS (*General Unified Threshold for Survival*). Selon Jager *et al.* (2011), le compartiment de dommages est une notion abstraite puisqu'elle ne peut généralement pas être mesurée directement. Le niveau de dommages « D » est alors une variable d'état qui permet d'intégrer l'ensemble des processus biochimiques (transformation, distribution *etc.*) et physiologiques (accumulation, altérations *etc.*) impliqués lors d'une exposition à un toxique. Le concept général de ce compartiment de dommages est défini par l'équation suivante :

$$\frac{dD}{dt} = k_d C_i - k_r D \quad (4.18)$$

avec D le niveau de dommages, C_i la concentration interne du composé toxique, k_d le taux d'accumulation et k_r le taux de réparation proportionnelle à l'actuel niveau de dommages D inconnu.

Ce compartiment de dommages fonctionne de la même façon que le compartiment Toxicocinétique (TK) des approches DEBtox utilisées dans le cadre des composés chimiques (Eq., (4.5)). Le niveau de dommages D est normalisé par son facteur de bioconcentration (BCF) avec : $D^* = \frac{k_r}{k_d} D$, donnant ainsi l'équation suivante (Jager *et al.*, 2011):

$$\frac{dD^*}{dt} = k_r (C_e - D^*) \quad (4.19)$$

avec D^* le niveau de dommages normalisé proportionnel au niveau réel de dommages et ayant la même unité que la concentration externe, k_r correspond au taux de réparation des dommages (temps⁻¹).

Ces modèles de dynamiques de dommages sont particulièrement adaptés aux situations d'exposition multigénérationnelles où l'intensité des effets peut varier au fil des générations sans pour autant être corrélée aux concentrations interne ou externe du contaminant. Ceci est très bien illustré chez la daphnie, *D. magna*, exposée pendant trois générations successives à l'U appauvri (Massarin *et al.*, 2011; Plaire, 2013).

Les travaux de (Massarin *et al.*, 2010) ont démontré que l'U appauvri affectait principalement l'assimilation des daphnies avec en parallèle une augmentation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction au fil des générations. Même si les analyses DEBtox menées dans le cadre de cette étude ont confirmé qu'une réduction de l'assimilation pouvait expliquer les effets observés sur la croissance et la reproduction (Massarin *et al.*, 2011), ce mode d'action métabolique ne permet pas d'expliquer à lui seul l'aggravation des effets au fil des générations (Figure 29). En effet, les concentrations d'U appauvri internalisées dans les daphnies sont identiques entre les générations et l'aggravation ne peut être décrite que par des paramètres toxicodynamiques spécifiques de chaque génération. Ainsi, pour une même concentration internalisée, le stress sur l'assimilation peut augmenter d'une génération à l'autre (Figure 29A).

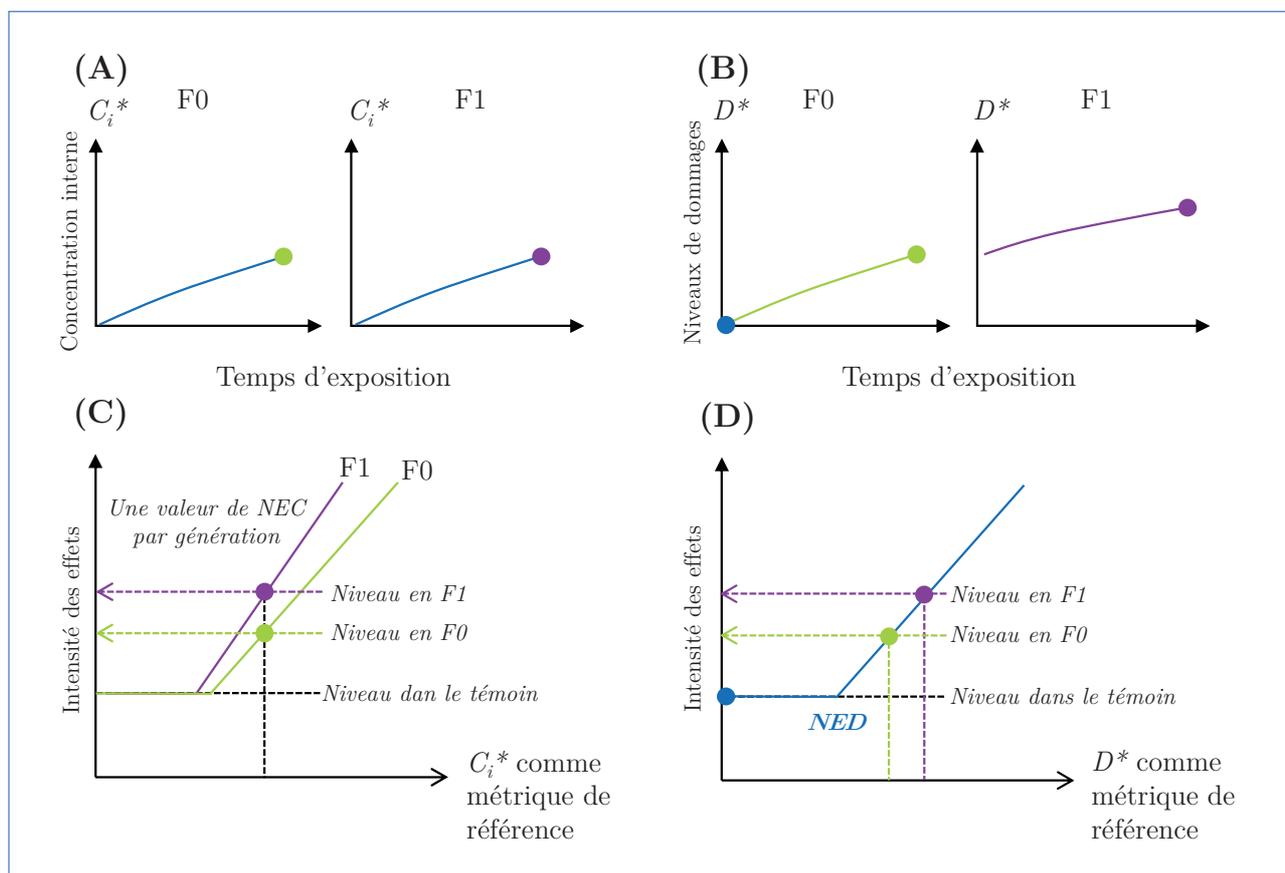


Figure 29. Représentation des effets de l'uranium appauvri (U appauvri) au cours de deux générations (F0 et F1), avec A) Une internalisation similaire de l'U appauvri dans les générations F0 et F1, nécessitant C) des valeurs de NEC (*No Effect Concentration*) distinctes entre les générations F0 et F1 pour décrire (sans expliquer) les effets observés au fil des générations (Massarin *et al.*, 2011) et B) une accumulation transgénérationnelle de dommages, donnant D) une valeur unique de NED (*No Effect Damage*) dans les générations F0 et F1 pour expliquer l'aggravation des effets au fil des générations (Alonzo *et al.*, 2014).

L'augmentation de la sensibilité des organismes à l'U appauvri implique nécessairement qu'une variable d'état soit transmise d'une génération à l'autre. Pour tester cette hypothèse, [Plaire *et al.* \(2013\)](#) ont démontré expérimentalement que l'U appauvri induisait une aggravation des effets sur les traits d'histoire de vie de la daphnie en parallèle d'une accumulation des dommages à l'ADN transmise au fil des générations. Pour tenir en compte de cette observation, les auteurs ont alors développé un modèle DEBtox avec deux facteurs de stress, l'un corrélée à la concentration externe, l'autre à un niveau de dommage héritable, afin de mieux cerner les causes de l'aggravation des effets au fil des générations ([Figure 29B](#)) ([Alonzo *et al.*, 2014](#)). Les analyses DEBtox suggèrent que les effets observés au fil des générations impliquent à la fois une réduction de l'assimilation (*Modèle Assimilation*) et une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle Croissance*). Par conséquent, la réduction de l'assimilation (induit par l'internalisation de l'U appauvri) et l'augmentation des coûts de croissance et de maturation (induit par une accumulation de dommages héréditaires d'une génération à la suivante) permettent d'expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction des daphnies au fil des générations. À ce jour, il s'agit du seul modèle DEBtox, à deux facteurs de stress, qui ait été développé dans le cadre d'une exposition multigénérationnelle.

PARTIE B

ÉTUDE DES EFFETS DE L'IRRADIATION GAMMA
EXTERNE AU COURS DE TROIS GÉNÉRATIONS
SUCCESSIVES DE *DAPHNIA MAGNA* :
EXPÉRIMENTATION, RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie sont présentés les conditions de culture de l'élevage des daphnies, la mise en place de la démarche expérimentale d'irradiation et les différents tests et mesures réalisés qui nous ont permis de répondre à nos objectifs. Pour rappel, l'objectif général de cette approche est d'évaluer les effets d'une irradiation gamma externe à faibles débits de dose chez la daphnie au cours de trois générations successives. Plus précisément, les objectifs de cette démarche sont : (i) examiner si de faibles débits de dose d'irradiation induisent une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction au cours des générations, (ii) tester s'il existe une accumulation et une transmission d'altérations à l'ADN (des parents à la progéniture) au fil des générations et (iii) comparer les réponses radiotoxiques entre les échelles moléculaire et individuelle.

CHAPITRE 1

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Conditions d'élevage des daphnies au laboratoire

Les cultures de *Daphnia magna* (clone A, INERIS, Verneuil-en-Halatte, France) sont maintenues en reproduction parthénogénétique, conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE depuis de nombreuses années au laboratoire (OECD, 2008). Les daphnies sont élevées à une densité d'un organisme pour 50 mL de milieu de culture « M4 » à pH 8 (Annexe 1). Ce milieu de culture artificiel est renouvelé une fois par semaine par un milieu frais saturé en oxygène ($\sim 9 \text{ mg.L}^{-1}$). Les cultures sont maintenues dans des chambres thermostatées à une température de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) sous une intensité lumineuse de $20 \text{ }\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\sim 1500 \text{ lux}$) et une photopériode de 16/8 (16 heures de jour et 8 heures de nuit) (Figure 30A).

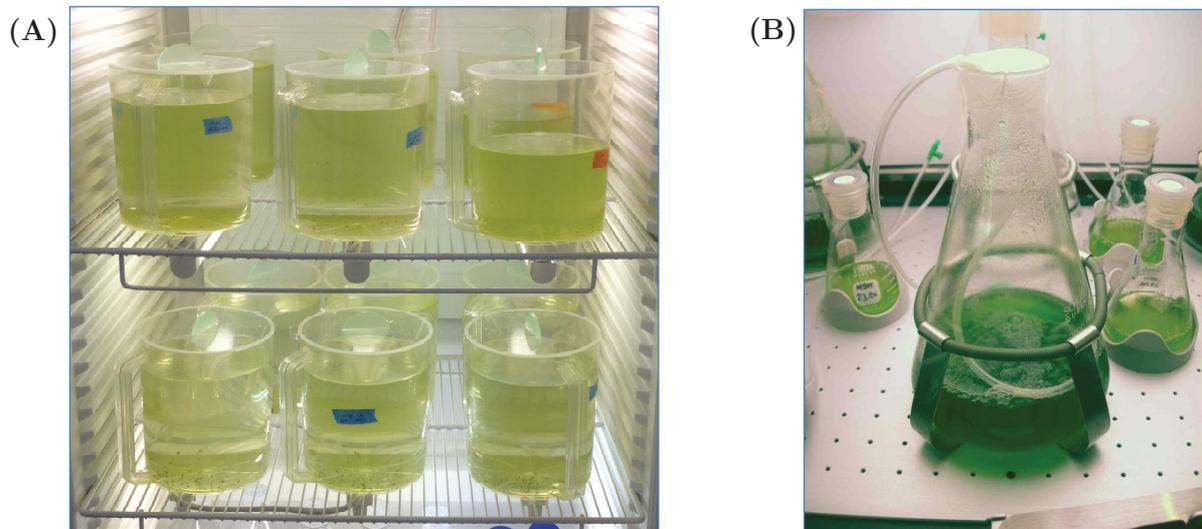


Figure 30. Photographie de l'élevage de daphnies (A) et des cultures d'algues (B).

Les daphnies sont triées tous les jours afin de garder une densité optimale d'individus dans les cultures. Ces tris sont effectués à l'aide d'un jeu de tamis de mailles différentes afin de séparer les néonates (maille de $180 \text{ }\mu\text{m}$) des adultes (maille de $1000 \text{ }\mu\text{m}$). Les néonates sont soit éliminés, soit utilisés pour lancer de nouveaux élevages.

Les daphnies sont nourries quotidiennement avec les algues vertes unicellulaires, *Chlamydomonas reinhardtii* (souche 11/32B, CCAP, Oban, UK) (Figure 30B). La ration journalière est de $100 \mu\text{g}$ de carbone.daphnie⁻¹. Les algues sont cultivées axéniquement dans 1 L de milieu HSM (High Salt Medium) (Annexe 2), collectées par centrifugation en phase exponentielle (8×10^4 cellules.mL⁻¹) et resuspendues dans du milieu de culture M4 à pH8. La concentration cellulaire d'algues est calculée en utilisant un compteur et analyseur de particules, Z2 Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

2. Adaptation du dispositif d'irradiation

2.1. Dispositif

L'irradiation gamma externe a été réalisée dans l'installation MIRE (*Mini Irradiator for Radio-Ecology*) à l'IRSN de Cadarache. MIRE est composée de cinq sources de Césium-137 (Cs-137) provenant du CERCA-LEA (Areva, Pierrelatte, France), incluant trois sources de Cs-137 liquides de 1,73 - 17,4 - 173 MBq et deux sources de Cs-137 solides de 1,54 GBq chacune. Chaque source est placée séparément dans une chambre thermostatique ventilée (Figure 31A), dans laquelle se trouve un plateau métallique central permettant d'accueillir des unités expérimentales. Un château de plomb amovible entoure chaque source afin d'atténuer le rayonnement gamma (Figure 31B). Lors d'une irradiation, celui-ci est relevé afin de découvrir la source radioactive. Les chambres sont séparées les unes des autres par un mur de plomb de 10 cm d'épaisseur afin d'éviter les irradiations croisées entre les conditions d'exposition (Figure 31A).

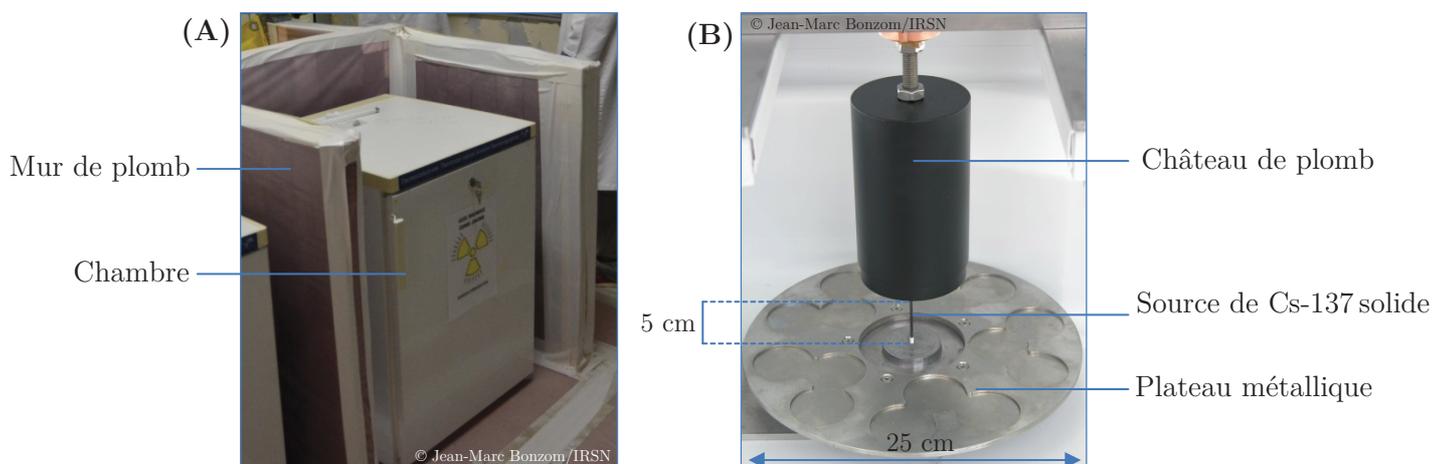


Figure 31. Dispositif d'irradiation de l'installation MIRE (IRSN). Photographie d'une chambre thermostatique ventilée avec son mur de plomb (A) et d'une source de Cs-137 solide ouverte avec son plateau métallique permettant d'accueillir les unités expérimentales (B).

En raison des contraintes spatiales à l'intérieur des mini-irradiateurs (Figure 31B), nous avons mis en place un design expérimental adapté à nos besoins. Ce design expérimental devait répondre à plusieurs critères. Ces critères sont les suivants : (i) avoir une gamme intéressante de débits de dose, (ii) diminuer au maximum la variabilité de la dose reçue par les organismes au sein de chaque unité expérimentale, (iii) avoir des unités expérimentales qui répondent aux lignes directrices de l'OCDE (OECD, 2008), c'est-à-dire, pouvant contenir au moins 50 mL de culture, (iv) avoir un nombre de réplicat suffisant pour réaliser toutes nos mesures avec une puissance statistique suffisante.

2.2. Étude dosimétrique

Lors de la mise en place de ce type d'étude, une première approche consiste avant le début de l'expérience à estimer les débits de dose (Gy/unité de temps) auxquels nous souhaitons exposer les organismes. Ces débits de dose sont ensuite vérifiés pendant l'expérience à l'aide de la dosimétrie.

Le débit de dose d'une source radioactive décroît avec le carré de la distance (Annexe 3). Cette décroissance varie également selon la nature des milieux traversés. Dans notre expérience, les particules radioactives vont venir interagir avec les unités expérimentales et le milieu de culture qu'elles contiennent. Par conséquent, nous avons réalisé une simulation numérique en utilisant le code MCNP (Monte Carlo N-Particle code) afin de prendre en compte l'atténuation des radiations ionisantes à l'intérieur des unités expérimentales (Brown, 2003). La simulation numérique a été réalisée par Nicolas Dubourg (Responsable technique, service GARM à l'IRSN). Trois phases sont prises en compte lors de la simulation du trajet des rayonnements: l'air, la paroi des unités expérimentales et le milieu de culture. Dans notre étude, nous avons supposé que les daphnies évoluaient de façon aléatoire dans le volume des unités expérimentales, sans différence de comportement entre les conditions d'exposition. Ainsi, nous avons considéré que le centre géométrique des unités expérimentales représentait la meilleure estimation possible de la position des daphnies pour le calcul du débit de dose reçu.

2.3. Conditions d'exposition

Vingt-quatre unités expérimentales ont été disposées en cercle autour de chaque source (Figure 32-33). Chaque unité expérimentale contient une daphnie dans 50 mL de milieu de culture M4-pH 8. Les milieux de culture sont renouvelés tous les jours avec un milieu frais pré-oxygéné ($\sim 9 \text{ mg.L}^{-1}$) avant l'ajout de la nourriture, aussi bien pour les daphnies exposées que non-exposées. Les températures de maintien des cultures, l'intensité lumineuse, la photopériode et la quantité de nourriture donnée par daphnie sont identiques à celles des cultures d'élevage (Cf. Partie 1). Les unités expérimentales spécialement fabriquées pour notre expérience ont été disposées de manière à former deux types de cercles bien distincts autour des sources : les cercles « externes » (x5) et les cercles « internes » (x2) (Figure 33). Les cercles externes ont été positionnés à une distance précise de 13 cm autour de toutes les sources (S4 – S3 – S2 – S1A et S1B), afin d'obtenir la plus petite variabilité de débits de dose possible au sein de chaque unité expérimentale. Les cercles internes ont été positionnés à une distance précise de 4,5 cm autour des deux plus fortes sources (S1A et S1B), afin de maximiser le débit de dose reçue par les organismes. La hauteur de chaque unité expérimentale couvre intégralement la hauteur des sources de césium (5 cm), permettant ainsi une exposition homogène sur tout le volume de l'unité.

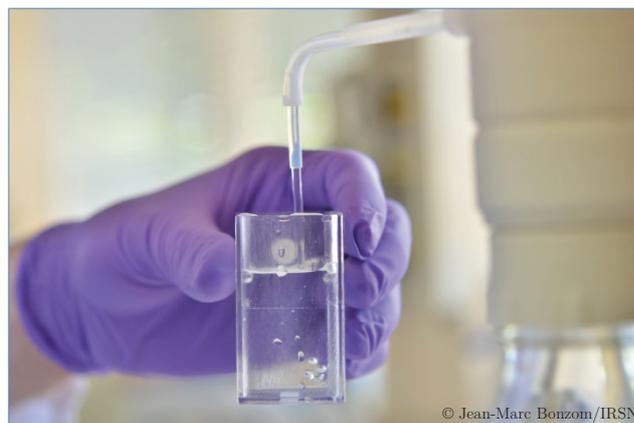
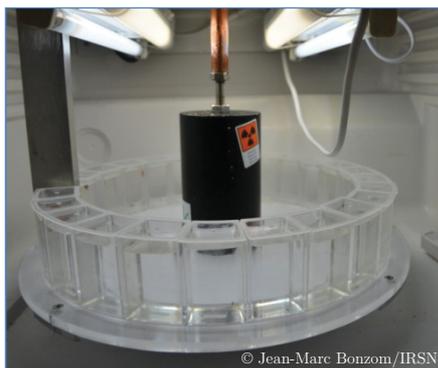


Figure 32. Présentation du type d'unité expérimentale utilisé durant l'expérience d'irradiation.

Trois sources de Cs-137 liquides
S4, S3 et S2



Deux sources de Cs-137 solides
S1A et S1B

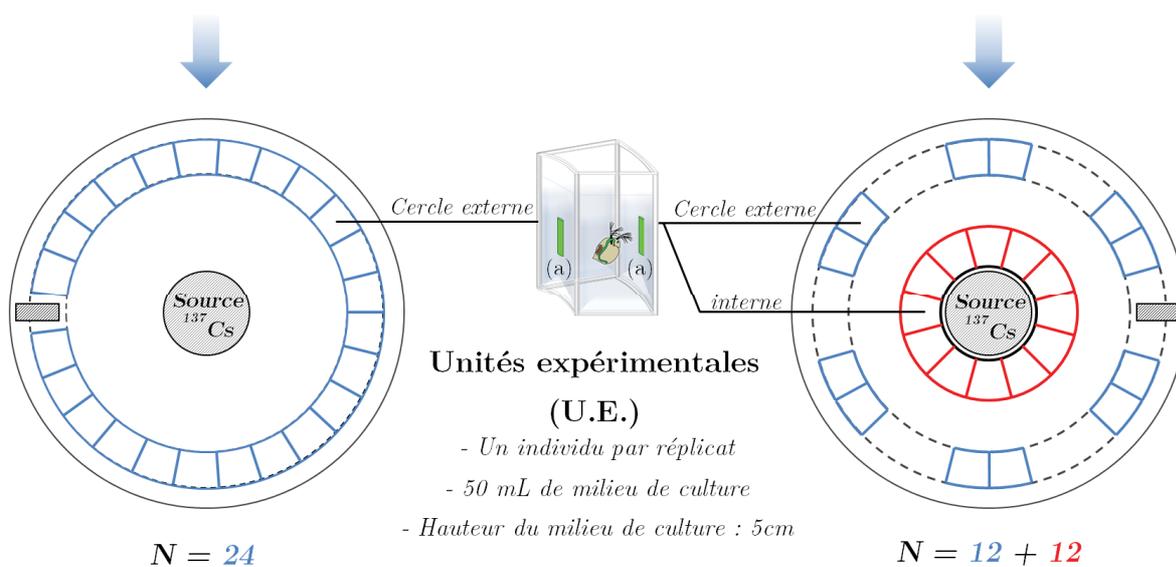
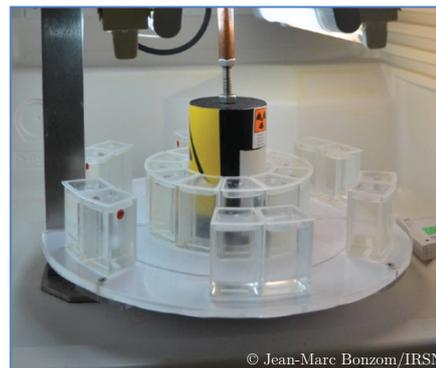


Figure 33. Dispositif expérimental utilisé durant l'expérience d'irradiation gamma externe. Vingt-quatre unités expérimentales (U.E.) ont été disposées le long d'un cercle externe autour des sources liquides S4, S3 et S2. Vingt-quatre (12 +12) unités expérimentales ont été disposées le long de deux cercles externes et internes autour des sources solides S1A et S1B. Des dosimètres Radio Photo Luminescent (a) ont été placés sur les faces avant et arrière des unités expérimentales afin de valider les débits de dose nominaux durant l'expérience.

Six conditions d'exposition ont été testées, incluant cinq valeurs nominales de débits de dose de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹ estimées à l'aide du code Monte Carlo N-Particle MCNP (Tableau 4), et une condition témoin non-exposée à l'irradiation. Ces valeurs nominales ont ensuite été confirmées pendant l'expérience à l'aide de dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL, type GD-301, Chiyoda Technol Corporation, Japon) placés sur les faces avant et arrière de trois unités expérimentales de chaque condition d'exposition (Figure 34 et Annexe 3). Les débits de dose mesurés représentent en moyenne 90 % des valeurs nominales (Tableau 4). Les daphnies non-exposées ont été maintenues dans les mêmes unités expérimentales que les daphnies exposées. La température et la luminosité de toutes les conditions ont été enregistrées toutes les demi-heures à l'aide d'un data logger placé dans chacune des chambres thermostatées (HOBO, Onset Computer, Pocasset, MA).

Tableau 4. Débits de dose délivrés aux daphnies au centre des unités expérimentales, estimés avec les calculs de Monte Carlo N-Particle (MCNP) et mesurés avec des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL), selon l'activité de la source en (Bq) et la position des unités expérimentales dans la chambre d'irradiation. Les valeurs représentent les moyennes \pm plage de variation calculée entre les parois proximales et distales des unités expérimentales. L'erreur relative est la différence (en %) entre les débits de dose nominaux et mesurés.

Source	Activité (Bq)	Position Cercle	Unités Experimentales	Débits de dose (mGy.h ⁻¹)		Erreur Relative (%)
				Nominaux (MCNP)	Mesurés (RPL)	
S1 (A and B)	1.54x10 ⁹	<i>Interne</i>	12A + 12B	35,4 \pm 21,2	31,9 \pm 18,7	8
S1 (A and B)	1.54x10 ⁹	<i>Externe</i>	12A + 12B	4,70 \pm 1,34	4,45 \pm 1,37	5
S2	1.73x10 ⁸	<i>Externe</i>	24	0,65 \pm 0,20	0,76 \pm 0,25	15
S3	1.74x10 ⁷	<i>Externe</i>	24	0,070 \pm 0,020	0,075 \pm 0,024	7
S4	1.73x10 ⁶	<i>Externe</i>	24	0,007 \pm 0,002	0,008 \pm 0,002	13



Figure 34. Dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL) utilisés lors de l'expérimentation.

3. Design experimental

3.1. Exposition multigénérationnelle

Avant le début de l'expérience, des daphnies ont été maintenues individuellement dans un volume de 50 mL de milieu de culture pendant une génération (~21 jours). Cette démarche a été réalisée afin d'assurer que les daphnies prochainement utilisées pour l'expérience multigénérationnelle auront reçu la même quantité de nourriture au cours de leurs vies, contrairement aux daphnies d'élevage où des phénomènes de compétition pour la nourriture peuvent s'installer. Cette démarche a également été effectuée dans le but d'avoir des daphnies totalement synchrones au début de l'expérience, c'est-à-dire, qui pondent leurs œufs aux mêmes moments.

Trois générations successives (F0, F1 et F2) de daphnies ont été continuellement exposées aux rayonnements gamma pour une durée totale d'environ 75 jours (Figure 35). L'exposition a été initiée avec des œufs issus de ponte 5 (dénommée « B5 » pour « Brood 5 » sur la figure), fraîchement déposés (< 24h) dans la poche incubatrice de daphnies femelles. Les œufs de la génération F0 étaient portés par des femelles préalablement non-exposées (génération P). L'exposition de la génération F0 a été prolongée au-delà de la libération des néonates fraîchement éclos (3 jours) jusqu'au dépôt de la ponte 5 (21-23 jours). Les générations suivantes F1 et F2 ont été exposées dans les mêmes conditions que leurs parents. L'exposition a pris fin en génération F2, à la libération des néonates de la ponte 5 (génération F3).

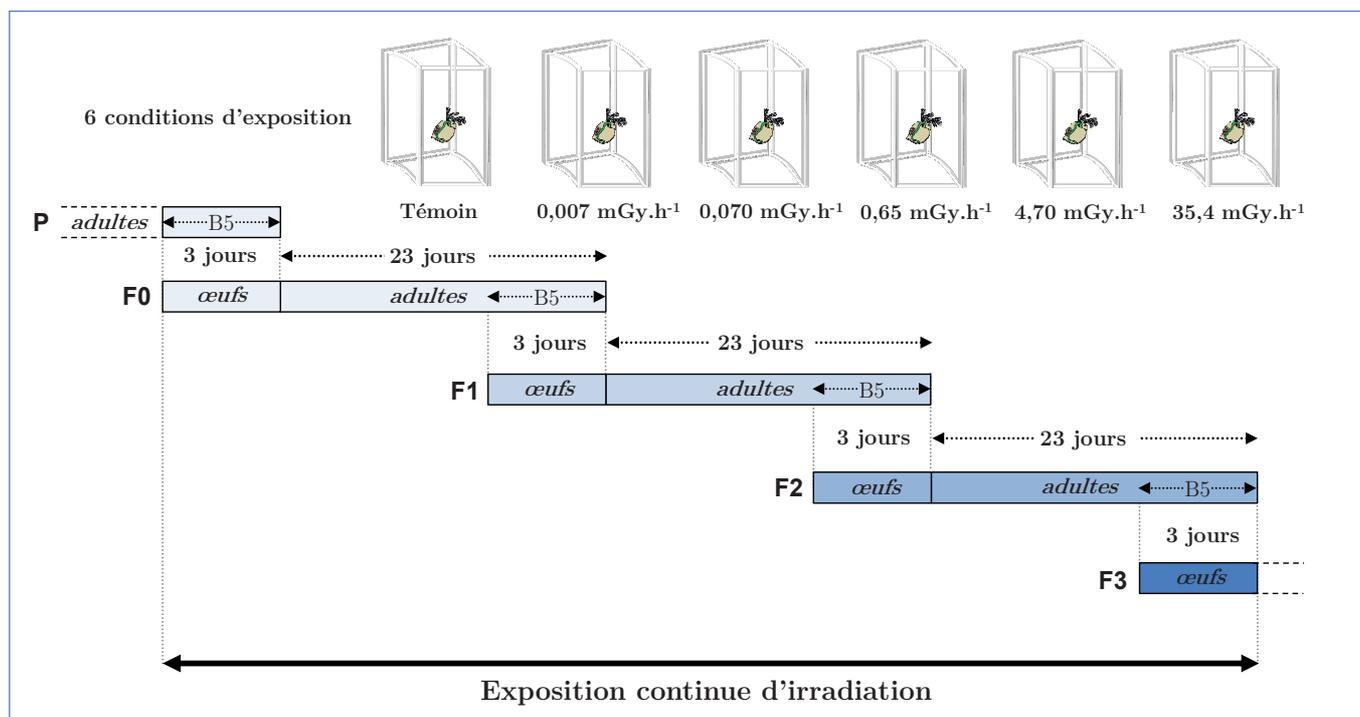


Figure 35. Design expérimental de l'irradiation gamma externe multigénérationnelle.

3.2. Suivis de la survie et de la reproduction

Les unités expérimentales ont été suivies quotidiennement pour suivre la survie, le dépôt des œufs dans la poche incubatrice des daphnies et la libération des néonates. Le jour de leur libération, tous les néonates sont comptés et éliminés. La proportion de daphnies survivantes, l'âge du dépôt des œufs et la taille des pontes ont été suivies dans dix unités expérimentales.

3.3. Mesure de la croissance somatique en taille et en masse

La taille et la masse des daphnies ont été mesurées chez les néonates fraîchement éclos et chez les adultes au moment du dépôt des pontes 1, 3 et 6. Quatre réplicats ont été utilisés au moment de la ponte 3 et cinq réplicats pour les autres points d'échantillonnages. La taille des daphnies a été mesurée, depuis le sommet de la capsule céphalique jusqu'à la base de l'épine caudale, sous une loupe binoculaire équipée d'une règle micrométrique ([Annexe 5](#)). Les œufs ont été délicatement retirés des poches incubatrices des femelles et comptés. Les néonates, les adultes et les œufs préalablement retirés des mères ont été rincés avec de l'eau ultrapure et transférés dans des microcoupelles d'aluminium pré-pesées. Les échantillons ont été séchés pendant 48 h dans une étuve à 60°C, refroidis dans un dessiccateur et immédiatement pesés à l'aide d'une ultra-microbalance (SE2 Sartorius, Gottingen, Germany) avec une précision de 0,1 µg. Chaque réplicat était composé de 5 néonates, d'une daphnie adulte ou de l'intégralité d'une ponte d'œufs.

3.4. Altérations de l'ADN

3.4.1. Choix d'un biomarqueur : la RAPD-PCR

Dans le but d'évaluer le potentiel génotoxique des radiations ionisantes chez les daphnies, il nous fallait sélectionner un biomarqueur adapté à nos contraintes, notamment concernant le nombre de réplicats. Notre choix s'est tourné vers la RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction*). Nous avons fait ce choix, d'une part, car cette méthode avait été utilisée avec succès au laboratoire sur *D. magna* pour caractériser les dommages ADN induits par l'U appauvri ([Plaire et al., 2013](#)) et d'autre part, car la RAPD-PCR est très peu consommatrice d'ADN (~ 20 ng) ([Atienzar et Jha, 2006](#)). Par conséquent, une expérience pilote a été menée avant l'expérience afin de déterminer quelle serait la quantité minimale d'individu par réplicat nous permettant d'avoir suffisamment d'ADN pour réaliser ce type d'analyse. Cette étude pilote a révélé qu'une daphnie adulte (âgée de 9 ou 21 jours) et que 20 - 25 néonates (issus de la ponte 1 ou 5) suffisaient pour effectuer une analyse avec la méthode de RAPD-PCR ([Annexe 4](#)).

La RAPD est une méthode fiable et reproductible qui a le potentiel de détecter une large gamme d'altérations et de mutations de l'ADN à tous les niveaux du génome. Le principal avantage de cette méthode réside en sa rapidité et son applicabilité sur n'importe quel organisme, sans besoin préalable d'informations sur le génome de l'espèce étudié.

Par le passé, la RAPD reposait essentiellement en l'analyse de gels d'électrophorèse sur agarose où l'on observait soit des disparitions, soit des apparitions (ou des modifications) d'intensité de bandes entre les individus exposés et non-exposés à un contaminant. La RAPD par électrophorèse a largement été utilisée pour étudier la génotoxicité de nombreux polluants chez diverses espèces aquatiques telles que le poisson *Gambusia affinis* (Theodorakis *et al.*, 1997) ou *Danio rerio* (Zhiyi et Haowen, 2004), le gastéropode *Littorina littorea* (De Wolf *et al.*, 2004), la macro-algue *Palmaria palmata* (Atienzar *et al.*, 2000) et le micro-crustacé *Daphnia magna* (Atienzar *et al.*, 1999). Cette technique a également fait l'objet de nombreuses critiques en raison de son manque de reproductibilité et de certains problèmes d'amplification parasitant l'interprétation des profils de gels d'électrophorèse (Atienzar et Jha, 2006).

Récemment, Cambier *et al.* (2010) ont amélioré la méthode afin d'obtenir une caractérisation fiable et reproductible des effets génotoxiques de faibles doses de cadmium chez le poisson zèbre, *Danio rerio*. L'approche quantitative mise en place par ces auteurs repose sur l'analyse des températures de fusion des produits de PCR, en substitution à l'analyse de gel d'agarose. La PCR est une technique de Réactions de Polymérisation en Chaîne qui permet d'acquérir une grande quantité d'un fragment précis de l'ADN sélectionné par le couple d'amorce. La PCR repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase, la *Taq Polymerase*, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* qui a la propriété de résister aux très hautes températures et de rester active pendant la réaction. La RAPD couplée à la PCR quantitative permet ainsi d'obtenir une meilleure efficacité d'hybridation de l'amorce sur l'ADN génomique et offre la possibilité de réaliser la comparaison des températures de fusion entre chaque réaction d'amplification. La RAPD-PCR est une méthode très sensible et permet ainsi de détecter de minuscules modifications génétiques induit par un contaminant (Cambier *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, la sensibilité et la précision de la RAPD-PCR, on fait de cette technique un outil adapté pour évaluer la génotoxicité des polluants chez de nombreuses espèces telles que le poisson zèbre *Danio rerio*, l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le mollusque marin *Ruditapes phillipparum*, le polychète marin, *Hediste diversicolor*, et la daphnie *Daphnia magna* (Cambier *et al.*, 2010; Orioux *et al.*, 2011; Geffroy *et al.*, 2012; Lerebours *et al.*, 2013; Mat *et al.*, 2013; Plaire, 2013; Dedeh *et al.*, 2014).

3.4.2. Extraction de l'ADN

Dans chaque génération (F0, F1 et F2) et chaque condition d'exposition, des échantillons d'ADN ont été collectés à l'éclosion (7-8 réplicats de 25 néonates) et à la libération des pontes 1 et 5 (5 réplicats d'une daphnie adulte). Les néonates de la F3 ont été collectés à l'éclosion. Pour finir, des échantillons de néonates ont également été collectés à la libération de la ponte 1 (7-8 réplicats de 25 néonates). Ces néonates seront dénommés ci-après F1', F2' et F3'.

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en conditions stériles en utilisant le DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Crawley, UK) selon le protocole « Spin-Column Protocol » du fournisseur agrémenté de modifications mineures (Figure 36).

Brièvement, les échantillons de néonates ou de daphnies adultes ont été ajoutés dans un tube à centrifuger Eppendorf® de 1,5 mL contenant 180 µL de tampon ATL et 20 µL de protéinase K. Les daphnies en solution ont été homogénéisées avec un micropilon, mixées avec un agitateur-mélangeur Vortex® et incubées à 56°C pendant toute la nuit. Une fois que les daphnies étaient complètement lysées, 200 µL de tampon AL et 200 µL d'éthanol (96%) ont été ajoutés dans les tubes. Ces tubes ont ensuite été mixés pendant 15 sec. Les mixtures ont été pipetées dans une colonne « DNeasy spin-column » et centrifugés à 8 000 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute (4°C). Les colonnes ont été séquentiellement lavées avec les tampons AW1 (500 µL) et AW2 (500 µL), puis centrifugées à 14 000 rpm pendant 3 minutes (4°C) afin de sécher la membrane des colonnes. L'ADN a été élué dans 75 µL de tampon AE, incubé pendant une minute à la température ambiante de la pièce, puis centrifugée à 8 000 rpm pendant 1 minute (4°C). La pureté de l'ADN a été déterminée en mesurant le rapport de l'absorbance à 260 et 280 nm ($A_{260}/280$) avec un Nanodrop® 2000 (Thermo, Scientific, DE, USA). Les échantillons ont été stockés à -20°C en attendant les analyses RAPD-PCR.

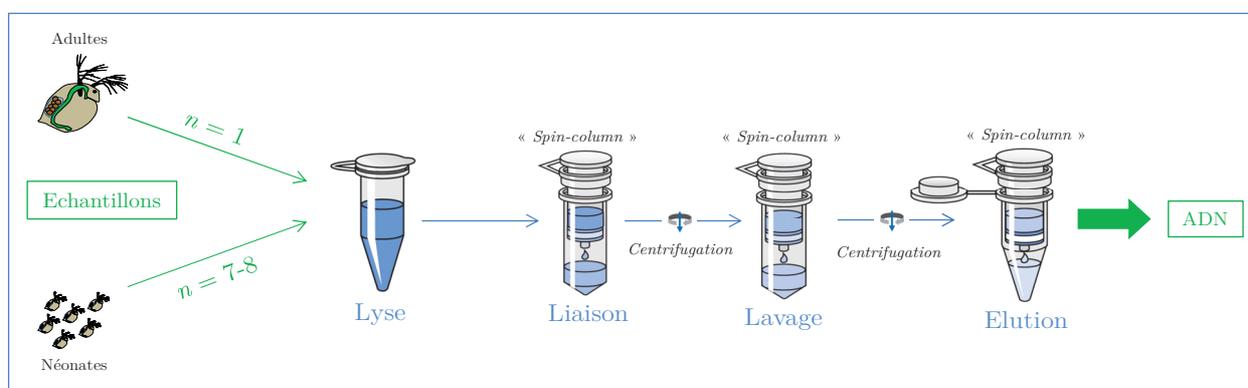


Figure 36. Synthèse de l'extraction d'ADN sur les échantillons de daphnies adultes et néonates avec une étape de lyse, de liaison sur la membrane des colonnes, de lavage et d'élution.

3.4.3. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe : la RAPD

Les réactions de RAPD ont été réalisées en utilisant les oligonucléotides décimères OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3') et OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3'). Ces amorces ont été sélectionnées d'après les travaux de Plaire (2013) et obtenues auprès de Sigma Proligo (Missouri, USA). Les réactions de RAPD-PCR en temps réel ont été réalisées avec un LightCycler (Roche, Meylan, France) en utilisant le kit de réactifs « LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I » (Roche, Meylan, France). Les réactions de PCR ont été préparées dans des capillaires avec un mélange réactif de 20 μL contenant : 2 μL d'ADN génomique dilué 20 fois, 2 μL d'amorce RAPD (6 μM) et 16 μL d'un mélange réactionnel de PCR (1 μL d'une solution contenant les dNTPs, la *Taq Polymerase* et le colorant fluorescent SYBR Green I ; 3,2 μL de MgCl_2 à 25 mM et 11,8 μL d'eau ultrapure). Les capillaires sont ensuite fermés et centrifugés à 2 000 rpm pendant 10 sec. Ces capillaires sont ensuite placés dans le thermocycleur (LightCycler, Roche, Meylan, France) afin de débiter la phase d'amplification de l'ADN par PCR.

L'ADN a été amplifié avec les paramètres de cycles thermiques suivants : (i) une étape de dénaturation pendant 10 minutes à 95°C permettant de séparer le double brin d'ADN en deux simples brins, (ii) 60 cycles d'amplifications de 40 secondes composés chacun de 3 phases différentes : la dénaturation (5 secondes à 95°C), l'hybridation des amorces (5 secondes à 50°C) et l'élongation (30 secondes à 72°C) pendant laquelle le brin d'ADN complémentaire est synthétisé par la *Taq Polymérase*. À la fin de la phase d'élongation, la température a été graduellement augmentée de 65°C à 95°C (par étapes de 0.05°C.s⁻¹) et des mesures en temps réel de fluorescence (colorant SYBRGreen I) ont été effectuées par le LightCycler. Cette étape permettra l'obtention de courbes d'amplification et de températures de fusion. Pour finir, une étape de refroidissement à 40°C a été accomplie. A la fin d'un cycle d'amplification, les deux simples brins d'ADN donnent alors deux doubles brins d'ADN identiques à l'ADN initial (Figure 32). Ces produits d'amplification constituent les produits de PCR.

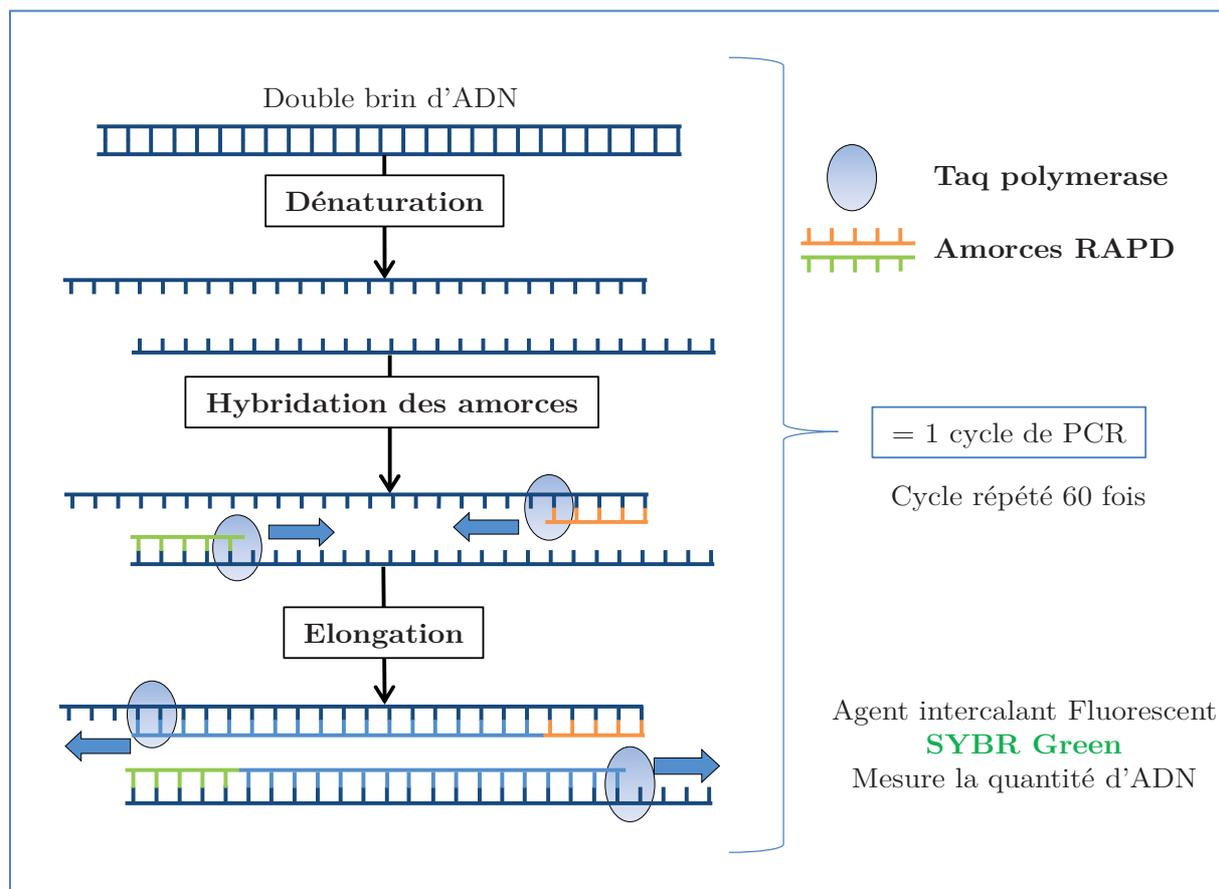


Figure 37. Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR) : illustration d'un cycle de PCR.

3.4.4. Analyses des produits de PCR

La quantité et la composition des produits de PCR dépend à la fois du nombre de sites d'hybridation des amorces et de leurs positions sur l'ADN génomique amplifié. Ainsi, des modifications, des créations ou des pertes de sites d'hybridation peuvent modifier la quantité et la composition des produits de PCR finaux. Si de telles variations sont détectées sur l'ADN de daphnies exposées à l'irradiation, cela signifie qu'il y a eu induction d'altérations de l'ADN. La détection des altérations de l'ADN est réalisée par des analyses combinées du nombre de sites d'hybridation et des courbes de températures de fusion.

Les analyses des courbes de température de fusion ont été réalisées en utilisant le logiciel LightCycler Software 3.5 (Roche, Meylan, France). Le logiciel nous a permis d'obtenir une distribution des températures de fusion (T_m) en dérivant le suivi de la fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$) (Figure 38). Chaque produit de PCR est caractérisé par une température de fusion (T_m). Ainsi, pour un échantillon d'ADN et une amorce donné, la température de fusion (T_m) de chaque produit de PCR a été obtenue et classée dans une table

logique couvrant 12 intervalles de températures différentes, allant de 71 à 92 °C. Les fréquences d'apparition des pics de température pour chaque intervalle ont été calculées et comparées entre les individus témoins et exposés. Une différence significative indique une modification de la composition nucléotidique de la séquence d'ADN, impliquant la perte ou la création d'un site d'hybridation pour une amorce donnée.

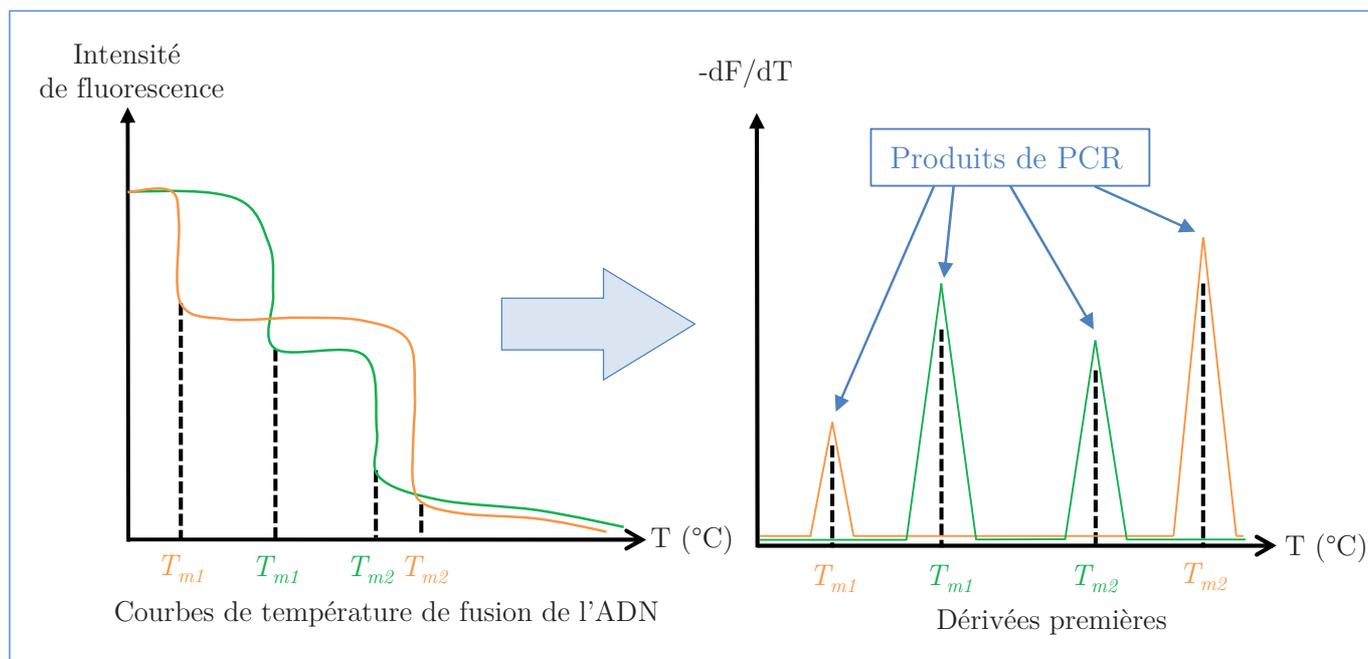


Figure 38. Courbes de températures de fusion théoriques de l'ADN. Les courbes et les pics de couleurs différentes correspondent à l'analyse de deux échantillons différents.

L'autre partie de l'analyse a consisté à calculer le nombre moyen de cycles thermiques nécessaire pour entrer en phase exponentielle de l'amplification, il s'agit des cycles seuils (C_t) (Figure 39).

La valeur d'un C_t a été calculée à l'aide de la courbe d'amplification de l'ADN en suivant l'intensité de la fluorescence du colorant SYBR Green. Cette intensité de fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN, a été mesurée au terme de chaque phase d'élongation. Dans le but de quantifier le nombre de sites d'hybridation d'une amorce RAPD par unité de génome, une PCR de référence supplémentaire a été effectuée avec chaque échantillon d'ADN en utilisant le gène de l'énolase (Eno) *Daphnia magna* (Numéro d'accès à GenBank : JN994253). Les régions amont et aval des amorces du gène émolase correspondent aux oligonucléotides, ENO3 (5'-CTCATCAGCACTGCCATCG-3') et ENO5 (5'-CAAGTAGGTAGCCGGGTCAG-3'), bordant les régions 5' et 3' du troisième exon du gène de l'énolase et, respectivement complémentaire des quatrième et second introns.

Le cycle seuil $C_{t_{\text{ENO}}}$, obtenu avec les amorces du gène de l'énolase entraîne huit événements d'hybridation par unité de génome, indiquant ainsi la présence de deux isoformes de ce gène (deux amorces sur 2×2 *loci* de l'énolase). Par conséquent, le nombre de sites d'hybridation par unité de génome d'une amorce RAPD, a été calculé de la manière suivante :

$$2^{(\Delta+3)} \text{ avec } \Delta = C_{t_{\text{ENO}}} - C_{t_{\text{amorce RAPD}}} \quad (1.4)$$

où $C_{t_{\text{amorce RAPD}}}$ est la valeur de cycle seuil obtenue soit avec l'amorce OPA9, soit avec l'amorce OPB10. Lorsque $\Delta = 0$, l'amorce RAPD permet d'amplifier la même quantité d'ADN que l'amorce de référence de l'énolase. Par conséquent, elles présentent toutes les deux le même nombre de sites d'hybridation par unité de génome, c'est-à-dire 8 sites d'hybridation : $2^{(0+3)} = 8$.

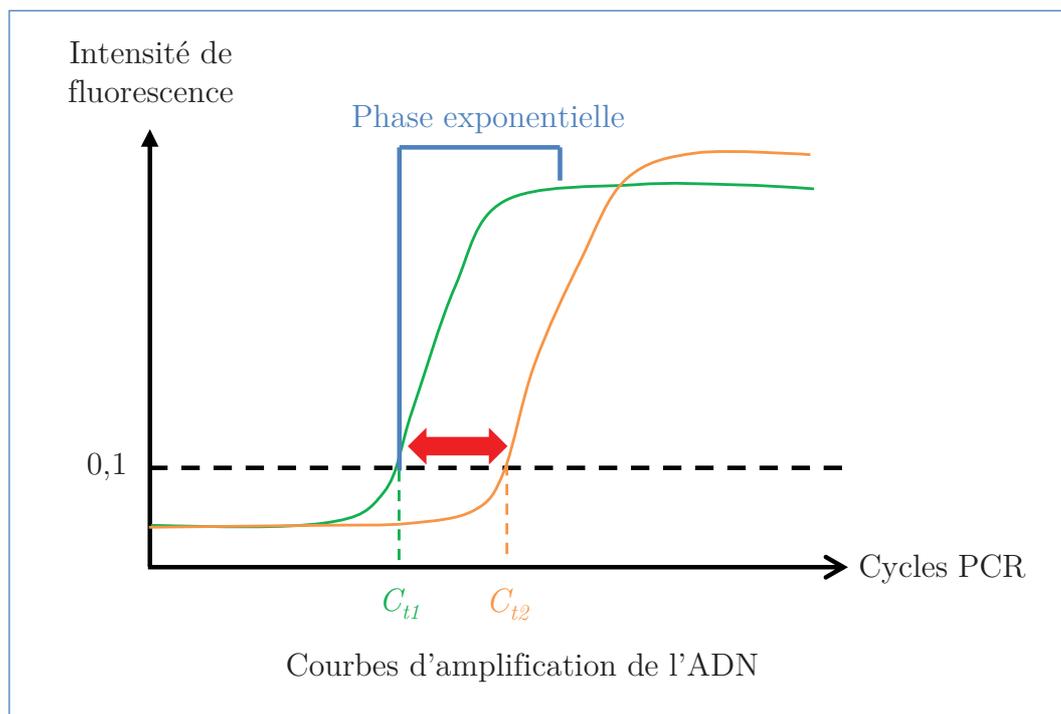


Figure 39. Courbes d'amplification théoriques de l'ADN représentant l'amplification de deux échantillons d'ADN différents dont les deux courbes dépassent le bruit de fond (courbe en pointillé noir) de l'intensité de fluorescence.

3.5. Ajustements et analyses statistiques

Les analyses statistiques et les ajustements des modèles ont été réalisés à l'aide du logiciel statistique R (R Development Core Team, 2014). La normalité des résidus a été vérifiée à l'aide de graphiques de normalité résiduelles « qq-plots » et avec des tests de Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité des résidus a été vérifiée en utilisant les tests de Bartlett et Levene. La significativité statistique a été basée sur un risque alpha de 0,05.

Les effets de l'irradiation gamma sur la taille et la masse des daphnies ont été testés après avoir pris en considération l'influence du temps et/ou de la taille, en utilisant des équations en accord avec la théorie DEB de Kooijman (2010) et l'étude de Massarin *et al.* (2010) (Tableau 5). Les modèles linéaire et non-linéaire ont été ajustés à l'aide des routines *lm* et *glm* en suivant le critère des moindres carrés. Les courbes ajustées ont été comparées entre les conditions d'exposition et le témoin en appliquant la procédure séquentielle de Holm (Holm, 1979). Les différences de fécondité entre les daphnies exposées et non-exposées ont été testées indépendamment pour chaque ponte en utilisant une ANOVA à un facteur contrôlé, suivie par des tests de comparaison multiple de Dunnett. Lorsque les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité ont été rejetées, la transformation optimale Box-Cox a été appliquée. Les différences d'âge au moment de la libération des pontes entre les daphnies exposées et non-exposées ont été analysées avec le test de Kruskal-Wallis.

Concernant les altérations de l'ADN, le nombre de sites d'hybridation a été comparé entre les différentes conditions d'exposition en appliquant le test-U de Mann-Whitney. Les différences de distribution de fréquence des températures de fusion ont été analysées en utilisant une table 2x2 de contingence, avec une significativité testé à l'aide de la méthode de simulation de Monte Carlo afin de pallier la petite taille de l'échantillonnage.

Tableau 5. Équations et paramètres de taille des daphnies associés aux changements de la masse sèche des adultes et des œufs en accord avec la théorie DEB (Kooijman, 2010).

Critères d'effets (unités)	Équations	Paramètres
Taille du corps (mm)	$L_t = L_m - (L_m - L_b) \cdot e^{(-r_B \cdot t)}$ (1.5)	L_m : Taille maximale (mm) L_b : Taille à la naissance (mm) r_B : taux de croissance von Bertalanffy (j^{-1})
Masse sèche du corps (μg)	$W_t = \delta \cdot L_t^3$ (1.6)	δ : Coefficient de forme ($\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$)
Masse sèche des œufs (μg)	$W_t = \beta \cdot L_t + \omega$ (1.7)	β : Pente de régression linéaire ($\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-1}$) ω : Intercetion de régression linéaire (μg)

CHAPITRE 2

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Survie

Aucune mortalité n'a été observée dans les conditions témoins au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) (Figure 40). Seuls les deux plus forts débits de dose ($4,70 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ et $35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) ont induit une diminution de la survie des daphnies au fil des générations, mais aucune différence statistique significative n'a été décelée par rapport aux individus témoins.

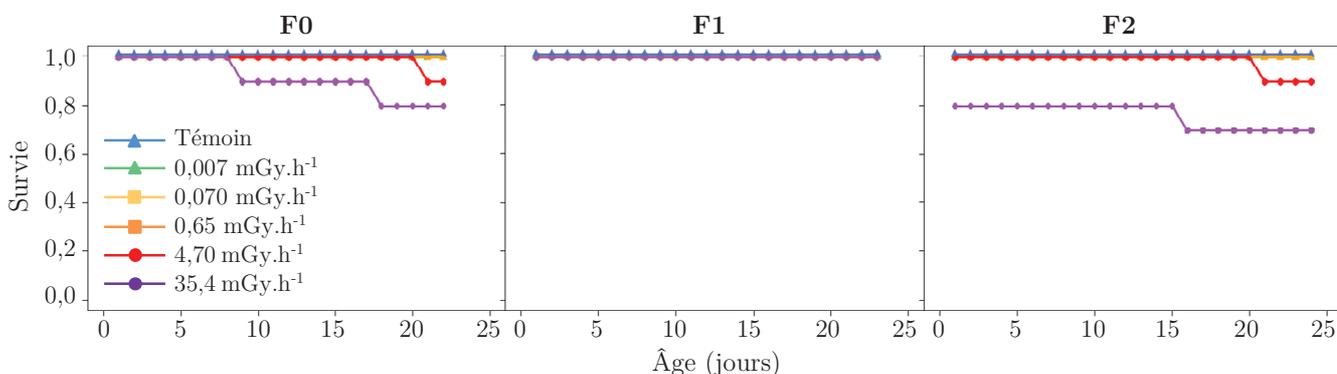


Figure 40. Proportion de daphnies survivantes ($n = 10$) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de $0,007$; $0,070$; $0,65$; $4,70$ et $35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$. Aucune différence statistique significative avec le témoin.

Dans la génération F0, les daphnies exposées à $4,70 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ d'irradiation ont présenté une mortalité de 10% après 23 jours d'exposition. Le même niveau d'effet (10%) a été enregistré dans la génération F2 à $4,70 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ après 23 jours d'exposition. Une tendance à une augmentation graduelle de la mortalité a été observée chez les daphnies exposées à $35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ dans la génération F0, avec des valeurs allant de 10% après 9 jours d'exposition jusqu'à 20% après 18 jours d'exposition. Dans la génération F2, ce même débit dose d'irradiation a induit une mortalité allant de 20% à l'éclosion (jour 1) jusqu'à 30% après 16 jours d'exposition. Ceci contraste avec les observations effectuées dans la génération F1, où les daphnies ne présentaient aucune mortalité quel que soit le débit de dose testé.

2. Croissance somatique en taille et en masse

L'irradiation gamma chronique a induit une légère réduction de la taille des daphnies (Figure 41). Bien que les effets soient restés relativement faibles au sein de chaque génération, les résultats de l'expérience suggèrent qu'un retard de croissance pourrait augmenter au fil des générations.

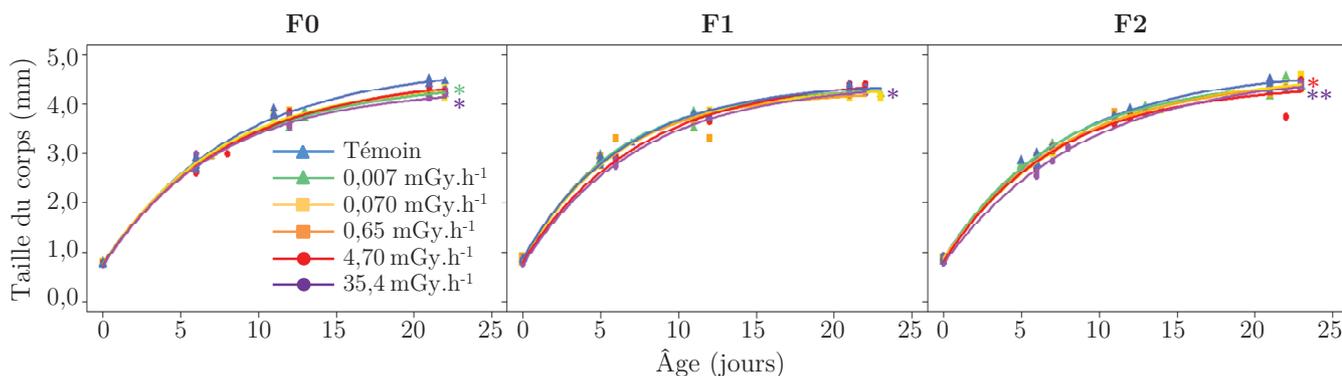


Figure 41. Taille du corps des daphnies (mm) en fonction de leur âge (jours) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹. Les données expérimentales et les courbes de croissance de von Bertalanffy (ajustées avec l'équation (1.4), Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Différences statistiques significatives avec le témoin (Tests multiples de Holm) : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; $n = 19$.

Dans la génération F0, les effets sur la taille (Tableau 6) sont associés à une réduction significative ($p \leq 0,05$) de la taille maximale (L_m) de 7% et 8% par rapport aux témoins, respectivement à 0,007 et 35,4 mGy.h⁻¹. Dans la génération F1, les effets sur la taille (Tableau 6) restent significatifs ($p \leq 0,05$) seulement au plus fort débit de dose (35,4 mGy.h⁻¹), avec des réductions de la taille à la naissance (L_b) de 8% et du taux de croissance de von Bertalanffy (r_B) de 13 % par rapport aux individus témoins. Dans la génération F2, la taille des daphnies (Tableau 6) est significativement ($p \leq 0,05$) affectée dès 4,70 mGy.h⁻¹, avec une L_b et une L_m réduites de 5 % chacune par rapport aux témoins. Dans cette même génération, les valeurs de la L_b et du r_B des daphnies exposées à 35,4 mGy.h⁻¹ ont respectivement été réduites de 6% et 13 % ($p \leq 0,01$) par rapport aux daphnies témoins (Tableau 6).

La relation entre la taille et la masse sèche des daphnies (Equation (1.6), Tableau 5) ne diffère pas significativement entre les conditions témoins et exposées quelle que soit la génération concernée (Figure 42 et Annexe 6). Ceci suggère que les différences de masses sèches observées sont les simples conséquences des légères réductions de tailles observées au cours des générations. A taille égale, des masses légèrement plus importantes des individus exposés sont même observées dans certaines conditions où les mesures de masses varient fortement entre les individus. Cette tendance n'est toutefois pas statistiquement significative.

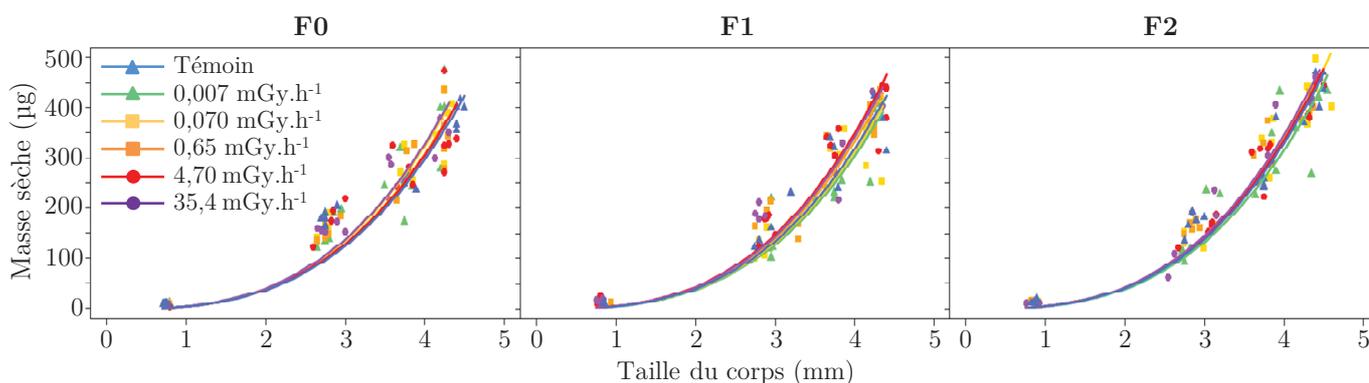


Figure 42. Masse sèche des daphnies (μg) en fonction de leur taille (mm) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$. Les données expérimentales et les courbes (Equation (1.6), Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Aucune différence statistique significative; $n = 19$.

3. Reproduction

La reproduction est l'un des paramètres les plus affectés par l'irradiation à l'échelle de l'organisme. Les daphnies ont montré une augmentation du retard de la libération des pontes et des réductions du nombre de descendants produits au cours des générations (Figure 43).

Au sein de chaque génération, les daphnies témoins ont réalisé cinq libérations de pontes pulsées et successives au cours d'une période de 21-23 jours. Les pics de libération de néonates se sont produits aux jours : 8-9 ; 11-12 ; 15 ; 18 et 21, quelle que soit la génération concernée (Tableau 6).

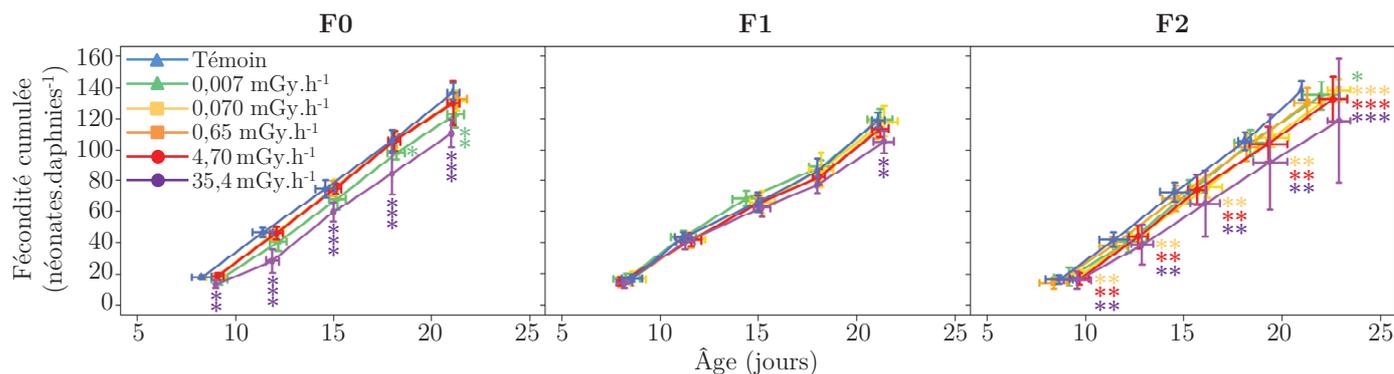


Figure 43. Production de néonates cumulée par daphnie en fonction de leur âge (jours) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹. Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; Tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticales et les différences significatives d'âge au moment de la libération des pontes par rapport au témoin (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par des astérisques horizontales : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; $n = 10$.

Dans la génération F0, de légers retards de libération de pontes ont été décelés chez les daphnies exposées à tous les débits de dose. Ces effets significatifs concernaient la libération des pontes 1 à 3 ($p \leq 0,05$), avec respectivement un retard allant en moyenne de 0,4 à 0,8 jours (significativités non-représentées sur la figure, voir Tableau 6). Cependant, ces retards ont progressivement été rattrapés au cours de la génération puisqu'ils ne sont plus significativement détectés après 15 jours d'exposition. Aucun retard significatif n'a été observé dans la génération F1. Dans la génération F2, chaque pic de libération de pontes a été significativement retardé chez les daphnies exposées à 0,070 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹ ($p \leq 0,05 - 0,001$) (Figure 43). Au plus fort des débits de dose de 35,4 mGy.h⁻¹, ce retard atteint la valeur maximale de deux jours au moment de la libération de la cinquième ponte. Dans cette même génération, un retard significatif est également décelé au plus faible des débits de dose de 0,007 mGy.h⁻¹ au moment de la libération de la ponte 5 ($p \leq 0,05$). Cette augmentation de retard est en accord avec la réduction progressive de la taille à la naissance et du taux de croissance de von Bertalanffy observée au cours des générations (Tableau 6).

La fécondité des daphnies a été significativement réduite dans la génération F0, dès la libération de la ponte 1 à 35,4 mGy.h⁻¹ et à partir de la libération de la ponte 4 à 0,007 mGy.h⁻¹, représentant respectivement une réduction de fécondité cumulée après la cinquième ponte de 19% et 11% par rapport aux témoins (avec respectivement, $p \leq 0,01$ et $p \leq 0,05$: Tableau 6).

Les effets sur la fécondité sont légèrement plus faibles dans la génération suivante. Dans la génération F1, seule une diminution significative de 12 % de fécondité totale est observée à 35,4 mGy.h⁻¹ ($p \leq 0,01$). Cette diminution n'est intervenue qu'à partir de la libération de la ponte 4. Les daphnies de la génération F2 exposées à 35,4 mGy.h⁻¹ présentaient également une réduction de la fécondité totale d'environ 14 % par rapport aux témoins. Cette réduction n'est toutefois pas significative dû à une forte variabilité entre les individus exposés. Les résultats suggèrent que cette variabilité interindividuelle est principalement liée aux retards de libération de pontes observés chez les individus exposés.

Concernant la masse investie dans les œufs, les résultats des ajustements montrent que la masse augmente linéairement avec la longueur des mères (Figure 44 et Équation (1.7), Tableau 5). Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les conditions d'exposition (Annexe 6). Encore une fois, les légères différences de masse sèche des œufs observées seraient les conséquences d'une diminution de la taille des mères dans les conditions d'exposition.

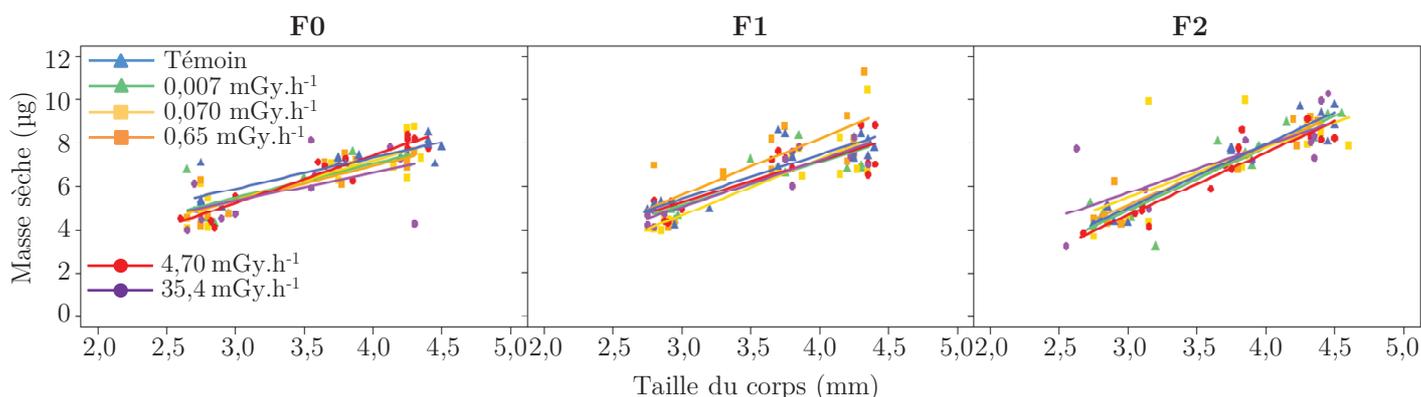


Figure 44. Masse sèche des œufs (μg) en fonction de la taille des mères (mm) dans les trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹. Les données expérimentales et les courbes (Equation (1.7), Tableau 5) sont respectivement représentées par des points et des lignes. Aucune différence statistique significative; $n = 19$.

Tableau 6. Paramètres estimés pour la croissance en taille, la fécondité cumulée sur cinq pontes et l'âge au moment de la libération des pontes 1,3 et 5 pour les daphnies exposées aux débits de dose gamma (Cs-137) de 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Différences statistiques significatives avec le témoin : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. L_m : Taille maximale du corps, L_b : taille du corps à la naissance et r_B : le taux de croissance de von Bertalanffy (j⁻¹). Fécondité cumulée : Moyenne \pm SD (*Standard Deviation*).

Génération	Débits de dose (mGy.h ⁻¹)	Taille du corps				Fécondité cumulée			Âge au moment de la libération des pontes								
		L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (d ⁻¹)	p	Moyenne	SD	p	Ponte 1			Ponte 3			Ponte 5		
									Moyenne	SD	p	Moyenne	SD	p	Moyenne	SD	p
F0	0	0,725	4,751	0,123		136,900	8,685		8,300	0,383		14,600	0,516		21,100	0,316	
	0,007	0,776	4,443	0,129	*	122,900	8,556	**	9,200	0,422	**	15,200	0,422	*	21,200	0,421	
	0,070	0,741	4,483	0,135		131,800	6,713		9,000	0,471	**	15,100	0,316	*	21,300	0,483	
	0,65	0,758	4,517	0,128		132,700	5,012		9,000	0,000	**	15,000	0,000	*	21,300	0,483	
	4,70	0,753	4,571	0,123		129,700	14,298		9,100	0,316	**	15,100	0,316	*	21,100	0,316	
	35,4	0,756	4,369	0,136	*	110,429	8,904	***	9,000	0,000	**	15,000	0,000	*	21,000	0,000	
F1	0	0,856	4,426	0,155		119,000	6,128		8,400	0,516		15,000	0,000		21,100	0,316	
	0,007	0,812	4,337	0,170		119,500	6,754		8,300	0,675		14,400	0,699		21,200	0,632	
	0,070	0,798	4,338	0,163		118,200	9,931		8,600	0,699		15,200	0,632		21,400	0,699	
	0,65	0,846	4,254	0,170		111,900	5,13		8,000	0,000		15,000	0,000		21,000	0,000	
	4,70	0,806	4,541	0,134		113,300	5,658		8,000	0,000		15,000	0,000		21,200	0,421	
	35,4	0,793	4,480	0,135	*	104,900	8,646	**	8,200	0,422		15,200	0,422		21,400	0,516	
F2	0	0,868	4,668	0,129		138,222	6,28		8,300	0,480		14,600	0,510		21,000	0,000	
	0,007	0,842	4,501	0,143		135,000	9,018		9,200	0,789		15,300	0,823		22,000	0,942	*
	0,070	0,879	4,624	0,122		138,400	7,042		9,800	0,422	**	16,200	0,789	**	22,900	0,568	***
	0,65	0,837	4,518	0,134		130,100	9,78		8,400	0,699		14,600	0,699		21,300	0,675	
	4,70	0,829	4,419	0,139	*	132,440	14,782		9,700	0,483	**	15,700	0,483	**	22,600	0,699	***
	35,4	0,820	4,683	0,113	**	118,700	39,883		9,600	0,699	**	16,100	0,738	**	22,900	0,568	***

4. Altérations de l'ADN

Dans le but de ne pas alourdir la lecture et la compréhension de cette partie, nous avons préféré utiliser le terme « d'altérations de l'ADN » lorsqu'une différence significative a été détectée en nombre de sites d'hybridation (Ct) et/ou en fréquence de distribution des températures de fusion (Tm) entre les conditions témoins et exposées. Les résultats détaillés des Ct et des Tm obtenus avec les amorces OPA9 et OPB10 sont présentés dans les [Tableaux 7 à 10](#). Les analyses statistiques associées sont synthétisées dans le [Tableau 11](#) ($p \leq 0,05$).

Des altérations significatives de l'ADN ([Tableau 11A](#)) ont été détectées dès l'éclosion (stade néonate) de la génération F0 aux deux plus forts débits de dose de 4,70 mGy.h⁻¹ (avec seulement l'amorce OPB10) et 35,4 mGy.h⁻¹ (avec les deux amorces). Plus tard, au cours de la génération F0, des altérations de l'ADN significatives ont été observées à des débits de dose de plus en plus faibles : à 0,65 mGy.h⁻¹ chez les adultes libérant leur ponte 1, soit à environ 9 jours (seulement avec l'amorce OPA9), et dès 0,007 mGy.h⁻¹ chez les adultes libérant leur ponte 5, soit à environ 21 jours (avec les deux amorces). Des altérations de l'ADN ont significativement été détectées à tous les débits de dose au moment de l'éclosion de la génération F1 (stade néonate) ([Tableau 11A](#)). Dans cette génération, l'ADN des adultes libérant leur ponte 1 apparaît également significativement affecté aux deux plus forts débits de dose (4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹), alors qu'il ne l'est pas chez les adultes exposés aux débits de dose $\leq 0,65$ mGy.h⁻¹. Quelques jours plus tard, les altérations de l'ADN ont de nouveau été détectées significativement à 0,070 mGy.h⁻¹ chez les adultes F1 libérant leur ponte 5, et sont restées significatives jusqu'à la libération de la génération F2 (seulement avec l'amorce OPB10). Dans la génération F2, les résultats suggèrent que les dommages ADN ont été accumulés, puisqu'ils sont significativement détectés à tous les débits de dose (avec les deux amorces dans la plupart des cas) lors de la libération des pontes 1 à 5 ([Tableau 11A](#)).

Des altérations significatives de l'ADN ([Tableau 11A](#)) ont été détectées aux mêmes débits de dose entre les mères adultes et leur néonates libérés lors de la ponte 5 (*e.g.* les néonates qui donneront la génération suivante). Ce phénomène a été détecté à 0,007 mGy.h⁻¹ entre les femelles de la génération F0 et les néonates de la génération F1, à 0,070 mGy.h⁻¹ entre les femelles de la F1 et les néonates de la F2 et à 0,007 mGy.h⁻¹ entre les femelles de la F2 et les néonates de la F3. Ces résultats reflètent une potentielle transmission d'altérations de l'ADN d'une génération à l'autre. De plus, des altérations significatives de l'ADN ([Tableau 11B](#)) ont été observées à des débits de dose plus faibles chez les néonates issus de la ponte 1 par rapport à leurs mères adultes. Ces altérations ont été détectées à 0,070 mGy.h⁻¹ pour les néonates de la F1' et 0,65 mGy.h⁻¹ pour les néonates de la F2' alors que chez les adultes, ces altérations sont

seulement visibles à 0,65 mGy.h⁻¹ en F0 et à 4,70 mGy.h⁻¹ en F1. Ces résultats suggèrent que les néonates issus de la ponte 1 pourraient être plus sensible à la génotoxicité de l'irradiation gamma externe que leurs mères.

Tableau 11. Synthèse des résultats RAPD-PCR. Altérations de l'ADN significativement détectées avec les amorces OPA9 et OPB10 entre les daphnies témoins et celles exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137), (A) dans les générations P, F0, F1, F2 et F3 : néonates (à l'éclosion), B1 et B5 (adultes au moment de la libération des pontes 1 et 5) ; et (B) dans les générations F1', F2' et F3' : néonates de la ponte 1 (à l'éclosion). La génération P = parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats des amorces OPA9 et OPB10 sont respectivement référencés à gauche et à droite des barres obliques (avec, OPA9/OPB10) : une seule astérisque ([*/] ou [/*]) indique la détection de différences significatives soit sur les *Ct* ou soit sur les *Tm* de l'amorce considérée ($p \leq 0,05$); une double astérisque ([** /] ou [/**]) indique la détection de différences significatives à la fois sur les *Ct* et les *Tm* de l'amorce considérée ($p \leq 0,05$) ; une barre oblique sans astérisque [/] indique qu'aucune altération de l'ADN n'a été détectée (avec les deux amorces).

(A)

Génération Débits de dose	P		F0			F1			F2			F3
	B5	Néonates	B1	B5	Néonates	B1	B5	Néonates	B1	B5	Néonates	
0,007 mGy.h ⁻¹	/	/	/	**/**	**/	/	/	/	**/**	*/	/	/*
0,070 mGy.h ⁻¹	/	/	/	**/*	*/	/	**/	/*	/*	**/**	/	/
0,65 mGy.h ⁻¹	/	/	*/	/*	/**	/	/	/	/**	**/**	*/	/*
4,70 mGy.h ⁻¹	/	/**	*/	/**	**/*	*/	/	/	/*	**/**	/	/*
35,4 mGy.h ⁻¹	/	**/**	**/**	**/**	*/	*/	*/	/	*/	**/**	*/	**/**

(B)

Génération Débits de dose	F1'		F2'		F3'	
	B1	Néonates	B1	Néonates	B1	Néonates
0,007 mGy.h ⁻¹	/	/	/	/	**/**	**/**
0,070 mGy.h ⁻¹	*/	*/	/	/	**/**	**/**
0,65 mGy.h ⁻¹	**/**	**/**	**/**	**/**	**/**	**/**
4,70 mGy.h ⁻¹	**/*	**/*	**/*	**/*	*/	*/
35,4 mGy.h ⁻¹	**/**	**/**	**/*	**/*	**/**	**/**

Tableau 7. Nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPA9 (à partir des résultats des *Ct*) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2 ' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats sont les moyennes \pm SEM (multipliées par 10^3 pour faciliter la lecture). Les différences significatives avec le témoin (Test U de Mann-Whitney): * $p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates.

Adultes Cs ¹³⁷	P	F0		F1		F2	
	B5	B1	B5	B1	B5	B1	B5
0 mGy.h ⁻¹	(1,05 \pm 0,12)	(4,22 \pm 1,10)	(13,00 \pm 1,87)	(19,83 \pm 3,62)	(9,95 \pm 3,84)	(14,19 \pm 5,25)	(1,05 \pm 0,30)
0,007 mGy.h ⁻¹	(1,72 \pm 0,31)	(10,93 \pm 3,23)	(2,36 \pm 0,93)*	(12,45 \pm 4,27)	(34,31 \pm 6,70)	(222,24 \pm 41,49)*	(7,94 \pm 4,00)
0,070 mGy.h ⁻¹	(1,34 \pm 0,32)	(10,17 \pm 3,13)	(2,17 \pm 0,45)*	(49,45 \pm 33,10)	(34,95 \pm 5,37)*	(18,32 \pm 3,87)	(14,49 \pm 1,45)*
0,65 mGy.h ⁻¹	(1,98 \pm 0,65)	(7,85 \pm 4,33)	(9,63 \pm 2,89)	(111,59 \pm 56,89)	(2,87 \pm 0,48)	(47,87 \pm 12,34)	(0,21 \pm 0,05)*
4,70 mGy.h ⁻¹	(1,67 \pm 0,32)	(9,33 \pm 2,29)	(6,17 \pm 2,04)	(4,45 \pm 2,12)*	(4,27 \pm 1,06)	(14,62 \pm 9,01)	(0,28 \pm 0,07)*
35,4 mGy.h ⁻¹	(1,95 \pm 0,66)	(13,07 \pm 2,90)*	(7,10 \pm 1,74)	(7,20 \pm 2,77)	(3,81 \pm 1,92)	(2,92 \pm 1,20)*	(4,08 \pm 1,22)*
Néonates	F0	F1'	F1	F2'	F2	F3'	F3
0 mGy.h ⁻¹	(4,76 \pm 1,82)	(5,45 \pm 1,60)	(8,28 \pm 1,45)	(13,45 \pm 2,14)	(11,62 \pm 4,86)	(8,51 \pm 1,95)	(1,08 \pm 0,55)
0,007 mGy.h ⁻¹	(1,75 \pm 0,67)	(13,21 \pm 3,68)	(2,65 \pm 1,23)*	(14,43 \pm 3,79)	(7,09 \pm 1,66)	(62,56 \pm 19,98)*	(3,65 \pm 2,11)
0,070 mGy.h ⁻¹	(2,46 \pm 0,53)	(1,83 \pm 0,61)	(3,75 \pm 1,01)*	(53,13 \pm 22,11)	(22,69 \pm 5,43)	(154,04 \pm 50,42)*	(4,14 \pm 2,30)
0,65 mGy.h ⁻¹	(2,33 \pm 1,36)	(12,16 \pm 3,30)*	(6,82 \pm 1,42)	(5,66 \pm 1,80)*	(4,02 \pm 0,91)	(1,44 \pm 1,10)*	(23,43 \pm 7,94)*
4,70 mGy.h ⁻¹	(4,43 \pm 0,84)	(14,02 \pm 2,66)*	(2,23 \pm 0,41)*	(5,74 \pm 1,12)*	(8,05 \pm 4,02)	(12,80 \pm 8,47)	(11,82 \pm 8,67)
35,4 mGy.h ⁻¹	(8,16 \pm 1,90)	(11,71 \pm 2,35)*	(10,03 \pm 2,74)	(5,76 \pm 1,50)*	(4,59 \pm 0,89)	(1,19 \pm 0,78)*	(24,57 \pm 8,78)*

Tableau 8. Nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPB10 (à partir des résultats des *Ct*) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2 ' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Les résultats sont les moyennes \pm SEM (multipliées par 10^3 pour faciliter la lecture). Les différences significatives avec le témoin (Test U de Mann-Whitney): * $p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates.

Adultes Cs ¹³⁷	P	F0		F1		F2	
	B5	B1	B5	B1	B5	B1	B5
0 mGy.h ⁻¹	(0,74 \pm 0,10)	(1,86 \pm 0,69)	(1,43 \pm 0,12)	(10,61 \pm 1,79)	(13,27 \pm 5,22)	(4,14 \pm 1,09)	(0,023 \pm 0,002)
0,007 mGy.h ⁻¹	(0,94 \pm 0,26)	(7,70 \pm 2,73)	(0,05 \pm 0,01)*	(10,21 \pm 2,68)	(21,94 \pm 5,61)	(94,45 \pm 9,92)*	(2,18 \pm 0,91)
0, 070 mGy.h ⁻¹	(1,02 \pm 0,31)	(4,68 \pm 1,14)	(1,48 \pm 0,56)*	(13,82 \pm 6,39)	(21,11 \pm 3,41)*	(19,79 \pm 16,25)	(5,29 \pm 0,42)*
0, 65 mGy.h ⁻¹	(2,05 \pm 0,69)	(5,13 \pm 2,36)	(1,26 \pm 0,18)	(17,21 \pm 4,13)	(2,72 \pm 0,94)	(21,40 \pm 5,18)*	(0,30 \pm 0,25)*
4,70 mGy.h ⁻¹	(1,64 \pm 0,47)	(2,83 \pm 0,45)	(4,46 \pm 0,78)*	(1,84 \pm 0,56)*	(4,27 \pm 0,98)	(1,03 \pm 0,46)*	(0,002 \pm 0,001)*
35,4 mGy.h ⁻¹	(2,37 \pm 0,87)	(10,54 \pm 2,30) *	(4,67 \pm 0,60)*	(4,66 \pm 1,02)*	(2,05 \pm 0,33)	(2,89 \pm 0,93)	(1,15 \pm 0,20)*
Néonates	F0	F1'	F1	F2 '	F2	F3 '	F3
0 mGy.h ⁻¹	(0,71 \pm 0,32)	(2,86 \pm 1,33)	(3,92 \pm 0,30)	(13,32 \pm 1,90)	(7,19 \pm 2,85)	(3,04 \pm 0,44)	(0,11 \pm 0,08)
0,007 mGy.h ⁻¹	(0,98 \pm 0,21)	(7,82 \pm 1,57)	(2,73 \pm 1,43)*	(16,75 \pm 2,49)	(4,43 \pm 2,63)	(15,16 \pm 3,80)*	(2,80 \pm 1,86)
0, 070 mGy.h ⁻¹	(1,78 \pm 0,49)	(2,00 \pm 1,02)	(4,18 \pm 1,48)*	(13,01 \pm 4,25)	(16,74 \pm 2,90)*	(77,99 \pm 20,07) *	(1,36 \pm 0,88)
0, 65 mGy.h ⁻¹	(1,33 \pm 0,32)	(9,50 \pm 1,87)*	(2,01 \pm 0,51)*	(3,69 \pm 1,07)*	(2,74 \pm 0,80)	(0,37 \pm 0,35)*	(5,45 \pm 3,07)*
4,70 mGy.h ⁻¹	(2,02 \pm 0,32)*	(10,01 \pm 1,89)*	(1,47 \pm 0,47)*	(3,45 \pm 0,59)*	(7,26 \pm 4,31)	(1,12 \pm 0,56)	(11,45 \pm 6,27)
35,4 mGy.h ⁻¹	(7,34 \pm 0,64)*	(11,54 \pm 1,85)*	(4,96 \pm 1,43)	(7,00 \pm 2,17)*	(2,46 \pm 0,44)*	(1,27 \pm 0,32)*	(13,24 \pm 1,60)*

Tableau 9. Fréquence d'apparition des produits de PCR avec l'amorce OPA9 en fonction de la température de fusion (T_m fréquence par intervalle de température) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes provenant des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Différences significatives avec le témoin (Table 2x2 de contingence avec simulation Monte Carlo): $*p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates.

Adultes	P						F0						F1						F2																								
	B5						B1						B5						B1						B5																		
	Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)																		
Intervalle de température (°C)	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4							
[74-78[0	0	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,2	0	0	0,6	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0,8*	0	0,2	0,8	0*	0,2	0,8	0,6	0,4
[78-80[1	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,4	0,4	0,6	0*	0,2	0,8	0*	0*	0,4	0,6	0*	0	0,2	0,6	0,5	0,6	0,8*	0,8	1	0,2	0,6	0,4	0*	0,4	1	0,4	0,2	0,2	0	0	0,4	0,8*	0,2	0,2	0	
[80-81[0	0,2	0,2	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,4	0,6	0	0	0,4	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0,2	0	0,8	0*	0*	0,2	0*	0*	
[81-82[1	0,8	1	1	0,6	1	1	0,6	1	0,8	1	1	1	1	0,8	0,6	1	0,6	1	1	0,6	0,83	1	1	1	0,6	1	1	1	0,8	1	1	0,8	1	1	1	0,6	1	1	1	1	1	
[82-83[0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0,2	
[83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0,4	
[84-85[0,8	1	1	1	0,4	0,6	1	0,6	0,8	0,2*	0,8	0*	0,4	0,8	0,8	1	1	0,6	1	1	0,8	0,67	0,4	0,8	0,8	0,8	0,6	1	0,4	0,4	0,8	0,2	0,6	0*	0,6	0,4	1	1	0,8	0,2*	0,6	0,4	
[85-86[0,2	0	0	0	0,6	0,2	0	0,2	0,6	0,4	0,2	1*	0	0	0,2	0	0	0,4	0	0	0,2	0	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,4	0,4	0,2	0	0,4	0,8	0	0,6	0	0	0,2	0,6	0	0	
[86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0,8*	0	0,2	0	0	1*	0,4	0	0	0	0	0,2	1*	0	0	0	
[87-88[1	1	1	1	1	0,8	1	1	1	1	0,8	1	1	0,2*	0,4	0,8	0,6	0,8	1	0,8	0,8	0,5	0,4	0,6	1	0,8	0,2*	1	0,8	0,8	0,8	0*	0,6	0,8	0,4	0,8	1	0,8	0*	0*	0,2*	0,8	
[88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0,2	
[89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Néonates	F0						F1'						F1						F2'						F2						F3'						F3						
[74-78[0	0	0,2	0	0	0	0	0,25	0	0	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,43	0,13	0,38	0,25	0	0,14	0,43	0	0,5	0,13	0,13	0,25	0	0,17	0	0,14	0	0	0,57	0,14	0,38	0	
[78-80[1	0,8	0,4	0,67	0,4	0*	0,25	0,37	0,37	0,75	0,12	0	0,87	0*	0,5	0,5	0,63	0,5	1	1	0,71	0,38*	0,38*	0,38*	0,71	0,71	0,86	0,86	0,63	0,5	0,38	0,5	0,29	0,5	0,33	0,14	1	0,86	0,71	0,71	0,88	0,5	
[80-81[0	0,2	0	0	0,4	0	0	0	0	0,12	0	0	0	0,17	0	0,25	0,25	0,33	0	0	0,29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0	0,13	0
[81-82[0,2	0,2	0,4	0	0,2	0,6	1	1	1	0,75	1	1	1	0,67	1	0,63	0,5	0,67	1	0,8	0,71	1	0,63	0,75	1	1	1	1	0,75	1	1	1	0,86	0,67	1	1	1	1	0,86	1	0,88	0,5	
[82-83[0,8	0,8	0,6	1	0,6	0,4	0	0	0	0,12	0	0	0	0,17	0	0,13	0,5	0,17	0	0	0	0	0,38	0,25	0	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0,33	0	0	0	0	0	0	0,13	0,5	
[83-84[0	0	0,2	0	0	0,8*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0
[84-85[1	1	0,8	1	1	0,2*	0,25	0,75	1*	0,75	1*	1*	0,43	0,83	0,83	0,75	1*	1*	0,83	1	0,71	0,5	1	0,25	0,86	1	0,71	1	0,5	0,63	0,75	0,75	0,43	0,17*	0,17*	0*	1	1	1	1	0,63	0,67	
[85-86[0	0	0	0	0	0	0,75	0,25	0*	0,25	0*	0,25	0	0,17	0,17	0,13	0	0	0,17	0	0,29	0,38	0	0,75	0	0	0,29	0	0,5	0,38	0,13	0,25	0,29	0,5	0,33	0,14	0	0,14	0	0	0,13	0,17	
[86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0,17	0	0	0	0	0	0,43	0	0	0,13	0,14	0	0,29	0	0	0	0	0,5	0,57	0	0,17	0	0	0,14	0,14	0,14	0,25	0	
[87-88[1	0,8	1	0,67	1	0,6	1	1	0,5	1	1	1	1	0,67	0,67	1	1	1	1	1	0,57	1	0,88	0,88	1	1	0,71	0,86	1	0,63	1	0,38*	0,14*	0,5	0,17	0*	1	0,57	0,71	0,57	0,5	0,67	
[88-89[0	0	0	0,33	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
[89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tableau 10. Fréquence d'apparition des produits de PCR avec l'amorce OPB10 en fonction de la température de fusion (T_m fréquence par intervalle de température) détectés sur l'ADN génomique des daphnies exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137) de l'expérience pour les adultes provenant des générations P, F0, F1 et F2 (B1 et B5 : au moment de la libération des pontes 1 et 5) et leurs néonates provenant des générations F0, F1, F2 et F3 (ponte 5) et F1', F2 ' et F3' (ponte 1). Génération P : parents de la F0 exposés pendant l'incubation des œufs de la ponte 5. Différences significatives avec le témoin (Table 2x2 de contingence avec simulation Monte Carlo): $*p \leq 0,05$; $n=5$ pour les échantillons d'adultes et $n=7-8$ pour les échantillons de néonates.

Adultes	P						F0						F1						F2																								
	B5						B1						B5						B1						B5																		
	Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)						Débits de dose (mGy.h ⁻¹)																		
Intervalles de température (°C)	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4	0	0,007	0,07	0,65	4,7	35,4							
[74-78[0	0	0	0	0,4	0,4	0	0,2	0,2	0	0	0,2	0	0,2	0	0,4	0	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0,2	0,2	0	0,6	0	0	0,8	0,2	0,8	0	0,2	0*	
[78-80[1	0,8	1	1	0,6	0,4	1	0,8	0,8	1	0,8	0,8	1	1	1	0,6	1	1	0,8	0,8	0,8	0,6	1	1	1	0,8	1	1	1	0,2*	1	1	0,8	0,2*	1	1	1	1	0,2*	1	0,8	1	
[80-81[0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0	0	0,6	0	0	0	0	0	0,4	0	0,2	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0
[81-82[0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,6	1	1	0,4	0,8	0,6	0,2*	0,8	1	1	0,2	0,6	0,6	1	1	0,8	0,4	1	0,8	0,8	1	0,6	1	1	0,4	1	1	1	0,8	0,6	0,4	1	0,4	0,6	1	1	0,8	
[82-83[0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0	0	0	0	0,2	0,2	0,6	0,2	0	0	0,2	0,2	0,4	0	0	0	0,2	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0,2	0,4	0,2	0	0,4	0,2	0	0	0,4	
[83-84[0	0,2	0,4	0	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0	0	0	0,4	0	0,2	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0,4	0	0,4	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0,4	0,2	
[84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0,2	0,2	0,6	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0,6	0,2	0,2
[85-86[0	0	0	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,8*	0,6	0,4	0,6	0	0,2	0,4	0,4	0	0	0,6	0	0,4	0	0	0	0	1*	1*	0,2	0,4	1*	0	0,2	1	0	0,4	0,2	
[86-87[1	1	1	0,8	0,8	0,8	1	1	1	0,6	1	0,6	1	1	0,2*	0,2*	0,4	0*	1	0,6	0,6	0,4	1	1	0,4	1	0,4	0,8	1	1	1	0*	0*	0,8	0,4	0*	1	0,6	0*	1	0,6	0,8	
[87-88[0	0	0,2	0	0,2	0,4	0	0,2	0,2	0	0	0,4	0	1*	1*	0,4	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0,6	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	1*	0,2	0	0	0	0,2	0,8	1*	1*	0,4	0,2	
[88-89[1	1	0,8	1	1	0,6	1	0,8	0,8	1	1	0,6	1	0*	0*	0,4	0,2*	0,6	0,8	0,8	0,8	0,4	1	1	1	1	0,8	1	1	1	1	0*	0,8	1	0,8	1	0,8	0,2	0*	0*	0,6	0,8	
[89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Néonates	F0						F1 '						F1						F2 '						F2						F3 '						F3						
[74-78[0	0	0,2	0	0,8*	0,8*	0	0	0,13	0,67*	0,13	0,5	0	0	0	0,38	0	0	0,33	0,33	0,14	0,29	0,13	0	0,14	0	0,43	0	0,13	0,38	0	0,63*	0,4	0,17	0,17	0,43	0,17	0	0,33	0	0,5	0,29	
[78-80[1	1	0,6	0,67	0,2*	0,2*	1	1	0,88	0,78	0,88	0,38*	1	1	1	0,13*	1	1	0,83	0,83	0,71	0,71	1	1	0,57	1	0,71	1	0,75	0,5	1	0,38*	0,6	0,83	1	0,86	1	0,86	0,83	1	0,88	0,71	
[80-81[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0	0	0	0,63*	0	0	0	0	0,14	0,14	0	0	0	0	0	0,43	0	0	0,13	0	0,5	0	0	0	0,14	0	0,14	0,17	0	0	0	
[81-82[0,8	0,6	0,6	0,67	0,4	0,6	1	1	0,75	0,78	0,5	0,38*	0,88	0,83	0,86	0*	0,5	0,5	0,83	0,83	0,57	0,57	1	0,86	0,71	1	0,57	0,86	0,88	0,63	1	0,13*	0,6	0,18*	0,17*	0,43*	1	0,71	0,83	0,86	0,88	0,71	
[82-83[0,2	0,4	0	0,33	0,6	0,2	0	0	0,13	0,11	0	0,38	0	0,17	0,14	0,25	0,5	0,5	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0,14	0	0,13	0	0,13	0,2	0,68*	0,83*	0,57*	0	0,29	0	0	0	0	
[83-84[0	0	0	0,33	0	0,2	0	0,13	0,13	0,22	0	0	0,13	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,29	0	0	0,14	0	0	0,25	0	0	0,2	0	0	0	0	0,14	0,33	0	0,63*	0	
[84-85[0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0	0	0	0,33	0,29	0	0,25	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0,13	0	0	0,25	0	0	0	0,14	0,83	0*	0,33	0*	0*	0*	
[85-86[0	0,2	0	0	0,6	0,6	0	0,13	0,13	0	0,5	0,13	0,13	0,5	0	0,5	0,13	0,50	0,83	0,67	0,57	0*	0*	0*	0,14	0	0,71	0	0	0,13	0	0,13	1*	0	0,33	0,14	0	0,29	0,33	0	0,25	0	
[86-87[1	0,8	1	1	0,4	0,2*	1	0,75	0,88	0,67	0,5	0,88	0,5	0,33	0,71	0,13	0,75	0,33	0,18	0,33	0,43	1*	1*	1*	0,86	1	0,29	0,86	0,75	0,75	1	1	0	1	0,67	0,86	0,83	0,43	0,5	1	0,75	0,86	
[87-88[0	0	0	0	0,4	0,4	0	0	0	0	0,5	0,13	0	0,5	1	0	0,25	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0	0,71*	0,33	0	0,13	0	
[88-89[1	1	1	1	0,6	0,6	1	1	1	0,89	0,5	0,88	1	0,5	0*	1	0,75	0,83	0,83	1	1	1	1	1	1	1	0,86	1	1	1	1	1	1	0,67	0,83	1	1	0,29*	0,33	1	1	1	
[89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

CHAPITRE 3

DISCUSSION

1. Effets transgénérationnels sur la survie, la croissance et la reproduction

La présente étude démontre que les effets chroniques de l'irradiation gamma varient au cours des générations successives (F0, F1 et F2) de *Daphnia magna*. Les résultats indiquent une augmentation générale de la radiotoxicité sur la croissance et la reproduction des daphnies de la génération F0 à la génération F2 pour les débits de dose $\geq 4,70$ mGy.h⁻¹. Notre étude met également en évidence une absence transitoire d'effets au cours de la génération F1, en particulier lors de la libération de la ponte 1 (~ 9 jours après le début de la génération). Nos observations sur la reproduction sont concordantes avec plusieurs études, montrant qu'une irradiation chronique affecte la reproduction des polychètes marins, *Neanthes arenaceodentata* et *Ophryotrocha diadema*, et de l'oligochète terrestre *Eisenia foetida*, respectivement exposés à 13,7 mGy.h⁻¹; 0,19 mGy.h⁻¹ et 43 mGy.h⁻¹ (Harrison et Anderson, 1994; Knowles et Greenwood, 1994; Hertel-Aas *et al.*, 2007). Les résultats de la génération F0 de notre expérience sont également en accord avec ceux obtenus par Gilbin *et al.* (2008) chez *D. magna* exposées à 31 mGy.h⁻¹ pendant 21 jours. En effet, pour des débits de dose similaire, une réduction comparable de la fécondité cumulée (environ 20%) a été observée dans les deux études. Toutefois, cette réduction apparaît quelques jours plus tôt dans notre étude (respectivement, 9 jours contre ~15 jours). De même, nous avons observé une mortalité légèrement plus importante (respectivement, 20% contre 7,5%). Les raisons de cette disparité pourraient être en partie imputables aux différences d'exposition, avec une exposition commençant trois jours plus tôt dans notre expérience (à partir du dépôt des œufs) par rapport à celle de Gilbin *et al.* (2008) (à partir de la libération des néonates). La comparaison de ces deux travaux suggère que l'exposition embryonnaire de notre expérience augmente très légèrement la radiosensibilité des daphnies exposées à des débits de dose pertinents d'un point de vue environnemental. Cette situation avait déjà été observée chez *D. magna* exposée à l'U appauvri, où l'exposition du stade embryonnaire conduisait à une augmentation des effets (Massarin *et al.*, 2010; Plaire *et al.*, 2013). Cette situation concorde également avec les effets observés chez l'insecte coléoptère *Dermestes maculatus* et chez le copépode cyclopoïde *Paracyclopsina nana* exposés aux rayonnements gamma, où les œufs seraient un stade particulièrement sensible chez ces espèces (Seal et Tilton, 1986; Won et Lee, 2014). Ces constatations sont toutefois à nuancer car ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'expositions aiguës et à des doses 10 fois supérieur

(~100 Gy) aux nôtres. *A contrario*, d'autres résultats suggèrent qu'une exposition chronique au rayonnement gamma (17 mGy.h⁻¹), allant du stade larvaire au stade adulte, induit des effets plus prononcés qu'une exposition du stade embryonnaire chez *N. arenaceodentata* (Harrison et Anderson, 1988).

Nos observations montrant que les daphnies de la génération F0 sont plus radiosensibles que celles de la génération F1 semblent s'opposer aux précédentes études mettant en évidence que la sévérité des effets augmente au cours de trois générations successives de *D. magna* exposées à l'U appauvri ou à l'Américium-241 (Am-241) (Alonzo *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010). Parmi les seules études examinant les effets chroniques de l'irradiation gamma au cours de plusieurs générations, des effets décroissants sur la reproduction du ver *E. foetida* ont également été observés entre les générations F0 et F1 pour des débits de dose supérieurs à 4 mGy.h⁻¹ (Hertel-Aas *et al.*, 2007). Cependant, cette étude a été limitée à deux générations d'exposition et les effets sur la troisième génération n'ont pas été examinés.

Plusieurs processus peuvent expliquer les différences d'effets entre nos générations F0 et F1. Dans un premier temps, dans le cadre d'une irradiation gamma chronique, les organismes sont exposés à un stress radiologique qui est constamment proportionnel aux débits de dose au cours des générations. *A contrario*, dans le cadre de l'U appauvri ou de l'Am-241, ces radioéléments ont besoin d'être bioaccumulés à l'intérieur des organismes pour induire un stress chimique ou une irradiation alpha, correspondant à une cinétique d'apparition des effets plus lente en génération F0 qu'en génération F1. Cette explication est fortement étayée par la rapide induction d'effets observés sur la reproduction dans notre étude, c'est-à-dire, dès la libération de la ponte 1 en génération F0. Dans un second temps, la disparition transitoire des effets sur la survie et la reproduction des daphnies de la génération F1 (dès la ponte 1) pourrait refléter d'une induction tardive de processus compensatoires, nécessitant qu'une dose ou que des dommages suffisants aient été accumulés pour pouvoir être déclenchés. D'autre part, nous avons constaté que les effets sur la reproduction (réduction de la fécondité et/ou retard de libérations de pontes) deviennent de nouveaux significatifs plus tard dans la génération F1 (à environ 18 jours), et continuent d'augmenter en sévérité au fil de la génération F2 à partir des plus forts débits de dose ($\geq 4,70$ mGy.h⁻¹). Cette observation suggère que la radiotoxicité deviendrait dominante par rapport aux processus compensatoires lorsque la dose totale continue d'être accumulée au cours du temps. On pourrait alors supposer un excès de dommages ou une altération des processus de réparation. Dans un troisième temps, la réduction de la fécondité et l'apparition de la mortalité dans la génération F0 pourraient conduire à la sélection de daphnies relativement plus résistantes dans la génération F1. Cette hypothèse a

également été proposée pour expliquer la diminution de radiosensibilité observée au cours de 7 générations du polychète marin *O. diadema* exposé à des débits de dose $\geq 7,7$ mGy.h⁻¹ (Knowles et Greenwood, 1994).

2. Accumulation et transmission d'altérations de l'ADN au cours des générations

Dans cette étude, les résultats de RAPD-PCR mettent en évidence une accumulation et une transmission des altérations de l'ADN au cours des générations d'exposition. Ce fait a été démontré par plusieurs points importants. Premièrement, la détection d'altérations de l'ADN successivement significatives à 4,70 mGy.h⁻¹; 0,65 mGy.h⁻¹ et 0,007 mGy.h⁻¹, respectivement chez les néonates de la F0 (à l'éclosion), chez les adultes F0 libérant leur ponte 1 (9 jours) et chez les adultes F0 libérant leur ponte 5 (21 jours), montrent que les altérations de l'ADN sont accumulées dans les daphnies de manière dose-dépendante et temps-dépendante. Cet ensemble se traduit par une cinétique rapide d'apparition des dommages à l'ADN dans la génération F0. Deuxièmement, les altérations de l'ADN détectées dans les néonates F0 fraîchement éclos suggèrent que la génotoxicité de l'irradiation a été également directement induite durant le stade embryonnaire. En effet, aucun dommage ADN ne peut être transmis des mères aux œufs puisque l'exposition a débuté après le dépôt des œufs, avec un matériel génétique n'ayant auparavant subi aucun stress radiologique. Par conséquent, les altérations de l'ADN ont été accumulées durant les stades embryonnaires, juvéniles et adultes. Troisièmement, le fait que des dommages ADN aient été détectés à des débits de dose de plus en plus faibles chez les néonates au cours des générations F0, F1, F2 et F3, respectivement à partir de 4,70 - 0,007 - 0,070 et 0,007 mGy.h⁻¹, et également aux mêmes débits de dose que leurs parents (F0, F1 et F2), montre que les dommages moléculaires induits par l'irradiation affectent les cellules germinales des femelles et sont transmises à la progéniture. Quatrièmement, les comparaisons de débits de dose à partir desquelles de la génotoxicité a été détectée entre les mères et leurs néonates (particulièrement entre la génération P et F0), mettent en évidence, qu'au niveau moléculaire, les embryons sont plus radiosensibles que les femelles adultes.

À ce jour, la grande majorité des études évaluant la génotoxicité des radionucléides dans un contexte multigénérationnel s'est principalement focalisée sur les vertébrés, incluant des modèles biologiques de souris et de poissons (Kubota *et al.*, 1995; Morgan, 2003; Nomura, 2003; Shimada et Shima, 2004; Barber et Dubrova, 2006; Barber *et al.*, 2006; Tsyusko *et al.*, 2007; Grygoryev *et al.*, 2013). Chez les invertébrés, une accumulation d'altérations de l'ADN et une transmission à leurs descendants ont été constatées au cours de deux générations successives de *D. magna* exposée à l'U appauvri (Plaire *et al.*, 2013) et également chez le papillon *Zizeeria*

maha exposé à des débits de dose environnementaux de rayonnement gamma (Hiyama *et al.*, 2013). En accord avec nos résultats, Plaire *et al.* (2013) ont observé une génotoxicité plus prononcée dans les néonates que dans les adultes, suggérant que la capacité de réparation de l'ADN pourrait être meilleure ou plus efficace chez les adultes que chez les néonates. Cette hypothèse est fortement soutenue par les résultats de David *et al.* (2011), montrant que l'expression des gènes impliqués dans des processus de réparation (lutte contre le stress oxydatif, réparation des dommages ADN *etc.*) est plus importante chez les adultes que chez les néonates après une exposition à un mélange de contaminants génotoxiques.

Dans notre étude, la différence de radiosensibilité entre les néonates et les adultes pourraient également expliquer pourquoi, aux débits de dose $\leq 0,65 \text{ mGy.h}^{-1}$, les altérations de l'ADN ont été détectées significativement dans les adultes F0 et les néonates F1 (éclosion), et non-significativement plus tard chez les adultes F1 libérant leur ponte 1 (9 jours). Cette observation, suggérant l'existence d'une relation dose-réponse non linéaire au cours du temps ou d'une réparation transitoirement plus efficace, pourrait résulter de plusieurs processus. Une précédente étude a suggéré que la non-linéarité dans les réponses moléculaires pourrait résulter d'une absence de réparation de l'ADN à de très faibles doses de rayonnement gamma, en supposant que les mécanismes de réparation seraient déclenchés seulement après un seuil de dommages critiques (Zaichkina *et al.*, 2004). Ainsi, il existerait un délai dans le temps et/ou dans la dose (car la dose est dépendante du temps) entre l'apparition de dommages à l'ADN et l'activation de mécanismes de défenses ou de processus compensatoires (Figure 45, Burlakova *et al.*, 1998).

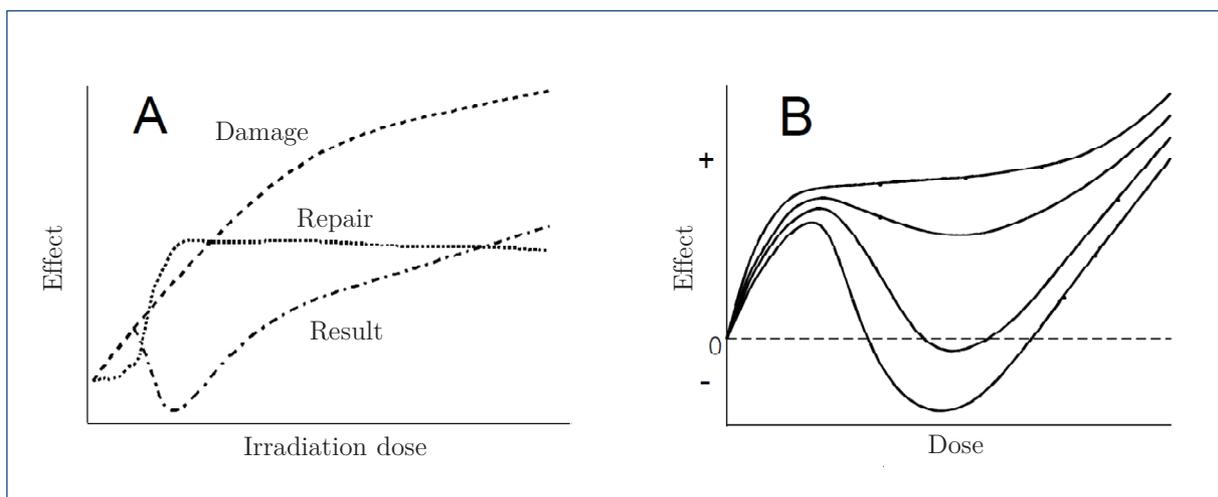


Figure 45. Schéma illustrant (A) l'apparition des dommages moléculaires et l'initiation des processus de réparation en fonction de la dose d'irradiation et (B) les répercussions de ces différents processus sur les cinétiques d'effets à l'échelle de l'organisme (d'après Burlakova *et al.*, 1998).

En conséquence, les altérations de l'ADN pourraient être détectées significativement à faibles débits de dose ou très tôt durant l'exposition (comme dans la génération F0 de notre étude), avant d'être réparées par des mécanismes de réparation de l'ADN ou éliminées par une mort cellulaire programmée telle que l'apoptose (comme dans la génération F1 de notre étude). Finalement, lorsque l'exposition continue et que la dose ne cesse d'être accumulée par les organismes, les lésions de l'ADN deviendraient dominantes par rapport aux processus de défense et de réparation, menant à des altérations de l'ADN constamment significatives chez les adultes F1 à 0,070 mGy.h⁻¹ (à la libération de la ponte 5) et chez les adultes F2 dès 0,007 mGy.h⁻¹ (à partir de la libération de la ponte 1). Aux débits de dose $\geq 4,70$ mGy.h⁻¹, les lésions de l'ADN semble dominer les mécanismes de défense et de compensation dans toutes les générations, menant constamment à l'observation d'altérations à l'ADN significatives. On pourrait alors supposer que ces mécanismes de défense soient saturés par les dommages et/ou altérés à leur tour par l'irradiation continue (*e.g.* erreurs de réparation) (Twining, 2011).

D'autres auteurs ont mis en évidence que les gènes impliqués dans les réparations de l'ADN et les réponses antioxydantes étaient exprimés d'une manière dose-dépendante chez les copépodes marins, *T. japonicus* et *P. nana* lors d'une exposition aiguë au Cs-137 (Han *et al.*, 2014; Won et Lee, 2014). Même si la comparaison des réponses radiotoxiques entre une exposition aiguë et prolongée reste relativement complexe, nous pouvons émettre l'hypothèse que lors d'une irradiation chronique, les mécanismes de réparation de l'ADN deviennent efficaces seulement lorsque les organismes ont reçu une dose cumulée suffisante. Cette hypothèse pourrait expliquer la radiosensibilité plus importante observée dans la génération F0 (due à l'absence ou la contribution insignifiante de réparation de l'ADN) par rapport à la génération F1. Finalement, plusieurs études démontrent également que l'irradiation pourrait induire des changements épigénétiques héréditaires, tels que des méthylations de l'ADN, causant sur le long terme des changements transgénérationnels dans l'expression de différentes catégories de gènes (réparation de l'ADN, régulation du stress oxydatif, développement embryonnaire, perturbations endocriniennes *etc.*) (Dubrova, 2003; Skinner, 2008). Dans certains cas, ces changements épigénétiques sembleraient expliquer les variations d'effets chimiotoxiques ou radiotoxiques observées au cours de plusieurs générations de *D. magna* (Vandegheuchte *et al.*, 2010; Sarapultseva et Gorski, 2013). De plus amples analyses moléculaires seraient nécessaires pour quantifier la contribution des processus génétique et épigénétique potentiellement impliquées dans la réponse des daphnies à une irradiation gamma multigénérationnelle.

3. Lien entre les altérations ADN et les réponses individuelles au cours des générations

Dans la présente étude, les perturbations induites par l'irradiation au niveau moléculaire sont devenues significatives à des débits de dose plus faibles et après une plus courte durée d'exposition que les effets observés sur la taille et la reproduction des daphnies (Tableau 12). Une tendance similaire a été constatée vis-à-vis des effets sur la survie, mais ces effets n'étaient toutefois pas statistiquement significatifs au cours des générations (Tableau 12).

Tableau 12. Débits de dose les plus faibles (en mGy.h⁻¹) induisant des effets observables (*LOEDR*, « *Lowest Observed Effect Dose Rates* ») sur l'ADN, la survie, la croissance et la reproduction des daphnies exposées à l'irradiation gamma au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) : Néo (néonates à l'éclosion), B1 et B5 (adultes au moment de la libération des pontes 1 et 5). Seuls les *LOEDR* sur l'ADN, la croissance et la reproduction des daphnies représentent des effets significatifs de l'irradiation gamma par rapport au témoin. Les *LOEDR* sur la survie représentent uniquement une tendance d'effet statistiquement non significative. Les astérisques indiquent qu'aucune différence significative sur la croissance et la reproduction des daphnies n'a été détectée aux débits de dose intermédiaires (de 0,070 à 4,70 mGy.h⁻¹) de la génération F0. NE = Aucun effet observé ; - = mesures non applicables.

Critère d'effets	F0			F1			F2		
	Néo	B1	B5	Néo	B1	B5	Néo	B1	B5
Altérations ADN	4,70	0,65	0,007	0,007	4,70	0,07	0,07	0,007	0,007
Croissance	NE	NE	35,40 0,007	35,40	35,40	35,40	4,70	4,70	4,70
Reproduction	-	35,40	35,40 0,007	-	NE	35,40	-	0,070	0,070
Survie	NE	35,40	4,70	NE	NE	NE	35,4	35,4	4,70

De manière similaire, des études antérieures ont démontré que les dommages ADN étaient un critère d'évaluation plus sensible que les effets à l'échelle individuelle chez *D. magna* exposée au benzo[a]pyrène ou à l'U appauvri pendant plusieurs générations (Atienzar et Jha, 2004; Plaire *et al.*, 2013). Plaire *et al.* (2013), suggèrent que les profils RAPD altérés, pourraient être utilisés comme de puissants outils de prédiction et servir d'indicateurs d'effets précoces sur la fécondité, si l'exposition des organismes est maintenue. Cette hypothèse est également soutenue par Hagger *et al.* (2005), mettant en évidence - avec la méthode de RAPD - qu'une exposition chronique au tritium (émetteur β) induit des dommages à l'ADN même au plus faible débit de dose de 0,002 mGy.h⁻¹, chez les embryons de la moule marine, *M. edulis*. Dans le cadre de notre

irradiation chronique, le temps de latence entre la détection d'altérations moléculaires et l'apparition d'effets à l'échelle des organismes dépend du débit de dose : quelques jours dans la génération F0 au plus fort débit de dose testé ($35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) et plus de 35 jours à $0,070 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, soit le temps de plus d'une génération dans notre expérience. En revanche, la radiosensibilité observée au plus faible débit de dose testé ($0,007 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) est plus difficile à comparer entre l'échelle moléculaire et individuelle. Dans ce cas précis, des perturbations simultanées de la fécondité et des profils RAPD ont été détectées à la fin de la génération F0. Ces observations pourraient être le résultat d'altérations de l'ADN non-réparées suite à un niveau de dommages accumulés insuffisant pour permettre l'atteinte du seuil de déclenchement des mécanismes de défense et de réparation. Cette hypothèse est également proposée par De Coen *et al.* (2006) pour expliquer la détection plus importante d'altérations de l'ADN chez des daphnies provenant de stations faiblement polluées par rapport à celles provenant d'une station soumise à une forte contamination d'effluents métallurgiques. Certaines études, quant à elles, posent l'hypothèse que l'hypersensibilité des organismes à de très faibles doses d'irradiation chronique résulterait de processus épigénétiques (Kovalchuk *et al.*, 2004; Pogribny *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 2006; Grygoryev *et al.*, 2013). Encore une fois, cette hypothèse reste à tester. Dans notre étude, même si dans la génération F2 nous détectons des altérations de l'ADN et un léger effet sur le retard de ponte pour les daphnies exposées à $0,007 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, il serait nécessaire d'évaluer si ces effets pourraient s'aggraver sur un plus grand nombre de générations. De manière similaire, une apparente corrélation a été trouvée entre l'accumulation de dommages ADN au cours du temps et leurs conséquences sur le succès reproducteur (taille des pontes) des deux invertébrés, *N. arenaceodentata* et *C. elegans* exposés respectivement, à de faibles doses de rayonnements gamma (Co-60) et ultraviolet (UV-B) (Anderson *et al.*, 1994).

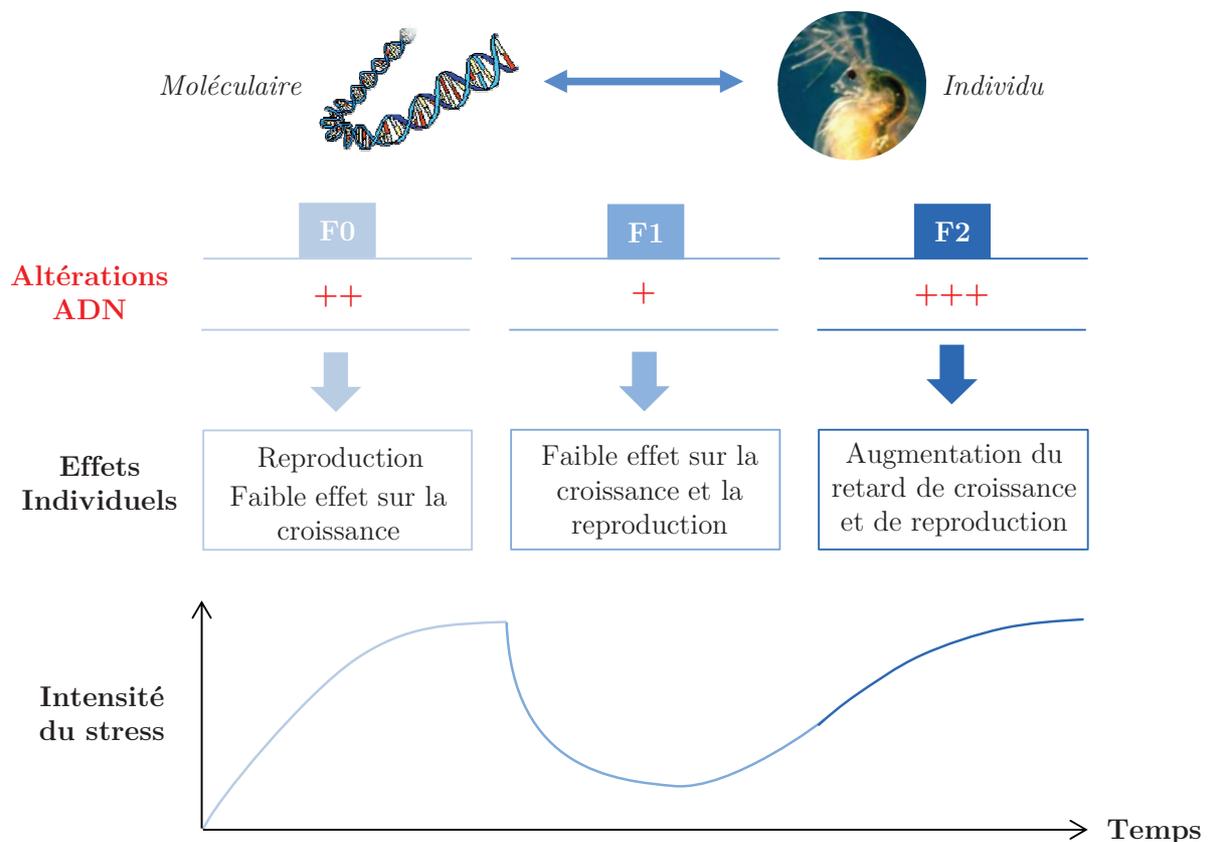
Nos résultats ont décrit une tendance parallèle d'effets aux niveaux moléculaire et individuel, avec une augmentation globale de la sévérité des effets entre les générations F0 et F2, et une diminution transitoire d'effets au cours de la génération F1. La nature des effets change au cours des générations, avec une réduction dominante de la taille des pontes dans la génération F0 et une augmentation du retard de croissance et de libération des pontes dans la génération F2. Ces observations sont concordantes avec les résultats précédents acquis au laboratoire montrant que l'augmentation des effets de l'U appauvri au fil des générations (Massarin *et al.*, 2010; Plaire *et al.*, 2013) est principalement expliquée par une augmentation des coûts énergétiques causant un retard de croissance à la suite d'une accumulation de dommages ADN (Alonzo *et al.*, 2014).

4. Conclusion

Cette étude a démontré que des altérations de l'ADN ont été accumulées et transmises au cours de trois générations successives de daphnies exposées à de faibles doses de rayonnement gamma, avec en parallèle une augmentation de la sensibilité des organismes. Les dommages ADN et leurs effets associés au niveau individuel ont été constatés à un débit de dose minimal de $0,007 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, en dessous du critère de référence de radioprotection internationale de $10 \text{ }\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ (Garnier-Laplace *et al.*, 2010). Les radiations ionisantes à faibles doses pourraient avoir des conséquences génétiques plus importantes que celles prédites par les modèles d'extrapolation basés sur des données à fortes doses (Copplesstone *et al.*, 2001). A ce jour, la pertinence de ce genre d'altérations génétiques et leurs potentielles répercussions à l'échelle des populations reste controversée dues aux manques de résultats concordants dans le domaine de l'évaluation du risque environnemental. Dans ce contexte, des approches approfondies pourraient aider à mieux comprendre les liens complexes entre les réponses aux niveaux moléculaire et individuel afin de protéger convenablement l'environnement.

SYNTHÈSE

- Les résultats démontrent que les effets de l'irradiation sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies augmentent en sévérité de la génération F0 à F2 (Figure 46).
- La mortalité après 21 jours à 35,4 mGy.h⁻¹ tend à augmenter de 20% à 30% entre la F0 et la F2. La croissance a été affectée par une légère réduction de la taille maximale à 35,4 mGy.h⁻¹ en F0 et par des réductions du taux de croissance de 5% et 13% respectivement à 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹ en F2. La reproduction a été affectée par une réduction de 19% de la fécondité totale à 35,4 mGy.h⁻¹ en F0 et par un retard d'environ 1,9 jours dès 0,070 mGy.h⁻¹ en F2.
- En parallèle, les altérations de l'ADN sont devenues significatives à des débits de dose décroissants au cours de la génération F0 (de 4,70 mGy.h⁻¹ à l'éclosion à 0,007 mGy.h⁻¹ après 21 jours) et, de la génération F0 à F2 (de 0,070 mGy.h⁻¹ à l'éclosion à 0,007 mGy.h⁻¹ après 21 jours), démontrant leurs rapides accumulations dans les daphnies F0 et leurs transmissions aux générations suivantes.
- L'induction de processus de réparation à l'ADN transitoirement plus efficaces a été suggérée pour expliquer les effets radiotoxiques moins prononcés au cours de la F1, avec aucun effet sur la survie, une légère réduction de 12% de la fécondité à 35,4 mGy.h⁻¹ après 21 jours et des altérations de l'ADN significatives seulement pour les plus forts débits de dose.

Figure 46. Synthèse des effets de l'irradiation γ entre les échelles moléculaire et individuelle.

PARTIE C

ÉTUDE DES EFFETS DE LA CONTAMINATION ALPHA INTERNE AU COURS DE TROIS GÉNÉRATIONS SUCCESSIVES DE *DAPHNIA MAGNA* : PRÉSENTATION DES DONNÉES ET RÉANALYSE STATISTIQUE

Pour rappel, l'un des objectifs de ces travaux de thèse est d'une part de comparer la radiotoxicité des rayonnements alpha (Am-241) et gamma (Cs-137) chez la daphnie à l'aide du modèle mécaniste DEBtox et d'autre part, de caractériser l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha interne par rapport au rayonnement gamma externe. Dans cette partie sont présentés les résultats d'une contamination alpha interne au cours de trois générations de *D. magna*, acquis lors d'une précédente étude réalisée par [Alonzo et al. \(2008\)](#). Les objectifs de cette partie sont : (i) de présenter succinctement la démarche expérimentale mise en place par [Alonzo et al. \(2008\)](#), (ii) de familiariser le lecteur aux résultats prochainement utilisés pour les analyses DEBtox, (iii) de ré-analyser statistiquement les données de cette étude en se basant sur les modèles de croissance et de reproduction du DEB ([Kooijman, 2010](#)) et (iv) de développer une analyse statistique homogène entre les deux expériences pour améliorer la robustesse de la comparaison. Compte tenu du fait que cette étude de contamination alpha interne n'a pas été réalisée durant ces travaux de thèse, aucune discussion n'accompagnera la présentation des résultats. Pour plus de détails, se référer aux études d'[Alonzo et al. \(2006, 2008\)](#)

CHAPITRE 1

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les études menées par *Alonzo et al.* avaient été initialement publiées en 2006 et 2008 sur *Daphnia magna* afin de substantiellement pallier le manque de données concernant les effets à long terme des émetteurs alpha sur les organismes non-humains.

1. Conditions d'exposition

Trois générations successives (F0, F1 et F2) de daphnies ont été exposées à une gamme de concentrations d'Am-241, incluant trois concentrations nominales de 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹ et une condition témoin sans Am-241. Les concentrations d'exposition, correspondant à l'activité radioactive de l'Am-241 par unité de volume (Bq.mL⁻¹), ont été préparées à partir d'une solution mère d'Am-241 de 20 kBq.mL⁻¹ dans 25 mM HNO₃. Dans chacune des quatre conditions, la concentration de NaNO₃ du milieu de culture a été ajustée à 0,05 mM (pH 8), dans le but d'éliminer la différence de concentration en NO₃⁻ résultant de l'ajout d'Am-241. Cet ajout de NaNO₃ n'a eu aucune incidence sur les daphnies, puisqu'une mortalité acceptable (< 10%) et une fécondité totale sur 21 jours supérieure aux 60 néonates requises ont été observées dans la condition témoin de l'expérience (OECD, 2008). Les milieux d'exposition ont été renouvelés tous les jours afin de compenser les potentielles pertes d'Am-241 liées à l'adsorption sur la paroi des unités expérimentales. Les conditions d'exposition (quantité de nourriture, pH, oxygénation *etc.*) étaient identiques à celles de l'expérimentation gamma externe (cf. PARTIE B, Chapitre 1), incluant notamment un apport de nourriture et un changement des milieux quotidiens.

2. Design expérimental

L'expérience multigénérationnelle a été réalisée en utilisant 16 daphnies par condition d'exposition. Comme pour l'expérience d'irradiation gamma, les daphnies ont été exposées individuellement pendant 23 jours dans des unités expérimentales contenant 50 mL de milieu M4. La génération F0 a été initiée en utilisant les néonates issus de la cinquième ponte fraîchement éclos (<24h), et prolongée jusqu'au dépôt de la ponte 5 (21-23 jours). Au 23^{ème} jour, 16 néonates fraîchement éclos (<24h) ont été utilisés pour lancer les générations suivantes, exposées dans les mêmes conditions que leurs parents. De cette manière trois générations successives ont été successivement exposées à l'Am-241 pour une durée totale de 70 jours (Figure 47).

Il est important de noter que le stade embryonnaire de la génération F0 de cette étude n'est pas exposé, contrairement aux générations suivantes F1 et F2. Ainsi, le design expérimental des expériences gamma et alpha diffère légèrement, puisque le stade embryonnaire de la génération F0 était exposé lors de l'irradiation gamma externe.

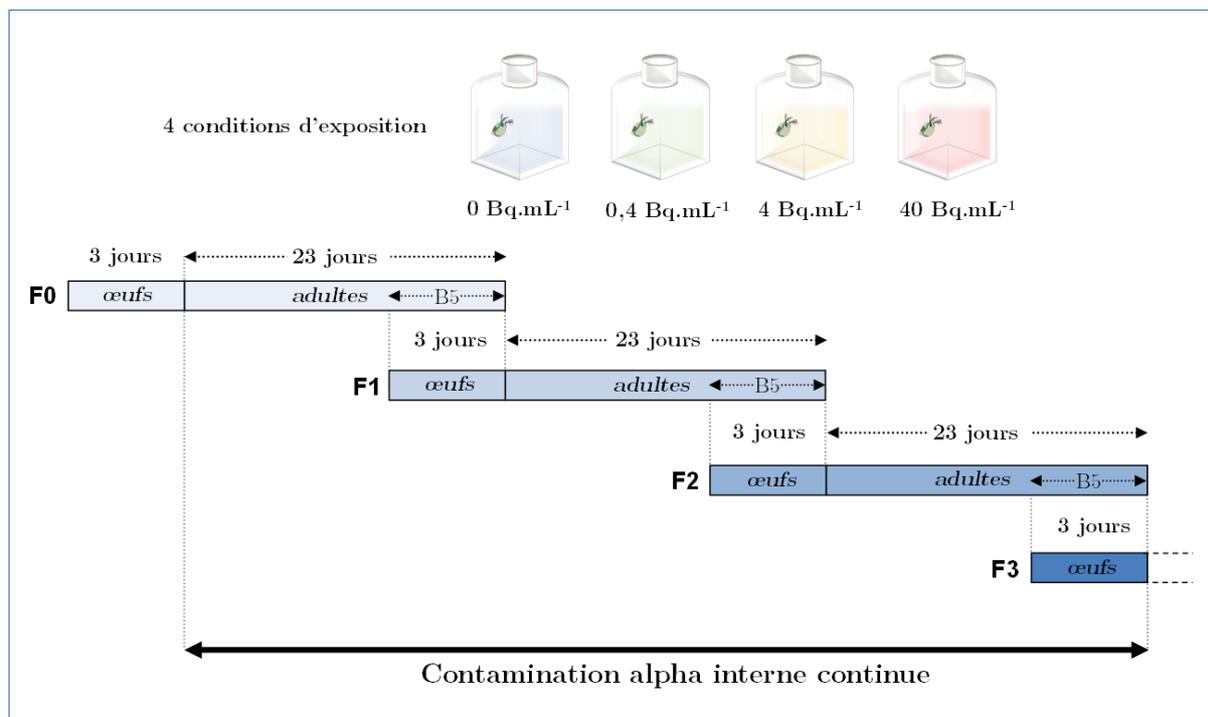


Figure 47. Design expérimental de l'exposition multigénérationnelle à l'Am-241.

Les unités expérimentales ont été vérifiées quotidiennement pour le suivi de la survie, de la libération des mues, du dépôt des œufs dans la chambre incubatrice des femelles et de la libération des néonates. La proportion de daphnies survivantes, l'âge au moment du dépôt des œufs et le nombre de néonates ont été estimés sur 11 unités expérimentales. Les temps de mesures et la méthodologie utilisée pour mesurer les critères d'effets de la survie, la croissance somatique et la reproduction des daphnies étaient les mêmes que ceux de l'expérience d'irradiation gamma externe (cf. PARTIE B, Chapitre 1). Ils ne seront donc pas redétaillés dans cette partie. Seules la bioaccumulation et l'estimation des débits de dose seront succinctement abordées dans les sections suivantes.

3. Bioaccumulation et débits de dose

L'exposition réalisée correspond à une contamination interne par le milieu d'exposition. Afin de déterminer les débits de dose alpha auxquels les organismes sont exposés aux différentes concentrations d'Am-241, la bioaccumulation a été mesurée dans les néonates et les adultes, leurs cuticules et leurs œufs au dépôt des pontes 1, 3 et 6. Ces mesures permettent de suivre la cinétique d'internalisation et d'adsorption de l'Am-241 dans les tissus et sur les cuticules des daphnies au cours de l'exposition et de suivre l'évolution du débit de dose alpha associé au cours du temps.

Les Coefficients de Conversion de Dose (DCCs pour « *Dose Conversion Coefficients* ») ont été estimés à l'aide du logiciel EDEN (*Elementary Dose Evaluation for Natural Environment*, EDEN 2.0) (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2006). Ce logiciel a été spécialement développé par l'IRSN pour calculer la dose de radioactivité reçue par les organismes non-humains. L'estimation des débits de dose prend en compte : (i) la géométrie particulière des daphnies, c'est-à-dire leur forme ellipsoïdale, (ii) la taille et le volume des individus, (iii) la composition organique des organismes (*e.g.* Hydrogène, Carbone, Azote *etc.*) et (iv) la composition organique du milieu de culture. Les DCCs ont été estimés à l'aide de calculs de Monte Carlo (modèle MCNP-4C). La durée des calculs a été ajustée afin d'obtenir avec une incertitude d'estimation strictement inférieure à 1%.

Les DCCs exprimés en $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Bq}^{-1}\cdot\text{mL}$, correspondent aux débits de dose reçus de chaque compartiment par unité d'activité volumique. Ils sont dérivés des particules alpha (5,5 MeV) et bêta (allant de 4,6 KeV à 1,0 MeV) émises par l'Am-241 dans le milieu, avec une distance de propagation allant de 2 à 400 μm . Les DCCs ont été estimés pour chacun des compartiments, à savoir : le milieu d'exposition, les tissus des daphnies et la cuticule (Tableau 13). Les estimations des DCCs prennent en compte les changements de taille et de volume des daphnies au cours du temps. Le volume des daphnies a été calculé en considérant que la taille des daphnies varie de 0,8 à 4,0 mm sur la période de 23 jours. Le volume de la cuticule a été calculé en supposant une épaisseur constante quel que soit le stade de vie de la daphnie (soit 1 μm mesuré microscopique). L'Am-241 absorbé par la paroi des unités expérimentales ne possédait qu'un très faible DCC de $9,0 \times 10^{-5}$ par Bq. Par conséquent, la contribution de ce compartiment n'a représenté qu'une fraction négligeable du débit de dose reçu par les organismes ($\sim 0,01\%$).

Tableau 13. Coefficients de Conversion de Dose (DCCs) utilisés pour estimer les débits de dose (en mGy.h⁻¹) délivrés aux daphnies en fonction de leurs tailles (en mm) et de la concentration en Am-241 dans les tissus internes, la cuticule et le milieu d'exposition (Alonzo *et al.*, 2008).

Taille daphnies (mm)	DCCs (mGy.h ⁻¹ .Bq ⁻¹ .mL)		
	Tissus	Cuticule	Milieu
0,8	2,8 x 10 ⁻³	18,1 x 10 ⁻⁶	2,65 x 10 ⁻⁴
1,0	2,9 x 10 ⁻³	14,5 x 10 ⁻⁶	2,08 x 10 ⁻⁴
2,0	3,0 x 10 ⁻³	7x2 x 10 ⁻⁶	1,05 x 10 ⁻⁴
3,0	3,0 x 10 ⁻³	5,0 x 10 ⁻⁶	0,71 x 10 ⁻⁴
4,0	3,0 x 10 ⁻³	3,7 x 10 ⁻⁶	0,54 x 10 ⁻⁴

Finalement, les niveaux d'exposition d'Am-241 (Bq.mL⁻¹) ont été convertis en débits de dose (DR) suivant la formule :

$$DR = \sum_k DCC_k \times [Am-241]_k \quad (1.1)$$

où DCC_k (mGy.h⁻¹.Bq⁻¹.mL) est le coefficient de conversion de dose du compartiment « *k* » et $[Am-241]_k$ est l'activité volumique (Bq.mL⁻¹) de l'Am-241.

4. Réanalyse statistique des résultats

Avant toute analyse, nous avons besoin de connaître l'investissement d'énergie dans les œufs à partir du nombre cumulé de néonates par daphnies et de la masse des œufs selon les pontes et la concentration d'Am-241. La présente approche a pour objectif : (i) d'estimer l'énergie totale (en masse) investie dans la reproduction au cours du temps pour chaque génération et (ii) de conduire une approche statistique homogène entre l'expérience alpha et gamma afin de rendre la comparaison d'effets plus robuste. Pour ce faire, nous avons utilisé, comme pour l'expérience d'irradiation gamma externe, les équations présentées dans le [Tableau 14](#).

Tableau 14. Équations et paramètres de taille des daphnies associés aux changements de la masse sèche des adultes et des œufs en accord avec la théorie DEB (Kooijman, 2010).

Critères d'effets (unités)	Équations	Paramètres
Taille du corps (mm)	$L_t = L_m - (L_m - L_b) \cdot e^{(-r_B \cdot t)}$ (2.1)	L_m : Taille maximale (mm) L_b : Taille à la naissance (mm) r_B : taux de croissance von Bertalanffy (j^{-1})
Masse sèche du corps (μg)	$W_t = \delta \cdot L_t^3$ (2.2)	δ : Coefficient de forme ($\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$)
Masse sèche des œufs (μg)	$W_t = \beta \cdot L_t + \omega$ (2.3)	β : Pente de régression linéaire ($\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-1}$) ω : Intercetion de régression linéaire (μg)

Ces équations vont nous permettre d'estimer différents jeux de paramètres liés à la croissance (taille et masse) et à la reproduction (masse des œufs) des daphnies, et serviront à moduler l'investissement énergétique par œuf en fonction de la taille des daphnies dans le modèle DEBtox. Les tests statistiques associés aux ajustements des données sont en tous points identiques à ceux de l'expérience d'irradiation gamma externe (cf. PARTIE B, Chapitre 1).

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

Dans ce chapitre, sont présentés les résultats originaux de l'étude d'Alonzo *et al.* (2008) concernant la bioaccumulation, les débits de dose et la survie des daphnies. Puis dans un second temps, les résultats de croissance somatique (taille et masse) et de reproduction réanalysés statistiquement au cours de ces travaux de thèse.

1. Bioaccumulation et débits de dose

La quantité d'Am-241 dans les daphnies augmente en fonction des concentrations d'exposition dans les milieux, variant approximativement d'un ordre de grandeur entre les conditions d'exposition (Figure 48). La quantité d'Am-241 observée varie en fonction de l'âge des daphnies et de la génération concernée.

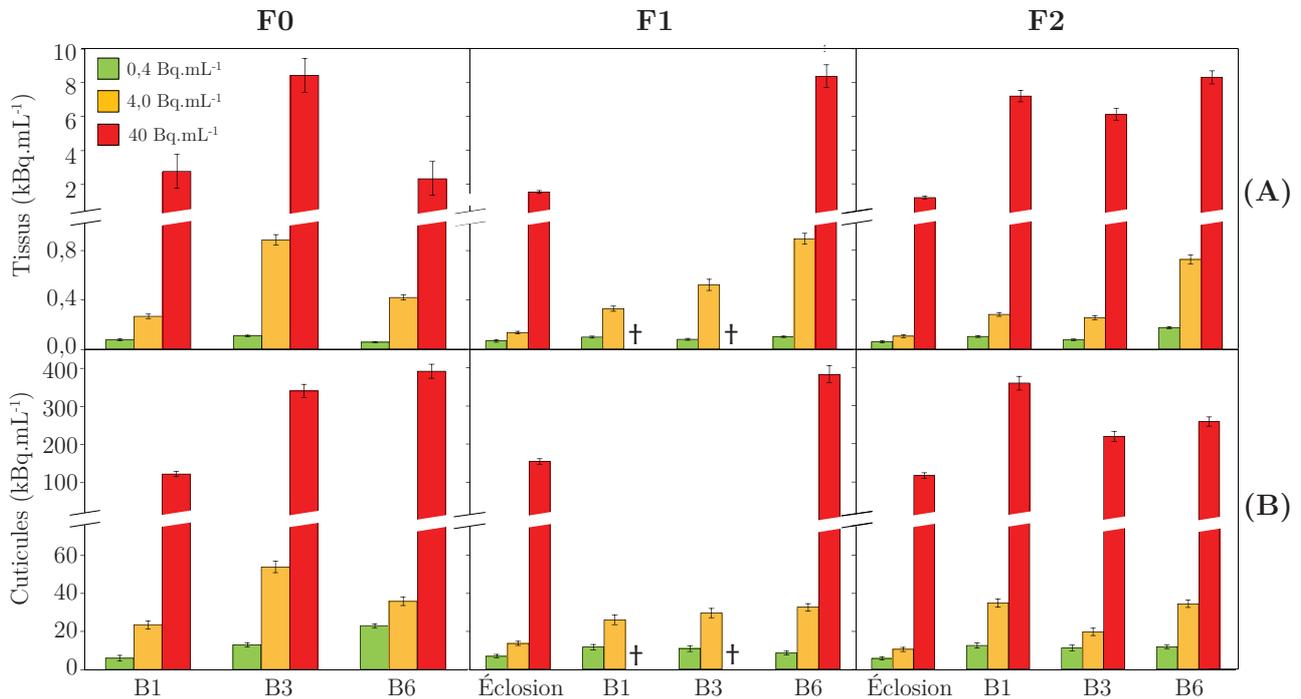


Figure 48. Bioaccumulation de l'Américium (kBq.mL⁻¹) dans les tissus des daphnies (A) et dans leurs cuticules (B) en fonction des concentrations et de leurs âges, correspondant aux dépôts des différentes pontes (B1 : ponte 1, B3 : ponte 3 et B6 : ponte 6) au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Les symboles † indiquent les mesures non réalisées pour cause de mortalité. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types ($n=3$).

Dans la génération F0, la quantité d'Am-241 atteint un maximum dans les tissus des daphnies entre le dépôt des pontes 1 (6 jours) et le dépôt des pontes 3 (12 jours) pour toutes les conditions d'exposition. Une diminution a ensuite été constatée au moment des pontes 6 (23 jours) (Figure 48A). Dans les générations F1 et F2, la quantité d'Am-241 dans les tissus était en constante augmentation pour les deux plus fortes conditions d'exposition (4,0 et 40 Bq.mL⁻¹) jusqu'au moment du dépôt des pontes 6. Pour la plus faible condition d'exposition (0,4 Bq.mL⁻¹), la quantité d'Am-241 dans les tissus des daphnies est restée relativement constante au cours de la génération F1, tandis que dans la génération F2, une légère augmentation de la quantité a été observée à la fin de la période de 23 jours (Figure 48A). À 0,4 Bq.mL⁻¹, la cuticule a contribué à une part importante de la quantité d'Am-241 dans les daphnies, représentant 40% et 33% de la quantité totale (tissus + cuticule) d'Am-241, respectivement chez les néonates et les adultes (Figure 48B). Pour les deux plus fortes conditions d'exposition, cette contribution a été plus faible puisqu'elle ne représente que 27% et 14% de la quantité totale (tissus + cuticule) d'Am-241, respectivement chez les néonates et les adultes (Figure 48B).

Les calculs de débits de dose ont permis d'estimer dans les différentes conditions des valeurs d'exposition moyennes de 0,3 ; 1,53 et 15,0 mGyh⁻¹ (Tableau 15).

Tableau 15. Débits de dose moyens (mGy.h⁻¹) délivrés aux daphnies au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2) en fonction des différentes conditions d'exposition à l'Am-241, de la contribution des tissus et de la cuticule des daphnies.

Conditions d'exposition	Débits de dose (mGy.h ⁻¹)	% de contribution des compartiments	
		Tissus	Cuticule
0,4 Bq.mL ⁻¹			
F0	0,27	81 - 88	12 - 19
F1	0,33	67 - 90	10 - 33
F2	0,37	67 - 92	8 - 33
4,0 Bq.mL ⁻¹			
F0	1,64	87 - 92	8 - 13
F1	1,68	88 - 95	5 - 12
F2	1,19	82 - 94	6 - 18
40 Bq.mL ⁻¹			
F0	14,3	82 - 95	5 - 18
F1	16,7	85 - 94	6 - 15
F2	20,1	91 - 96	4 - 9

Bien que la quantité d'Am-241 dans les cuticules ait été nettement supérieure à celle à l'intérieur des tissus, elle n'a participé qu'à hauteur de 34% au débit de dose reçu par les organismes. La contribution des tissus aux débits de dose a augmenté en fonction de l'âge des daphnies, allant de 66% (dans les néonates < 6 jours) à 92% (dans les adultes de 23 jours) pour le plus faible niveau d'exposition ($0,4 \text{ Bq.mL}^{-1}$). Pour les niveaux d'exposition supérieurs (4 et 40 Bq.mL^{-1}), cette contribution varie de 82% (dans les néonates < 6 jours) à 92% (dans les adultes de 23 jours). Parmi les différentes particules émises par l'Am-241 (principalement alpha et bêta⁻), l'irradiation alpha a contribué à 99% de la dose totale reçue par les organismes, alors que l'irradiation bêta⁻ n'a contribué qu'à seulement 1%. Cette observation suggère que la toxicité de l'Am-241 est essentiellement attribuable à l'irradiation alpha interne des tissus et de la cuticule des daphnies.

Le débit de dose moyen estimé au cours de l'expérience n'est toutefois pas représentatif du stress subi par les organismes, quelles que soient la condition d'exposition et la génération. Le débit de dose alpha interne mériterait d'être estimé au cours du temps en prenant en compte la cinétique progressive de bioaccumulation de l'Am-241. Par conséquent, les résultats à venir de survie, de croissance et de reproduction seront présentés en fonction des concentrations nominales d'exposition.

2. Survie

Aucune mortalité n'a été induite par la contamination alpha interne au cours de la génération F0 (Figure 49). A la plus faible concentration de $0,4 \text{ Bq.mL}^{-1}$, la contamination alpha interne a induit l'apparition de mâles (non reproducteurs) au cours de la génération F2, représentant 31% de la totalité des daphnies (Figure 49A). Cette tendance a également été observée à $4,0 \text{ Bq.mL}^{-1}$, avec une apparition de mâles dans les générations F1 et F2, représentant respectivement 38% et 12% des daphnies totales (Figure 42B). A la plus forte concentration de 40 Bq.mL^{-1} , une importante mortalité de 90 % a été décelée dès le 2^{ème} jour après l'éclosion de la génération F1 (Figure 49C). Une mortalité croissante a également été observée au cours de la génération F2, atteignant 36% de mortalité au bout des 23 jours d'exposition. À cette concentration, la mortalité a principalement touché la fraction de mâles induite par la contamination alpha interne, représentant 43% de la totalité des daphnies de la génération F2.

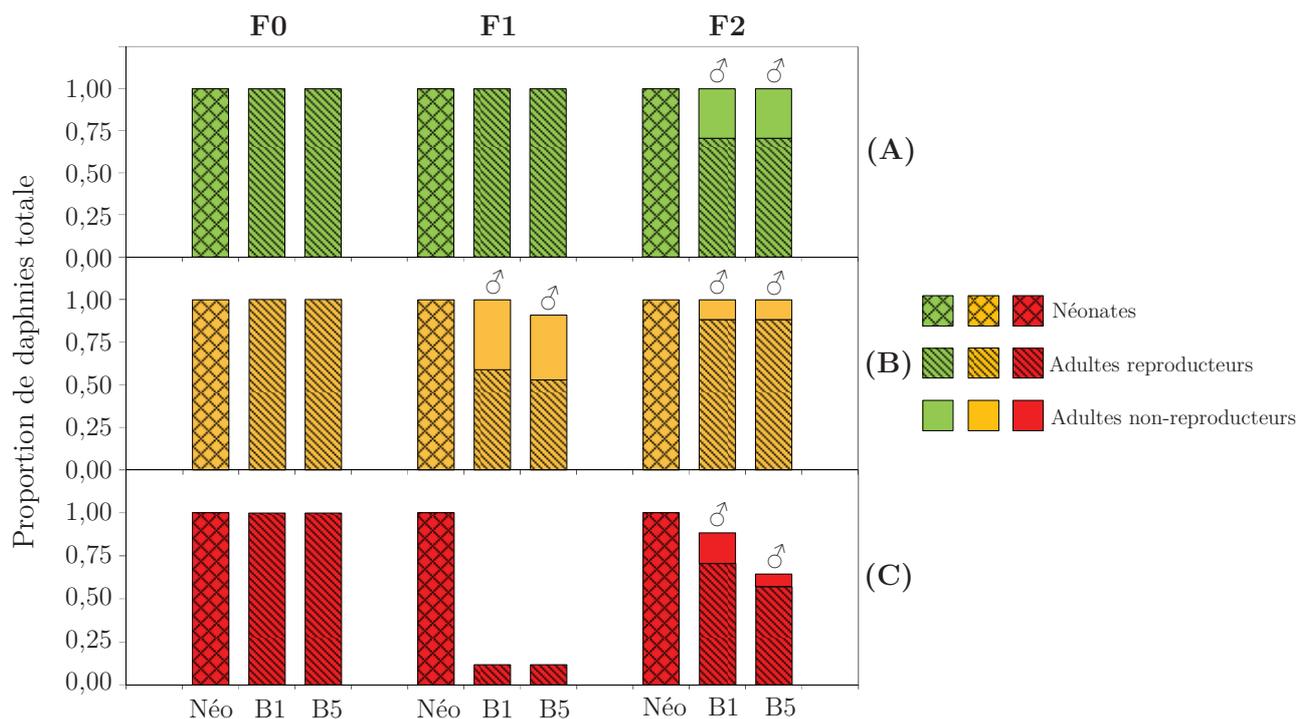


Figure 49. Proportion de daphnies survivantes et reproductrices ($n=10$) aux concentrations d'Am-241 de $0,4 \text{ Bq.mL}^{-1}$ (A), $4,0 \text{ Bq.mL}^{-1}$ (B) et 40 Bq.mL^{-1} (C) en fonction du stade de vie (Néo : Néonates, B1 : libération de la ponte 1, B5 : libération de la ponte 5) dans les trois générations successives F0, F1 et F2. La somme des adultes reproducteurs et non reproducteurs représente les daphnies survivantes. L'apparition de mâles est indiquée par le symbole ♂.

3. Croissance somatique en taille et en masse

La contamination alpha interne a induit une réduction de la taille des daphnies au fil des générations (F0, F1 et F2) dans les différentes conditions d'exposition (Figure 50). Dans la génération F0, une diminution de la taille des daphnies par rapport au témoin a été observée après 23 jours dès $4,0 \text{ Bq.mL}^{-1}$. Ces effets sont principalement associés à des réductions significatives de la taille maximale (L_m) de 5% et 6% pour les daphnies respectivement exposées à $4,0$ et 40 Bq.mL^{-1} ($p \leq 0,05$) (Tableau 16). En revanche, aucun effet significatif sur la taille n'a été décelé dans la génération F1 (Figure 50). Ceci peut être expliqué par le nombre très faible de réplicats dans cette génération en raison de la mortalité survenue à la plus forte concentration. Finalement, des diminutions significatives de la taille ont été observées dans la génération F2 dès la plus faible concentration d'Am-241 de $0,4 \text{ Bq.mL}^{-1}$ ($p \leq 0,01$) (Figure 50). D'une manière générale, ces effets sont associés à des réductions de la taille à la naissance (L_b) et de la taille maximale (L_m) des daphnies par rapport aux témoins ($p \leq 0,01$), allant de 2 à 5% pour la L_b et de 9 à 10% pour la L_m (Tableau 16).

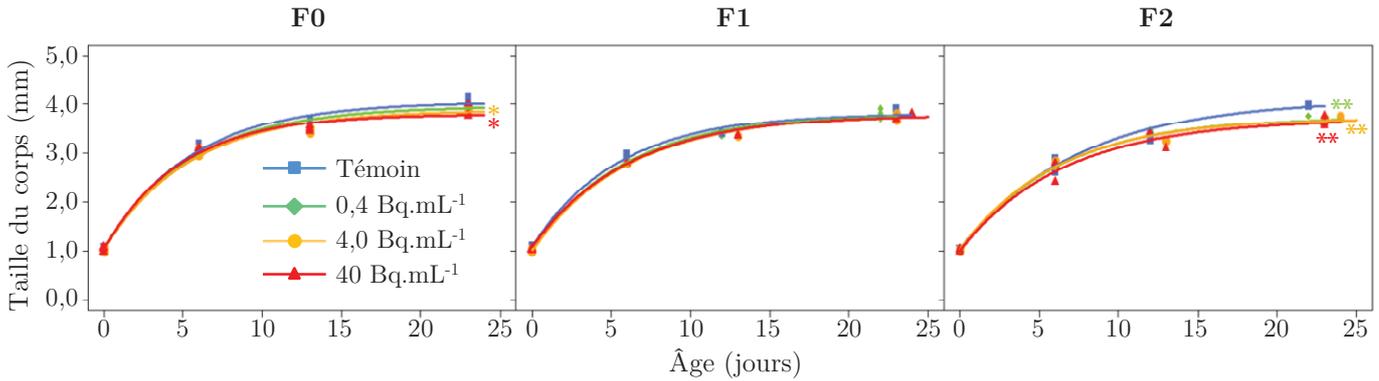


Figure 50. Tailles des daphnies (mm) en fonction de leur âge (en jours) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹. Les symboles représentent les données expérimentales de chaque condition et les courbes représentent les meilleurs ajustements estimés avec le modèle de croissance de von Bertalanffy (Eq. 2.1. Tableau 14). Différences significatives avec le témoin (tests multiples de Holm) : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; $n = 12$.

Contrairement aux précédentes analyses statistiques menées sur la masse sèche des daphnies (Alonzo *et al.*, 2008), les analyses statistiques conduites dans cette partie indiquent que l'Am-241 n'a pas affecté significativement la masse des daphnies au fil des générations et ce, quelle que soit la concentration concernée (Figure 51 et Annexe 6). Ceci s'explique par le fait que les précédentes analyses statistiques menées dans (Alonzo *et al.*, 2008), comparaient la masse des daphnies indépendamment pour chaque temps de prélèvement (*e.g.* éclosion, B1, B3 et B6). Or, pour une analyse statistique robuste des effets sur la croissance somatique en masse, il s'avère plus judicieux et plus pertinent de prendre compte la croissance comme un processus dynamique, c'est-à-dire en comparant simultanément l'intégralité des points de mesures.

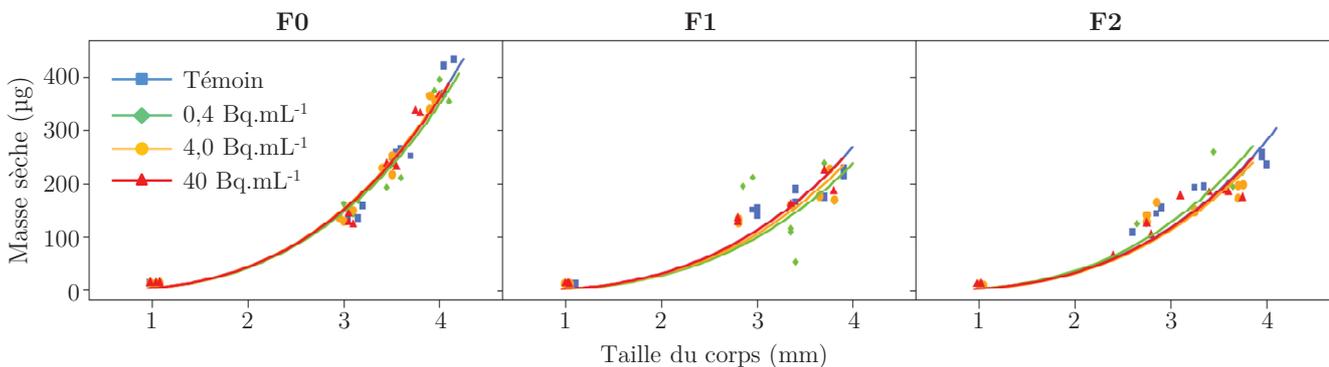


Figure 51. Masse sèche des daphnies (μg) en fonction de leurs tailles (mm) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹. Les données expérimentales ($n = 12$) et les meilleurs ajustements associés sont représentés respectivement par les points et les courbes (Eq. 2.2. Tableau 14). Aucune différence statistique significative.

Tableau 16. Paramètres estimés pour la croissance en taille, la fécondité cumulée sur cinq pontes et l'âge au moment de la libération des pontes 1,3 et 5 pour les daphnies exposées aux concentrations d'Am-241 de ,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Différences statistiques significatives avec le témoin : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. L_m : Taille maximale du corps, L_b : taille du corps à la naissance et r_B : le taux de croissance de von Bertallanfy (j⁻¹). Fécondité cumulée : Moyenne \pm SD (*Standard Deviation*).

Concentrations (Bq.mL ⁻¹)	Taille du corps				Fécondité cumulée			Âge au moment de la libération des pontes								
	L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (d ⁻¹)	p	Moyenne	SD	p	Ponte 1			Ponte 3			Ponte 5		
								Moyenne	SD	p	Moyenne	SD	p	Moyenne	SD	p
0	1,046	4,034	0,186		78,182	8,280		9,455	0,522		15,909	0,302		23,182	0,405	
0,4	1,048	3,956	0,185		76,909	11,095		9,364	0,505		16,000	0,000		23,091	0,302	
4,0	1,045	3,868	0,186	*	78,545	8,779		9,545	0,688		15,909	0,539		22,636	0,674	
40	1,041	3,797	0,210	*	78,909	10,986		9,273	0,647		15,818	0,603		22,545	0,688	
0	1,090	3,815	0,185		57,000	9,626		9,000	0,000		15,500	0,527		22,600	0,966	
0,4	1,042	3,815	0,171		57,636	9,047		9,000	0,000		15,909	0,302		22,727	0,467	
4,0	1,017	3,769	0,168		57,500	6,892		9,000	0,000		15,857	0,378		22,833	0,408	
40	1,024	3,773	0,167		61,000	2,828		11,500	2,100	**	17,500	2,121		23,500	2,121	
0	1,042	4,089	0,132		64,900	8,543		9,000	0,000		15,200	0,422		22,100	0,311	
0,4	0,993	3,728	0,166	**	60,143	9,990		9,000	0,000		15,429	0,535		22,429	0,535	
4,0	1,024	3,712	0,166	**	55,889	7,322		9,200	0,422		15,222	0,441		22,888	0,333	***
40	1,005	3,687	0,155	**	43,000	9,872	***	9,571	0,787	*	16,571	0,876	**	23,429	0,700	***

4. Reproduction

Au sein de chaque génération, les daphnies témoins ont réalisé cinq libérations de pontes successives au cours de la période de 21-23 jours (Figure 52 et Tableau 16). La contamination alpha interne a affecté significativement les temps auxquels les daphnies ont libéré leurs pontes aux concentrations d'Am-241 $\geq 4,0$ Bq.mL⁻¹ dans la génération F1 et F2 (Tableau 16). Dans la génération F1, cet effet significatif concernait la libération de la ponte 1 des daphnies exposées à 40 Bq.mL⁻¹, avec un retard moyen de 2,5 jours ($p \leq 0,05$). Ce retard a été rattrapé progressivement au cours de la génération puisqu'il n'est plus significativement détecté après 16 jours d'exposition (Figure 52). Ce résultat est toutefois à nuancer car il n'y avait que très peu de daphnies survivantes. Dans la génération F2, des retards significatifs ont été observés lors de la libération de la ponte 5 pour les daphnies exposées à 4,0 Bq.mL⁻¹ ($p \leq 0,001$) et durant la libération des pontes 1 à 5 pour les daphnies exposées à 40 Bq.mL⁻¹ ($p \leq 0,05 - p \leq 0,01$) (Figure 52 et Tableau 16). Au plus fort débit de dose de 40 Bq.mL⁻¹, ce retard a atteint la valeur maximale de deux jours au moment de la libération de la ponte 5.

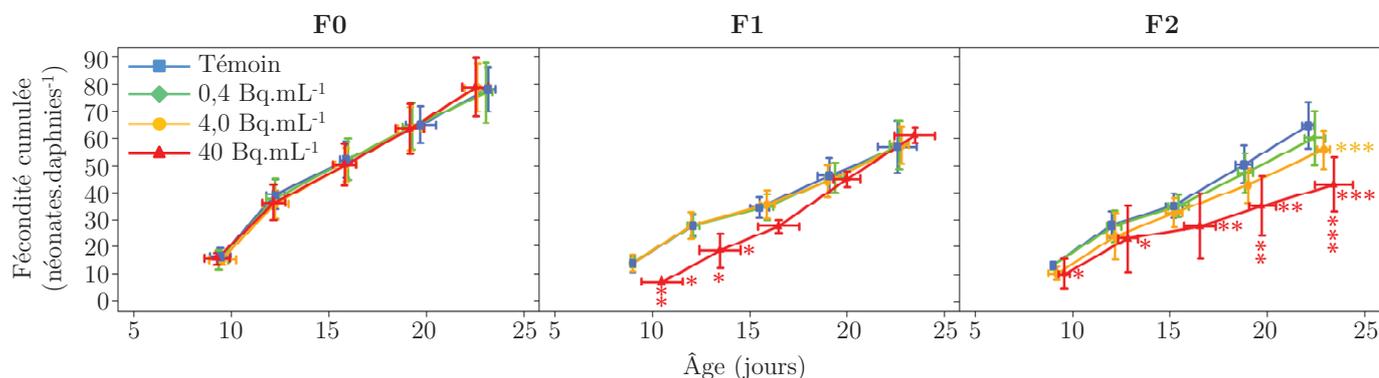


Figure 52. Nombre cumulé de néonates par daphnie en fonction de leurs âges (en jours) au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹. Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; Tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticales et les différences significatives d'âge au moment de la libération des pontes par rapport au témoin (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par des astérisques horizontales : * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; $n = 11$.

Les daphnies témoins ont produits un total de néonates de 78,3 ($\pm 8,28$), 57,0 ($\pm 9,62$) et 64,9 ($\pm 8,54$) respectivement au cours de la génération F0, F1 et F2 (Tableau 16). Aucun effet significatif sur la fécondité n'a été décelé entre les daphnies témoins et exposées de la génération F0. Dans la génération F1, la fécondité des daphnies a été significativement réduite à 40 Bq.mL⁻¹, dans la F1 par rapport aux témoins, avec une diminution de 49% lors libération de la ponte 1 ($p \leq 0,01$) et de 34% lors de la libération de la ponte 2 ($p \leq 0,05$). Cette réduction de fécondité à 40 Bq.mL⁻¹ n'a toutefois pas perduré dans le temps puisque cet effet n'est plus observé après 16 jours d'exposition (Figure 52). Encore une fois ce résultat est à nuancer dû à la forte mortalité dans la génération F1. Dans la génération F2, l'irradiation alpha a induit une réduction significative dès la libération de la ponte 1 à 40 Bq.mL⁻¹, atteignant une réduction de la fécondité totalité de 45% à la fin de la génération ($p \leq 0,001$) (Tableau 16). Les daphnies de la génération F2 exposées à 4,0 Bq.mL⁻¹ présentaient également une réduction de la fécondité totale d'environ 14% par rapport aux témoins. Cette réduction n'était toutefois pas significative due à la variabilité entre les individus exposés.

Les résultats d'ajustements de la masse sèche des œufs indiquent que la masse des œufs augmente de manière linéaire en fonction de la taille des daphnies (Figure 53). Bien que des différences significatives aient été décelées lors des précédentes analyses statistiques (Alonzo *et al.*, 2008), aucune différence statistique significative n'a été trouvée avec notre approche entre les conditions d'exposition, quelle que soit la génération concernée (Annexe 6). Les causes de ces différences entre les deux approches s'expliquent par les mêmes raisons que celles mentionnées dans la section concernant les résultats de croissance somatique en masse.

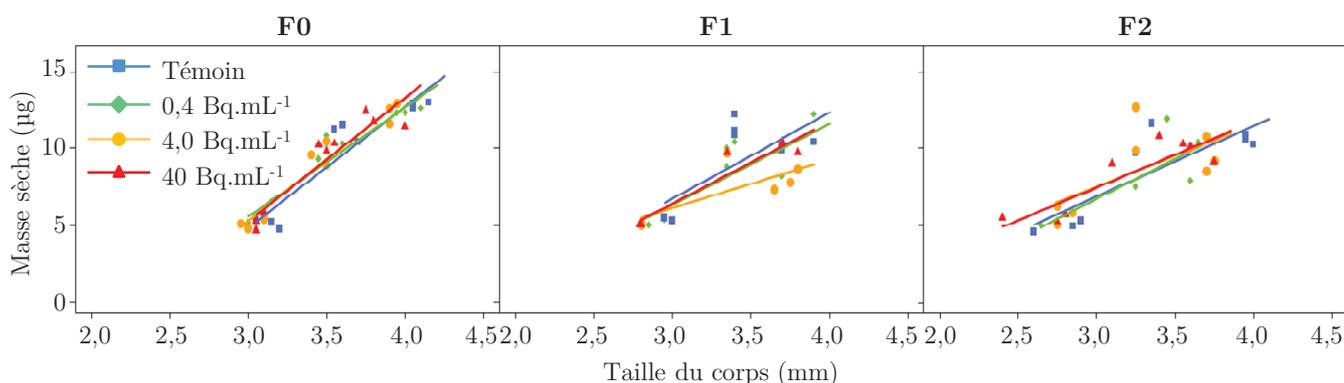


Figure 53. Masse sèche des œufs en fonction de la taille du corps des daphnies adultes au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) exposées aux concentrations d'Am-241 de 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹. Les données expérimentales ($n = 12$) et les meilleurs ajustements associés sont représentés respectivement par les points et les courbes (Eq. 2.3. Tableau 14). Aucune différence statistique significative.

SYNTHÈSE

- Les résultats ont démontré que les effets radiotoxiques de la contamination alpha interne sur les traits d'histoire de vie de *D. magna* augmentent de la génération F0 à F2 (Figure 54).
- Dans la F0, les résultats ont démontré une réduction significative de la taille à 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹, alors que la mortalité et la fécondité n'étaient pas affectées. Les résultats de la F0 contrastent fortement avec ceux observés dans les générations suivantes. La survie a été affectée par une forte réduction à 40 Bq.mL⁻¹ dans la F1 et a également été réduite à tous les concentrations testées en F2. La reproduction a été significativement retardée à 40 Bq.mL⁻¹ en F1 et F2, et la fécondité a été significativement réduite à 40 Bq.mL⁻¹ dans la F2. Une tendance à la réduction de la fécondité et un retard significatif de libération de ponte est également observée dans cette même génération à 4,0 Bq.mL⁻¹. La croissance a continué d'être progressivement affectée par la contamination alpha interne entre la F0 et la F2, avec des réductions significatives à toutes les concentrations testées en F2.

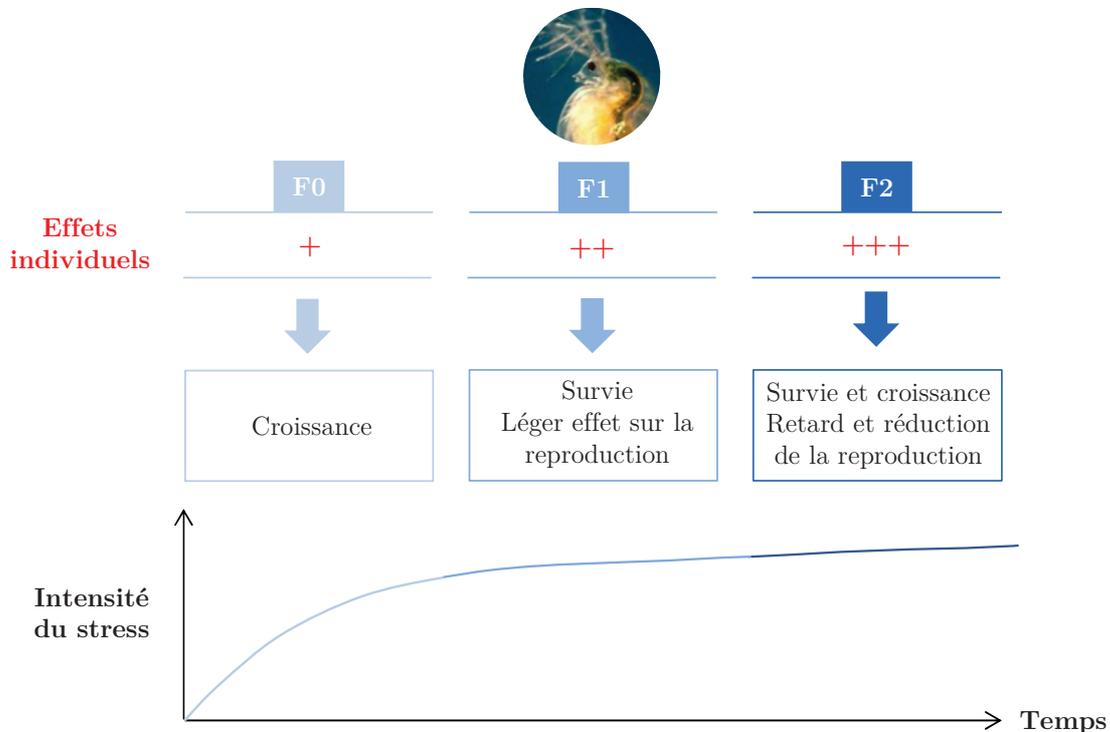


Figure 54. Synthèse des effets de la contamination alpha interne à l'échelle individuelle.

PARTIE D

COMPARAISON MÉCANISTE DE LA
RADIOTOXICITÉ GAMMA ET ALPHA DANS UN
CONTEXTE MULTIGÉNÉRATIONNEL : MODES
D'ACTION MÉTABOLIQUES ET EFFICACITÉ
BIOLOGIQUE RELATIVE

Dans cette partie, il est dans un premier temps présenté l'adaptation du modèle DEBtox aux situations d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne, ainsi que les résultats découlant de l'analyse des données issues des expériences. Dans un second temps, sont présentées les méthodes de calculs et les résultats de l'estimation de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha. Une discussion générale accompagne ces deux parties.

CHAPITRE 1

APPLICATION AU MODÈLE DEBTOX

1. Formulation du modèle

1.1. Choix des hypothèses du modèle

Basée sur la même approche que celle développée sur *D. magna* exposée à l'U appauvri (Alonzo *et al.*, 2014), nous utilisons des compartiments de dommages transgénérationnels pour prendre en compte la variation de l'intensité des effets radiotoxiques gamma et alpha au fil des générations des deux expériences. Les résultats de ces deux études montrent dans les deux cas une augmentation générale de la sévérité des effets sur les traits d'histoire de vie des daphnies au fil des générations (Partie B et C). En revanche, le scénario d'exposition, le mécanisme d'induction et la cinétique des effets sont différents entre les deux expériences. De ce fait, nous avons défini des modules cinétiques différents pour décrire la variation du stress radiologique induit par les rayonnements gamma et alpha. Des cinétiques de dommages spécifiques aux deux types de rayonnements sont présentées dans les sections suivantes.

1.2. Choix d'une métrique de référence

Dans le cas des contaminants chimiques, les modèles DEBtox se basent sur la concentration internalisée du contaminant comme métrique à laquelle le stress est corrélé. Appliquer l'approche DEBtox au cas des radiations ionisantes implique qu'une métrique soit définie pour rendre compte du stress radiologique alpha et gamma. Dans notre projet, la métrique choisie est le débit de dose « *DR* », pour « *Dose Rate* ». Pour rappel, la dose (en Gy ou mGy) définit la quantité d'énergie déposée par unité de masse et le débit de dose (en Gy.h⁻¹ ou mGy.h⁻¹) représente sa quantité par unité de temps. Ainsi, l'apparition du dommage radiologique (équivalent d'une concentration interne en facteur toxique) au cours du temps peut être supposée proportionnelle au débit de dose *DR*, exprimé par unité de masse volumique et de temps.

1.3. Cas de l'irradiation gamma externe

Au cours de l'expérience d'irradiation externe, le débit de dose gamma moyen « DR_γ » ($\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) reçu par les daphnies est supposé être constant au cours du temps (Figure 55), malgré les variations possibles de distance entre les organismes et la source de Cs-137. Étant constant, le débit de dose ne permet pas à lui seul d'expliquer l'aggravation des effets observés au fil des générations.

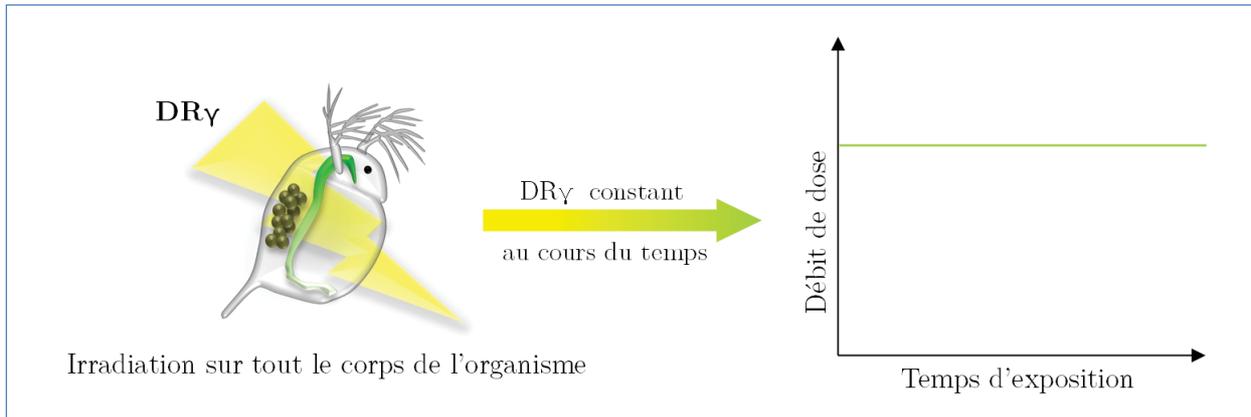


Figure 55. Irradiation gamma externe constante au cours du temps.

Les cinétiques de dommages mises en place dans notre modèle doivent prendre en compte la cinétique particulièrement complexe des effets au fil des générations, à savoir : une augmentation de la sévérité des effets de la génération F0 à la génération F2 et une diminution transitoire de l'intensité des effets au début de la génération F1. Cette observation suggère que les daphnies possédaient une capacité de réparation plus efficace dans la génération F1 que dans la génération F0.

Afin de prendre en compte cette hypothèse, nous avons assigné des taux de réparation différents pour la génération F0 et les générations F1 - F2, avec $k_{r\text{F0}} < k_{r\text{F1-F2}}$.

Un premier compartiment de dommages (1) est défini par les équations suivantes :

$$(1) \left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r\text{F0}} (DR_\gamma - D_1^*) \quad \text{pour la génération F0} \quad (1.3) \\ \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r\text{F1-F2}} (DR_\gamma - D_1^*) \quad \text{pour les générations F1 et F2} \quad (1.4) \end{array} \right.$$

avec D_1^* le niveau de dommages normalisé ($\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) du compartiment de dommages (1), DR_γ le débit de dose gamma ($\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$), $k_{r\text{F0}}$ le taux de réparation (temps^{-1}) spécifique de la génération F0 et $k_{r\text{F1-F2}}$ le taux de réparation (temps^{-1}) spécifique des générations F1 et F2.

Ce premier compartiment de dommages ne permet pas à lui seul d'expliquer l'aggravation et la nature différente des effets observés au fil des générations. Pour rappel, les effets dans les générations F0 et F1 sont principalement représentés par des réductions de la reproduction alors que dans la génération F2, l'aggravation des effets est majoritairement représentée par des retards de croissance et de reproduction. Par conséquent, nous avons introduit un second compartiment de dommages transgénérationnel afin de caractériser ces effets. Ce second compartiment de dommages (2) est défini par l'équation suivante :

$$(2) \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_2^*}{dt} = k_{r_2} (DR_\gamma - D_2^*) \end{array} \right. \text{ pour les générations F0, F1 et F2} \quad (1.5)$$

avec D_2^* le niveau de dommages normalisé ($\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) du compartiment de dommages (2), DR_γ le débit de dose gamma ($\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$), k_r le taux de réparation des dommages (temps^{-1}) commun à toutes les générations F0, F1 et F2.

1.4. Cas de la contamination alpha interne

Au cours de l'expérience de contamination interne, le débit de dose alpha « DR_α » varie potentiellement en fonction de la taille des daphnies et de la cinétique d'internalisation de l'Am-241 dans la cuticule et les tissus des daphnies (cf. [Partie C](#)). Le scénario d'exposition varie également en fonction des générations, puisque la première génération est exposée seulement après l'éclosion des néonates, alors que les générations suivantes le sont dès le dépôt des œufs.

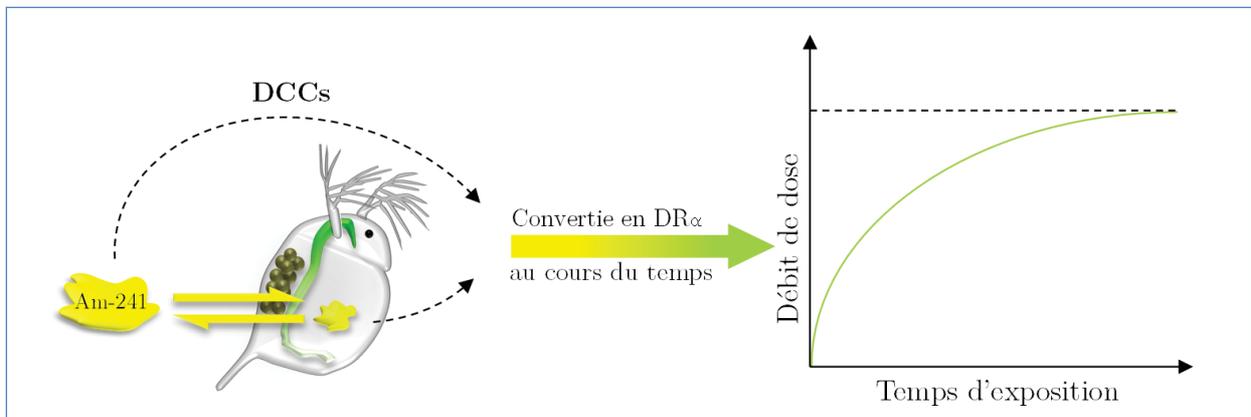


Figure 56. Contamination alpha interne convertie en DR_α au cours du temps.

L'accumulation de l'Am-241 (Figure 56) dans la cuticule (C_s) et les tissus (C_v) est décrite en utilisant un modèle à un compartiment unique avec une cinétique de premier ordre. Nous considérons que l'internalisation de l'Am-241 dans la cuticule C_s , suit la même cinétique que celle dans les tissus C_v , suivant un rapport de proportionnalité fixe noté, $k_{s/v}$. Les données de bioaccumulation sont celles qui ont été présentées dans la Partie C de ce manuscrit. L'équation définissant l'internalisation de l'Am-241 dans les tissus et la cuticule est la suivante :

$$\frac{C_v}{dt} = C_e \frac{k_a}{l} - C_v \left(\frac{k_e}{l} + \frac{d}{dt} \ln l^3 \right) \quad (1.6)$$

avec C_v la concentration d'Am-241 internalisée dans les tissus (en Bq.mL⁻¹) qui est diluée par la croissance des daphnies au cours du temps, selon $\frac{d}{dt} \ln l^3$, k_a et k_e représentent respectivement les taux d'accumulation et d'élimination (temps⁻¹) de l'Am-241, et C_e correspond à la concentration d'Am-241 dans le milieu (en Bq.mL⁻¹).

L'équation définissant l'internalisation de l'Am²⁴¹ dans les cuticules est la suivante :

$$C_s = k_{s/v} \times C_v \quad (1.7)$$

avec C_s et C_v la concentration d'Am-241 internalisée dans la cuticule et les tissus (en Bq.mL⁻¹) et $k_{s/v}$ le rapport entre les concentrations.

Le débit de dose alpha DR_α (Figure 56 et 57) a été calculé en utilisant les Coefficients de Conversion de Dose (DCC, cf. Partie C) dépendants de la taille « L » des daphnies pour chaque compartiment, à savoir : le milieu d'exposition, la cuticule et les tissus :

$$DR_\alpha = \sum_k DCC_k \times C_k \quad (1.8)$$

$$\text{avec } \begin{cases} DCC_e = 1,45 \times 10^{-5} \times L^{-0,987} \\ DCC_s = 2,10 \times 10^{-4} \times L^{-0,985} \\ DCC_v = 2,86 \times 10^{-3} \times L^{0,0408} \end{cases}$$

où DCC_k (mGy.h⁻¹.Bq⁻¹.mL) est le coefficient de conversion de dose et C_k est l'activité volumique (Bq.mL⁻¹) de l'Am-241 dans le compartiment k .

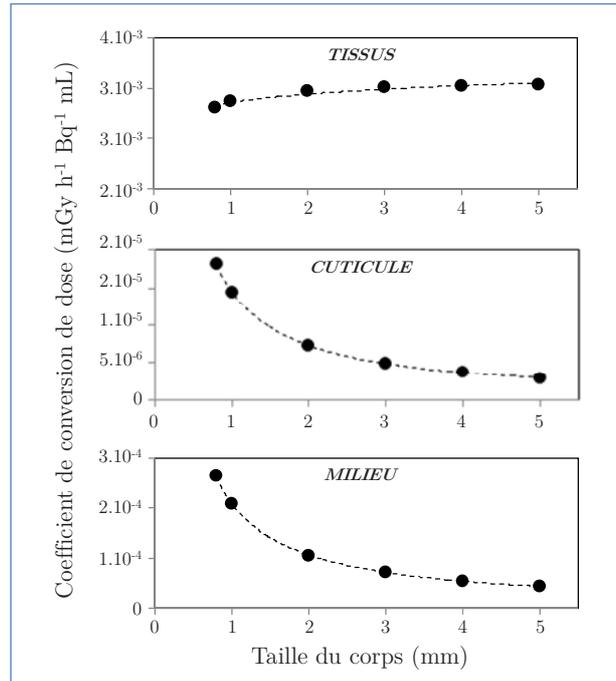


Figure 57. Représentation des variations de Coefficients de Conversion de Dose (DCC, mGy.h⁻¹.Bq⁻¹.mL) en fonction de la taille des daphnies (mm), utilisés pour convertir la concentration d'Am-241 (Bq.mL⁻¹) en débit de dose alpha (DR_α, mGy.h⁻¹) dans les différents compartiments (tissus, cuticule et milieu).

Les cinétiques de dommages mises en place pour ce modèle doivent prendre en compte la nature et la variation des effets au fil des générations. De manière analogue à l'irradiation gamma, nous avons choisi d'introduire deux compartiments de dommages transgénérationnels afin de répondre à nos objectifs. Les équations définissant ces deux compartiments de dommages (1 et 2) sont les suivantes pour toutes les générations :

$$(1) \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r1} (DR_\alpha - D_1^*) \end{array} \right. \quad (1.9)$$

$$(2) \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_2^*}{dt} = k_{r2} (DR_\alpha - D_2^*) \end{array} \right. \quad (1.10)$$

avec D_1^* et D_2^* les niveaux de dommages normalisés (mGy.h⁻¹) des compartiments de dommages (1 et 2), DR_α le débit de dose alpha (mGy.h⁻¹), k_{r1} et k_{r2} les taux de réparation des dommages (temps⁻¹) des deux compartiments.

1.5. Dynamique des effets

1.5.1. Fonctions de stress

Pour les deux types de rayonnements, les compartiments de dommages sont supposés agir indépendamment au travers de deux fonctions de stress, σ_1 et σ_2 associées à deux modes d'action distincts (1) et (2) et corrélées à deux niveaux de dommage héritable D_1^* et D_2^* . Les fonctions de stress σ_1 et σ_2 sont exprimées par les formules suivantes :

$$\text{Mode d'action 1} \begin{cases} \sigma_1(D_1^*) = 0 & \text{si } D_1^* < NED_1 \\ \sigma_1(D_1^*) = b_1 \cdot (D_1^* - NED_1) & \text{si } D_1^* \geq NED_1 \end{cases} \quad (1.11)$$

$$\text{Mode d'action 2} \begin{cases} \sigma_2(D_2^*) = 0 & \text{si } D_2^* < NED_2 \\ \sigma_2(D_2^*) = b_2 \cdot (D_2^* - NED_2) & \text{si } D_2^* \geq NED_2 \end{cases} \quad (1.12)$$

avec D_1^* et D_2^* les niveaux de dommages normalisés des compartiments de dommages 1 et 2 ($\text{mGy} \cdot \text{h}^{-1}$), b_1 et b_2 les pentes d'intensité de stress associées aux modes d'action 1 et 2 ($\text{mGy} \cdot \text{h}^{-1}$), NED_1 et NED_2 les niveaux de dommages sans effet (*No Effect Damage*) associés aux modes d'action 1 et 2 ($\text{mGy} \cdot \text{h}^{-1}$).

1.5.2. Choix des modes d'action

Les modes d'action métaboliques 1 et 2 ont été choisis spécifiquement pour chaque type de rayonnement. En considérant que la reproduction des daphnies (production d'œufs) est fonction de leur taille, les réductions de tailles observées sont trop faibles pour expliquer les effets sur la reproduction quels que soient le type de rayonnement et la condition d'exposition considérés. Par conséquent, pour les deux types de rayonnements, le premier mode d'action (1) affecte uniquement la reproduction et le second mode d'action (2) affecte la croissance et la reproduction. Les combinaisons de modes d'action testées sont présentées dans le [Tableau 17](#).

Tableau 17. Combinaisons de modes d'action testées pour les rayonnements gamma et alpha. Les modes d'action affectant directement la reproduction correspondent à une augmentation des coûts de production d'un œuf (*Modèle Coûts*) et une mortalité pendant l'ovogenèse (*Modèle Hasard*). Les modes d'action affectant indirectement la croissance et la reproduction, correspondent à une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle Croissance*), et une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (*Modèle de Maintenance*).

Rayonnement gamma	Rayonnement alpha
Mode d'action 1 / Mode d'action 2	Mode d'action 1 / Mode d'action 2
<i>Coûts / Croissance</i>	<i>Coûts / Croissance</i>
	<i>Hasard / Croissance</i>
<i>Hasard / Croissance</i>	<i>Coûts / Maintenance</i>

L'ensemble des équations et une représentation conceptuelle des modèles DEBtox utilisés pour analyser les données d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne sont résumés dans le [Tableau 18](#) et la [Figure 58](#).

Tableau 18. Équations et hypothèses communes ou distinctes entre les analyses DEBtox menées sur l'irradiation gamma externe et la contamination alpha interne.

Irradiation gamma externe	Contamination alpha interne
Source de Cs-137 externe	Contamination à l'Am-241 $C_e = \text{constante}$ $\frac{C_v}{dt} = C_e \frac{k_a}{l} - C_v \left(\frac{k_e}{l} + \frac{d}{dt} \ln l^3 \right)$ $C_s = k_{s/v} \times C_v$
Débit de dose gamma DR γ constant au cours du temps	Débit de dose alpha $DR_\alpha = DCC_e \times C_e + DDC_s \times C_s + DCC_v \times C_v$ $DCC_e = 1,45 \times 10^{-5} \times L^{-0,987}$ $DCC_s = 2,10 \times 10^{-4} \times L^{-0,985}$ $DCC_v = 2,86 \times 10^{-3} \times L^{0,0408}$
Niveau de dommages 1 $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r_{F0}} (DR_\gamma - D_1^*) \quad \text{en F0} \\ \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r_{F1-F2}} (DR_\gamma - D_1^*) \quad \text{en F1 et F2} \end{array} \right.$	Niveau de dommages 1 $\left\{ \frac{dD_1^*}{dt} = k_{r_1} (DR_\alpha - D_1^*) \quad \text{en F0, F1, F2} \right.$
Niveau de dommages 2 $\left\{ \frac{dD_2^*}{dt} = k_{r_2} (DR_{\gamma\alpha} - D_2^*) \quad \text{en F0, F1, F2} \right.$	
Mode d'action 1 (affectant uniquement la reproduction) $\left\{ \begin{array}{ll} \sigma_1(D_1^*) = 0 & \text{si } D_1^* < NED_1 \\ \sigma_1(D_1^*) = b_1 \cdot (D_1^* - NED_1) & \text{si } D_1^* \geq NED_1 \end{array} \right.$ Mode d'action 2 (affectant la taille et la reproduction) $\left\{ \begin{array}{ll} \sigma_2(D_2^*) = 0 & \text{si } D_2^* < NED_2 \\ \sigma_2(D_2^*) = b_2 \cdot (D_2^* - NED_2) & \text{si } D_2^* \geq NED_2 \end{array} \right.$	
Combinaison de modes d'action testées <ul style="list-style-type: none">- Coûts / Croissance- Hasard / Croissance	Combinaison de modes d'action testées <ul style="list-style-type: none">- Coûts / Croissance- Hasard / Croissance- Coûts / Maintenance

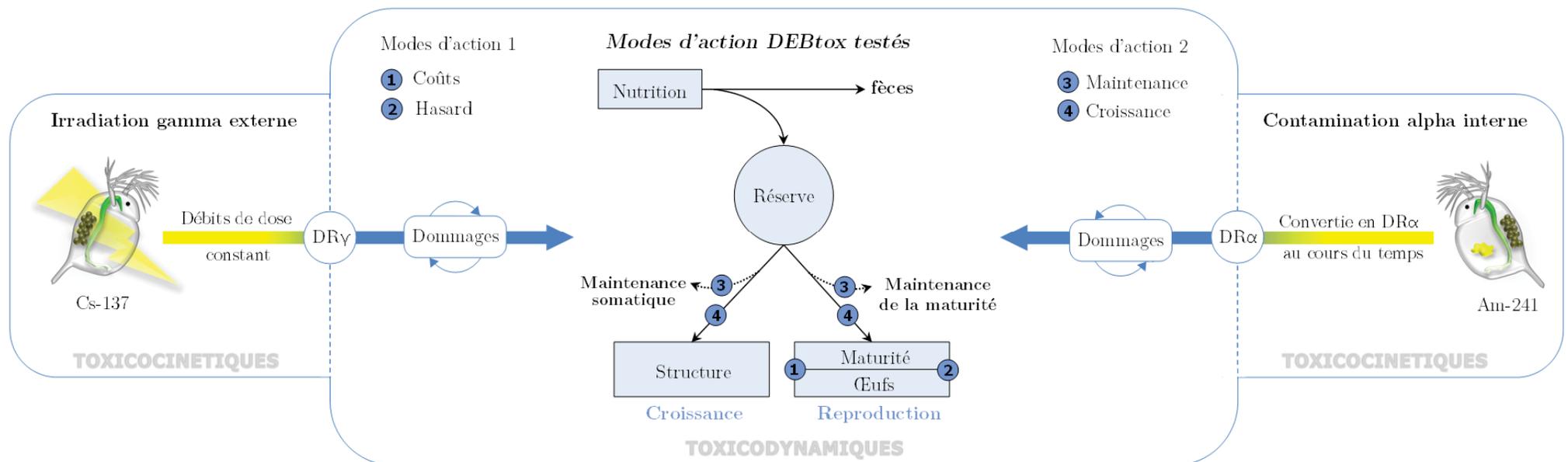


Figure 58. Représentation des modèles DEBtox utilisés pour analyser les données des expériences d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne. Seuls les modes d'action testés au cours des analyses sont représentés sur la figure.

2. Ajustements de la croissance et de la reproduction

2.1. Individus non exposés

La croissance et la reproduction des individus non exposés sont déterminées par l'intégration des équations suivantes :

A partir de $l(0) = l$ et $R(0) = 0$ et avec $R(l) = 0$ si $l < l_p$

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B (f - l) \quad (1.13)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] \quad (1.14)$$

2.2. Croissance et reproduction des individus exposés

Les équations relatives à la détermination de la croissance et la reproduction des individus exposés aux rayonnements gamma et alpha sont présentées ci-dessous, où les fonctions de stress σ_1 et σ_2 sont associées aux modes d'action 1 et 2 :

A partir de $l(0) = l$ et $R(0) = 0$ et avec $R(l) = 0$ si $l < l_p$

Hasard – Croissance :

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B \left(\frac{f+g}{f+g(1+\sigma_2)} \right) (f - l) \quad (1.15)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1+\sigma_2)+l}{g(1+\sigma_2)+f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma_1} \quad (1.16)$$

Coûts - Croissance

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B \left(\frac{f+g}{f+g(1+\sigma_2)} \right) (f - l) \quad (1.17)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1+\sigma_2)+l}{g(1+\sigma_2)+f} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma_1)^{-1} \quad (1.18)$$

Coûts - Maintenance

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B (f - l (1 + \sigma_2)^{-1}) \quad (1.19)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} (1 + \sigma_2) \left[fl^2 \left(\frac{g(1+\sigma_2)^{-1}+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma_1)^{-1} \quad (1.20)$$

Tableau 19. Liste des paramètres DEBtox utilisés dans les équations.

Symbole	Unité	Interprétation
<i>Paramètres génériques</i>		
f	[-]	Réponse nutritive fonctionnelle
g	[-]	Ratio de l'investissement de l'énergie
<i>Paramètres physiologiques</i>		
L_m	mm	Taille maximale
L_b	mm	Taille à la naissance
L_p	mm	Taille à la puberté
l	[-]	Taille normalisée par la taille maximale
l_b	[-]	Taille à la naissance normalisée par la taille maximale
l_p	[-]	Taille à la puberté normalisée par la taille maximale
r_B	j^{-1}	Taux de croissance de von Bertalanffy
R	$\mu\text{g.oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction journalier
R_{cum}	$\mu\text{g.oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction maximum
<i>Paramètres toxicocinétiques-toxicodynamiques</i>		
σ	[-]	Facteur de stress
NED	mGy.h^{-1}	Niveau de dommage sans effet
b	mGy.h^{-1}	Pente d'intensité de stress
kr	j^{-1}	Taux de réparation du dommage
ka	j^{-1}	Taux d'accumulation de l'Am-241
ke	j^{-1}	Taux d'élimination de l'Am-241
ks/v	[-]	Rapport entre la concentration d'Am-241 dans les tissus et la cuticule

3. Paramétrage du modèle

3.1. Méthode d'ajustement

En accord avec Jager *et al.* (2004), le paramétrage du modèle est réalisé simultanément sur les données de croissance et de reproduction. L'ajustement simultané permet de prendre en compte le lien entre les deux grandeurs. Les résultats des expériences gamma et alpha confirment que la masse des œufs était fortement corrélée à la taille des daphnies (Partie B et Partie C). Les femelles de grande taille produisent des œufs de plus grande masse, l'utilisation de la masse des œufs pour l'investissement énergétique semble donc plus judicieuse et apporte une valeur plus correcte que l'utilisation du nombre d'œufs. Les ajustements des données de reproduction sont donc réalisés en utilisant la masse cumulée des œufs.

Les équations du DEBtox relatives aux individus non exposés et exposés ont été paramétrées séparément. Dans un premier temps, la méthode consiste à estimer les paramètres physiologiques des individus non exposés. Ces paramètres (L_b , l_p , L_m , r_B et R_m) sont estimés à partir des jeux de données provenant des daphnies témoins de chaque expérience et permettent de décrire leur état physiologique. La nomenclature de ces paramètres physiologiques est présentée dans le Tableau 19. La qualité des ajustements des données témoins est une étape fondamentale, puisque c'est sur cette base que l'analyse des effets chez les individus exposés est réalisée. Dans un second temps, des paramètres toxicocinétiques-toxicodynamiques sont estimés à partir des jeux de données provenant des daphnies exposées aux rayonnements gamma et alpha. Ces paramètres (σ , NED , b , k_r , k_a , k_e , $k_{s/v}$) décrivent comment le stress radiologique alpha et gamma vient modifier le modèle des daphnies témoins préalablement ajusté. La nomenclature de ces paramètres toxicocinétiques-toxicodynamiques est présentée dans le Tableau 19.

3.2. Critère d'optimisation

Toutes les données sont ajustées selon le critère des moindres carrés (Lika *et al.*, 2011). Pour chacune des deux expériences, les différentes combinaisons de modes d'actions ont été ajustées et comparées avec cette méthode. Elle consiste à minimiser la somme des carrés des écarts RSS entre les points de données expérimentales et les points théoriques du modèle. Le but étant d'obtenir un jeu de paramètres θ définissant un modèle le plus proche possible des données expérimentales. Une pondération des sommes des carrés des écarts est utilisée pour ajuster les différentes grandeurs Y , à savoir: (i) la croissance (en mm), (ii) la reproduction des daphnies (en μg) non-exposées et exposées aux rayonnements gamma et alpha, et (iii) l'Am-241 contenu dans les tissus et la cuticule des daphnies exposées à l'Am-241.

Dans le cas de la contamination alpha interne, les quantités d'Am-241 Q_S et Q_V prédites respectivement dans la cuticule et les tissus des daphnies ont été ajustées aux données de mesures expérimentales provenant de l'étude d'Alonzo *et al.* (2008). Les valeurs de Q_S et de Q_V ont été estimées selon l'équation :

$$Q_t = C_V \times V_t \quad (1.21)$$

avec

$$V_t = \frac{4}{3} \pi \times (x y z) \quad (1.22)$$

en considérant que les daphnies sont de forme ellipsoïdale, avec x, y et z représentant les trois demi-axes en longueur ($y = 0,5 L$), largeur ($y = 0,2 L$), et hauteur ($z = 0,3 L$) d'une daphnie de taille L (dimension en mm).

Ainsi, la quantité d'Am-241 (en Bq) dans la cuticule Q_S et les tissus Q_V d'une daphnie de taille L est donnée par :

$$Q_V = C_V \left(\frac{4}{3} \times \pi \times 0,5 \times 0,3 \times 0,2 \times L^3 \right) = C_V (0,04 \times \pi \times L^3)$$

$$Q_S = C_S \left(0,04 \times \pi \times L^3 - \frac{4}{3} \times \pi \times (0,5 \times L - 0,001)(0,3 \times L - 0,001)(0,2 \times L - 0,001) \right)$$

où C_S et C_V correspondent à la concentration d'Am-241 (en Bq.mL⁻¹) respectivement dans la cuticule et les tissus, et L est la taille des daphnies (en mm).

Les sommes des carrés des écarts moyens RSS sont calculées pour chacune des grandeurs Y en utilisant l'équation suivante (d'après Jager et Zimmer, 2012):

$$RSS(\theta; Y) = \sum_j \frac{1}{n_r(Y, j)} \sum_r^{n_r(Y, j)} \left(\frac{\hat{Y}_{ji}(\theta) - Y_{jir}}{\hat{\sigma}(Y_{ji})} \right)^2 \quad (1.23)$$

avec $n_r(Y, j)$ le nombre d'observations de Y dans la condition j (à tous les Y_{jir} temps), $\hat{Y}_{ji}(\theta)$ la valeur estimée de Y pour les paramètres θ dans la condition j au temps i , Y_{jir} le réplicat observé de la mesure Y dans la condition j au temps i et $\hat{\sigma}(Y_{ji})$ l'écart-type des observations de Y estimée dans la condition j au temps i . La contribution des données de croissance et de reproduction (ainsi que celle de la quantité d'Am-241 dans les tissus et la cuticule dans le cas de la contamination alpha interne) au critère d'ajustement a été équilibrée en utilisant le facteur de pondération $w_{(Y)}$:

$$wRSS = \sum_Y w_{(Y)} \cdot RSS(\theta; Y) \quad (1.24)$$

où $w_{(Y)}$ est calculée selon :

$$w_{(Y)} = \frac{1}{RSS_{min}(Y)} \quad (1.25)$$

avec

$$RSS_{min}(Y) = \sum_j \frac{1}{n_r(Y, j)} \sum_r^{n_r(Y, j)} \left(\frac{\bar{Y}_{ji} - Y_{jir}}{\hat{\sigma}(Y_{ji})} \right)^2 \quad (1.26)$$

où \bar{Y}_{ji} est la valeur moyenne des observations Y dans la condition j et au temps i .

Dans le but d'explorer au mieux l'espace des paramètres du modèle, chaque recherche de minimum de $wRSS$ a été réalisé de nombreuses fois (1000 itérations) et avec différentes valeurs initiales de paramètres afin d'éviter au modèle de converger vers des miniums locaux.

4. Résultats

4.1. Ajustements des individus non-exposés

Pour chacune des deux expériences, le modèle DEBtox ajusté aboutit à une bonne description des données de croissance et de reproduction des individus témoins (Figures 59 et 60).

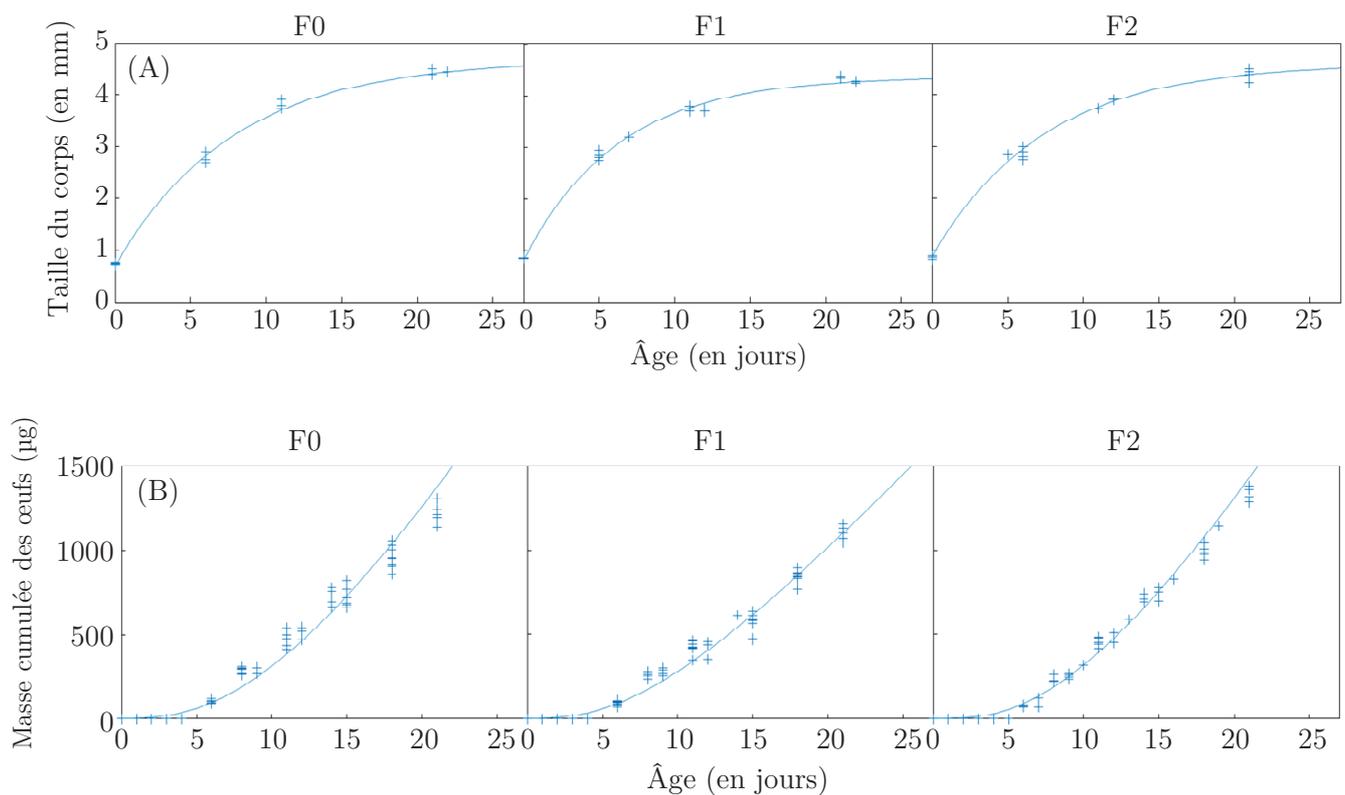


Figure 59. Ajustements des données de croissance (A) et de reproduction (B) des individus témoins de l'expérience multigénérationnelle (F0, F1 et F2) d'irradiation gamma externe. Points (+) : données observées. Ligne (—) : prédiction du modèle.

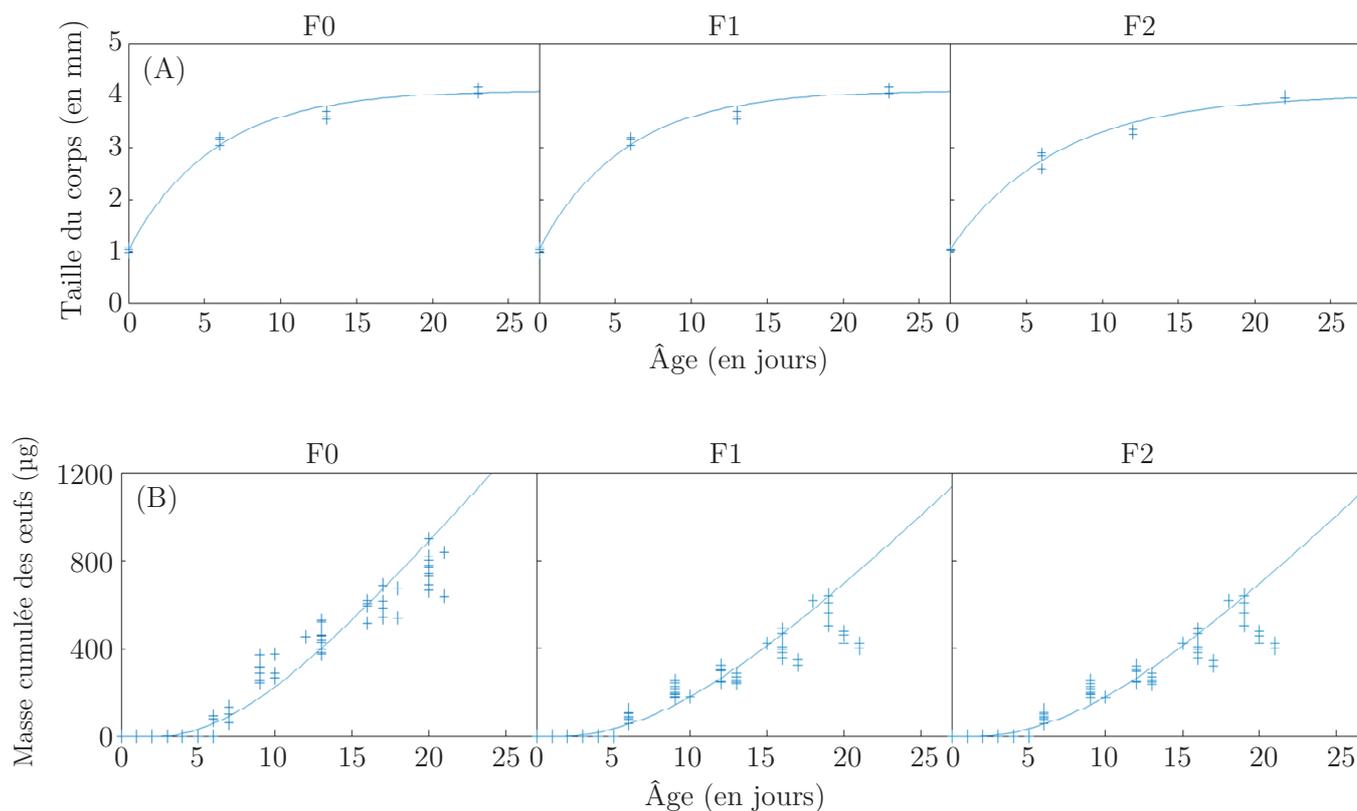


Figure 60. Ajustements des données de croissance (A) et de reproduction (B) des individus témoins de l'expérience multigénérationnelle (F0, F1 et F2) de contamination alpha interne. Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.

Les paramètres physiologiques ajustés pour chaque expérience et générations sont présentés dans le [Tableau 20](#). Différentes valeurs de paramètres physiologiques ont été estimées entre les générations successives des expériences gamma et alpha. Dans les deux cas, un ajustement simultané sur les trois générations n'était pas satisfaisant en raison de différences observées principalement sur la reproduction rendant un ajustement nécessaire pour chaque génération. Ces différences observées entre les générations sont le fruit de légères fluctuations expérimentales entre les générations telles que la qualité de la nourriture qui est difficilement contrôlable. Celles-ci ne remettent toutefois pas en cause la validité des résultats expérimentaux puisque, dans les deux cas, la reproduction sur 21 jours excède largement les 60 néonates requises (valeurs guide des tests de reproduction de l'OCDE) (OECD, 2008).

Tableau 20. Paramètres physiologiques des individus témoins estimés pour chaque expérience (gamma et alpha) et chaque génération (F0, F1 et F2).

<i>Paramètres</i>	Expérience gamma			Expérience alpha		
	F0	F1	F2	F0	F1	F2
L_b	0,736	0,852	0,867	1,030	1,080	1,027
L_m	4,701	4,386	4,617	4,105	3,936	4,026
r_B	0,127	0,161	0,135	0,178	0,142	0,142
L_p	0,249	0,304	0,392	0,560	0,457	0,441
R_m	135,741	91,308	136,636	79,729	67,578	64,365

4.2. Ajustements des individus exposés

4.2.1. Identification du mode d'action métabolique

Conformément aux hypothèses émises lors des parties précédentes, deux modes d'actions ont été combinés pour expliquer les effets radiotoxiques observés des rayonnements gamma et alpha au fil des générations. Pour chaque expérience, les valeurs des sommes des carrés des écarts pondérées $wRSS$ des différentes combinaisons de modes d'action testées sont données dans le Tableau 21. Plus les valeurs de RSS sont faibles et plus la distance moyenne entre les points expérimentaux et les prédictions théoriques du modèle sont proches, permettant le choix du meilleur modèle.

Tableau 21. Sommes des moindres carrés pondérées ($wRSS$) et leurs composantes non pondérées pour la croissance et la reproduction, respectivement $RSS_{(croissance)}$ et $RSS_{(reproduction)}$, obtenues pour les différentes combinaisons de modes d'action testées sur les données d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne.

Combinaisons de modes d'action testées	$RSS_{(croissance)}$	$RSS_{(reproduction)}$	$wRSS$
Irradiation gamma externe			
Coûts / Croissance	20,6	31,2	5,77
Hasard / Croissance	21,3	31,9	5,91
Contamination alpha interne			
Coûts / Croissance	19,2	30,7	28,7
Hasard / Croissance	19,3	31,4	28,9
Coûts / Maintenance	20,4	26,3	27,6

Pour chaque combinaison de modes d'action, les valeurs de $RSS_{(\text{croissance})}$ et $RSS_{(\text{reproduction})}$ représentent respectivement les composantes non pondérées de la croissance et de la reproduction. Quelle que soit l'expérience et la combinaison de modes d'action, les valeurs de $RSS_{(\text{croissance})}$ sont inférieures aux valeurs de $RSS_{(\text{reproduction})}$. Ceci est principalement dû aux différences d'ordre de grandeur caractérisant les données de croissance (quelques mm) et de reproduction (quelques centaines à quelques milliers de μg d'œufs), menant ainsi à une plus faible variabilité dans les données de croissance que dans les données de reproduction. Cette observation justifie le fait d'employer un $wRSS$ afin de ne pas trop donner de poids aux données de reproduction (forte dispersion) par rapport à celles de croissance (faible dispersion), évitant ainsi de biaiser l'ajustement du modèle.

Pour le rayonnement gamma, la comparaison des valeurs des $wRSS$ montre que les modes d'action correspondant à une augmentation des coûts de production d'un œuf (*Modèle Coûts*) et une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle Croissance*), décrivent le mieux les effets observés sur la croissance et la reproduction des daphnies. Comme en témoigne les valeurs de $RSS_{(\text{croissance})}$ et de $RSS_{(\text{reproduction})}$, la qualité d'ajustement de ce modèle (*Coûts - Croissance*) est meilleure que celle du modèle *Hasard - Croissance*.

Les effets du rayonnement alpha sont plus difficiles à trancher à la fois pour la croissance et pour la reproduction, puisque les meilleurs ajustements sur les données de croissance et de reproduction ne sont pas retrouvés au sein d'une même combinaison de modes d'action. À titre d'exemple, les combinaisons des modes d'action *Coûts - Croissance* et *Hasard - Croissance* s'ajustent mieux aux données de croissance, que le modèle *Coûts - Maintenance*. En contrepartie, ces deux combinaisons s'ajustent moins bien aux données de reproduction et tendent à sous-estimer les effets du rayonnement alpha sur la reproduction. Toutefois, les effets du rayonnement alpha sur la croissance restaient légers au fil des générations. Par conséquent, une augmentation des coûts de production d'un œuf et une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (*Coûts - Maintenance*) est la combinaison de modes d'action décrivant le mieux les effets du rayonnement alpha sur la croissance et la reproduction des daphnies.

Pour résumer, différentes combinaisons de modes d'action semblent être suggérées par le modèle DEBtox pour expliquer l'aggravation des effets induits par l'irradiation gamma externe et la contamination alpha interne au fil des générations.

4.2.2. Validation graphique des ajustements

La capacité du modèle à décrire les données de croissance et de reproduction de l'expérience d'irradiation gamma externe est vérifiée graphiquement dans la [Figure 61](#). D'une manière générale, les données de croissance et de reproduction de l'expérience d'irradiation gamma sont bien décrites quelles que soient les conditions d'exposition et les générations concernées, excepté dans la génération F0 où les effets au plus faible débit de dose ($0,007 \text{ mGy.h}^{-1}$) n'ont pas été pris en compte. En effet, afin d'éviter de biaiser l'estimation des paramètres toxicocinétiques-toxicodynamiques, nous avons fait le choix de ne pas prendre en considération les effets significatifs détectés à ce débit de dose ([Partie B, chapitre 2](#)).

Les graphiques illustrant les ajustements sur les données de croissance, de reproduction et de bioaccumulation de l'Am-241 de l'expérience de contamination alpha interne sont présentés dans les [Figures 62 et 63](#). Le modèle appliqué au cas de la contamination alpha décrit également bien les effets observés sur la croissance et la reproduction quel que soit la condition d'exposition et la génération, à l'exception: (i) de la reproduction de la génération F0 où les effets à 40 Bq.mL^{-1} sont légèrement surestimés et (ii) de la reproduction des générations F1 où les effets à 4 Bq.mL^{-1} sont légèrement sous-estimés. D'un point de vue graphique, la bioaccumulation de l'Am-241 dans la cuticule et les tissus ([Figure 63](#)) est elle aussi bien décrite au fil des générations, hormis: (i) dans la génération F1 où le manque de données dû à la forte mortalité induit une légère approximation de la prédiction dans les tissus et la cuticule à 40 Bq.mL^{-1} et (ii) dans la génération F2 où la grande variabilité de mesures dans les tissus à 40 Bq.mL^{-1} ne permet pas au modèle de passer exactement par tous les points expérimentaux.

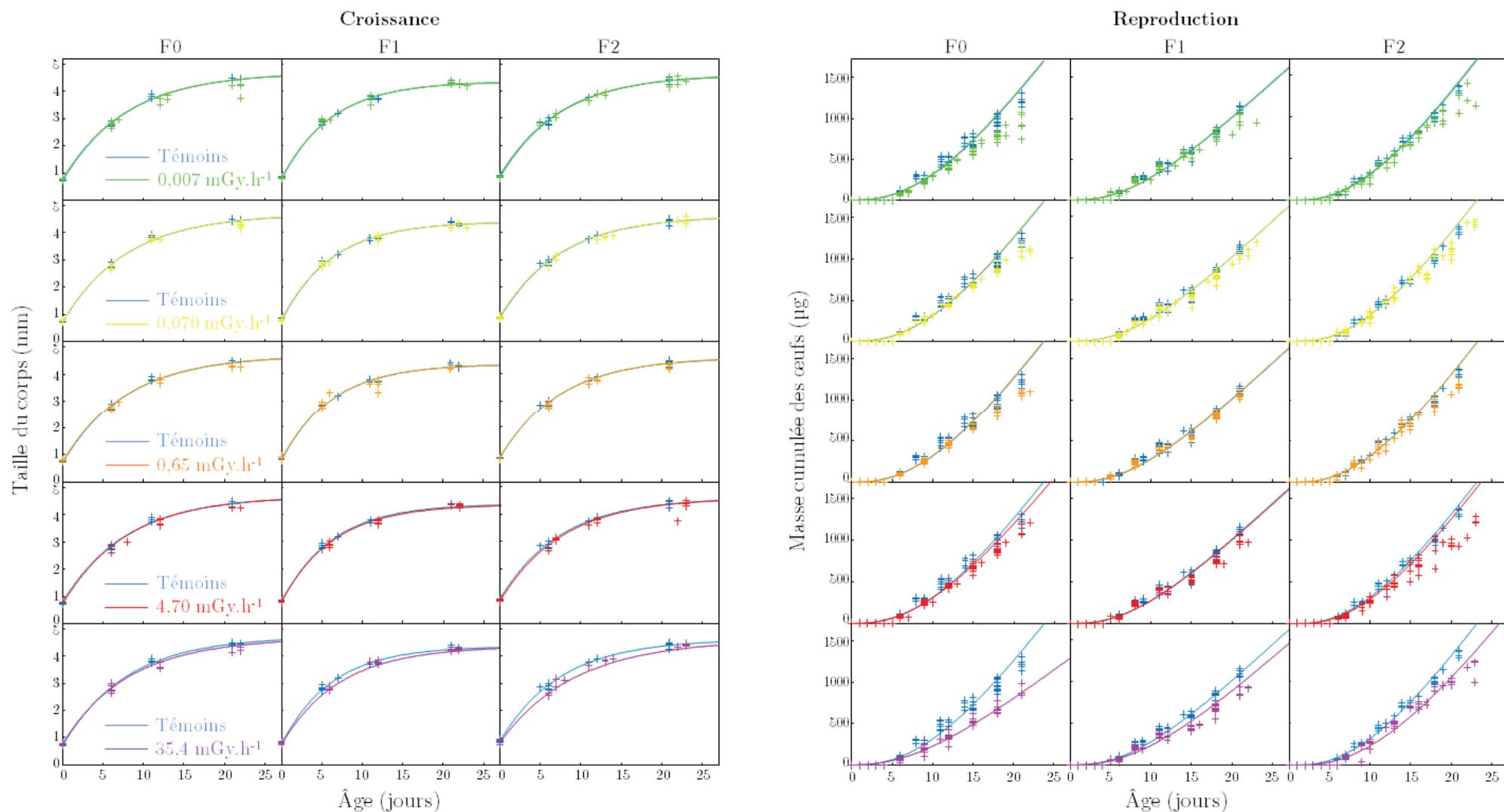


Figure 61. Ajustements DEBtox aux données de croissance et de reproduction provenant de l'expérience d'irradiation gamma externe, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de croissance et de maturation, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (-) : prédiction du modèle.

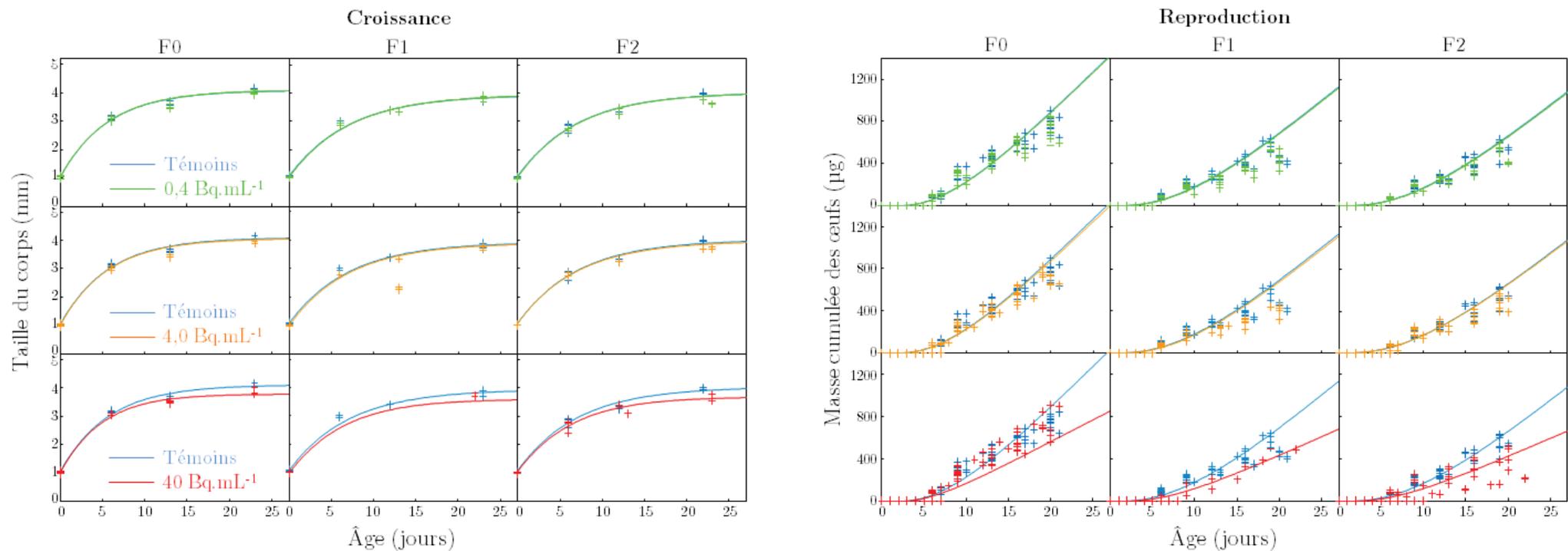


Figure 62. Ajustements DEBtox aux données de croissance et de reproduction provenant de l'expérience de contamination alpha interne, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de maintenance, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (—) : prédiction du modèle.

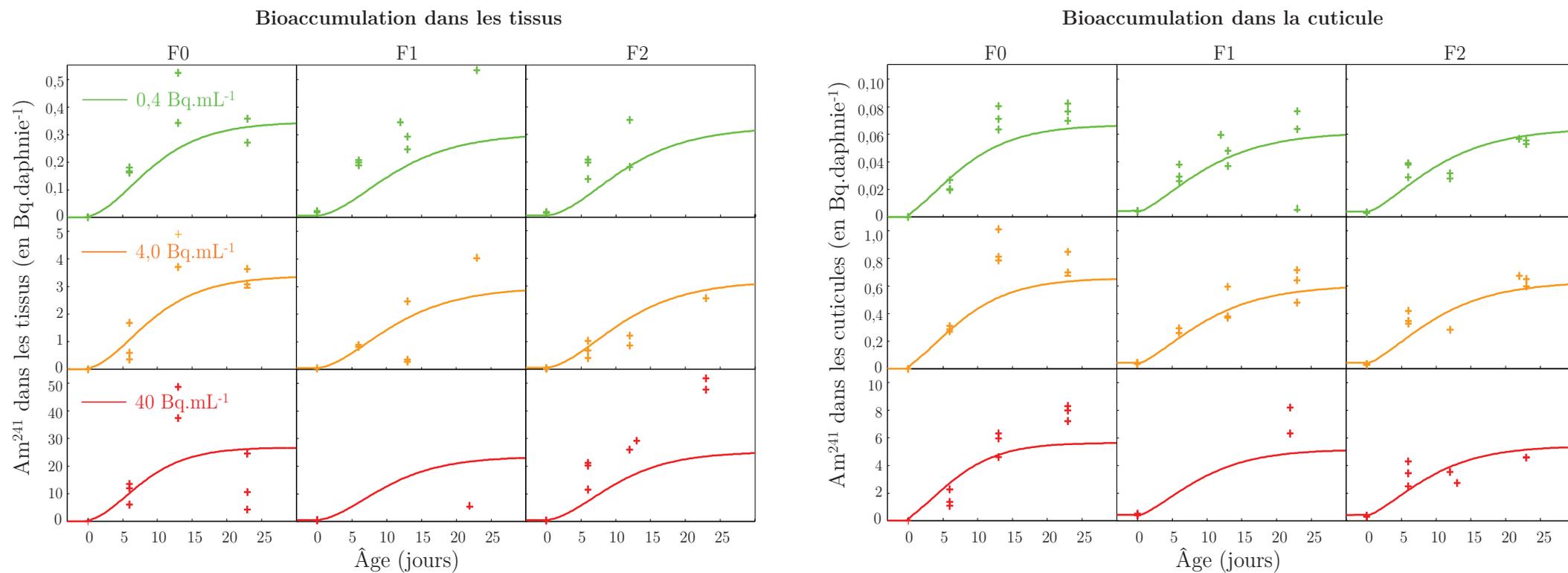


Figure 63. Ajustements DEBtox aux données de bioaccumulation de l'Am-241 dans les tissus et la cuticule provenant de l'expérience de contamination alpha interne, avec une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de maintenance, respectivement corrélés aux niveaux de dommages héréditaires D_1^* et D_2^* . Points (+) : données observées. Ligne (—) : prédiction du modèle.

4.2.3. Paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques estimés

Les paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques estimés pour les différentes combinaisons de modes d'action testées pour les deux expériences sont présentés dans le Tableau 22. Les valeurs des paramètres toxicocinétiques de taux d'accumulation ka , d'élimination ke , et de réparation kr , donnent lieu à des situations contrastées entre l'expérience d'irradiation gamma externe et l'expérience de contamination alpha interne.

Tableau 22. Paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques des modèles DEBtox donnant les meilleurs ajustements (meilleurs $wRSS$) parmi toutes les combinaisons de modes d'action testées pour les expériences d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne. Les paramètres ka , ke et ks/v sont communs aux deux modes d'action testés pour le rayonnement alpha. Les valeurs entre crochets concernent la cinétique d'internalisation de l'Am-241.

Symbole	Unité	Interprétation	Mode d'action 1	Mode d'action 2
Irradiation gamma externe			Coûts de production d'un œuf	Coûts de croissance et de maturation
NED	mGy.h ⁻¹	Niveau de dommages sans effet	0,490	0,144
b	mGy.h ⁻¹	Pente d'intensité de stress	5,60.10 ⁻⁵	2,47.10 ⁻²
k_r	j ⁻¹	Taux de réparation des dommages	$k_{r,F0} = 6,17.10^{-2}$ $k_{r,F1-F2} = 1,31$	1,76.10 ⁻²
Contamination alpha interne			Coûts de production d'un œuf	Coûts de maintenance
NED	mGy.h ⁻¹	Niveau de dommages sans effet	7,97	3,44.10 ⁻²
b	mGy.h ⁻¹	Pente d'intensité de stress	9,65.10 ⁻²	7,00.10 ⁻³
k_r	j ⁻¹	Taux de réparation des dommages	0,606	0,568
k_a	j ⁻¹	Taux d'accumulation		$\left[\begin{array}{c} 0,207 \\ 2,07 \\ 76,8 \end{array} \right]$
k_e	j ⁻¹	Taux d'élimination		
$k_{s/v}$	-	Rapport fixe entre la concentration dans les tissus et les cuticules		

Dans le cas de l'irradiation gamma externe, le débit de dose gamma reste constant au cours du temps (Figure 64), nécessitant ainsi deux compartiments de dommages différents pour expliquer : (i) la rapide cinétique d'apparition des effets en génération F0, (ii) la diminution de l'intensité des effets en génération F1, (iii) puis un retour des effets de nature et d'intensité différentes en génération F2. Avec un pic important au cours de la génération F0 (dû à la réparation moins efficace caractérisée par : $kr_{F0} = 6,17 \times 10^{-2}$ par jour), puis une décroissance précoce au cours de la génération F1 (dû à la réparation plus efficace caractérisée par : $kr_{F1-F2} = 1,31$ par jour), le niveau de dommages D_1^* permet d'expliquer les effets observés sur la reproduction en F0 et leur diminution transitoire en F1 (Figure 64). Avec une cinétique d'accumulation et de transmission plus lente au cours des générations ($k_r = 1,76 \cdot 10^{-2}$ par jour), le niveau de dommages D_2^* permet d'expliquer l'augmentation graduelle des effets radiotoxiques de la génération F0 à F2. Ce second facteur de stress, n'a toujours pas atteint sa valeur d'équilibre au terme de la génération F2 (Figure 64). Ainsi, le modèle DEBtox prédit qu'une rapide augmentation des coûts de production d'un œuf (mode d'action 1) serait responsable des effets sur la reproduction en génération F0 et, qu'en parallèle, l'augmentation progressive des coûts de croissance et de maturation (mode d'action 2) permettrait d'expliquer les retards de croissance et de libération de pontes observés dans la génération F2.

Dans le cas de la contamination alpha interne, l'internalisation de l'Am-241 est progressive au cours de la première génération (Figure 65). Avec un taux d'élimination k_e de 2,07 par jour, l'Am-241 a besoin d'environ 20 jours pour atteindre sa concentration d'équilibre dans les tissus des daphnies de la génération F0, principalement en raison de la dilution par la croissance. Cette observation s'oppose aux générations suivantes où les concentrations d'équilibre dans les tissus sont atteintes dès la fin du stade œuf dans les générations F1 et F2 (Figure 65). En conséquence, le débit de dose alpha augmente progressivement au cours de la génération F0 alors qu'il reste relativement constant au cours des générations F1 et F2. Les cinétiques de dommages D_1^* et D_2^* suivent fidèlement les variations des débits de dose alpha au fil des générations (Figure 65), en raison des taux de réparation relativement efficaces au sein des deux compartiments de dommages (avec $kr_1 = 0,606$ par jour pour D_1^* et $kr_2 = 0,568$ par jour pour D_2^*). Ainsi, le modèle DEBtox suggère que les différences d'exposition entre les générations (stade œuf F0 non exposé) est la principale cause de l'augmentation de la sévérité des effets de la génération F0 à la génération F1, et qu'aucune augmentation d'effets n'est prédite de la génération F1 à la génération F2.

Les valeurs des paramètres des niveaux de dommages sans effets (*NED*) semblent également être contrastées entre les expériences d'irradiation gamma externe et de contamination alpha interne (Tableau 22).

Dans le cas de l'irradiation gamma externe, les valeurs des niveaux de dommages sans effets (*NED*), suggèrent que les coûts de production d'un œuf et les coûts de croissance et de maturation pourraient augmenter respectivement à partir des débits de dose de 0,490 et 0,144 mGy.h⁻¹. Sachant que ces modes d'action sont liés aux niveaux de dommages, ces valeurs indiquent que le budget énergétique des daphnies est perturbé seulement lorsqu'un certain niveau d'altérations moléculaires est atteint. Toutefois, les données non-prises en compte de la génération F0 à 0,007mGy.h⁻¹ pourraient influencer sur l'estimation des niveaux de dommages sans effets.

Dans le cas de la contamination alpha interne, les valeurs des niveaux de dommages sans effets (*NED*), suggèrent que les coûts de maintenance somatique et de maturité pourraient augmenter dès 34,4 µGy.h⁻¹, alors que les coûts de production d'un œuf pourraient augmenter à partir de 8 mGy.h⁻¹. Ces valeurs sont en accord avec les effets observés au cours de l'expérience puisque de légers effets ont été observés sur la croissance aux plus faibles niveaux d'exposition, alors que des effets sur la reproduction sont observés seulement à la plus forte condition d'exposition (Partie C, Chapitre 2).

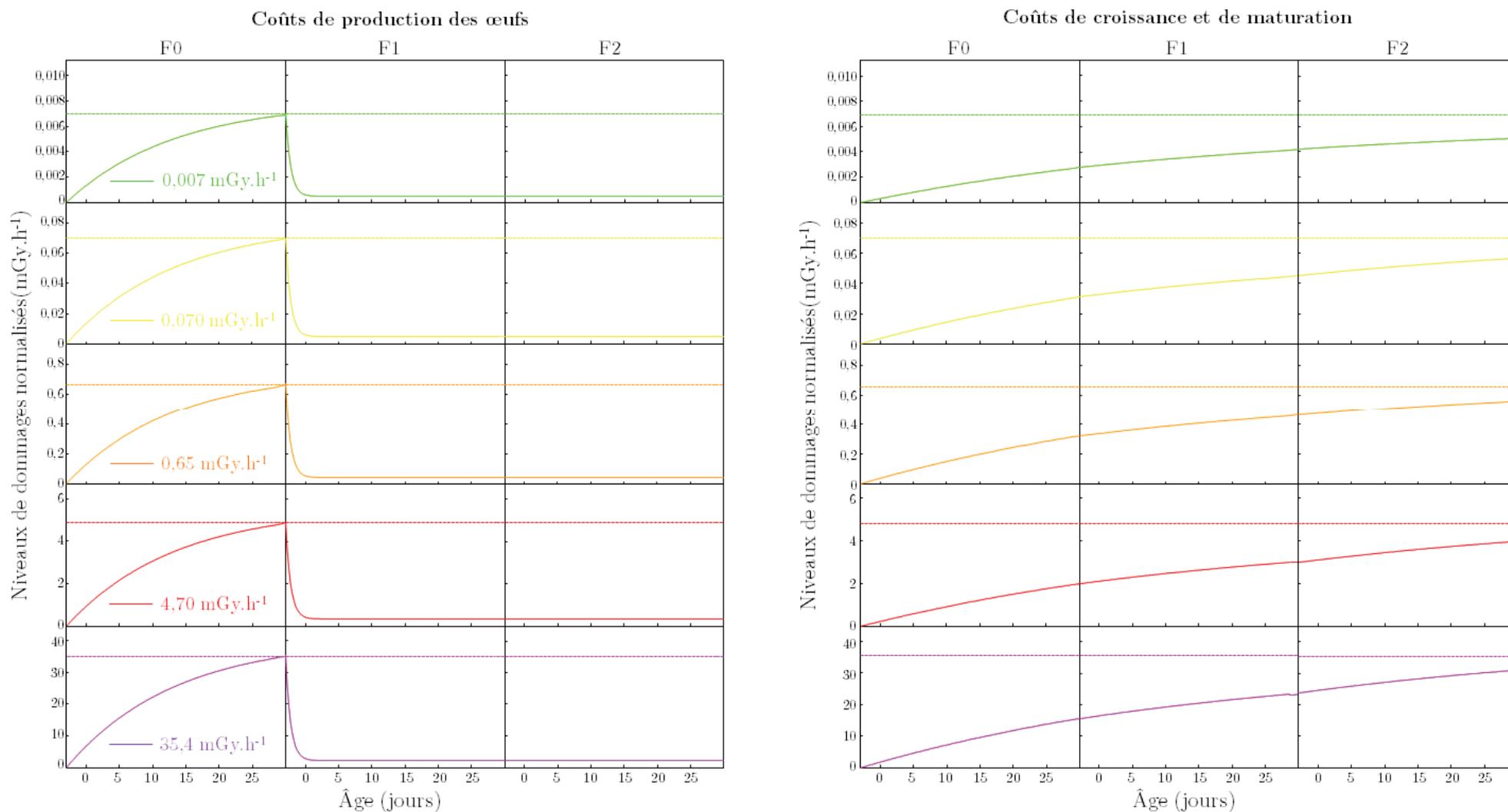


Figure 64. Courbes prédites des niveaux de dommages transgénérationnels D_1^* et D_2^* (lignes continues) normalisés par le débit de dose gamma (lignes discontinues) estimé durant l'expérience d'irradiation gamma externe. Les niveaux de dommages D_1^* et D_2^* sont respectivement associés à une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts de croissance et de maturation.

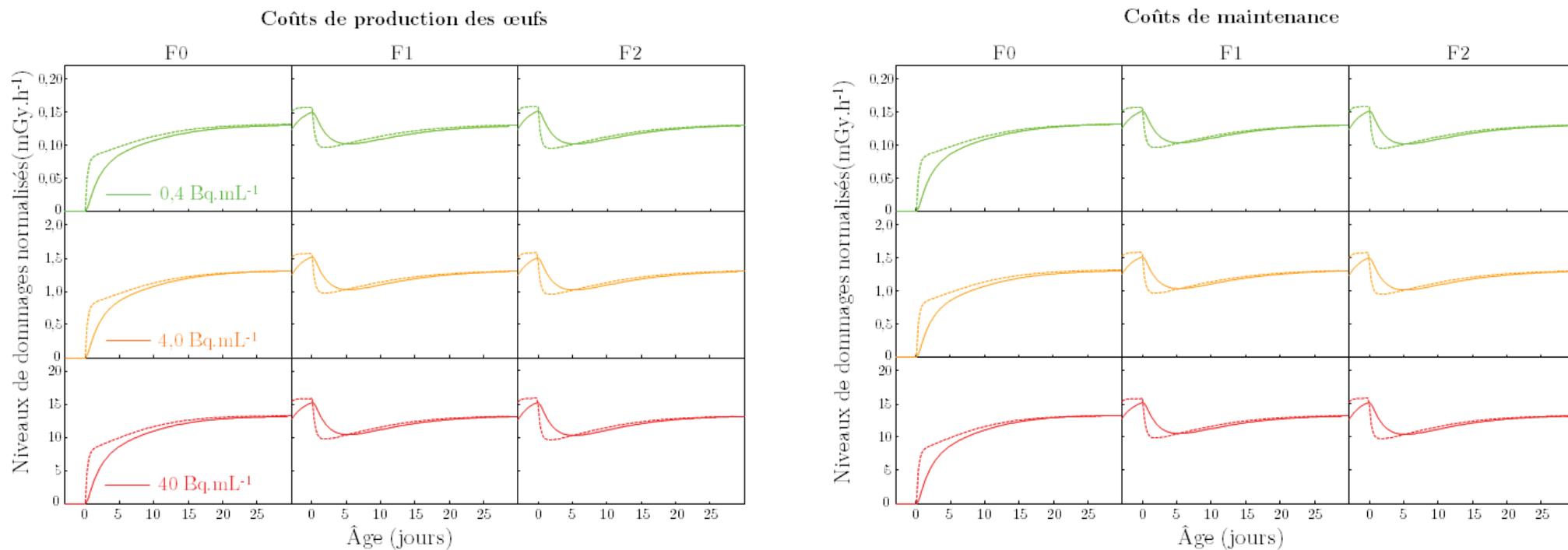


Figure 65. Courbes prédites des niveaux de dommages transgénérationnels D_1^* et D_2^* (lignes continues) normalisés par le débit de dose alpha (lignes discontinues) estimé durant l'expérience de contamination alpha interne. Les niveaux de dommages D_1^* et D_2^* sont respectivement associés à une augmentation des coûts de production des œufs et une augmentation des coûts maintenance.

La modélisation DEBtox nous permet pour chaque mode d'action de prédire les niveaux de stress associés à la radiotoxicité gamma et alpha pour un même débit de dose (Figure 66). Obtenir expérimentalement un résultat similaire est pratiquement irréalisable, en raison de l'impossibilité de contrôler avec précision le débit de dose alpha reçu par les organismes au laboratoire. La Figure 66 ci-après représente l'évolution des niveaux de stress des différents modes d'action en fonction des doses de radioactivité gamma et alpha absorbées par les organismes.

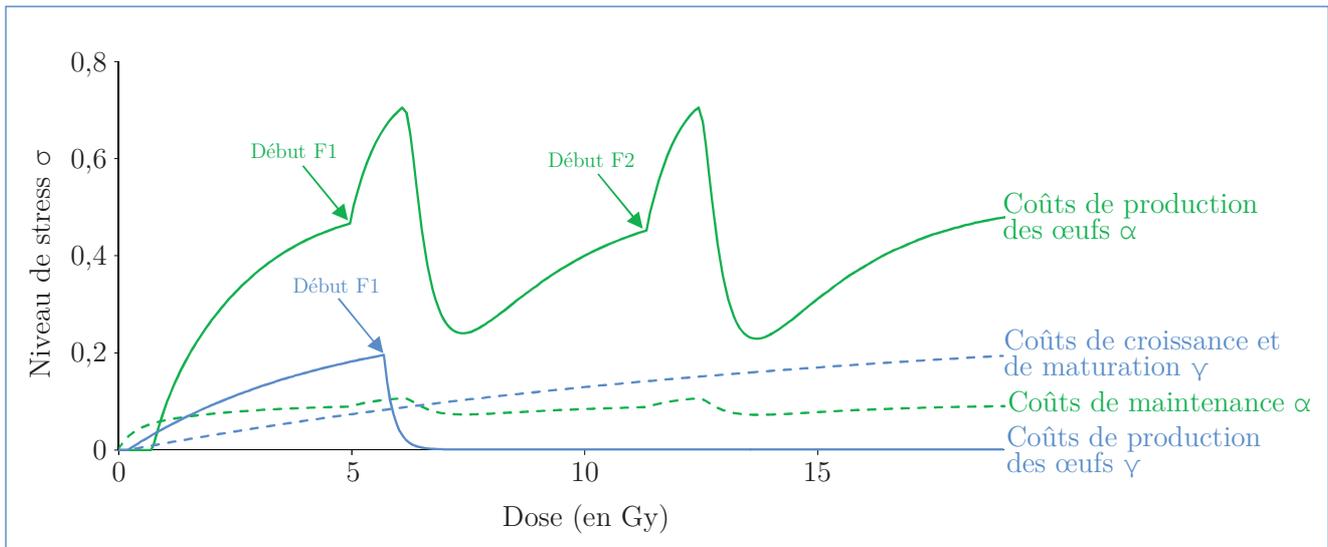


Figure 66. Prédications DEBtox des niveaux de stress des différents modes d'action associés à la radiotoxicité gamma (γ) et alpha (α). Les niveaux de stress σ sont présentés en fonction de la dose cumulée alpha et gamma au cours des trois générations successives (F0, F1 et F2) d'exposition et pour un débit de dose de même intensité ($\sim 11,3 \text{ mGy.h}^{-1}$).

Les niveaux de stress σ augmentent lorsque le niveau de dommages dans l'organisme dépasse les valeurs de *NED* (Niveaux de dommages sans effets). Selon le mode d'action considéré, un niveau de stress supérieur à zéro indique la présence d'effets sur la croissance et/ou la reproduction des daphnies. Ainsi, plus le niveau de stress est élevé et plus le pourcentage d'effets sur la croissance et/ou la reproduction des daphnies est important. En prenant en compte les seuls modes d'action comparables entre les deux types de rayonnements (les coûts de production des œufs), nous constatons que l'intensité du stress alpha est nettement supérieure à celui du gamma (Figure 66). En particulier, les pics de stress associés à l'exposition du stade œuf des générations F1 et F2 participent grandement à ces différences. Ainsi, lorsque l'écart entre les niveaux de stress alpha et gamma est très grand, le niveau d'effets sur la croissance et la reproduction l'est aussi. Par conséquent, le passé d'exposition des daphnies et les cinétiques d'apparition des effets différentes entre les deux stress radiologique vont rendre plus complexe l'estimation précise d'une EBR.

CHAPITRE 2

EFFICACITÉ BIOLOGIQUE RELATIVE ALPHA

1. Explication de la démarche

Estimer l'EBR du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma sur la base des données expérimentales est extrêmement complexe car il est difficile de contrôler les niveaux d'effets observés. Un inventaire exhaustif des points où les niveaux d'effets étaient comparables entre les deux expériences a été réalisé à l'aide du modèle DEBtox. Plusieurs choix ont été effectués afin de comparer les effets entre les deux types de rayonnements.

Les différentes cinétiques d'induction des dommages et les différents modes d'action prédits par le modèle DEBtox ne nous permettaient pas de réaliser une comparaison sur les niveaux de dommages, soulignant l'intérêt de comparer les effets sur la croissance, la reproduction et la survie des individus. Les calculs de l'EBR alpha devaient être réalisés à des doses comparables et sur une gamme d'effets comparables, impliquant nécessairement de prendre en compte uniquement les niveaux d'exposition où les effets sont significatifs, c'est-à-dire, les niveaux d'exposition supérieurs aux valeurs de *NEDs* prédites. De plus, les expositions non comparables et les cinétiques différentes des effets entre les deux expériences ne nous permettaient pas de comparer les effets des générations F0 (stade œuf exposé en gamma et non exposé en alpha) et F1 (peu d'effets en gamma et forte mortalité en alpha). Par conséquent, seuls les plus forts niveaux d'exposition alpha (40 Bq.mL^{-1}) et gamma ($35,4 \text{ mGy.h}^{-1}$) de la génération F2 ont été inclus dans les calculs de l'EBR alpha. Pour les deux types de rayonnements, les comparaisons d'effets sur la croissance et la reproduction ont été réalisées à l'aide des meilleurs ajustements prédits par le modèle DEBtox. Les comparaisons sur la survie ont été réalisées sur les données expérimentales de chaque expérience. Pour chaque critère d'effet biologique, les calculs ont été réalisés pour des niveaux d'effets strictement supérieurs à 5%. Un exemple de calcul d'EBR alpha est donné dans la section suivante.

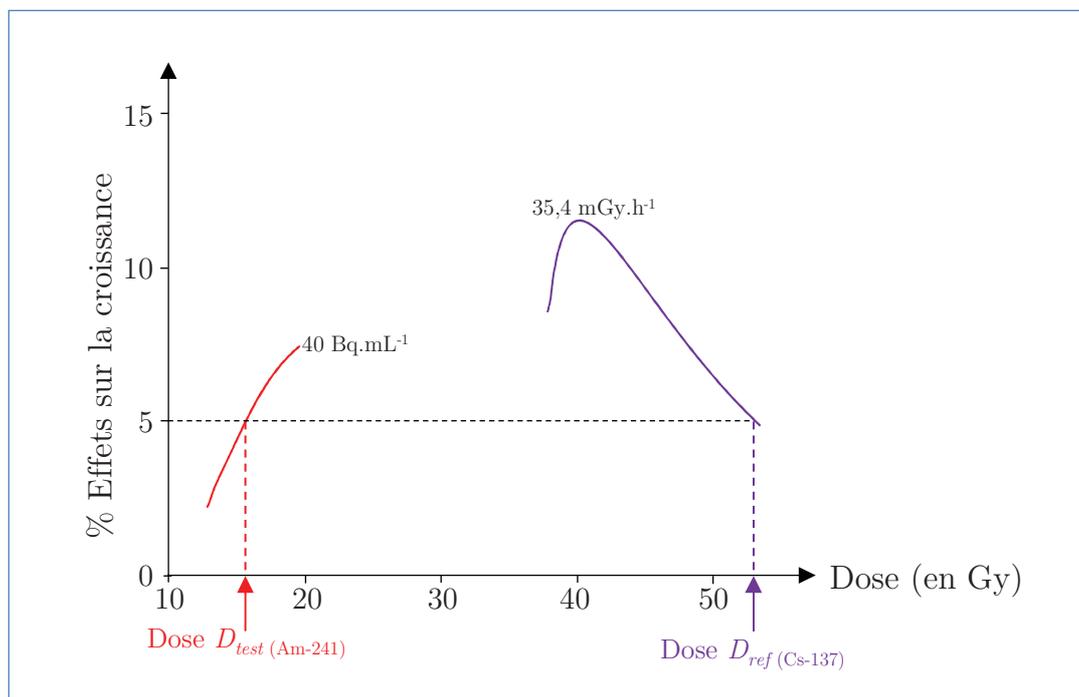


Figure 67. Représentation graphique de l'évolution des effets sur la croissance (en %) des daphnies exposées aux rayonnements alpha (Am-241) et gamma (Cs-137) de la génération F2 en fonction de la dose cumulée (en Gy). Exemple d'une comparaison avec les conditions d'exposition à 40 Bq.mL⁻¹ et 35,4 mGy.h⁻¹ pour respectivement le rayonnement alpha et gamma où un niveau d'effet identique de 5% est observé. D_{test} et D_{ref} correspondent aux doses cumulées (en Gy) reçues par les daphnies, respectivement exposées à l'Am-241 et au Cs-137 pendant trois générations successives.

L'EBR du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma est ensuite calculée en utilisant l'équation de l'EBR (PARTIE A, Eq. (1.1)), donnant ainsi pour notre exemple :

$$EBR = \frac{D_{ref}}{D_{test}} = \frac{54,16 \text{ Gy}}{15,59 \text{ Gy}} = 3,47$$

où D_{ref} et D_{test} correspondent aux doses cumulées gamma et alpha reçues par les daphnies au cours des trois générations successives.

Pour ce critère d'effet, la valeur d'EBR indique que le rayonnement alpha est 3,47 fois plus radiotoxique que le rayonnement gamma.

Si on ne considère que la dose reçue lors de la génération F2, cela donne pour notre exemple :

$$\text{EBR} = \frac{D_{ref}}{D_{test}} = \frac{18,48 \text{ Gy}}{14,10 \text{ Gy}} = 4,50$$

où D_{ref} et D_{test} correspondent aux doses cumulées gamma et alpha reçues par les daphnies seulement au cours de la génération F2.

La valeur d'EBR demeure du même ordre de grandeur que celle calculée en fonction de la dose accumulée au cours des trois générations successives et indique que le rayonnement alpha est 4,50 fois plus radiotoxique que le rayonnement gamma pour la croissance. Pour chaque critère d'effet, les calculs d'EBR ont été réalisés soit en prenant en compte la dose cumulée au cours des trois générations successives, soit seulement sur celle accumulée au cours de la génération F2.

2. Résultats

En prenant en compte la dose cumulée au cours des trois générations, les valeurs d'EBR calculées pour le rayonnement alpha semblent relativement homogènes entre les critères d'effets sélectionnés, avec des valeurs de 3,47 pour la croissance, de 3,27 pour la reproduction et des valeurs allant de 3,37 à 4,91 pour la survie (Tableau 23).

Tableau 23. Valeurs de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma calculée pour un même niveau d'effet (en %) sur la croissance, la reproduction et la survie des daphnies en fonction de la dose accumulée au cours des trois générations successives. Les valeurs d'EBR présentées correspondent au rapport entre la dose absorbée par les daphnies (en Gy) entre le rayonnement gamma (Cs-137) et le rayonnement alpha (Am-241).

Critère d'effets	% Effets	Dose (Gy)		EBR
		Cs ¹³⁷	Am ²⁴¹	Cs ¹³⁷ /Am ²⁴¹
<i>Croissance</i>	5%	54,16	15,59	3,47
<i>Reproduction</i>	30%	47,79	14,63	3,27
<i>Survie</i>	10%	7,33	1,49	4,91
	20%	48,00	15,45	3,11
	30%	50,98	15,59	3,27

En prenant en compte la dose cumulée seulement au cours de la génération F2, les valeurs d'EBR calculées pour le rayonnement alpha semblent, comme pour le cas précédent, relativement homogènes entre les critères d'effets sélectionnés, avec des valeurs de 4,50 pour la croissance, de 2,32 pour la reproduction et des valeurs allant de 3,00 à 3,97 pour la survie (Tableau 24).

Tableau 24. Valeurs de l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha par rapport au rayonnement gamma calculée pour un même niveau d'effet (en %) sur la croissance, la reproduction et la survie des daphnies en fonction de la dose accumulée au cours de la génération F2. Les valeurs d'EBR présentées correspondent au rapport entre la dose absorbée par les daphnies (en Gy) entre le rayonnement gamma (Cs-137) et le rayonnement alpha (Am-241).

Critère d'effets	% Effets	Dose (Gy)		EBR
		Cs ¹³⁷	Am ²⁴¹	Cs ¹³⁷ /Am ²⁴¹
<i>Croissance</i>	5%	18,48	4,10	4,50
<i>Reproduction</i>	30%	9,35	4,03	2,32
<i>Survie</i>	10%	2,59	0,65	3,97
	20%	12,32	4,10	3,00
	30%	15,29	4,17	3,66

Que ce soit en cumulant la dose sur les trois générations successives ou seulement au cours de la génération F2, les valeurs d'EBR restent du même ordre de grandeur. D'une manière générale, les valeurs d'EBR indiquent que le rayonnement alpha est 2,5 à 5 fois plus radiotoxique que le rayonnement gamma sur les critères d'effets sélectionnés de notre étude.

Calculer précisément une valeur fixe d'EBR entre le rayonnement alpha et gamma est plus complexe que prévu. Comme le prédisait le modèle DEBtox, les cinétiques d'apparition et d'intensité des effets sont nettement différentes entre les deux types de rayonnements, conduisant dans certaines cas (génération F0 et F1) à l'impossibilité de comparer la radiotoxicité des deux émetteurs. Ainsi, la radiotoxicité de chaque émetteur n'est pas réellement prise en compte dans les calculs et les valeurs d'EBR restent peu représentatives de l'efficacité biologique réelle du rayonnement alpha.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

1. Modes d'action métaboliques des rayonnements gamma et alpha

L'un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie et de la radioécologie est de découvrir les mécanismes à travers lesquels les substances chimiotoxiques et radiotoxiques peuvent affecter la physiologie des organismes, et à terme, menacer l'équilibre et la pérennité des populations. Les substances toxiques présentes dans l'environnement sont susceptibles d'affecter simultanément tous les traits d'histoire de vie d'un organisme. Les tests chroniques - prenant en compte le cycle de vie entier d'un organisme - sont des outils précieux pour comprendre les effets à long terme des polluants. Cependant, bien que ces tests fournissent des informations pertinentes sur les effets des toxiques à l'échelle des organismes et des populations, certaines méthodes analytiques complémentaires sont également des outils précieux pour identifier les modes d'action des toxiques (Barata et Baird, 2000). Les modes d'action métaboliques des toxiques peuvent, par exemple, être examinés par des mesures biochimiques, cellulaires, moléculaires, mais également par l'intermédiaire de la modélisation mécaniste telle que l'approche DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996). Ces modèles permettent de lier les effets moléculaires aux effets à l'échelle de l'individu et de la population, tout en identifiant les modes d'action les plus probablement affectés par le composé toxique concerné (Jager et Zimmer, 2013). Dans ces travaux, nous avons utilisé une version explicitement remaniée du modèle DEBtox (Alonzo *et al.*, 2014) afin de répondre à notre premier objectif qui était de déterminer les modes d'action physiologiques du Cs-137 et de l'Am-241 au cours d'une exposition multigénérationnelle de *Daphnia magna*.

L'approche DEBtox assume initialement qu'un polluant peut affecter la croissance et la reproduction d'un organisme de diverses manières (Kooijman et Bedaux, 1996). Jusqu'à présent, la plupart des études se sont focalisées sur l'identification d'un unique mode d'action par polluant. Chez le nématode *Acrobeloides nanus*, une exposition au cadmium induit une augmentation des coûts de croissance, tandis que des expositions au carbendazime (pesticide) et pentachlorobenzène (fongicide) induisent toutes les deux une réduction de l'assimilation de la nourriture (Álvarez *et al.*, 2006). Billoir *et al.* (2008b) suggèrent qu'une exposition au cuivre induit une augmentation des coûts de croissance chez *D. magna*. En revanche, lors d'une contamination au zinc, ces mêmes auteurs ne parviennent pas à discriminer si le zinc induit une diminution de l'assimilation ou une augmentation des coûts de maintenance (Billoir *et al.*,

2008b). Ce dernier exemple illustre que l'identification d'un mode d'action propre au polluant est dans certain cas une tâche difficile. En particulier, lorsque la cinétique des effets observés sur la croissance et la reproduction des organismes est relativement complexe (Jager et Zimmer, 2013).

D'autres travaux mettent en évidence que plusieurs modes d'action peuvent expliquer la toxicité d'un polluant sur un organisme. Le modèle DEBtox développé sur la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*, indique qu'une exposition aux nanoparticules de zinc induit à la fois une réduction de l'assimilation et une augmentation des coûts de maintenance (Muller *et al.*, 2014). Jager *et al.* (2007) mettent en évidence que le chlorpyrifos (pesticide) induit deux modes d'action différents en fonction de la durée d'exposition chez le collembole *Folsomia candida*. Dans le cas d'une courte exposition (45 jours), toutes les doses de chlorpyrifos induisent des effets sur la production des œufs. En revanche, une exposition plus longue induit une augmentation des coûts de maintenance pour les plus faibles doses, et des effets sur la production des œufs pour les plus fortes doses (Jager *et al.*, 2007).

L'implication de plusieurs modes d'action différents au cours d'une exposition a aussi été mise en évidence au cours de ces travaux de thèse. Nous avons ajusté deux modèles DEBtox indépendants pour les jeux de données des expériences d'irradiation gamma externe (Cs-137) et de contamination alpha interne (Am-241). Dans les deux cas, deux compartiments de dommages transgénérationnels, impliquant chacun un mode d'action métabolique distinct, ont été nécessaires pour expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction de *D. magna* au cours des trois générations successives d'exposition.

1.1 Irradiation gamma externe

Nos analyses DEBtox prédisent que le mode d'action métabolique le plus probablement affecté par le stress radiologique gamma concerne tout d'abord une augmentation précoce des coûts de production des œufs en génération F0. Selon le DEBtox, ce mécanisme affecte la reproduction par une réduction du taux de reproduction, sans aucun effet sur la taille des organismes (Kooijman et Bedaux, 1996). Ce mode d'action direct sur la reproduction est en accord avec les observations réalisées au cours de l'expérience, puisque des réductions significatives de la fécondité cumulée ont été précocement détectées (après 9 jours d'exposition) chez les daphnies exposées au plus fort débit de dose ($35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) de la génération F0. Le mode d'action des coûts de production des œufs concorde également avec la littérature puisque la reproduction est considérée comme étant l'un des paramètres biologiques les plus affectés par l'irradiation gamma externe chez les invertébrés (revue dans Won *et al.*, 2014).

Par exemple, des réductions significatives de pontes ont été observées chez la crevette impériale *Penaeus japonicus*, après 1 mois d'exposition à 10 Gy d'irradiation gamma (Sellars *et al.*, 2005). Une stérilité temporaire a également été détectée lors d'une exposition chronique de l'oligochète *Eisenia foetida*, illustrant que l'irradiation gamma affecte directement le système reproducteur de l'organisme (Hertel-Aas *et al.*, 2011). De même, chez le copépode marin *Paracyclops nana*, des perturbations de la reproduction ont été détectées à partir de 30 Gy, avec des réductions du taux d'éclosion et une augmentation des dommages moléculaires (protéines chaperons) dans les œufs. Les auteurs mettent également en évidence l'induction d'altérations moléculaires (ROS et dommages ADN) chez les organismes adultes, suggérant que les altérations moléculaires expliqueraient les effets observés sur la reproduction des copépodes. Il est intéressant de rappeler que le coût de production des œufs est considéré comme étant croissant en fonction de la concentration du composé toxique dans l'organisme (Kooijman et Bedaux, 1996). Dans notre modèle, ce mode d'action est lié au niveau de dommages moléculaires. Le modèle DEBtox confirme notre hypothèse que des dommages moléculaires pourraient expliquer les effets précoces observés dans la génération F0 (principalement au plus fort débit de dose).

D'autre part, il est important de noter que nos données s'ajustent également très bien au modèle lié à une augmentation de la mortalité pendant l'ovogenèse (*Modèle Hasard*). Ce mécanisme d'action semble lui aussi très logique car les adultes de la F0 présentent une mortalité non négligeable (de 10 à 20 %) aux plus forts débits de dose ($> 4,70 \text{ mGy.h}^{-1}$). Nous pouvons alors poser l'hypothèse que les adultes et leurs œufs en développement seraient affectés de la même manière par l'irradiation externe, du fait par exemple, de l'apparition de phénomènes apoptotiques ou de mutations létales (Brill *et al.*, 1999). Cette hypothèse demande toutefois à être confirmée.

L'augmentation des coûts de production des œufs n'est cependant pas transmise dans les générations futures (*e.g.* fort taux de réparation) et ne nous permet pas d'expliquer l'aggravation des effets au fil des générations F1 et F2. Un second mode d'action est nécessaire.

Le mode d'action prédit par notre modèle DEBtox pour expliquer l'aggravation des effets de l'irradiation au fil des générations est une augmentation des coûts de croissance et de maturation. Ce mécanisme implique généralement une diminution du taux de croissance, mais n'a aucun effet sur la taille maximale des organismes exposés (Kooijman et Bedaux, 1996). L'augmentation transgénérationnelle des coûts de croissance coïncide avec les résultats de notre expérience, puisqu'une diminution significative du taux de croissance (r_B) a été observée au

plus fort débit de dose ($35,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) dans les générations F1 et F2 (diminution de 13% dans chaque génération). De plus, des retards significatifs de libération de pontes ont été constatés pour pratiquement tous les débits de dose de la génération F2, en accord avec ce mécanisme impliquant une augmentation des coûts de maturation. Ce phénomène est particulièrement observable aux plus forts débits de dose ($> 4,70 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) de notre expérience où de légères réductions de fécondité et de masse investie dans la reproduction ont été constatées au cours des générations F1 et F2.

Identifier un mode d'action lié à la croissance et à la maturation est en accord avec la littérature. Selon Nussenzweig *et al.* (1997), les retards de croissance radio-induits pourraient refléter des dépenses métaboliques supplémentaires investies dans les processus de réparation des dommages. Cette hypothèse est également soutenue par d'autres études (revue dans Won *et al.*, 2014). Par exemple, chez les copépodes marins, *Paracyclops nana* et *Tigriopus japonicus*, des retards significatifs du taux de croissance associés à des augmentations des niveaux de stress oxydatif (ROS) et des dommages ADN ont été mis en évidence lors d'une irradiation gamma. En parallèle, ces deux études ont pu clairement démontrer que l'augmentation dose-dépendante des dommages moléculaires était intimement associée à une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GR, GST, GPx) et une surexpression de gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN (protéines DNA-PK, Ku70, Ku80). De nombreuses études ont pu mettre en évidence l'importance de l'ADN et de l'ARN dans la croissance des tissus et la synthèse des protéines chez de nombreux organismes aquatiques (revue dans Dahlhoff, 2004). Par conséquent, si des retards de croissance sont observables à l'échelle de l'organisme, cela signifie que d'importantes altérations ont eu lieu aux niveaux moléculaire et cellulaire, indiquant que l'organisme a déjà commencé à mettre en place des processus de réparation. Ainsi, cette réparation, nécessaire pour maintenir l'intégrité de l'ADN et réduire le taux d'apoptose cellulaire, nécessiterait l'utilisation de ressources énergétiques supplémentaire initialement allouées à la croissance et la reproduction des organismes (Figure 68).

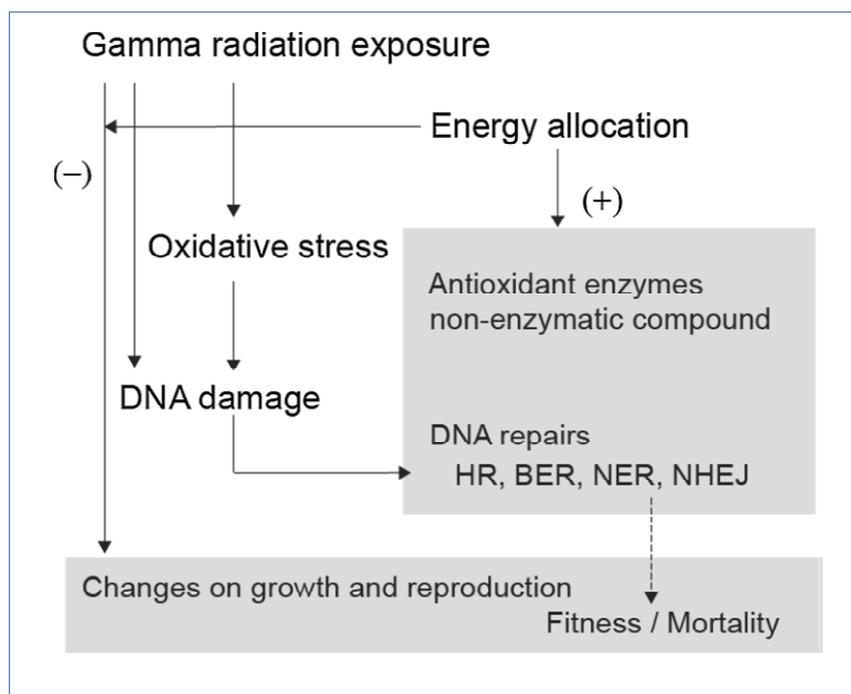


Figure 68. Schéma illustrant les répercussions modulées des dommages moléculaires (Stress oxydatifs et dommages ADN) et de l'allocation d'énergie investie dans les mécanismes de réparation (enzymes antioxydantes et réparation de l'ADN) en réponse à une irradiation gamma (d'après Won *et al.*, 2014).

Ce mode d'action métabolique soutenu par nos observations expérimentales et nos analyses DEBtox nous permettrait de proposer plusieurs hypothèses. La première étant l'activation des processus de réparation transitoirement plus efficaces au cours de la génération F1 suite à une accumulation de dommages ADN. La seconde hypothèse étant que ces processus pourraient être dépassés et ne pas suffisamment réparer les dommages induits par l'irradiation, menant à une accumulation des dommages ADN au cours de la génération F2. Ainsi, l'accumulation de dommages à l'ADN détectée au fil des générations mobiliserait de plus amples dépenses énergétiques, aux dépens de la croissance et de la reproduction des organismes. Ceci expliquerait alors les effets sur la croissance dès $4,70 \text{ mGy.h}^{-1}$ et les retards de libération de ponte pour les débits de dose supérieurs à $0,65 \text{ mGy.h}^{-1}$ en génération F2 (débits de dose supérieurs aux valeurs de NED prédites). D'autre part, le modèle DEBtox prédit que les niveaux de dommages associés à ce mode d'action n'ont toujours pas atteint leurs valeurs d'équilibre à la fin de la génération F2. Cette observation laisse présager des effets encore plus prononcés dans les générations suivantes non testées. Toutes ces hypothèses demandent toutefois à être confirmées par des expériences et des analyses moléculaires complémentaires.

Pour résumer, les analyses DEBtox indiquent que le rayonnement gamma externe induit une augmentation précoce des coûts de production des œufs et une lente augmentation des coûts de croissance et de maturation au fil des générations. Cette combinaison de modes d'action concorde avec la littérature. Tout d'abord, un modèle DEBtox développé sur le nématode *C. elegans* a mis en évidence que l'irradiation gamma externe impliquait la même combinaison de mode d'action (Coûts de spermatogénèse et coûts de croissance). De plus, une augmentation des coûts de croissance et de maturation associée à une accumulation d'altérations de l'ADN a été démontrée chez *D. magna* exposée à l'U appauvri pour expliquer l'aggravation des effets au fil des générations (Alonzo *et al.*, 2014). En analogie à l'étude de Plaire (2013), nous avons également observé une accumulation des altérations de l'ADN au fil des générations associée à une augmentation des coûts de croissance et de maturation.

1.2. Contamination alpha interne

Dans le cas de la contamination alpha interne, le modèle DEBtox suggère que les modes d'action les plus probables concernent à la fois une augmentation des coûts de maintenance et une augmentation des coûts de production des œufs.

Une perturbation de la maintenance somatique affecte principalement la taille maximale de l'organisme (Kooijman *et Bedaux*, 1996). La taille maximale d'un organisme dépend de son assimilation par la nourriture et des coûts de maintenance somatique. On pourrait alors supposer que l'internalisation progressive de l'Am-241 dans les daphnies induirait une réduction de l'assimilation, comme il l'a été démontré chez *D. magna* exposée à l'U appauvri (Massarin, 2010). Toutefois, l'étude antérieure réalisée sur *D. magna* exposée pendant 23 jours à l'Am-241 (même niveaux d'exposition) avait mis en évidence une augmentation des taux de respiration alors que les taux d'ingestion étaient restés inchangés (Alonzo *et al.*, 2006). Ces observations ont été interprétées par les auteurs comme une augmentation des dépenses métaboliques induites par le stress radiologique et laissaient supposer une absence d'effet sur l'assimilation puisque l'apport d'énergie était resté constant. Des analyses histologiques de l'épithélium intestinal des daphnies et des mesures d'assimilation du carbone permettraient de confirmer cette hypothèse.

L'augmentation des dépenses métaboliques (Alonzo *et al.*, 2006) est en accord avec le mode d'action prédit par le DEBtox, puisqu'une augmentation des coûts de maintenance est caractéristique de la mise en place de processus de détoxification et de réparation des dommages (Jager *et Zimmer*, 2013). Ce mode d'action concorde également avec la littérature. Des perturbations de la croissance ont été mises en évidence chez le poisson tête de boule,

Pimephales promelas, exposé par voie de contamination interne à des doses environnementales de Radium-228 (émetteur α) ($< 16 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$). Les auteurs concluent que les effets observés sont liés à des modifications du métabolisme, telles que des perturbations de la synthèse de protéines (Mothersill *et al.*, 2013, 2014). L'augmentation des coûts de maintenance suggèrerait que les daphnies exposées à l'Am-241 ont besoin de détourner une certaine proportion d'énergie disponible pour réparer ou protéger leurs tissus somatiques et reproducteurs (Figure 68). Dans notre modèle, ce mode d'action est lié au niveau de dommages. Une fois internalisé l'Am-241 délivre de façon progressive un débit de dose croissant dans la génération F0. Nous pourrions alors supposer que le débit de dose alpha pourrait progressivement induire des dommages moléculaires dans les daphnies, qui en réponse à ce stress, mobiliseraient les systèmes de compensation ou de réparation. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses études *in vivo* et *in vitro*, démontrant l'importante génotoxicité des particules α chez la souris et le rat (Lorimore et Wright, 2003; Morgan, 2003ab). Chez les organismes aquatiques, des cassures double brin de l'ADN et une surexpression de gènes liés au stress oxydatif et la détoxification ont respectivement été mises en évidence dans les fibroblastes et le cerveau du poisson zèbre *Danio rerio* exposé à de faibles débits de dose de rayonnement alpha ($< 23 \text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) (Alonzo *et al.*, 2015). D'autres études ont également mis en évidence l'existence de nombreux processus de détoxification et de radioadaptation chez ce poisson (Choi *et al.*, 2010ab; Yu *et al.*, 2012).

Une augmentation des coûts de maintenance a également été mise en évidence par les analyses DEBtox conduites chez le nématode *C. elegans* exposé à l'atrazine, en parallèle d'une augmentation des activités antioxydantes (Swain *et al.*, 2010). Étant donné le fort potentiel génotoxique des rayonnements alpha, il serait intéressant de pouvoir réaliser des mesures d'activités des enzymes antioxydantes sur les daphnies exposées aux rayonnements alpha afin de tester l'hypothèse d'une potentielle induction de processus de détoxification. Dans l'approche DEBtox, le mécanisme d'augmentation des coûts de maintenance prédit initialement un léger effet sur la reproduction des organismes. Cependant, dans notre cas, il ne permet pas d'expliquer totalement les effets précoces observés sur la reproduction des daphnies des générations F1 et F2. Un mode d'action supplémentaire est nécessaire.

Le second mode d'action impliqué dans notre modèle DEBtox est une augmentation des coûts de production des œufs. Il suggère que l'Am-241 induit des effets directs sur la reproduction (Kooijman et Bedaux, 1996). Notre modèle décrit que l'Am-241 a besoin d'environ 20 jours pour atteindre sa concentration d'équilibre dans la génération F0, alors que cette dernière est atteinte à l'éclosion des néonates dans les générations F1 et F2. Ceci est principalement dû au fait que le stade œuf de la génération F0 n'était pas exposé. En conséquence, des pics de débits de dose alpha sont observés dans les stades œuf des générations

F1 et F2. On pourrait alors supposer que ces pics ($\sim 15 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la plus forte concentration) puissent induire d'importantes altérations moléculaires lors du développement embryonnaire des daphnies. Cette hypothèse est notamment soutenue par une étude montrant que de faibles doses de rayonnement alpha ($< 11,2 \text{ mGy}$) induisent une augmentation dose-dépendante de l'apoptose cellulaire dans les embryons du poisson *Danio rerio* (Yum *et al.*, 2010). De manière intéressante, la mort cellulaire programmée joue d'importants rôles dans la maturation des organes reproducteurs, le développement des embryons et la formation de structures tissulaires (Brill *et al.*, 1999). Cette explication coïncide avec la diminution précoce de la reproduction des daphnies exposées à $40 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les générations F1 et F2. Ceci pourrait également expliquer la mortalité précoce observée dans les générations F1 et F2 (stades œuf exposés) et son absence dans la génération F0 (stade œuf non exposé).

Toutefois, la transmission des dommages moléculaires entre les générations semble difficile à évaluer. En effet, le modèle DEBtox prédit que les différences d'exposition des daphnies semblent être les principales causes de l'aggravation des effets entre les générations F0 et F1, et qu'aucune aggravation des effets n'est prédite entre les générations F1 et F2. De plus, la diminution du nombre de daphnies observée en F1 (*e.g.* dû à la forte mortalité) aux plus forts débits de dose, ne nous permet pas de détecter des effets significativement comparables à la F2. Toutefois, les retards et les diminutions de croissance détectés respectivement à $40 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$ et dès $0,4 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans la génération F2, pourraient présager d'une accumulation de dommages ADN au fil des générations. Cette hypothèse demande à être testée en exposant toutes les générations de la même manière et en testant la transmission de dommages à l'ADN. Cette observation souligne l'importance du choix du design expérimental pour évaluer et comparer la toxicité de deux substances. Cette situation avait également été observée chez *D. magna* exposée à l'U appauvri où les conditions d'exposition des générations F0 et F1 différaient (Massarin, 2010; Plaire, 2013). Cela rejoindrait les conclusions de Villarroel *et al.* (2000), Sobral *et al.* (2001) et Arndt *et al.* (2014) soulignant l'importance de soumettre les générations successives au même régime d'exposition avant de pouvoir statuer d'une quelconque aggravation des effets.

Pour résumer, les analyses DEBtox indiquent que le rayonnement alpha interne induit en parallèle une augmentation des coûts de maintenance et une augmentation des coûts de croissance. À notre connaissance, il s'agit du seul modèle DEBtox combinant ces deux modes d'action pour expliquer les effets d'un toxique dans un contexte multigénérationnel.

1.3. Paramètres TK et TD estimés entre les deux types de rayonnements

Les approches classiques menées en écotoxicologie consistent soit à prédire des *ECx* (*x%* *Effect concentration*) en interpolant des courbes dose-réponse, soit à déterminer des *NOEC* (*No Observed Effect Concentration*) en utilisant des tests d'hypothèses. Cependant, ces valeurs écotoxicologiques sont fortement dépendantes des caractéristiques des bioessais (espèce biologique, critère d'effet, temps d'exposition *etc.*). Les modèles DEBtox quant à eux utilisent le concept de concentration sans effet (NEC), impliquant qu'au-delà d'un certain seuil, la concentration de la substance d'intérêt induit des perturbations sur le budget énergétique des organismes. Contrairement aux précédentes, la NEC est un concept extrêmement utile car elle présente l'avantage d'être indépendante du temps et commune à plusieurs critères d'effets (Kooijman, 2010; Jager et Zimmer, 2013).

Dans notre approche, les *NED* (*No Effect Damage*, équivalentes aux NEC) ont été déterminées pour les rayonnements gamma et alpha sur toutes les générations. Les valeurs de NED prédites par notre modèle correspondent à un niveau de dommages (en $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) à partir duquel chaque type de rayonnement aura des répercussions, aussi infimes soient-elles, sur le budget énergétique des daphnies. Dans un premier temps, le mode d'action des coûts de production des œufs suggère que les dommages moléculaires induiraient des effets sur la reproduction dès $0,490 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ pour le rayonnement gamma et dès $7,90 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ pour le rayonnement alpha. Compte tenu des différences d'intensité d'effets sur la reproduction entre les deux types de rayonnements, ces estimations semblent relativement logiques. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que les effets du Cs-137 observés au plus faible débit de dose ($0,007 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) de la génération F0 n'ont pas été pris en compte pour ne pas biaiser les estimations. Il serait intéressant de pouvoir intégrer ces effets au modèle.

Dans le cas du rayonnement gamma, la valeur de NED pour le mode d'action des coûts de croissance et de maturation indique que l'aggravation des effets au fil des générations se produirait seulement à partir de $0,144 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$. Cette valeur indique qu'un certain niveau de dommages moléculaires a besoin d'être atteint au cours des générations avant de produire un effet sur le budget énergétique des daphnies. Cette observation contraste avec les analyses conduites sur *D. magna* exposée à l'U appauvri suggérant que tous dommages à l'ADN auraient des conséquences sur le budget énergétique des daphnies (Alonzo *et al.*, 2014). Cette dernière suggestion concorde avec la NED du rayonnement alpha, avec une valeur de $34,4 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ pour le mode d'action des coûts de maintenance. Selon Tennekes et Sánchez-Bayo (2013), n'importe quel niveau d'exposition peut, à terme, induire des altérations moléculaires. L'intérêt est toutefois de savoir si les dommages moléculaires induits par ces faibles niveaux d'exposition

peuvent avoir des répercussions significativement détectables à l'échelle de l'organisme (*e.g.* croissance et reproduction). Ces interprétations ne seront valables que lorsque les intervalles d'incertitudes des différentes NED auront été calculés.

2. Comparaison de la radiotoxicité gamma et alpha

Différentes cinétiques d'effet et différents modes d'action ont été prédits entre le rayonnement alpha et gamma, illustrant que la comparaison entre les deux types d'émetteurs est plus complexe que prévue. Une valeur d'Efficacité Biologique Relative (EBR) allant de 2,5 à 5 a été estimée pour le rayonnement alpha. Toutefois, l'interprétation de cette valeur et sa comparaison avec la littérature scientifique disponible semble être difficile.

En radioprotection humaine, l'EBR est utilisé conjointement avec d'autres mesures pour dériver des facteurs de pondération (W_R). Ces facteurs de pondération ont été dérivés à partir d'une variété de critères d'effets incluant les dommages moléculaires, la mortalité cellulaire, les anomalies embryonnaires, l'induction de cancer *etc.* (Barendsen, 1968; ICRP, 1991, 2003). Ces facteurs sont ensuite multipliés par la dose absorbée (en Gy) pour donner la dose équivalente (en Sievert, Sv). Actuellement, les valeurs de facteurs de pondération pour l'Homme équivalent à 20 pour les particules alpha. À ce jour, il n'existe pas de véritable consensus concernant les valeurs de W_R alpha à utiliser en radioprotection environnementale (ICRP, 2003; Chambers *et al.*, 2006; Higley *et al.*, 2012) et les W_R alpha dérivés pour l'Homme ne sont pas applicables aux espèces non-humaines. La raison principale réside dans le fait que les approches développées en radioprotection humaine et environnementale diffèrent conceptuellement. Alors qu'en radioprotection humaine, la santé de l'individu est primordiale, l'intérêt de la radioprotection environnementale est de protéger les populations et les écosystèmes. En conséquence, la radioprotection humaine a pour but de prévenir les effets déterministes (morbidité, effets sur le succès reproducteur *etc.*) et réduire les effets stochastiques (apparition de cancers, de leucémies, d'effets héréditaires *etc.*) (Higley *et al.*, 2012), alors que pour l'environnement l'objectif est de prédire les effets déterministes (FASSET, 2003).

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont tenté d'estimer des valeurs d'EBR dans le but de dériver des facteurs de pondération pour les espèces non-humaines. Ces dernières ont principalement mis en évidence une incertitude considérable dans l'estimation de l'EBR alpha, avec des valeurs allant de 1 à 377 (SNIFFER, 2002; FASSET, 2003; Hofmann *et al.*, 2004; Chambers *et al.*, 2006; UNSCEAR, 2008; Priest et Hoel, 2010; Franken *et al.*, 2012; Mothersill *et al.*, 2013; 2014). Parmi ces études, Chambers *et al.* (2006) ont réalisé un examen de la littérature disponible afin de sélectionner avec pertinence des valeurs d'EBR alpha

obtenues sur les espèces non-humaines. Parmi les 1000 études analysées, seules 61 valeurs d'EBR résultaient d'effets déterministes, avec principalement des effets sur les mammifères (54 valeurs représentées par 4 espèces) et de la mortalité (mortalité cellulaire avec 53 valeurs). La distribution log-normale de ces valeurs est égale à 3,9 avec un intervalle de confiance à 95 % entre 3,2 et 4,7. Ces valeurs coïncident fortement avec les valeurs d'EBR alpha estimées pour la croissance, la reproduction et la survie des daphnies au cours de notre projet (avec une moyenne de $3,55 \pm 0,75$, valeur non présentée). Cependant, comparer nos valeurs d'EBR avec celles de la littérature est peu pertinent, puisque chaque espèce est plus ou moins radiosensible, chaque débit de dose est mesuré avec plus ou moins de précision et chaque critère d'effet répond différemment. Même si l'on s'affranchit de ces paramètres, les propriétés intrinsèques des rayonnements rendent l'estimation d'une EBR compliquée. Par exemple, dans notre cas, le rayonnement gamma délivre instantanément une dose diffuse dans tous les tissus des daphnies alors que le rayonnement alpha délivre une dose qui est fortement dépendante de l'internalisation et de la distribution de l'Am-241 dans les différents tissus.

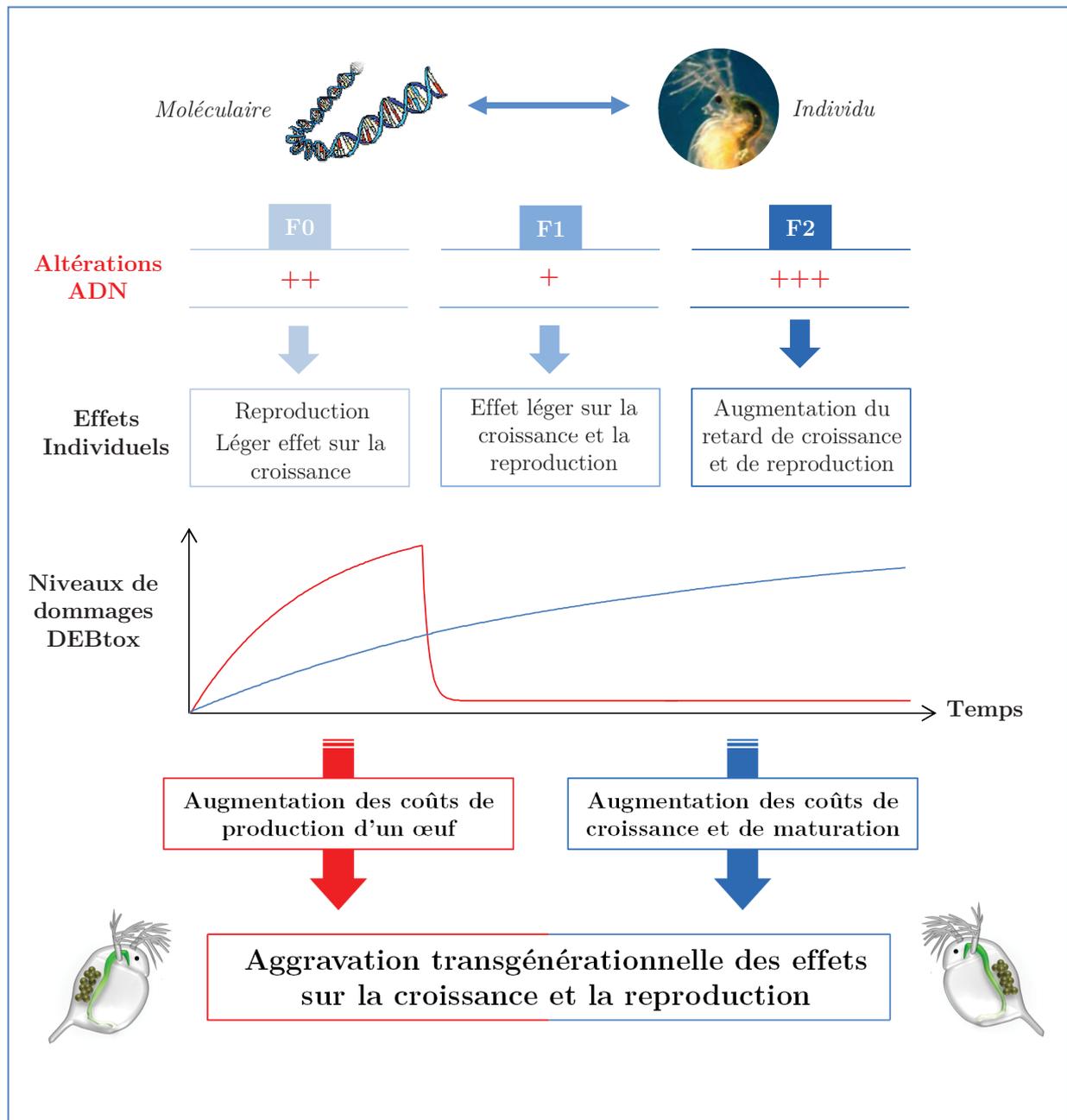
Ces difficultés d'estimation d'EBR sont particulièrement récurrentes dans les études à faibles débits de dose. Les raisons de ces difficultés peuvent être liées à : (i) une absence d'effets aux faibles doses (Walsh *et al.*, 2015), (ii) des amplitudes d'effets incomparables (Mothersill *et al.*, 2013) justifiant l'intérêt du modèle DEBtox où l'on peut choisir des prédictions comparables, (iii) des difficultés dans l'estimation de la dose reçue par les organismes ou par l'organe cible dans le cas d'une contamination (SNIFFER, 2002), (iv) des distributions différentes des émetteurs dans les tissus (Alonzo *et al.*, 2015) *etc.* Ces différents exemples soulignent que l'EBR d'un rayonnement donné dépend de nombreux facteurs, expliquant ainsi la difficulté d'estimation. D'une manière générale, l'EBR d'un rayonnement dépend : (i) de son énergie déposée par unité de longueur (TEL), (ii) de l'organisme étudié, (iii) des conditions de l'expérience (état physiologique de l'organisme, température, oxygène *etc.*), (iv) des doses sélectionnées et mesurées, (v) de la distribution de la dose dans l'organisme, (vi) du critère d'effet sélectionné et de l'ampleur de l'effet considérée (Higley *et al.*, 2012).

En raison de ces difficultés, le rapport de UNSCEAR (2008b) a clairement statué qu'il était très difficile, voire impossible, de dériver des facteurs de pondération valides et applicables sur l'ensemble des espèces animales et végétales dans le cadre de la protection de l'environnement. C'est d'ailleurs pour ces raisons que les travaux de l'ACRP (2002); FASSET (2003); Chambers *et al.* (2006); Higley *et al.* (2012) ont suggéré une valeur arbitraire de W_R équivalent à 10 pour caractériser les effets déterministes du rayonnement alpha en radioprotection environnementale. L'unique but de cette valeur est « d'illustrer » l'impact du facteur de pondération alpha dans les calculs de dose interne.

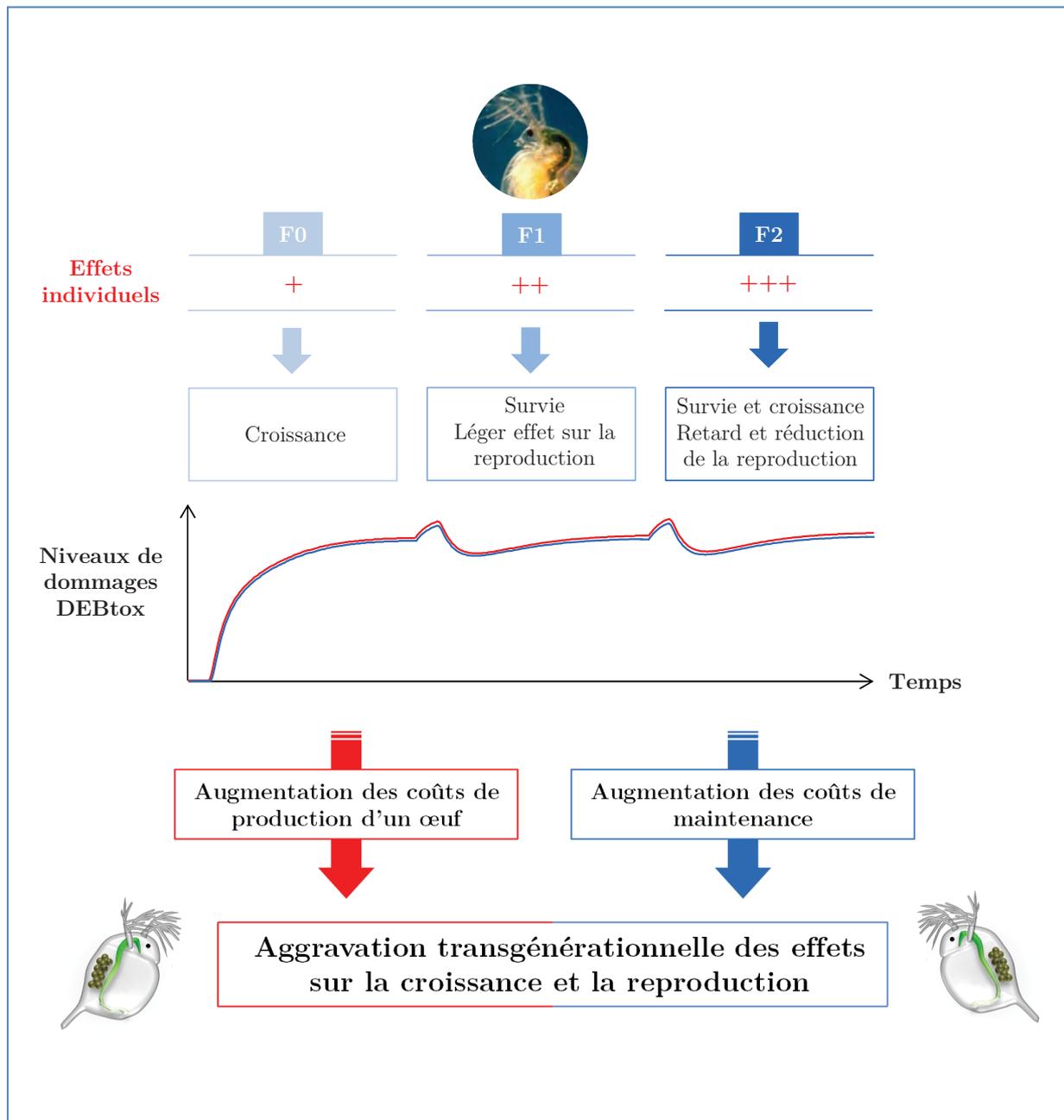
3. Conclusion

Nous avons réussi à ajuster deux modèles DEBtox indépendants pour les jeux de données multigénérationnelles des expériences d'irradiation gamma externe (Cs-137) et de contamination alpha interne (Am-241). Dans les deux cas, deux compartiments de dommages transgénérationnels, impliquant chacun un mode d'action métabolique distinct, ont été nécessaires pour expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction de *D. magna* au cours des trois générations successives. Les résultats de modélisation suggèrent que le Cs-137 et l'Am-241 agissent selon deux combinaisons de modes d'action différentes au fil des générations (Figure 68 et 69). Nos conclusions restent toutefois à nuancer dans la mesure où la paramétrisation du modèle présentée dans ce travail de thèse mérite d'être assortie d'une estimation d'incertitude.

Le modèle DEBtox suggère également une cinétique d'apparition des effets différente entre les types de rayonnements, rendant l'estimation d'une Efficacité Biologique Relative (EBR) difficile à calculer. Les résultats de l'estimation, avec un EBR alpha allant de 2,5 à 5, semblent toutefois confirmer la théorie dominante que le rayonnement alpha est plus radiotoxique que le rayonnement gamma (Chambers *et al.*, 2006; Higley *et al.*, 2012; Alonzo *et al.*, 2015). Cependant, le concept de l'EBR reste très discutable dans le domaine de la radioprotection environnementale puisque de nombreux facteurs confondants peuvent influencer sa détermination (scénarios d'exposition, exposition ou non des stades critiques, débits de dose, espèces et critères d'effets sélectionnés, types d'émetteurs *etc.*). Il est évident que les progrès réalisés en radioprotection humaine au cours des dernières décennies peuvent aider à améliorer le système de radioprotection environnementale déjà en place. Cependant, par rapport à l'Humain, il existe beaucoup de contraintes inhérentes aux espèces animales et végétales lorsque l'on tente d'évaluer l'impact des rayonnements ionisants. Dans ce contexte, il est important de garder à l'esprit les limites de la transversalité entre la radioprotection humaine et environnementale car leurs objectifs sont extrêmement différents.



Figures 69. Synthèse des principaux effets observés lors d'une exposition de daphnies à l'irradiation gamma externe (Cs-137) au cours de trois génération successives (F0, F1 et F2) associés aux modes d'action métaboliques prédits par les analyses DEBtox.



Figures 70. Synthèse des principaux effets observés lors d'une contamination alpha interne de daphnies à l'Am-241 au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2) associés aux modes d'action métaboliques prédits par les analyses DEBtox.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux de thèse était d'évaluer et de comprendre les effets des radiations ionisantes sur un invertébré aquatique, *Daphnia magna*, dans un contexte multigénérationnel. Dans un premier temps, la démarche expérimentale a consisté à explorer les potentielles conséquences des altérations de l'ADN sur les traits d'histoire de vie de la daphnie lors d'une exposition chronique au rayonnement gamma sur trois générations successives. Dans un second temps, le travail de modélisation visait à développer un modèle de Budget d'Énergie Dynamique (DEBtox) à deux compartiments de dommages transgénérationnels, afin d'identifier les processus métaboliques impliqués lors d'une irradiation gamma externe et une contamination alpha interne. En parallèle, l'approche DEBtox avait pour objectif de comparer la radiotoxicité des rayonnements gamma et alpha en tentant de déterminer l'Efficacité Biologique Relative (EBR) du rayonnement alpha.

1. Conclusion générale

1.1. Explorer le lien entre les réponses moléculaire et individuelle

Les résultats expérimentaux montrent que les effets de l'irradiation gamma externe sur la croissance et la reproduction des daphnies augmentent en intensité au cours des trois générations successives. Les effets se manifestent par une réduction précoce de la reproduction au plus fort débit de dose de la première génération, et par une augmentation progressive des retards de croissance et de reproduction à des débits de dose de plus en plus faibles au bout de la troisième génération. En parallèle, une accumulation et une transmission des altérations de l'ADN ont été constatées de la première à la troisième génération, conduisant dans la troisième génération, à une détection d'altérations de l'ADN à tous les débits de dose testés. Bien que l'intensité des effets augmente au fil des générations, les effets sur la reproduction diminuent transitoirement de la première à la seconde génération, en parallèle d'une absence d'altérations de l'ADN. Des processus de réparation de l'ADN transitoirement plus efficaces ont été proposés pour expliquer la diminution des effets à l'échelle de l'organisme au cours de la seconde génération.

Cette approche expérimentale souligne plusieurs points importants. Premièrement, elle démontre qu'une exposition parentale à de faibles débits de dose peut conduire à des effets plus intenses dans les générations suivantes. Deuxièmement, les effets observés à l'échelle individuelle et moléculaire partagent une tendance commune au fil des générations de *D. magna*, suggérant une corrélation entre la reprotoxicité et la génotoxicité des radiations ionisantes. Troisièmement, les perturbations induites par l'irradiation au niveau moléculaire ont été constatées à des débits de dose plus faibles et après une plus courte durée d'exposition que

les effets observés à l'échelle individuelle. Ceci suggère une possible utilisation des analyses moléculaires comme indicateurs précoces d'effets à venir sur les traits d'histoire de vie des organismes. Pour finir, les dommages moléculaires et leurs effets associés au niveau individuel ont été constatés à un débit de dose minimal de $0,007 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, en dessous du critère de radioprotection internationale de $10 \text{ }\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ (Garnier-Laplace *et al.*, 2010). Les radiations ionisantes à faibles doses pourraient avoir des conséquences plus importantes que celles prédites par les modèles d'extrapolation basés sur des données à fortes doses (Copplestone *et al.*, 2001). Cette étude indique clairement qu'il est nécessaire d'étudier et de comprendre davantage les effets transgénérationnels induits par les faibles doses de rayonnement. Des approches mécanistes approfondies pourraient aider à mieux comprendre les liens complexes entre les réponses moléculaire et individuelle.

1.2. Donner un sens à la radiotoxicité gamma et alpha à l'aide du modèle DEBtox

Les résultats de la modélisation indiquent que deux compartiments de dommages transgénérationnels, impliquant chacun un mode d'action métabolique distinct, ont été nécessaires pour expliquer les effets sur la taille et la reproduction des daphnies exposées à une irradiation gamma externe et à une contamination alpha interne. Dans le cas de l'irradiation externe, les résultats de modélisation suggèrent que le rayonnement gamma induit une augmentation précoce des coûts de production des œufs et une lente augmentation des coûts de croissance et de maturation au fil des générations. Dans le cas de la contamination interne, les résultats indiquent que le rayonnement alpha induit une augmentation des coûts de production des œufs, en parallèle d'une augmentation des coûts de maintenance au fil des générations. Les différentes cinétiques et différents modes d'action impliqués entre le rayonnement gamma et alpha illustrent toute la complexité à réaliser des comparaisons d'effets entre deux types de rayonnements. Basées sur les seules comparaisons d'effets disponibles entre les deux émetteurs, des valeurs d'Efficacité Biologique Relative allant de 2,5 à 5 ont été estimées pour le rayonnement alpha. Ces valeurs indiquent que la radiotoxicité alpha est 2,5 à 5 fois supérieure à la radiotoxicité gamma selon le critère d'effet sélectionné (parmi la survie, la croissance et la reproduction). L'interprétation de ces valeurs reste cependant entravée par les différences de répartition de la dose de radioactivité, à la fois dans le temps et dans l'organisme, entre les deux types de rayonnements. Alors que le rayonnement gamma (Cs-137) délivre rapidement une dose dans tous les tissus des daphnies, le rayonnement alpha délivre une dose qui est fortement dépendante de l'internalisation et de la distribution de l'Am-241 dans les tissus. Pour ces raisons, comparer les effets induits de différents types de rayonnements reste un enjeu très complexe en radioprotection.

Même si la modélisation DEBtox apparaît comme une approche consommatrice de temps et de données, elle représente clairement un outil puissant pour :

- (i) Lier les mécanismes moléculaires aux effets à l'échelle de l'individu, comme c'est le cas par exemple, chez *D. magna* exposée à l'irradiation gamma externe.
- (ii) Identifier les processus métaboliques sous-jacents affectés par la radiotoxicité.
- (iii) Considérer les réponses radiotoxiques comme des processus dynamiques pouvant varier au cours des générations et permettant de prendre en compte les situations d'exposition contrastées, comme celles entre l'irradiation gamma externe et la contamination alpha interne.
- (iv) Dériver des valeurs toxicologiques (*NEC*, *No Effect Concentration* ; *NED*, *No Effect Damage etc.*) indépendantes du temps et des générations.
- (v) Produire des prédictions dans des situations d'exposition non testées (temps et débits de dose *etc.*) pouvant être utilisées pour des extrapolations robustes au niveau de la population.

Pour conclure, ces travaux de thèse contribuent à apporter des connaissances significatives sur les effets chroniques des radiations ionisantes à faibles doses. Différents mécanismes d'action ont été suggérés pour expliquer les variations d'effets observées au cours des générations, illustrant toute la complexité des réponses à long terme des systèmes biologiques. Face à cette complexité, l'enjeu est de multiplier les approches impliquant différents niveaux d'organisation biologique afin d'améliorer la compréhension des liens complexes unissant chaque niveau d'organisation. De toute évidence, les approches mécanistes aux niveaux d'organisation supérieurs tels que la population semblent nécessaires pour élucider de manière pertinente les conséquences écologiques des effets à long terme des radiations ionisantes. Bien que ces enjeux restent évidemment très compliqués, l'intégration des bases fondamentales de l'écotoxicologie et de la radioprotection humaine, pourraient apporter de précieux outils à la radioprotection environnementale. Notamment, les aspects combinés de la modélisation et des nouvelles technologies moléculaires employées dans ces deux domaines, pourraient à terme, permettre de répondre aux actuelles lacunes scientifiques de la radioprotection environnementale (Copplestone *et al.*, 2010; Jager *et al.*, 2014; Vandegheuchte et Janssen, 2014; Baas et Kooijman, 2015; Garnier-Laplace *et al.*, 2015; Preston, 2015; Schmitt *et al.*, 2015)

2. Perspectives de recherches

Au cours de ce travail, nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer les variations d'effets induits par l'irradiation gamma externe au cours des générations. Parmi ces hypothèses, la notion d'épigénétique a été abordée. L'épigénétique est l'étude des changements géniques ou cellulaires, causés par des mécanismes autres que des changements de séquences d'ADN, et pouvant être héréditaires d'une génération à l'autre. Les processus épigénétiques, incluant la méthylation de l'ADN et la modification des histones, régulent une large gamme de gènes impliqués dans des mécanismes essentiels à la vie des organismes. Parmi ces gènes, ceux impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN et les contrôles du cycle cellulaire semblent être particulièrement sensibles aux processus épigénétiques (Kovalchuk *et al.*, 2004; Pogribny *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2010; Deem *et al.*, 2012). Ainsi, nous envisageons de quantifier les taux de méthylation globale sur les échantillons d'ADN utilisés au cours de ces travaux de thèse. Les objectifs de cette future démarche sont: (i) de tenter d'élucider si des mécanismes épigénétiques sont en partie responsables des effets décelés dans la génération F0 à 0,007 mGy.h⁻¹, (ii) d'évaluer la contribution des processus génétiques et épigénétiques au cours des générations, (iii) de tester si des changements épigénétiques ont un lien causal avec les effets observés à l'échelle de l'organisme et (iv) d'évaluer la persistance à long terme des modifications épigénétiques.

Les analyses moléculaires réalisées au cours de l'expérience d'irradiation ont permis de mettre en évidence une accumulation de dommages ADN au fil des générations. Cependant, elles ont également laissé présager l'induction de processus de réparation entre la première et la seconde génération. Par conséquent, il serait intéressant de compléter ces résultats par des analyses moléculaires nous permettant d'affirmer ou de réfuter la potentielle induction de mécanismes de réparation de l'ADN. Les radiations ionisantes sont capables d'interagir directement avec l'eau des cellules, conduisant à une production des espèces réactives de l'oxygène (*ROS*). Le stress oxydant engendré par les ROS peut directement induire des dommages à l'ADN. Il serait donc intéressant de quantifier l'activité des enzymes antioxydantes telles que la glutathionine-S-transférase (GST), la glutathionine réductase (GR), la catalase (CAT) ou encore la superoxyde dismutase (SOD). Tout en sachant que ces enzymes sont impliquées dans les mécanismes de défenses cellulaires contre les ROS. Cette première démarche nous permettrait à la fois de déterminer si les ROS sont à l'origine des dommages ADN et de définir si des mécanismes de défenses cellulaires ont été initiés. En parallèle le suivi de certaines protéines clés telles que les protéines kinase DNA-PK, Ku70, et Ku80 permettraient de précisément quantifier les mécanismes de réparation de l'ADN. Il aurait été également intéressant d'étudier le taux d'apoptose cellulaire afin d'évaluer le rôle de ce

mécanisme dans les variations d'effets observées au fil des générations. Le coût énergétique de ces différents processus pourrait notamment être pris en compte dans le modèle de Budget d'Énergie Dynamique (DEBtox).

Les analyses DEBtox ont prédit différents modes d'action en fonction du type de rayonnement. L'inférence Bayésienne pourrait être utilisée pour estimer les différents paramètres du modèle et leurs intervalles d'incertitudes associés. Une valeur de NED assortie de son intervalle de confiance est indispensable pour définir le niveau de dommages à partir duquel un rayonnement ionisant peut avoir des effets significatifs sur le budget énergétique de la daphnie et au-delà duquel ces effets peuvent s'aggraver au fil des générations. De plus, les modes d'action prédits par le modèle pourraient être vérifiés expérimentalement à l'aide de puces à ADN focalisées sur des gènes spécifiques, tels que le développement des cellules somatiques et germinales. Cette démarche permettrait de réaliser un lien direct et robuste entre les effets observés aux niveaux moléculaire, métabolique et individuel.

Les prédictions du modèle DEBtox pourraient également être appliquées aux modèles de population (matrice de Leslie) afin de réaliser une extrapolation écologiquement pertinente des effets observés, de l'individu à la population. Dans ce contexte écologiquement pertinent, les radiations ionisantes ne sont pas les seuls facteurs à influencer les populations naturelles. Dans la nature, l'environnement peut être soumis à des variations de nourriture, de température ou même être en contact de plusieurs contaminants. Au cours de ces travaux, les expériences ont été réalisées en conditions optimales. Il pourrait alors être intéressant d'étudier les effets des rayonnements ionisants combinés à des fluctuations de nourriture, de température et de luminosité. L'interaction de prédateurs ou d'autres contaminants pourrait également être envisagée. Ces démarches permettraient de se rapprocher encore un peu plus de la réalité.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications scientifiques

Parisot F., Alonzo F., and Garnier-Laplace J. An energy-based modelling to analyze radiotoxicity of external gamma and internal alpha radiation in *Daphnia magna* over three successive generations. *In Prep.*

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Plaire D., Adam-Guillermin C., & Alonzo F. **2015**. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 163, 27-36.

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. *Ecotoxicology* 22(5):869–878. DOI 10.1007/s10646-013-1078-5.

Livrable scientifique

Alonzo F., Horemans N., Oughton D., Adam-Guillermin C., Lecomte-Pradines C., **Parisot F.**, Zimmer, E., **2015**. DELIVERABLE (D-N°5.5) Protection criteria: Integrating radiation effects from molecules to populations and evaluation of group-specific criteria. *STAR* 1, 69.

Communications orales

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F. **2015**. DNA alterations and effects on energy budget in *Daphnia magna* during chronic external gamma irradiation over three successive generations. 4th Symposium on DEB Theory. Marseille, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F. **2015**. Etude mécaniste de la toxicité des radiations ionisantes chez *Daphnia magna*. Congrès de l'Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement (EDSE). Cassis, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F. **2015**. Etude mécaniste de la toxicité des radiations ionisantes chez *Daphnia magna*. Journées des thèses de l'IRSN. L'isle-sur-la-Sorgue, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., et Alonzo F. **2014**. Etude mécaniste de la toxicité des radiations ionisantes chez *Daphnia magna*. Colloque Société d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA). Besançon, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Plaire D., Adam-Guillermin C., and Alonzo F. **2014**. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. Workshop on Transgenerational and Epigenetic Mechanisms of Radiation Toxicity at Chronic Doses - COMET and STAR Workshop. Oxford, UK.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., and Alonzo F. **2014**. Mechanistic study of toxicity of ionizing radiation in *Daphnia magna*. 3rd International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER). Barcelone, Espagne.

Communications affichées

Parisot F., Alonzo F., and Garnier-Laplace J. **2015**. Making sense of radiation toxicity data using DEBtox : How do alpha and gamma radiation compare ? STAR Final Dissemination Event. Aix-en-Provence, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., and Alonzo F. **2015**. Radiation effects in *Daphnia magna* : Exploring the link between molecular and individual responses. STAR Final Dissemination Event. Aix-en-Provence, France.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F. **2015**. DNA alterations and effects on energy budget in *Daphnia magna* during chronic external gamma irradiation over three successive generations. SETAC Europe 25th Annual Meeting. Barcelone, Espagne.

Parisot F., Bourdineaud J.-P., Adam-Guillermin C., et Alonzo F **2014**. Etude mécaniste de la toxicité des radiations ionisantes. Les Doctoriales en Provence. Aix-en-Provence, France.

Concours

Parisot F., Alonzo F. et Poggiale J.-C., **2015**. Les faibles doses de radioactivité présentent-elles des risques à long terme pour l'environnement ? Les Doctoriales en Provence. France

« **Concours ma thèse en 180 secondes** »: 1^{er} Prix.

(vidéo lors de la journée des thèses IRSN :<https://www.youtube.com/watch?v=Ai4cMC4L5Q4>)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aarkrog, A., 2003. Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 50, 2597-2606.
- Abbott, D.T., Mix, M., 1979. Radiation effects of tritiated seawater on development of the goose barnacle, *Pollicipes polymerus*. *Health Physics* 36, 283-287.
- ACRP, 2002. Advisory Committee on Radiological Protection (ACRP). Protection of Non-Human Biota from Ionizing Radiation. Canadian Nuclear Safety Commission (CNSC). *Canadian Nuclear Safety Commission (CNSC) INFO-0703*.
- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, pp. 67-103.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint, Bone, Spine* 74, 324-329.
- Alamri, O.D., Cundy, A.B., Di, Y., Jha, A.N., Rotchell, J.M., 2012. Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus sp.* *Environmental Pollution* 168, 107-112.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Colao, B.N., Kammenga, J.E., 2006. Temporal dynamics of effect concentrations. *Environmental Science & Technology* 40, 2478-2484.
- 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.A., Garnier-Laplace, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 87, 146-156.
- Alonzo, F., Horemans, N., Oughton, D., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., Parisot, F., Zimmer, E., 2015. DELIVERABLE (D-N°5.5) Protection criteria: Integrating radiation effects from molecules to populations and evaluation of group-specific criteria. *STAR* 1, 69.
- Alonzo, F., Zimmer, E., Plaire, D., Buisset-Goussen, A., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., Horemans, N., 2014. DELIVERABLE (DN 5.4) Understanding the “metabolic” mode of actions of two different types of radiation using biokinetics/DEB-tox models. *STAR* 1, 69.
- Álvarez, O.A., Jager, T., Redondo, E.M., Kammenga, J.E., 2006. Physiological modes of action of toxic chemicals in the nematode *Acrobeloides nanus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 3230-3237.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 7915-7922.
- Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102, 9-12.

- Antunes, S., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 207-213.
- Ardestani, M.M., Oduber, F., van Gestel, C.A., 2014. A combined toxicokinetics and toxicodynamics approach to assess the effect of porewater composition on cadmium bioavailability to *Folsomia candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1570-1577.
- Arndt, D.A., Chen, J., Moua, M., Klaper, R.D., 2014. Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 541-547.
- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1899-1912.
- Ashauer, R., Boxall, A.B., Brown, C.D., 2007. Modeling combined effects of pulsed exposure to carbaryl and chlorpyrifos on *Gammarus pulex*. *Environmental Science & Technology* 41, 5535-5541.
- Ashauer, R., Brown, C.D., 2008. Toxicodynamic assumptions in ecotoxicological hazard models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1817-1821.
- Ashauer, R., Escher, B.I., 2010. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 2056-2061.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., Caravatti, I., Kretschmann, A., Escher, B.I., 2010. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. *Environmental Science & Technology* 44, 3963-3971.
- ASTM, 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and amphibians. *Annual Book of ASTM Standards*, pp 271-296.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences* 59, 241-250.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random-amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2275-2282.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology* 50, 1-12.

- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 125-140.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research, Reviews in Mutation Research* 613, 76-102.
- Augustine, S., 2012. Metabolic programming of zebrafish, *Danio rerio* uncovered. Physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget Theory and life-cycle consequences of uranium induced perturbations. Thèse IRSN. Université Aix-Marseille et Vrije Universiteit.

B

- Baas, J., Jager, T., Kooijman, B., 2010. A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures. *Science of the Total Environment* 408, 3740-3745.
- Baas, J., Kooijman, S.A., 2015. Sensitivity of animals to chemical compounds links to metabolic rate. *Ecotoxicology* 24, 657-663.
- Barata, C., Baird, D.J., 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology* 48, 195-209.
- Barber, M.C., 2003. A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1963-1992.
- Barber, R., Plumb, M.A., Boulton, E., Roux, I., Dubrova, Y.E., 2002. Elevated mutation rates in the germ line of first-and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 6877-6882.
- Barber, R.C., Dubrova, Y.E., 2006. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 598, 50-60.
- 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.
- Barendsen, G., 1968. Responses of cultured cells, tumours, and normal tissues to radiations of different linear energy transfer. *Health Research Organization TNO*, Rijswijk, Netherlands.
- Barendsen, G., 1994. The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammalian cells: biophysical and molecular mechanisms. *Radiation Research* 139, 257-270.
- Barsi, A., Jager, T., Collinet, M., Lagadic, L., Ducrot, V., 2014. Considerations for test design to accommodate energy budget models in ecotoxicology: A case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1466-1475.

- Beaudouin, R., Dias, V., Bonzom, J.M., Péry, A., 2012. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology* 21, 1225-1239.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Physics* 90, 485-493.
- Beresford, N., Wright, S., Barnett, C., Hingston, J., i Batlle, J.V., Coppelstone, D., Kryshev, I., Sazykina, T., Pröhl, G., Arkhipov, A., 2005. A case study in the Chernobyl zone Part 2: Predicting radiation induced effects in biota. *Radioprotection* 40, S299-S305.
- Bernhard, W.A., Close, D.M., 2003. DNA damage dictates the biological consequences of ionizing irradiation: The chemical pathways. Marcel Dekker: New York.
- 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.
- Beyer, W.N., Meador, J.P., 2011. Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations. *CRC Press*.
- Biermans, G., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Saenen, E., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J., Cuyper, 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.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M.L., Péry, A.R., Charles, S., 2008a. A Bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. *Environmental Science & Technology* 42, 8978-8984.
- Billoir, E., Laure Delignette-Muller, M., Péry, A.R.R., Geffard, O., Charles, S., 2008b. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of Theoretical Biology* 254, 55-64.
- Biron, P.A., Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Charles, S., Billoir, E., 2012. Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 46, 1136-1143.
- Box, G.E., 1976. Science and statistics. *Journal of the American Statistical Association* 71, 791-799.
- Brausch, J.M., Salice, C.J., 2011. Effects of an environmentally realistic pesticide mixture on *Daphnia magna* exposed for two generations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 272-279.
- Bréchnignac, F., Paquet, F., 2013. Radiation-induced risks at low dose: moving beyond controversy towards a new vision. *Radiation and Environmental Biophysics* 52, 299-301.
- Brenner, D., Ward, J., 1992. Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *International Journal of Radiation Biology* 61, 737-748.

- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V., 1999. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16, 512-519.
- Brown, F.B., 2003. MCNP–A General Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5. *Los Alamos National Laboratory, Oak Ridge, TN*.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771-1789.
- Brumfiel, G., 2011. <http://blogs.nature.com/news/2011/09/directlycomparingfukushimat.html>.
- Buijtendijk, F.J.J., 1918. Combined action of narcotics and potassium cyanide on daphne. *Archives Néerlandaises de physiologie* 2 : 521-524.
- Buisset-Goussen, A., 2014. Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle: le nématode *Caenorhabditis elegans*. Université Aix-Marseille.
- Burlakova, E., Goloshchapov, A., Gorbunova, N., Gurevich, S., Zhizhina, G., Kozachenko, A., Konradov, A., Korman, D., Molochkina, E., Nagler, L., 1998. Peculiarities of Biological Action of Low Irradiation Doses and Their Probable Relation to the Health State of Participants of Chernobyl Accident Liquidation.

C

- Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Bourdineaud, J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 312-319.
- Chambers, D.B., Osborne, R.V., Garva, A.L., 2006. Choosing an alpha radiation weighting factor for doses to non-human biota. *Journal of Environmental Radioactivity* 87, 1-14.
- Chapman, P.M., Caldwell, R.S., Chapman, P.F., 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 77-79.
- Chen, Y., Huang, J., Xing, L., Liu, H., Giesy, J.P., Yu, H., Zhang, X., 2014. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 234-243.
- Choi, V., Cheng, S.H., Yu, K., 2010. Radioadaptive response induced by alpha-particle-induced stress communicated in vivo between zebrafish embryos. *Environmental Science & Technology* 44, 8829-8834.
- Choi, V., Lam, R., Chong, E., Cheng, S.H., Yu, K., 2010. Designing experimental setup and procedures for studying alpha-particle-induced adaptive response in zebrafish embryos in vivo. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 268, 651-656.

- Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Gilbert, D., Thomas, W.K., Tucker, A., Oakley, T.H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G.J., Basu, M.K., 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science* 331, 555-561.
- Connelly, S.J., Moeller, R.E., Sanchez, G., Mitchell, D.L., 2009. Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* 85, 144-152.
- Cooley, J., Miller, J., FL, 1971. Effects of chronic irradiation on laboratory populations of the aquatic snail *Physa heterostropha*. *Radiation Research* 47, 716-724.
- Copplestone, D., Bielby, S., Jones, S., 2001. Impact assessment of ionising radiation on wildlife. *Environment Agency*, London (United Kingdom).
- Copplestone, D., Brown, J., Beresford, N., 2010. Considerations for the integration of human and wildlife radiological assessments. *Journal of Radiological Protection* 30, 283.
- Copplestone, D., Hingston, J., Real, A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1456-1463.

D

- Dahlhoff, E.P., 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology* 66, 183-207.
- 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.
- Darby, S.C., Doll, R., 1987. Fallout, radiation doses near Dounreay, and childhood leukaemia. *BMJ* 294, 603-607.
- Dauer, L.T., Brooks, A.L., Hoel, D.G., Morgan, W.F., Stram, D., Tran, P., 2010. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, ncq141.
- David, R., 2009. Xenobiotic metabolism and markers of genotoxicity in regulatory non-vertebrate ecotoxicological test species. University of Birmingham.
- David, R.M., Dakic, V., Williams, T.D., Winter, M.J., Chipman, J.K., 2011. Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquatic Toxicology* 104, 192-204.
- De Bruijn, J., van Leeuwen, K., 1996. No-effect concentrations in environmental policy. *The Analysis of Aquatic Toxicity Data*. VU University Press, Amsterdam, The Netherlands, 1-8.
- De Coen, W., Robbens, J., Janssen, C., 2006. Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. *Environmental Pollution* 141, 283-294.
- De Meester, L., 1996. Evolutionary potential and local genetic differentiation in a phenotypically plastic trait of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. *Evolution*, 1293-1298.

- de OF Rossetto, A.L., Melegari, S.P., Ouriques, L.C., Matias, W.G., 2014. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Science of the Total Environment* 490, 807-814.
- De Schamphelaere, K., Forrez, I., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Janssen, C., 2007. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 81, 409-418.
- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The population genetic structure of *Littorina littorea* (*Mollusca: Gastropoda*) along a pollution gradient in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. *Science of the Total Environment* 325, 59-69.
- Dedeh, A., Ciutat, A., Tran, D., Bourdineaud, J.-P., 2014. DNA Alterations Triggered by Environmentally Relevant Polymetallic Concentrations in Marine Clams *Ruditapes philippinarum* and Polychaete Worms *Hediste diversicolor*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 651-658.
- Deem, A.K., Li, X., Tyler, J.K., 2012. Epigenetic regulation of genomic integrity. *Chromosoma* 121, 131-151.
- 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*.
- Delius, B., 2015. DEB theory versus MTE. <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/essays/Deli2015.pdf>.
- Delpoux, M., Dulieu, H., Leonard, A., Dalebroux, M., 1996. Experimental study of the genetic effects of high levels of natural radiation in South-France.
- Denslow, N., Colbourne, J.K., Dix, D., Freedman, J.H., Helbing, C.C., S., K., 2007. Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics R. DiGiulio, W.H. Benson (Eds.), In genomic approaches for cross-species extrapolation in toxicology, *Taylor and Francis*, Washington, DC
- 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.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*—A multigenerational study. *Chemosphere* 79, 60-66.
- Dizdaroglu, M., 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research/DNAging* 275, 331-342.
- Dowling, K., Seymour, C., Mothersill, C., 2005. Delayed cell death and bystander effects in the progeny of Chinook salmon embryo cells exposed to radiation and a range of aquatic pollutants. *International Journal of Radiation Biology* 81, 89-96.
- Dubrova, Y.E., 2003. Radiation-induced transgenerational instability. *Oncogene* 22, 7087-7093.
- Dubrova, Y.E., Plumb, M., Gutierrez, B., Boulton, E., Jeffreys, A.J., 2000. Genome stability: transgenerational mutation by radiation. *Nature* 405, 37-37.

E

- Ebert, 2005. Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. ISBN 1-932811-06-0.
- Elendt, B. P., et Bias W. R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24 (9) 1157-1167.
- Engel, D., 1973. The radiation sensitivities of three species of fiddler crabs (*Uca pugilator*, *U. pugnax*, and *U. minax*). *Chesapeake Science* 14, 289-291.
- Environment Canada, 2003. Releases of radionuclides from nuclear facilities (impact on non-human biota). Priority substances list assessment report, Canadian environmental protection act, 1999. Ottawa: Environment Canada.
- Erickson, B., 1978. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 52, 117-128.
- Erickson, B., Martin, P., 1984. Reproductive and genetic effects of continuous prenatal irradiation in the pig. *Teratology* 30, 99-106.
- Erickson, B., Martin, P.G., 1976. Effects of continuous prenatal γ radiation on the pig and rat, Biological and environmental effects of low-level radiation.

F

- FASSET, 2003. Deliverable 3: dosimetric models and data for assessing radiation exposures to Biota.
- 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.
- 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., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272-280.
- Franken, N.A., Hovingh, S., Ten Cate, R., Krawczyk, P., Stap, J., Hoebe, R., Aten, J., Barendsen, G.W., 2012. Relative biological effectiveness of high linear energy transfer α -particles for the induction of DNA-double-strand breaks, chromosome aberrations and reproductive cell death in SW-1573 lung tumour cells. *Oncology Reports* 27, 769-774.
- Fuller, N., Lerebours, A., Smith, J.T., Ford, A.T., 2015. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review. *Aquatic Toxicology* 167, 55-67.

G

- Gajewski, E., Fuciarelli, A.F., Dizdaroglu, M., 1988. Structure of hydroxyl radical-induced DNA-protein crosslinks in calf thymus nucleohistone in vitro. *International Journal of Radiation Biology* 54, 445-459.
- Galic, N., Ashauer, R., Baveco, H., Nyman, A.M., Barsi, A., Thorbek, P., Bruns, E., Van den Brink, P.J., 2014. Modeling the contribution of toxicokinetic and toxicodynamic processes to the recovery of *Gammarus pulex* populations after exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1476-1488.
- Garnier-Laplace, J., Alonzo, F., Adam-Guillermin, C., 2015. Establishing relationships between environmental exposures to radionuclides and the consequences for wildlife: inferences and weight of evidence. *Annals of the ICRP*, 0146645315572311.
- Garnier-Laplace, J., Alonzo, F., Bradshaw, C., Della-Vedova, C., Lecomte-Pradines, C., Gilbin, R., Hertel-Aas, T., Hinton, T.G., Horemans, N., Oughton, D.H., Rudolfsen, G., Salbu, B., Vandenhove, H., 2011b. Plans for laboratory radiation effects studies. *European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672)*, 127 pp.
- Garnier-Laplace, J., Beaugelin-Seiller, K., Hinton, T.G., 2011a. Fukushima wildlife dose reconstruction signals ecological consequences. *Environmental Science & Technology* 45, 5077-5078.
- Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailes, C., Beresford, N., Howard, B., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *Journal of Radiological Protection* 30, 215.
- Garnier-Laplace, J., Geras'kin, S., Della-Vedova, C., Beaugelin-Seiller, K., Hinton, T., Real, A., Oudalova, A., 2013. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. *Journal of Environmental Radioactivity* 121, 12-21.
- Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brèthes, D., Bourdineaud, J.-P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6, 144-160.
- 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., Fesenko, S., Alexakhin, R., 2008. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environment International* 34, 880-897.
- 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.
- Gilhen, M., Cooper, K., Radbourne, K., Carrington, R., 2003. Current radionuclide activity concentrations in the Chernobyl Exclusion Zone and an assessment of the ecological impact. School of Biological Sciences, University of Liverpool (2001).

- Godoy, J., de Oliveira, M.S., de Almeida, C.E.B., de Carvalho, Z.L., da Silva, E.R., da Costa Fernandes, F., Pitanga, F.L., Danelon, O.M., 2008. ^{210}Po concentration in *Perna perna* mussels: looking for radiation effects. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 631-640.
- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., SanJuan-Reyes, N., 2014. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 164, 21-26.
- Goodhead, D.t., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65, 7-17.
- Goodhead, D.T., 1999. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *Journal of Radiation Research* 40, S1-S13.
- Goussen, B., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Bonzom, J.-M., Péry, A.R., 2015. Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans*: A case study on uranium. *Chemosphere* 120, 507-514.
- Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P., 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22, 633-648.
- Grung, M., Ruus, A., Holth, T.F., Sidhu, R.S., Eriksen, D.Ø., Hylland, K., 2009. Bioaccumulation and lack of oxidative stress response in the ragworm *H. diversicolor* following exposure to ^{226}Ra in sediment. *Journal of Environmental Radioactivity* 100, 429-434.
- Grygoryev, D., Moskalenko, O., Hinton, T., Zimbrick, J., 2013. DNA Damage Caused by Chronic Transgenerational Exposure to Low Dose Gamma Radiation in Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Radiation Research* 180, 235-246.
- Gudkov, D., Kipnis, L., 1996. Long-term effect of tritiated water on the biological indicators of *Daphnia magna*. *Hydrobiological Journal* 32, 1-10.

H

- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 74, 205-217.
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 70, 257-265.
- Han, J., Won, E.-J., Lee, B.-Y., Hwang, U.-K., Kim, I.-C., Yim, J.H., Leung, K.M.Y., Lee, Y.S., Lee, J.-S., 2014. Gamma rays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 152, 264-272.
- Harris, E.H., 1989. The *Chlamydomonas* sourcebook. *Cambridge Univ Press*.

- Harris, K.D., Bartlett, N.J., Lloyd, V.K., 2012. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genetics research international* 2012.
- Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1988. The effects of radiation on reproductive success of the polychaete worm *Neanthes arenaceodentata*. *US Environmental Protection Agency, report EPA/520/1-88-004, Washington, DC*.
- Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1994. Effects of chronic irradiation on the reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiation Research* 140, 401-409.
- Harrison, F.L., Rice Jr, D.W., Moore, D.H., Varela, M., 1983. Effects of radiation on frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in the benthic worm *Neanthes arenaceodentata*. *Lawrence Livermore National Lab., CA (USA)*.
- 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* 412-413, 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.
- Heugens, E.H., Jager, T., Creighton, R., Kraak, M.H., Hendriks, A.J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *Daphnia magna*: accumulation versus sensitivity. *Environmental Science & Technology* 37, 2145-2151.
- Higley, K., Kocher, D., Real, A., Chambers, D., 2012. Relative biological effectiveness and radiation weighting factors in the context of animals and plants. *Annals of the ICRP* 41, 233-245.
- Hill, A.V., 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 40, 4-7.
- Hinton, T., Février, L., 2011. STAR (Contract Number: Fission-2010-3.5. 1-269672) DELIVERABLE (DN° 1.1) Performance Report.
- Hinton, T.G., Byrne, M.E., Webster, S., Beasley, J.C., 2015. Quantifying the spatial and temporal variation in dose from external exposure to radiation: a new tool for use on free-ranging wildlife. *Journal of Environmental Radioactivity* 145, 58-65.
- Hiyama, A., Nohara, C., Kinjo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A., Otaki, J.M., 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific reports* 2.
- Hiyama, A., Nohara, C., Taira, W., Kinjo, S., Iwata, M., Otaki, J.M., 2013. The Fukushima nuclear accident and the pale grass blue butterfly: evaluating biological effects of long-term low-dose exposures. *BMC Evolutionary Biology* 13, 168.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr, G.A., Cairns Jr, J., 2002. Handbook of ecotoxicology. *CRC press*.

- Hofmann, W., Fakir, H., Aubineau-Laniece, I., Pihet, P., 2004. Interaction of alpha particles at the cellular level—implications for the radiation weighting factor. *Radiation Protection Dosimetry* 112, 493-500.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*, 65-70.

I

- IAEA, 1992. Effects of ionising radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards. Technical Reports Series No. 332. Vienna: *International Atomic Energy Agency*.
- Ichikawa, R., Suyama, I., 1974. Effects of tritiated water on the embryonic development of two marine teleosts. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.
- ICRP, 1977. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 26. *Annals of the ICRP* 1.
- ICRP, 1991. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP Publication 60. Annals of the ICRP* 21, 1-3.
- ICRP, 2001. A report on progress towards new recommendations. A communication from the international commission on radiological protection.
- ICRP, 2003. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR): ICRP Publication 92. *Annals of the ICRP* 33, 1-121.
- ICRP, 2007. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Annals of the ICRP* 37, 1.
- ICRP, 2008. Environmental Protection - the Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108. *Annals of the ICRP* 38, 4-6.
- Inthasen, P., 2015. Short and long-term effects of pulse exposures with malathion and pirimicarb on *Daphnia magna*. Miljøbiologi / Environmental Biology - Master thesis.
- IRSN, 2011. Source interne IRSN : <http://www.mesure-radioactive.fr/>.
- Ishii, N., 2007. Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. *Cornea* 26, S3-S9.
- Iwasaki, T., 1973. The differential radiosensitivity of oogonia and oocytes at different developmental stages of the Brine Shrimp, *Artemia salina*. *The Biological Bulletin* 144, 151-161.

J

- Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J., Oetken, M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium

- dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environmental Pollution* 186, 180-186.
- Jager, T., 2011. Some good reasons to ban EC x and related concepts in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 45, 8180-8181.
- Jager, T., Albert, C., Preuss, T.G., Ashauer, R., 2011. General unified threshold model of survival-a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 45, 2529-2540.
- Jager, T., Barsi, A., Hamda, N.T., Martin, B.T., Zimmer, E.I., Ducrot, V., 2014. Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook. *Ecological Modelling* 280, 140-147.
- Jager, T., Crommentuijn, T., Van Gestel, C.A., Kooijman, S.A., 2004. Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. *Environmental Science & Technology* 38, 2894-2900.
- Jager, T., Crommentuijn, T., van Gestel, C.A., Kooijman, S.A., 2007. Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution* 145, 452-458.
- Jager, T., Gudmundsdóttir, E.M., Cedergreen, N., 2014. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology* 48, 7026-7033.
- Jager, T., Heugens, E.H., Kooijman, S.A., 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. *Ecotoxicology* 15, 305-314.
- Jager, T., Kooijman, S.A., 2009. A biology-based approach for quantitative structure-activity relationships (QSARs) in ecotoxicity. *Ecotoxicology* 18, 187-196.
- Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W.M., Kooijman, S.A., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology* 19, 351-361.
- Jager, T., Zimmer, E., 2013. Making sense of chemical stress application of dynamic energy budget theory in ecotoxicology and stress ecology. *E-book available: <http://www.debttox.info/book.php>: Version 1, 14.*
- Jager, T., Zimmer, E.I., 2012. Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling* 225, 74-81.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586, 47-57.

K

- Kal'chenko, V., Fedotov, I., 2001. Genetic Effects of Acute and Chronic Ionizing Irradiation on *Pinus sylvestris* L. Inhabiting the Chernobyl Meltdown Area. *Russian Journal of Genetics* 37, 341-350.
- Kim, H.Y., Yu, S., Jeong, T.-y., Kim, S.D., 2014. Relationship between trans-generational effects of tetracycline on *Daphnia magna* at the physiological and whole organism level. *Environmental Pollution* 191, 111-118.
- Kim, K.T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.-H., Kim, S.D., 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment* 408, 2268-2272.
- Klok, C., Hjorth, M., Dahllöf, I., 2012. Qualitative use of Dynamic Energy Budget theory in ecotoxicology: Case study on oil contamination and Arctic copepods. *Journal of Sea Research* 73, 24-31.
- Klok, C., Nordtug, T., Tamis, J.E., 2014. Estimating the impact of petroleum substances on survival in early life stages of cod (*Gadus morhua*) using the Dynamic Energy Budget theory. *Marine Environmental Research* 101, 60-68.
- 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.
- Knowles, J.F., Greenwood, L.N., 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, dorvilleidae). *Marine Environmental Research* 38, 207-224.
- Koivisto, S., 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90, 263-267.
- Kooijman, S., 1986. Energy budgets can explain body size relations. *Journal of Theoretical Biology* 121, 269-282.
- Kooijman, S., Bedaux, J., 1996. Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Research* 30, 1711-1723.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge university press.
- Kooijman, S.A.L.M., 2010. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge university press.
- 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.
- Kretschmann, A., Ashauer, R., Hollender, J., Escher, B.I., 2012. Toxicokinetic and toxicodynamic model for diazinon toxicity-mechanistic explanation of differences in the

sensitivity of *Daphnia magna* and *Gammarus pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2014-2022.

Kretschmann, A., Ashauer, R., Preuss, T.G., Spaak, P., Escher, B.I., Hollender, J., 2011. Toxicokinetic model describing bioconcentration and biotransformation of diazinon in *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 45, 4995-5002.

Kubota, Y., Shimada, A., Shima, A., 1995. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 330-334.

L

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.

Lee, J.-H., Landrum, P.F., 2006. Development of a multi-component damage assessment model (MDAM) for time-dependent mixture toxicity with toxicokinetic interactions. *Environmental Science & Technology* 40, 1341-1349.

Lee, J.-H., Landrum, P.F., Koh, C.-h., 2002. Prediction of time-dependent PAH toxicity in *Hyalomma azteca* using a damage assessment model. *Environmental Science & Technology* 36, 3131-3138.

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 86-91.

Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermin, C., Bourdineaud, J.-P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 755, 55-60.

Lika, K., Kearney, M.R., Freitas, V., van der Veer, H.W., van der Meer, J., Wijsman, J.W., Pecquerie, L., Kooijman, S.A., 2011. The “covariation method” for estimating the parameters of the standard Dynamic Energy Budget model I: philosophy and approach. *Journal of Sea Research* 66, 270-277.

Lorimore, S., Wright, E., 2003. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *International Journal of Radiation Biology* 79, 15-25.

M

Ma, S., Liu, X., Jiao, B., Yang, Y., Liu, X., 2010. Low-dose radiation-induced responses: focusing on epigenetic regulation. *International Journal of Radiation Biology* 86, 517-528.

- Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110, 375-391.
- Marshall, J., 1966. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress. *Ecology*, 561-571.
- Marshall, J.S., 1962. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. *Ecology*, 598-607.
- 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.
- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., Pery, A.R.R., 2011. Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environmental Science and Technology* 45, 4151-4158.
- Mat, A.M., Haberkorn, H., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Tran, D., 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquatic Toxicology* 140, 458-465.
- 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.
- Morgan, W.F., 2003a. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiation Research* 159, 567-580.
- Morgan, W.F., 2003b. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiation Research* 159, 581-596.
- Morgan, W.F., Bair, W.J., 2013. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiation Research* 179, 501-510.
- Morino, Y., Ohara, T., Watanabe, M., Hayashi, S., Nishizawa, M., 2013. Episode analysis of deposition of radiocesium from the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident. *Environmental Science & Technology* 47, 2314-2322.
- Mothersill, C., Larivière, D., Smith, R.W., Thompson, M.P., Byun, S.H., Prestwich, W., Seymour, C.B., 2014. Dosimetric analysis of fathead minnow (*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820) exposed via ingestion to environmentally relevant activities of Ra-226 for two years. *International Journal of Radiation Biology* 90, 169-178.
- Mothersill, C., Seymour, C., 2013. Uncomfortable issues in radiation protection posed by low-dose radiobiology. *Radiation and Environmental Biophysics* 52, 293-298.

- Mothersill, C., Smith, R., Lariviere, D., Seymour, C., 2013. Chronic exposure by ingestion of environmentally relevant doses of ^{226}Ra leads to transient growth perturbations in fathead minnow (*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820). *International Journal of Radiation Biology* 89, 950-964.
- Muller, E.B., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Miller, R.J., Nisbet, R.M., 2014. Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the energy budgets of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Sea Research* 94, 29-36.
- Muysen, B.T., De Schampelaere, K.A., Janssen, C.R., 2006. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 77, 393-401.
- Muysen, B.T., Janssen, C.R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water quality guidelines and ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2053-2060.
- Muysen, B.T., Janssen, C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution* 130, 309-316.

N

- Nascimento, F.J., Svendsen, C., Bradshaw, C., 2015. Combined effects from gamma irradiation and fluoranthene exposure on carbon transfer from phytoplankton to zooplankton. *Environmental Science & Technology*.
- Naumann, E., 1934. Über die Anwendung von *Daphnia magna* Straus als Versuchstier zur experimentellen Klarlegung der Lebensverhältnisse im Wasser. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 31, 421-431.
- NCRP, 1990. Effects of Ionizing Radiation on Aquatic Organisms (NCRP Report No.109). Washington DC: NCRP.
- Nisbet, R., Muller, E., Lika, K., Kooijman, S., 2000. From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *Journal of Animal Ecology* 69, 913-926.
- Nomura, T., 2003. Transgenerational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis. *Mutation Research, Reviews in Mutation Research* 544, 425-432.
- Nussenzweig, A., Sokol, K., Burgman, P., Li, L., Li, G.C., 1997. Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 13588-13593.

O

- OECD, 2004. *Daphnia*, acute immobilisation test, 202.
- OECD, 2008. OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.

- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 974-983.
- Oujifard, A., Amiri, R., Shahhosseini, G., Davoodi, R., 2015. Effect of gamma radiation on the growth, survival, hematology and histological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Aquatic Toxicology* 165, 259-265.

P

- Park, S.-y., Choi, J.-H., 2010. Geno-and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Engineering Research* 15, 23-27.
- Pentreath, R., 1998. Radiological protection criteria for the natural environment. *Radiation Protection Dosimetry* 75, 175-179.
- Pentreath, R., Larsson, C., Copplestone, D., 2015. ICRP's approach to protection of the living environment under different exposure situations. *Annals of the ICRP* 44, 288-294.
- Péry, A., 2006. L'écotoxicologie revisitée par la modélisation de la dynamique énergétique. *Habilitation à diriger des recherches, Université Claude Bernard-Lyon 1*.
- Péry, A., Bédoux, J.J., Zonneveld, C., Kooijman, S.A., 2001. Analysis of bioassays with time-varying concentrations. *Water Research* 35, 3825-3832.
- Péry, A.R., Flammarion, P., Vollat, B., Bedaux, J.J., Kooijman, S.A., Garric, J., 2002. Using a biology-based model (DEBtox) to analyze bioassays in ecotoxicology: Opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 459-465.
- Pieters, B.J., Jager, T., Kraak, M.H., Admiraal, W., 2006. Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: intrinsic versus apparent sensitivity. *Ecotoxicology* 15, 601-608.
- Plaire, D., 2013. Etude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de *Daphnia magna* exposé à l'uranium appauvri. Aix-Marseille Université.
- Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology* 158, 231-243.
- Pogribny, I., Raiche, J., Slovack, M., Kovalchuk, O., 2004. Dose-dependence, sex-and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 1253-1261.
- Poston, T., Hanf Jr, R., Simmons, M., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution* 22, 289-298.
- Poynton, H.C., Lazorchak, J.M., Impellitteri, C.A., Smith, M.E., Rogers, K., Patra, M., Hammer, K.A., Allen, H.J., Vulpe, C.D., 2010. Differential gene expression in *Daphnia*

magna suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environmental Science & Technology* 45, 762-768.

Preston, R.J., 2015. Integrating basic radiobiological science and epidemiological studies: why and how. *Health Physics* 108, 125-130.

Preuss, T.G., Hammers-Wirtz, M., Hommen, U., Rubach, M.N., Ratte, H.T., 2009. Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: the influence of crowding on population dynamics. *Ecological Modelling* 220, 310-329.

Price, C.A., Weitz, J.S., Savage, V.M., Stegen, J., Clarke, A., Coomes, D.A., Dodds, P.S., Etienne, R.S., Kerkhoff, A.J., McCulloh, K., 2012. Testing the metabolic theory of ecology. *Ecology Letters* 15, 1465-1474.

Priest, N., Hoel, D., 2010. Determining the relative toxicity and RBE of internal emitters in animals. *Health Physics* 99, 367-370.

R

R Development Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.

Rautio, M., Tartarotti, B., 2010. UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshwater reviews: a journal of the Freshwater Biological Association* 3, 105.

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.

Ringelberg, J., 1964. The positively phototactic reaction of *Daphnia magna* Straus: a contribution to the understanding of diurnal vertical migration. *Netherlands Journal of Sea Research* 2, 319-406.

Rose, K., 1991. Lower limits of radiosensitivity in organisms, excluding man. *Journal of Environmental Radioactivity* 15, 113-133.

Rozman, K.K., Doull, J., 2000. Dose and time as variables of toxicity. *Toxicology* 144, 169-178.

Salomaa, S., Prise, K.M., Atkinson, M.J., Wojcik, A., Auvinen, A., Grosche, B., Sabatier, L., Salminen, E., Baatout, S., Kulka, U., 2013. State of the art in research into the risk of low dose radiation exposure? findings of the fourth MELODI workshop. *Journal of Radiological Protection* 33, 589.

S

Sarapultseva, E.I., Gorski, A.I., 2013. Low-Dose γ -Irradiation Affects the Survival of Exposed *Daphnia* and Their Offspring. *Dose-Response* 11, 460-468.

- Schmitt, W., Auteri, D., Bastiansen, F., Ebeling, M., Liu, C., Luttik, R., Mastitsky, S., Nacci, D., Topping, C., Wang, M., 2015. An example of population-level risk assessments for small mammals using individual-based population models. *Integrated Environmental Assessment and Management*.
- Seal, D.R., Tilton, E.W., 1986. Effect of gamma radiation on the metamorphic stages of *Dermestes maculatus* DeGeer (coleoptera: dermestidae). *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A, Applied Radiation and Isotopes* 37, 531-535.
- Sellars, M.J., Degnan, B.M., Carrington, L.E., Preston, N.P., 2005. The effects of ionizing radiation on the reproductive capacity of adult *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate). *Aquaculture* 250, 194-200.
- Seymour, C. B., & Mothersill, C. (2004). Radiation-induced bystander effects-implications for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 158-164.
- Shaw, J.R., Pfrender, M.E., Eads, B.D., Klaper, R., Callaghan, A., Sibly, R.M., Colson, I., Jansen, B., Gilbert, D., Colbourne, J.K., 2008. *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology* 2, 165-328.
- Shimada, A., Shima, A., 2004. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the *medaka* fish. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 119-124.
- Sijm, D.T., van der Linde, A., 1995. Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environmental Science & Technology* 29, 2769-2777.
- Skinner, M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reproductive Toxicology* 25, 2-6.
- SNIFFER, 2002. Scotland and Northern Ireland Forum for Environmental Research (SNIFFER). An investigation into the effects of chronic radiation on fish. *Research and Development Technical Report P3-053/TR*.
- Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A.M., Gonçalves, F., Ribeiro, R., 2001. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50, 174-179.
- 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.
- Spitz, D.R., Azzam, E.I., Li, J.J., Gius, D., 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 311-322.
- Stark, J.D., Banks, J.E., Vargas, R., 2004. How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 732-736.
- Stearns, S.C., 1992. The evolution of life histories. *Oxford University Press Oxford*.

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.

T

Tan, Q.-G., Wang, W.-X., 2012. Two-compartment toxicokinetic–toxicodynamic model to predict metal toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 46, 9709–9715.

Tennekes, H.A., Sánchez-Bayo, F., 2013. The molecular basis of simple relationships between exposure concentration and toxic effects with time. *Toxicology* 309, 39-51.

Theodorakis, C.W., Blaylock, B.G., Shugart, L.R., 1997. Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology* 6, 205-218.

Thompson, L.H., Schild, D., 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 509, 49-78.

Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T., Glenn, T., 2007. Radiation-induced untargeted germline mutations in *Japanese medaka*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology* 145, 103-110.

Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A., 1986. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. In *Radiobiologie*, p.33-71, Hermann, Paris.

Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A., 1997. Science et Pratique Médicale. *Radiobiologie*, Hermann: Paris.

Twining, J., 2011. Tropical Radioecology. *Elsevier Science, ISBN*.

U

UNSCEAR, 1996. Sources and effects of ionizing radiation. *Report to the General Assembly, with scientific annex. New York, United Nations: UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*.

UNSCEAR, 2000. Annex B: Exposures from natural radiation sources. *United Nations, New York*, 74-134.

UNSCEAR, 2000. Sources Effects of Ionizing Radiation. *United Nations, New York*, 453-487.

UNSCEAR, 2008. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). *Report on the Biological Effects of Ionising Radiation*.

UNSCEAR, 2008. UNSCEAR 2008 report Vol. II. Effects of ionising radiation. Annex E Effects of Ionising Radiation on Non-human Biota. *New York: United Nations*.

V

- Vandeghechuchte, M.B., Janssen, C.R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 764, 36-45.
- Vandeghechuchte, M.B., Lemièrre, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., Janssen, C.R., 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology* 151, 278-285.
- 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.
- Villarroel, M., Ferrando, M., Sancho, E., Andreu, E., 2000. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquatic Toxicology* 49, 39-47.
- Vindimian, E., 2000. Les modèles mécanistiques d'effet toxique en écotoxicologie. *Modélisation en écotoxicologie, Association Ecrin, Paris*, 123-132.
- Vives i Batlle, J., Beaugelin-Seiller, K., Beresford, N., Copplestone, D., Horyna, J., Hosseini, A., Johansen, M., Kamboj, S., Keum, D.-K., Kurosawa, N., 2011. The estimation of absorbed dose rates for non-human biota: an extended intercomparison. *Radiation and Environmental Biophysics* 50, 231-251.

W

- Walsh, S., Satkunam, M., Su, B., Festarini, A., Bugden, M., Peery, H., Mothersill, C., Stuart, M., 2015. Health, Growth and Reproductive Success of Mice Exposed to Environmentally Relevant Levels of Ra-226 via Drinking Water Over Multiple Generations. *International Journal of Radiation Biology*, 1-29.
- Ward, J., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in : *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 35, 95.
- Ward, T.J., Robinson, W.E., 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2341-2349.
- 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.

- Warren, E., 1900. On the reaction of *Daphnia magna* (Straus) to certain changes in its environment. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 43, 199-224.
- Weidman, J. R., Dolinoy, D. C., Murphy, S. K., & Jirtle, R. L. (2007). Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *The Cancer Journal*, 13(1), 9-16.
- Whicker, F., Bedford, J., 1995. Protection of the natural environment from the ionising radiation. Are specific criteria needed, Proceedings of an International Symposium on Environmental Impact of Radioactive Releases, *International Atomic Energy Agency, IAEA-SM-339/193*, pp. 561-567.
- Whicker, F.W., 1997. Impacts on plant and animal populations, Health impacts of large releases of radionuclides. *CIBA Foundation Symposium*, pp. 74-93.
- Williams, C., 2004. Framework for assessment of environmental impact (FASSET) of ionising radiation in European ecosystems. *Journal of Radiological Protection* 24, A1-177.
- Won, E.-J., Dahms, H.-U., Kumar, K.S., Shin, K.-H., Lee, J.-S., 2014. An integrated view of gamma radiation effects on marine fauna: from molecules to ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Won, E.-J., Lee, J.-S., 2014. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Aquatic Toxicology* 150, 17-26.
- Woodhead, D., 1998. The impact of radioactive discharges on native British wild-life and the implications for environmental protection. *Environment Agency, Bristol* (United Kingdom).
- 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.

X

- Xie, F., Koziar, S.A., Lampi, M.A., Dixon, D.G., Norwood, W.P., Borgmann, U., Huang, X.D., Greenberg, B.M., 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9, 10 phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 613-622.

Y

- Yablokov, A.V., Nesterenko, V.B., Nesterenko, A.V., 2009. Chapter III. Consequences of the Chernobyl Catastrophe for the Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1181, 221-286.

Yu, K., Tung, M., Choi, V., Cheng, S.H., 2012. Alpha radiation exposure decreases apoptotic cells in zebrafish embryos subsequently exposed to the chemical stressor, Cd. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 3831-3839.

Yum, E., Li, V., Choi, V., Cheng, S., Yu, K., 2010. Effects of alpha particles on zebrafish embryos. *Applied Radiation and Isotopes* 68, 714-717.

Z

Zaichkina, S., Rozanova, O., Aptikaeva, G., Achmadieva, A.C., Klokov, D., 2004. Low doses of gamma radiation induce nonlinear dose responses in mammalian and plant cells. *Nonlinearity in Biology Toxicology and Medicine* 2, 213-221.

Zaldívar, J.-M., Baraibar, J., 2011. A biology-based dynamic approach for the reconciliation of acute and chronic toxicity tests: Application to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 82, 1547-1555.

Zeman, F., 2008. Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*, Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie géosciences, Hydrosociences, Environnement Montpellier II.

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.

Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 96-103.

Zimmer, E.I., 2013. The pond snail under stress: interactive effects of food limitation, toxicants and copulation explained by Dynamic Energy Budget theory. Vrije Universiteit.

ANNEXES

ANNEXE 1

PRÉPARATION DU MILIEU D'ÉLEVAGE

Les daphnies sont maintenues au laboratoire dans le milieu M4 à pH 8 (Elendt et Bias, 1990). Ce milieu est préparé à partir de divers sels préalablement dilués dans de l'eau UHQ. Une fois le mélange réalisé, chaque milieu est soumis à un bullage de 24h dans un incubateur à 20°C afin de saturer le milieu en oxygène. Avant toute utilisation, une solution de vitamines (Tableau 25) est ajoutée dans le milieu M4. Les différents sels composant le milieu M4 à pH8 sont présentés dans le Tableau 26 :

Tableau 25. Préparation du milieu M4 à pH 8.

Solutions mères	Concentration (g.L ⁻¹)	Préparation pour 1L de milieu M4
Solution mère I (voir Tableau 26)	x	50
Chlorure de calcium CaCl ₂ .2H ₂ O	293,8	1,0
Chlorure de sodium NaCl	42,05	0,0
Sulfate de magnésium MgSO ₄ .7H ₂ O	246,6	0,5
Chlorure de potassium KCl	58	0,1
Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO ₃	64,8	1,0
Sodium métasilicate Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	50	0,2
Nitrate de sodium NaNO ₃	2,74	0,1
Potassium dihydrogénophosphate KH ₂ PO ₄	1,43	0,1
Di-potassium Hydrogénophosphate K ₂ HPO ₄	1,84	0,1
Solution mère de vitamines (voir Tableau 27)	x	0,1

Tableau 26. Préparation de la solution mère I.

Eléments traces	Concentration des éléments trace (mg.L ⁻¹)	Volume pour la préparation de la solution mère I (mL/L)
Acide borique H ₃ BO ₃	28 595	2
Chlorure de Manganèse MnCl ₂ .4H ₂ O	7 210	1
Lithium hydroxylé LiOH.H ₂ O	6 054	1
Carbonate de rubidium Rb ₂ CO ₃	1355	1
Chlorure de strontium hexahydraté SrCl ₂ .6H ₂ O	3 040	1
Bromure de sodium NaBr	320	1
Sodium molybdate Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 260	1
Sulfate de cuivre CuSO ₄ . 5H ₂ O	490	1
Sulfate de zinc ZnSO ₄ .7H ₂ O	285,4	1
Chlorure de cobalt CoCl ₂ . 6H ₂ O	200	1
Iodure de potassium KI	65	1
Ammonium monovanadate NH ₄ VO ₃	11,5	1
Éthylène Diamine Tétra-Acétique *	5 000	} Solution
Na ₂ EDTA.2H ₂ O		
Sulfate de fer *		
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 991	20

* les solutions Na₂EDTA et FeSO₄ sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises à l'étuve à 120 °C pendant 30 min, donnant le Fe-EDTA

Tableau 27. Préparation de la solution de vitamines.

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

ANNEXE 2

PRÉPARATION DE LA CULTURE D'ALGUES

Les cultures d'algues vertes, *Chlamydomonas reinhardtii* (souche 11/32 B, CCAP, UK) sont maintenues en croissance continue au laboratoire afin d'assurer l'alimentation quotidienne des daphnies. Chaque semaine, une nouvelle culture d'algues est repiquée dans un milieu stérile HSM (High Salt Medium) (Harris, 1989) (Tableau 28). Ce milieu est préalablement préparé dans un erlenmeyer de 2L, autoclavé et conservé en chambre froide à 4°C jusqu'à son utilisation. Pour lancer une nouvelle culture, des cellules d'algues provenant d'une culture d'environ 5-6 jours sont repiquées dans un milieu HSM. La culture est ensuite placée dans un incubateur à 24 °C, sous une lumière du jour et en agitation constante (100 rpm). Les daphnies sont nourries avec la culture algale lorsqu'elle a atteint sa phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire 5-6 jours après le repiquage.

Tableau 28. Composition et proportion des solutions stock utilisées pour la préparation du milieu HSM

Solutions	Quantités (g.L ⁻¹)	Volume (ml.L ⁻¹)
Beijerinck		5
NH ₄ Cl	100	
MgSO ₄ .7H ₂ O	4	
CaCl ₂	2	
Phosphate		25
KH ₂ PO ₄	29,6	
K ₂ HPO ₄	57,6	
AAP		1
H ₃ BO ₃	0,186	
MnCl ₂ , 4H ₂ O (10 g.L ⁻¹)	0,115	
ZnCl ₂	0,0035	
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0,16	
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	0,3	
CoCl ₂ , 6H ₂ O (1 g.L ₋₁)	0,00064	
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,00363	
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,00879	

ANNEXE 3

DOSIMÉTRIE

Chaque élément radioactif possède ses propres caractéristiques physiques. Pour pouvoir calculer un débit de dose théorique, la littérature fournit pour chaque élément radioactif un débit de dose calculé dans l'air à un mètre de la source radioactive. Par exemple, pour 1 Bq de Cs-137, le débit de dose calculé à un mètre de la source est de $9,2 \times 10^{-8} \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. Le débit de dose caractéristique de cette source, est calculé de la manière suivante :

$${}^{\circ}D_0 \times (d_0)^2 = A_0 \times \Gamma \quad (2.1)$$

avec ${}^{\circ}D_0$ le débit de dose absorbé proportionnel au carré de la distance $(d)^2$, A_0 correspond à l'activité de la source en Bq et Γ l'énergie spécifique de la source radioactive en keV.

Ce débit de dose (en $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) nous permet de calculer les débits de dose attendus pour une distance donnée. Ainsi, cette information nous offre la possibilité de savoir à quelle distance nous devons positionner nos unités expérimentales en fonction des débits de dose souhaités. Pour ce faire, la formule utilisée est la suivante :

$${}^{\circ}D_1 \times (d_1)^2 = {}^{\circ}D_2 \times (d_2)^2 \quad (2.2)$$

avec ${}^{\circ}D_1$ le débit de dose théorique calculé à 1 m de la source qui est proportionnel au carré de la distance $(d_1)^2$, ${}^{\circ}D_2$ le débit de dose souhaité proportionnel à une distance donnée $(d_2)^2$. Sachant que le carré de la distance $(d_1)^2$ d'une source situé à un mètre équivaut à 1, l'équation peut se simplifier de la manière suivante :

$${}^{\circ}D_2 = \frac{{}^{\circ}D_1}{(d_2)^2} \quad (2.3)$$

avec ${}^{\circ}D_2$ le débit de dose souhaité dépendant du débit de dose ${}^{\circ}D_1$ à 1 mètre, et de sa distance à la source $(d_2)^2$.

Pour une source de forte activité (en GBq par exemple), le moindre éloignement de la source diminuera fortement le débit de dose absorbé par les organismes. D'autres facteurs peuvent influencer le débit de dose. En effet, les formules ci-dessus correspondent à des calculs de débits

de dose dans l'air, et ne prennent pas en compte le transport et les interactions des particules chargées ou neutres avec la matière. Dans notre expérience, nous avons réalisé une simulation numérique en utilisant le code MCNP (Monte Carlo N-Particle) afin de prendre en compte l'atténuation des radiations ionisantes à l'intérieur des unités expérimentales (Figure 71).

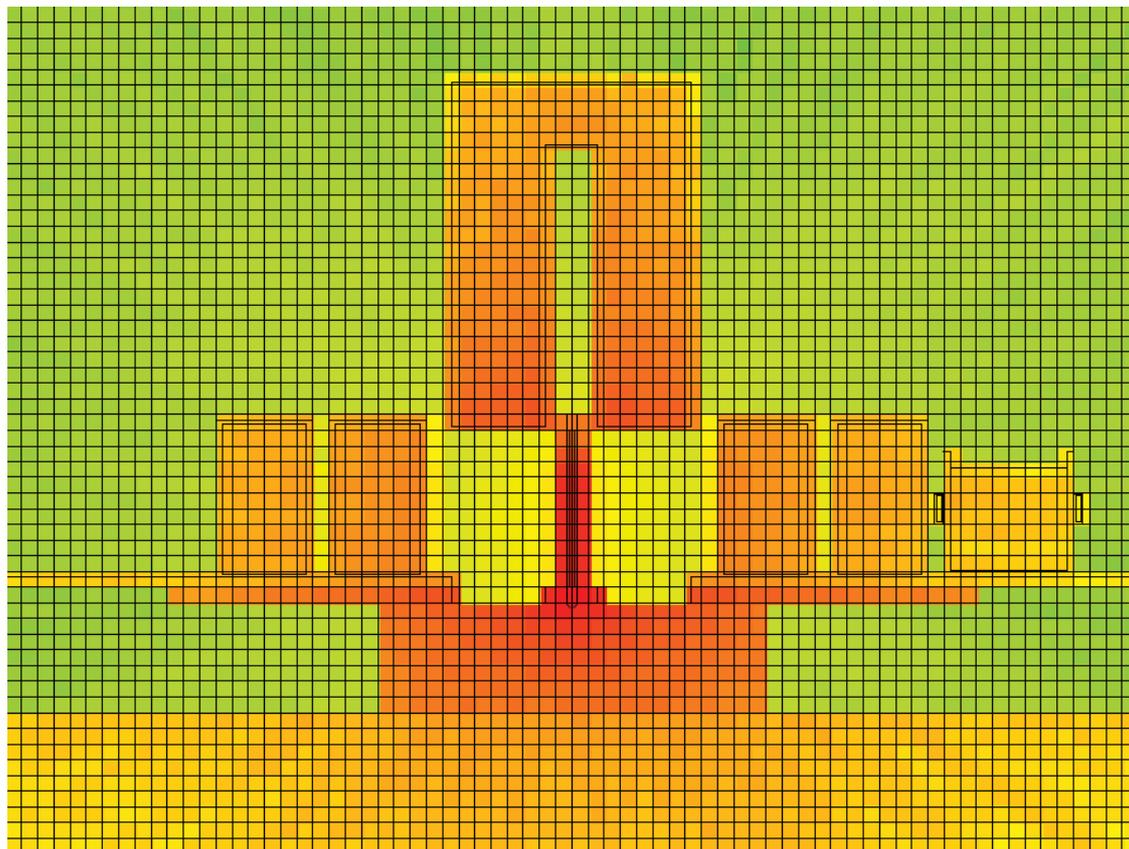


Figure 71. Représentation des dépôts d'énergie des particules gamma lors d'une simulation numérique. Les zones tendant vers une couleur orange-rouge sont les zones où les dépôts d'énergie sont les plus denses (N.Dubourg/IRSN).

Les débits de dose estimés ont ensuite été vérifiés expérimentalement à l'aide de dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL, type GD-301, Chiyoda Technol Corporation, Japon). Ces micro-dosimètres (hauteur de 12 mm, diamètre 1,5 mm) sont composés d'un verre phosphaté dopé à l'argent (ions argent Ag^+). Lorsque le verre est exposé à un rayonnement ionisant les ions Ag^+ se transforment en Ag^0 et Ag^{++} . Ces éléments forment alors les centres radiophotoluminescent (RPL) du verre. Pour lire les résultats, le verre de chaque dosimètre est

excité par un rayonnement UV (Ultraviolet). Les centres radiophotoluminescent émettent alors une couleur orangée, il s'agit de la radiophotoluminescence. Cette radiophotoluminescence est proportionnelle à la dose de radioactivité reçue par les dosimètres. Les lectures de chaque dosimètre sont effectuées à l'aide d'un lecteur DOSE-ACE FGDS-1000 (Chiyoda, Technol Corporation, Japon) possédant une limite de détection allant de 1 μ Gy à 10 Gy. La calibration de l'appareil est réalisée en irradiant un dosimètre de « référence » à une dose connue de rayonnement gamma (6 mGy). Ce genre d'approche présente de nombreux avantages, comme une bonne reproductibilité de la valeur de lecture, une stabilité à long terme et une meilleure linéarité de la dose.

ANNEXE 4

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Tableau 29. Résultats de l'expérience préliminaire visant à évaluer la quantité d'ADN contenue dans une daphnie adulte (n=1) et leurs néonates (n=25) au moment des ponte 1 et ponte 5.

Stade	Concentration d'ADN (ng.µL ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Quantité totale par échantillon (ng)
Ponte 1				
	101,10	1,940	1,330	7077
Adulte	106,20	2,090	1,250	7434
	101,00	2,130	1,360	7070
	95,30	2,160	1,430	6671
Néonate	93,60	2,010	1,360	5852
	102,30	2,140	1,350	7161
Ponte 5				
	153,80	2,040	1,400	10766
Adulte	157,00	1,990	1,330	10990
	154,50	2,020	1,420	10815
	143,10	1,950	1,370	10017
Néonate	145,50	1,930	1,370	10185
	141,20	1,930	1,370	9884

ANNEXE 5

MESURE DE LA TAILLE DES DAPHNIES

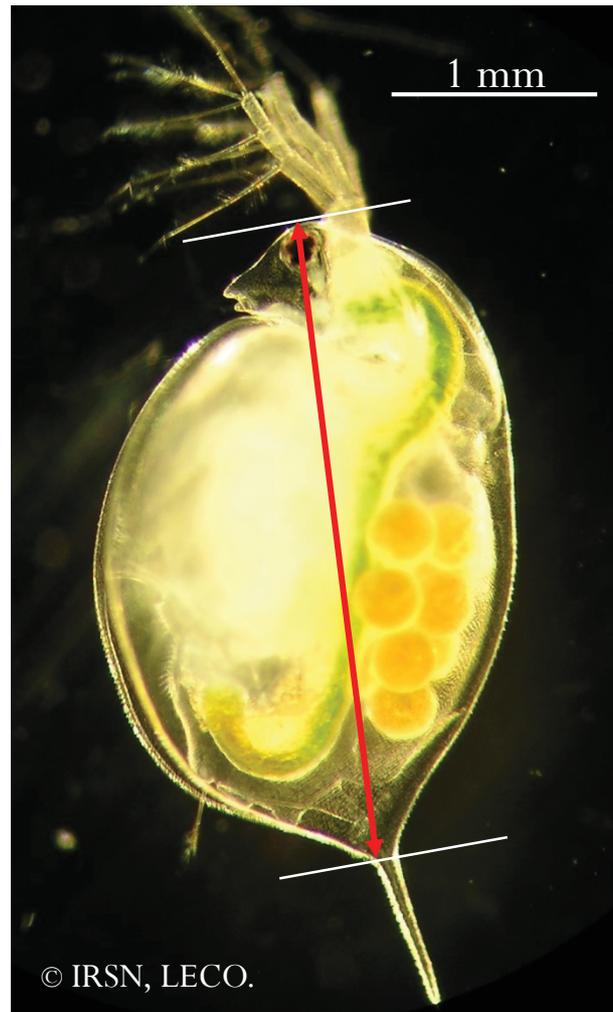


Figure 72. Mesure de la taille du corps d'une daphnie.

ANNEXE 6

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX DE MASSE SÈCHE

Tableau 30. Paramètres estimés pour la masse sèche des adultes et la masse sèche des œufs, chez les daphnies exposées au rayonnement gamma externe (Cs-137) aux débits de dose de 0 ; 0,007 ; 0,070 ; 0,65 ; 4,70 et 35,4 mGy.h⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Aucune différence significative avec le témoin; $n = 19$ pour la masse sèche des adultes et $n = 19$ pour la masse sèche des œufs. δ : coefficient de forme ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$); β : pente de régression linéaire ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$); ω : interception de régression linéaire (μg).

Génération	Débits de dose	Masse sèche des adultes	Masse sèche des oeufs	
	(mGy.h ⁻¹)	δ ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$)	β ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$)	ω (μg)
F0	0	4,657	1,414	1,682
	0,007	5,138	1,457	0,931
	0,070	5,071	1,836	-0,135
	0,65	4,838	1,606	0,531
	4,70	4,791	2,189	-1,328
	35,4	5,148	1,276	1,525
F1	0	4,995	2,056	-0,758
	0,007	4,756	1,990	-0,845
	0,070	4,899	2,590	-3,083
	0,65	5,227	2,583	-2,122
	4,70	5,473	1,943	-0,57
	35,4	5,365	2,176	-1,478
F2	0	5,139	2,923	-3,741
	0,007	4,912	2,904	-3,817
	0,070	5,234	2,307	-1,413
	0,65	5,394	2,723	-3,025
	4,70	5,235	2,894	-3,982
	35,4	5,397	2,193	-0,866

Tableau 31. Paramètres estimés pour la masse sèche des adultes et la masse sèche des œufs, chez les daphnies exposées aux concentrations de contamination alpha interne (Am-241) de 0 ; 0,4 ; 4,0 et 40 Bq.mL⁻¹ au cours de trois générations successives (F0, F1 et F2). Aucune différence significative avec le témoin; $n = 12$ pour la masse sèche des adultes et $n = 12$ pour la masse sèche des œufs. δ : coefficient de forme ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$); β : pente de régression linéaire ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}$); ω : interception de régression linéaire (μg).

Génération	Concentration	Masse sèche des adultes	Masse sèche des oeufs	
	(Bq.mL ⁻¹)	δ ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$)	β ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}$)	ω (μg)
F0	0	5,667	7,882	-18,798
	0,4	5,494	7,088	-15,682
	4,0	5,708	7,995	-18,670
	40	5,627	8,039	-18,845
F1	0	4,208	5,579	-9,999
	0,4	3,735	5,279	-9,507
	4,0	3,977	3,128	-3,239
	40	4,215	5,311	-9,495
F2	0	4,419	4,552	-6,778
	0,4	4,762	5,209	-8,882
	4,0	4,217	3,973	-4,363
	40	4,237	4,260	-5,288

ANNEXE 7

ARTICLE SCIENTIFIQUE

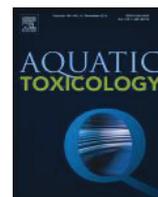
DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations

Florian Parisot^a, Jean-Paul Bourdineaud^b, Delphine Plaire^a, Christelle Adam-Guillermin^a and Frédéric Alonzo^{a,*}

^a *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN),
PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, St Paul-lez-Durance, 13115, France*

^b *UMR 5805 EPOC – OASU,
Station marine d’Arcachon, Université Bordeaux 1
Arcachon, 33120, France*

Published in *Aquatic Toxicology*, 163 (2015) 27-36.



DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations

Florian Parisot^a, Jean-Paul Bourdineaud^b, Delphine Plaire^a, Christelle Adam-Guillermin^a, Frédéric Alonzo^{a,*}

^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, St Paul-lez-Durance 13115, France
^b UMR 5805 EPOC – OASU, Station marine d'Arcachon, Université Bordeaux I, Arcachon 33120, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2014
 Received in revised form 26 February 2015
 Accepted 3 March 2015
 Available online 17 March 2015

Keywords:

Gamma radiation
 Transgenerational effects
 Growth
 Reproduction
 DNA alterations
 Daphnia magna

ABSTRACT

This study examined chronic effects of external Cs-137 gamma radiation on *Daphnia magna* exposed over three successive generations (F0, F1 and F2) to environmentally relevant dose rates (ranging from 0.007 to 35.4 mGy h⁻¹). Investigated endpoints included survival, growth, reproduction and DNA alterations quantified using random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Results demonstrated that radiation effects on survival, growth and reproduction increased in severity from generation F0 to generation F2. Mortality after 21 days at 35.4 mGy h⁻¹ increased from 20% in F0 to 30% in F2. Growth was affected by a slight reduction in maximum length at 35.4 mGy h⁻¹ in F0 and by reductions of 5 and 13% in growth rate, respectively, at 4.70 and 35.4 mGy h⁻¹ in F2. Reproduction was affected by a reduction of 19% in 21 day-fecundity at 35.4 mGy h⁻¹ in F0 and by a delay of 1.9 days in brood release as low as 0.070 mGy h⁻¹ in F2. In parallel, DNA alterations became significant at decreasing dose rates over the course of F0 (from 4.70 mGy h⁻¹ at hatching to 0.007 mGy h⁻¹ after ~21 days) and from F0 to F2 (0.070 mGy h⁻¹ at hatching to 0.007 mGy h⁻¹ after ~21 days), demonstrating their rapid accumulation in F0 daphnids and their transmission to offspring generations. Transiently more efficient DNA repair leading to some recovery at the organism level was suggested in F1, with no effect on survival, a slight reduction of 12% in 21 day-fecundity at 35.4 mGy h⁻¹ and DNA alterations significant at highest dose rates only. The study improved our understanding of long term responses to low doses of radiation at the molecular and organismic levels in a non-human species for a better radioprotection of aquatic ecosystems.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anthropogenic activities related to the nuclear industry contribute to continuous discharges of radionuclides into terrestrial and aquatic ecosystems, as part of the normal procedures of nuclear power plant (NPP) functioning and accidental releases such as at Chernobyl NPP in 1986 and at Fukushima–Daiichi NPP in 2011. On the sidelines of future worldwide energy-demand, protection of non-human biota from ionizing radiation has become a major public, regulatory and scientific concern over the past decades (ICRP, 1991, 2007). As a consequence, numerous national and international bodies have developed frameworks, such as the EC funded program FASSET, ERICA and PROTECT (Williams, 2004; Larsson,

2008; Howard et al., 2010), in order to provide methodological approaches to assess potential risks of ionizing radiation for many wildlife groups and derive radioprotection criteria for the environment. For example, a meta-analysis of chronic radiation effects observed in laboratory tests has been performed to derive a generic predicted no-effect dose rate (PNEDR) of 10 μGy h⁻¹ for ecosystems (Garnier-Laplace et al., 2010). However, until recently, laboratory studies on radiation effects have mainly been focused on acute, high-dose and exposure over a single generation, whereas data on chronic effects of radiation, closer to environmentally relevant conditions of exposure, is limited to a very small range of species and endpoints (Real et al., 2004). In this context, it is largely accepted that wildlife species are exposed most frequently to dose rates below 100 μGy h⁻¹ over many years, i.e., durations which largely exceed individual lifespan and involve many generations (UNSCEAR, 1996).

* Corresponding author. Fax: +33 42 19 91 49. E-mail address: frederic.alonzo@irsn.fr (F. Alonzo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002>

0166-445X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

A substantial number of studies in ecotoxicology and radioecology have addressed long-term responses of organisms to chemical contaminants or radionuclides, especially in invertebrates which are particularly suitable models due to their short life cycles. These studies have shown that biological responses can differ from one generation to the next, as a result of increasing sensitivity or tolerance to chemical toxicants during multigenerational exposure (Dietrich et al., 2010; Massarin et al., 2010; Chen et al., 2014; Jacobasch et al., 2014). In the case of ionizing radiation, increases in radiosensitivity or radioresistance are similarly described over generations (Marshall, 1962, 1966; Harrison and Anderson, 1994; Knowles and Greenwood, 1994; Hertel-Aas et al., 2007; Alonzo et al., 2008; Buisset-Goussen et al., 2014), suggesting that parental radiological stress can be transmitted to the progeny. Consequences of parental exposure for offspring generations has been well established in the pale grass blue butterfly *Zizeeria maha* from the Fukushima area, where abnormal morphological traits were observed in unexposed offspring after parental in situ exposure (Hiyama et al., 2012, 2013). The risk magnitude of ionizing radiation at low doses remains controversial due to lack of evidence (Morgan and Bair, 2013; Mothersill and Seymour, 2013), the question being whether low-level doses can potentially induce adverse effects over longer periods of time and multiple generations.

Molecular markers are known to respond to lower levels of chemical or radiological toxicity and have therefore the potential to serve as early indicators of future biological effects. Nucleic acids are recognized as primary targets of ionizing radiation, through induction of DNA single or double strand breaks (SSBs and DSBs). Whereas SSBs are most often repaired rapidly and error-free, DSBs can lead to faulty or lack of repair mechanisms causing various severe alterations. In aquatic organisms, reported radiation genotoxicity includes DNA lesions in the marine mussel *Mytilus edulis* exposed to tritiated water, chromosomal aberrations in the polychaete worm *Neanthes arenaceodentata* exposed to ^{60}Co gamma radiation, mutations and genomic instability in the Japanese medaka fish *Oryzias latipes* exposed to ^{137}Cs gamma radiation and apoptosis in oocytes of the brine shrimp *Artemia salina* exposed to ^{60}Co gamma radiation (Iwasaki, 1973; Harrison et al., 1983; Jha et al., 2005; Tsyusko et al., 2007; Grygoryev et al., 2013); (see Dallas et al., 2012 and Adam-Guillermin et al., 2012 for reviews). However, links between molecular responses and effects on processes which are critical for fitness (survival, growth and reproduction) are not always clearly established and it is generally accepted that the ecological relevance of biomarkers should be assessed. More recently, studies in two marine copepods, *Tigriopus japonicus* and *Paracyclops nana*, have shown dose-dependent increases in oxidative stress, DNA damage, and DNA repair activities in parallel to impaired growth and reproduction at high ^{137}Cs gamma doses (Han et al., 2014; Won and Lee, 2014). Thus, molecular markers may be used to explain underlying mechanisms and provide a better understanding of mechanistic links among effects at different levels of biological organization.

Establishing mechanistic links between the molecular and organism levels in a multigenerational context has been recently attempted in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna* (Crustacea), exposed to depleted uranium (Plaire et al., 2013). Authors examined the parallel increase in reproduction and growth effects and accumulation of DNA alterations across generations using the random amplified and polymorphic DNA method coupled to quantitative PCR (RAPD-PCR). The RAPD method is a reliable, sensitive and reproducible assay that has the potential to detect a wide range of DNA alterations and mutations at the whole genome level (Atienzar and Jha, 2006). The main advantages of this method lie in its rapidity and applicability to any organism without prior information on the nucleotide sequence, PCR allowing detection of small pollutant-induced modifications of genomic DNA at very low doses

(Cambier et al., 2010; Orieux et al., 2011). *D. magna* is a widely used model organism in ecotoxicological studies (ASTM, 1998; OECD, 2008) and particularly suitable for evaluating genotoxicity (parthenogenetic reproduction yielding genetically identical individuals) and toxicity across many generations (life cycle of 10 days). To date, effects of chronic gamma radiation in *D. magna* have been investigated on growth and reproduction only (Gilbin et al., 2008), while molecular alterations were not examined. Results indicate reductions in reproduction at a dose rate of 31 mGy h⁻¹ and in larval fitness at a dose rate as low as 0.41 mGy h⁻¹. Potential consequences for the progeny remain to be tested on several generations.

In this study, *D. magna* is exposed to ^{137}Cs dose rates ranging from 0.007 mGy h⁻¹ to 35.4 mGy h⁻¹ over three successive generations. The objectives of the study are three-fold: (i) to examine whether low dose rates of external gamma radiation induce increasing effects on survival, growth and reproduction over generations, (ii) to test a possible accumulation and transmission of DNA alterations from adults to offspring using the RAPD-PCR method and (iii) to compare responses to chronic gamma radiation between the molecular and organismal levels.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

D. magna culture (clone A from INERIS, Verneuil-en-Halatte, France) was maintained for several years at the laboratory in continuous parthenogenetic reproduction following the OECD guideline 211 (OECD, 2008). Daphnids were reared at a density of one animal per 50 mL in artificial M4 medium at a pH of 8.0 (hereafter referred to as “M4-pH8”) renewed with pre-aerated fresh medium once a week (Elendt and Bias, 1990). Cultures were kept in control chambers at a temperature of 20 °C (±1 °C) under a 16:8 h light:dark photoperiod, at light intensity of 20 E ~m⁻² s⁻¹ and an oxygen concentration of ~9 mg L⁻¹. Organisms were fed daily with the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (strain 11/32B from CCAP, Oban, UK) on a basis of 100 µg carbon daphnid⁻¹ day⁻¹. Algae were cultured axenically in high salt medium (Harris, 1989), collected by centrifugation in exponential growth phase (8 × 10⁴ cells mL⁻¹) and re-suspended in M4 medium. Algal cell concentration was calculated using a Z2 Coulter Particle Counter and Size Analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

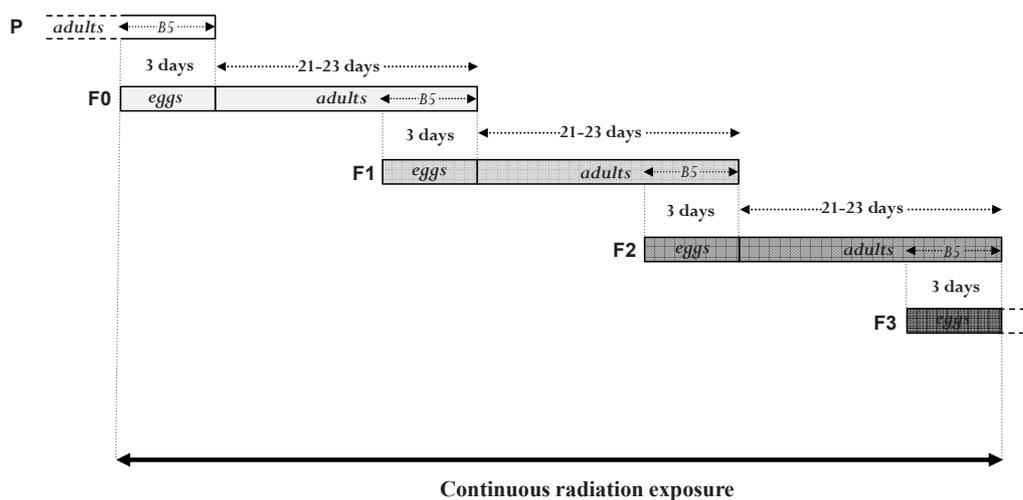
2.2. Exposure conditions

External gamma irradiation was performed in the irradiation facility MIRE (Mini Irradiator for Radio-Ecology) at IRSN (Cadarache, France). MIRE is composed of five ^{137}Cs sources (from CERCA-LEA, Framatome ANP, Pierrelatte, France), including 1.73, 17.4, 173 MBq liquid ^{137}Cs sources and two 1.54 GBq solid ^{137}Cs sources, placed in separate ventilated thermostatic chambers protected by 10-cm thick lead walls in order to avoid cross-irradiation among exposure conditions. Twenty-four experimental units were disposed in circles around each gamma source (detailed in Supplementary material Fig. A.1). Each experimental unit contained one daphnid in 50 mL of M4-pH 8 under culture conditions described above, renewed every day with fresh pre-aerated medium before food addition for both unexposed and exposed daphnids. “Outer” circles were positioned around all sources, in order to obtain the smallest possible variability in dose rate within each experimental unit. “Inner” circles were positioned around the two highest sources (S1A and S1B) in order to maximize received dose rate. Six conditions were tested, including five nominal dose rates, and a control without radiation. Received dose rates were estimated at unit centers, with variation ranges corresponding to the difference in dose rate between front and back sides of experimental units.

Table 1

Dose rates (mGy h^{-1}) delivered to daphnids at experimental unit center, estimated using Monte Carlo N-particle calculations (MCNP) and Radio Photo Luminescent (RPL) dosimeters, depending on source activity (Becquerel, Bq) and position in the irradiation chamber. Values are mean \pm variation range as calculated between the proximal and distal walls of experimental units. Relative error is the difference (%) between nominal dose rates and measured dose rates.

Source	Activity (Bq)	Circle position	Experimental units	Dose rates (mGy h^{-1})		Relative error (%)
				Nominal (MCNP)	Measured (RPL)	
S1 (A and B)	$1.54 \cdot 10^9$	Inner	12A + 12B	35.4 ± 21.2	31.9 ± 18.7	8
S1 (A and B)	$1.54 \cdot 10^9$	Outer	12A + 12B	4.70 ± 1.34	4.45 ± 1.37	5
S2	$1.73 \cdot 10^8$	Outer	24	0.65 ± 0.20	0.76 ± 0.25	15
S3	$1.74 \cdot 10^7$	Outer	24	0.070 ± 0.020	0.075 ± 0.024	7
S4	$1.73 \cdot 10^6$	Outer	24	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.002	13

**Fig. 1.** Multigenerational exposure design.

Values of 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h^{-1} were estimated using MCNP5 Monte Carlo N-Particle code (Brown, 2003). Nominal dose rates were confirmed during experiment, using Radio Photo Luminescent dosimeters (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation, Japan) placed on front and back sides of 3 experimental units for each condition (Table 1).

Three successive generations (F0, F1 and F2) were continuously exposed to gamma radiation for a total duration of ~ 75 days (Fig. 1). Exposure was initiated with freshly deposited eggs from brood 5 (<24 h old) in female brood pouches until hatching (~ 3 days) and continued for 21–23 days until release of brood 5. F0 eggs were carried by previously unexposed females (referred to as the parent generation P). Following generations F1 and F2 were exposed to the same conditions as their parents. Exposure experiment was ended in generation F2, upon release of neonates from brood 5 (hereafter referred to as F3).

2.3. Survival, growth and reproduction

Experimental units were checked daily for survival, egg deposition in the brood pouch and neonate release. On days of release, neonates were removed and counted. Proportions of surviving daphnids, age at brood release and brood size were monitored in 10 units. Body size and dry mass were measured in neonates (<24 h old) and in adults and eggs upon deposition of broods 1, 3 and 6 (4 replicates at brood 3; 5 replicates at other sample points). Body length was measured from apex of the helmet to the base of the apical spine under a binocular microscope with a micrometer (detailed in Supplementary material Fig. A.2). Eggs were carefully dissected out from female brood chambers and counted. Pools of 5 neonates, individual dissected adults and eggs (pooled per brood) were rinsed with ultra-pure water and transferred into pre-weighed aluminum pans. Samples were dried for 48 h at 60°C , cooled in a desiccator and

weighed immediately with an ultra-microbalance (SE2 Sartorius, Gottingen Germany) at a precision of $0.1 \mu\text{g}$.

2.4. Genomic DNA isolation

In each generation (F0, F1 and F2), DNA samples were collected at hatching (7–8 replicates of 25 pooled neonates) and release of broods 1 and 5 (5 replicates of individual adults). F3 neonates were also collected upon hatching. Finally, neonates samples were collected at hatching of brood 1 (7–8 replicates of 25 pooled neonates) and hereafter referred to as F1', F2' and F3'. Genomic DNA isolation was performed under sterile conditions using the DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Crawley, UK) following Spin-column protocol of suppliers with minor modifications. Briefly, samples were added to 1.5 mL micro-centrifuge tubes containing 180 μL of ATL buffer and 20 μL of proteinase K. Daphnids in solution were homogenized with micropestle, mixed by vortexing and incubated at 56°C overnight. Once completely lysed, 200 μL of buffer AL and 200 μL of ethanol (96%) were added before vortexing for 15 s. Mixtures were pipetted into the DNeasy Mini spin-column and centrifuged at 8,000 rpm for 1 min (4°C). The spin-columns were sequentially washed with AW1 (500 μL) and AW2 (500 μL) buffers and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min (4°C) to dry the DNeasy membranes. DNA was eluted with 75 μL buffer AE, incubated for 1 min (room temperature) and centrifuged at 8000 rpm for 1 min (4°C). DNA purity was determined by measuring the ratio 260/280 nm of absorbance with Nanodrop[®] 2000 (Thermo Scientific, DE, USA). Samples were stored at -20°C until RAPD-PCR analyses.

2.5. RAPD-PCR analyses

Genotoxicity analyses were performed using the RAPD method (Atienzar et al., 1999), modified as previously described (Orieux

Table 2
Equations and parameters for growth in body length and associated changes in body and egg dry mass, in agreement with the DEB theory (Kooijman, 2010) and Massarin et al. (2010).

Endpoints (unit)	Equations		Parameters
Body length (mm)	$L_t = L_m - (L_m - L_b) \cdot \exp(-r_B \cdot t)$	(1)	L_m : Maximum body length (mm) L_b : Body length at birth (mm) r_B : von Bertalanffy growth rate (day^{-1})
Body dry mass (μg)	$W_t = \delta \cdot L_t^3$	(2)	δ : Shape coefficient ($\mu\text{g mm}^{-3}$)
Egg dry mass (μg)	$W_t = \beta \cdot L_t + \omega$	(3)	β : Slope of the linear regression ($\mu\text{g mm}^{-1}$) ω : Intercept of the linear regression (μg)

et al., 2011; Geffroy et al., 2012; Lerebours et al., 2013) to take full advantages of PCR to quantify the number of hybridization sites of RAPD probes and access to tiny modifications of genomic DNA (Cambier et al., 2010). The number of hybridization sites is quantified using the threshold cycle (Ct), defined as the mean number of cycles required to enter in exponential phase of DNA amplification. The composition in PCR products depend both on the number and on the topographic position of hybridization sites on genomic DNA. Each PCR product is characterized by its melting temperature (Tm). Real-time quantitative PCR allows analysis of melting temperature curves to obtain the distribution of melting temperatures.

RAPD reactions were performed using the decamer oligonucleotides OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3') and OPB10 (5'-CTGCTGGGAC3') obtained from Sigma Proligo (Missouri, USA), as selected (Plaire et al., 2013). Real time RAPD-PCR were performed in capillaries using a LightCycler apparatus (Roche, Meylan, France) in a 20- μL reaction mixture containing 2 μL of 1/20 diluted genomic DNA, 2 μL of RAPD probe (6 μM), and 16 μL of PCR mix (1 μL of a Roche solution containing dNTPs, Taq DNA polymerase and SYBR Green I fluorescent dye, 3.2 μL of 25 mM MgCl₂ and 11.8 μL of PCR-grade water). Capillaries were closed and centrifuged at 2000 rpm for 10 s. DNA was amplified following the thermal cycling parameters: a warming step of 10 min at 95 °C to denature DNA, 60 amplification cycles of 5 s at 95 °C for denaturation, 5 s at 50 °C for annealing and 30 s at 72 °C for the extension step. Melting temperature curves were obtained by continuously measuring the decrease in fluorescence while raising the temperature from 65 °C to 95 °C by steps of 0.05 °C s⁻¹. A final cooling phase to 40 °C was achieved.

Melting temperature curves were analyzed using the LightCycler Software 3.5 (Roche, Meylan, France). Melting temperatures were classified on a range of 12 temperature intervals from 74 to 92 °C and their frequency distributions were compared between control and exposed daphnids. In order to quantify the number of hybridization sites of a RAPD probe per genome unit, an additional reference PCR was performed with each DNA sample using D. magna enolase (Eno) gene (accession number to Genbank: JN994253). The upstream and downstream enolase probes were two specific oligonucleotides, ENO3 and ENO5 (5'-CTCATCAGCACTGCCATCG-3' and 5'-CAAGTAGGTAGCCGGGTCAG3', respectively), flanking the 5' and 3' regions of the third exon of the enolase gene and therefore complementary to the second and fourth introns, respectively. The threshold cycle Ct_{ENO}, obtained with the enolase probes, indicates eight hybridization events per genome unit, identifying two enolase isoforms (two probes on each 2 × 2 enolase loci). Therefore, the number of hybridization sites per genome unit of a RAPD probe, was calculated as 2^(Ct_{ENO} - Ct_{PROBE} + 3), where Ct_{PROBE} is the threshold cycle value obtained with either the OPA9 or OPB10 probe.

2.6. Data analysis

Statistical analyses and model adjustment were performed with the statistical computing software R (R Development Core Team,

2014). Residuals normality was verified through normal qq-plots of residuals and Shapiro–Wilk tests. Residuals homoscedasticity was verified using Bartlett and Levene tests. Statements of significance are based on α -risk of 0.05.

Effects of gamma radiation on body length and dry mass were tested after accounting for the coincident influence of time and/or body length, using relationships in agreement with the Dynamic Energy Budget theory (Kooijman, 2010) and Massarin et al. (2010) (Table 2). Linear and non-linear models were adjusted and fitted using the lm and glm routines following the least squares criterion. Fitted curves were compared between different exposure conditions and the control using the sequential Holm procedure. Differences in fecundity between control and exposure conditions were tested using one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison tests. When assumptions of normality and homoscedasticity were rejected the optimal Box–Cox transformation was applied. Differences in age at brood release between different exposure conditions and the control were analyzed using Kruskal–Wallis' test.

Concerning DNA alterations, number of hybridization sites was compared between control and different exposure conditions using Mann–Whitney's U-test. Differences in frequency distribution of melting temperatures were analyzed using the 2 × 2 contingency table test, with significance tested by a Monte Carlo simulation method to correct for small sample size.

3. Results

3.1. Survival

No mortality was observed in control daphnids over the 3 successive generations (F0, F1 and F2). Mortality was observed at the two highest dose rates only, with no statically significant difference to the control (Fig. 2). In generation F0, exposure to gamma radiation induced a mortality of 10% after 23 days at 4.70 mGy h⁻¹. A same level of effect was recorded in generation F2 at 4.70 mGy h⁻¹. Increasing mortality was observed at 35.4 mGy h⁻¹, values ranging from 10% after 9 days to 20% after 18 days in generation F0 and from 20% at hatching to 30% after 16 days in generation F2. This contrasted with observations in generation F1, where daphnids showed no mortality independent of dose rate.

3.2. Effects on growth in length and mass

Chronic gamma radiation induced a slight reduction in body length. Results suggested that effects might increase at 35.4 mGy h⁻¹ although they remain small over generations (Fig. 3).

In generation F0, effects on body length (Table 3) were associated with a significant reduction ($p \leq 0.05$) of 7% and 8% relative to the control in maximum body length (L_m) at 0.007 and 35.4 mGy h⁻¹, respectively. In generation F1, effects on body length (Table 3) remained significant ($p \leq 0.05$) at the highest dose rate only (35.4 mGy h⁻¹), with reductions of 8% and 13% relative to the control in length at birth (L_b) and von Bertalanffy growth rate (r_B).

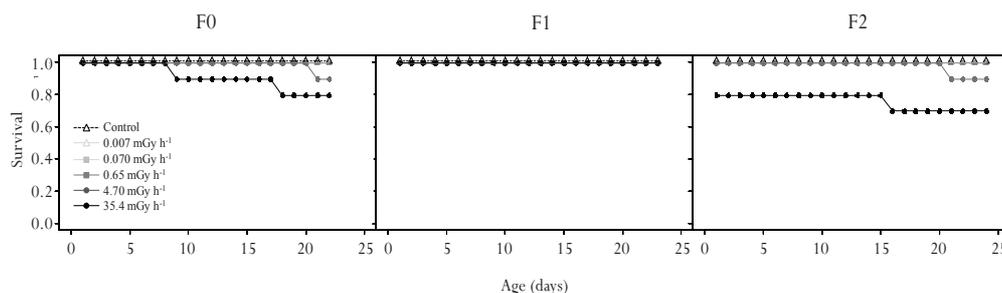


Fig. 2. Proportion of surviving daphnids (n = 10) in the three successive generations (F0, F1 and F2) exposed to Cs-137 gamma dose rates of 0, 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h⁻¹.

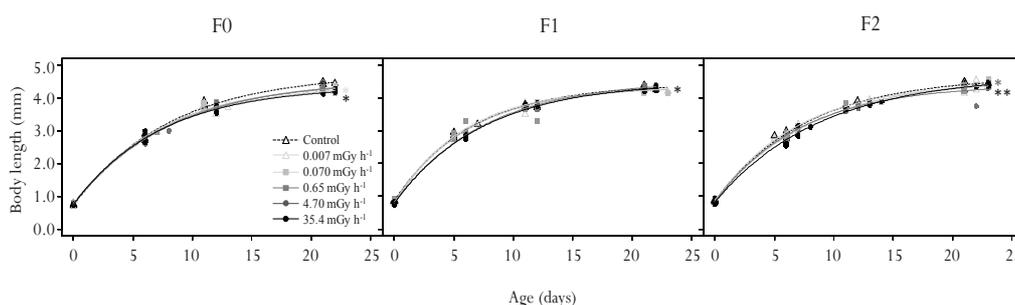


Fig. 3. Daphnid body length (mm) in relation to age (days) in the three successive generations (F0, F1 and F2) exposed to Cs-137 gamma dose rates of 0, 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h⁻¹. Experimental data and von Bertalanffy growth curves (fitted using Eq. (1), Table 2) are represented by symbols and lines, respectively. Significant differences with the control (Holm’s multiple tests): **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01; n = 19.

In generation F2, body length (Table 3) was affected due to reductions of 5% relative to the control in both *L_b* and *L_m* at 4.70 mGy h⁻¹, and due to reductions of 6% and 13% in *L_b* and *r_B*, respectively, at 35.4 mGy h⁻¹ (*p* ≤ 0.01).

The relationship between body length and dry mass (Table 2 – Eq. (2)) did not differ significantly between the control and exposure conditions independent of the generation (Fig. 4 and Supplementary material Table A.1), suggesting that differences in body dry mass are mere consequences of the differences in body length.

3.3. Effects on reproduction

Reproduction was the most affected among organism-level endpoints, daphnids showing increasing delay in brood release and reduction in number of produced offspring over generations (Fig. 5).

Control daphnids showed a pulsed egg production with 5 successive broods released during the 23-day period in every generation and peaks of neonate release occurring on days, 8–9, 11–12, 15, 18 and 21. In generation F0, a significant delay from 0.4 to 0.8 days in release of broods 1 to 3, respectively, (*p* ≤ 0.01 and *p* ≤ 0.05,

Table 3

Estimated parameters for growth in body length, cumulated reproduction on 5 broods and age at release of brood 5, in daphnids exposed to Cs-137 gamma dose rates of 0, 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h⁻¹ over three successive generations (F0, F1 and F2). Significant differences with the control: **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001; n = 19. *L_m*: Maximum body length (mm); *L_b*: body length at birth (mm); *r_B*: von Bertalanffy growth rate (day⁻¹).

Generation	Dose rates (mGy h ⁻¹)	Body length				Cumulated fecundity			Age at release of brood 5		
		<i>L_b</i> (mm)	<i>L_m</i> (mm)	<i>r_B</i> (day ⁻¹)	<i>p</i>	Mean	SD	<i>p</i>	Mean	SD	<i>p</i>
F0	0	0.725	4.751	0.123		136.900	8.685		21.100	0.316	
	0.007	0.776	4.443	0.129	*	122.900	8.556	**	21.200	0.421	
	0.070	0.741	4.483	0.135		131.800	6.713		21.300	0.483	
	0.65	0.758	4.517	0.128		132.700	5.012		21.300	0.483	
	4.70	0.753	4.571	0.123		129.700	14.298		21.100	0.316	
	35.4	0.756	4.369	0.136	*	110.429	8.904	***	21.000	0.000	
F1	0	0.856	4.426	0.155		119.000	6.128		21.100	0.316	
	0.007	0.812	4.337	0.170		119.500	6.754		21.200	0.632	
	0.070	0.798	4.338	0.163		118.200	9.931		21.400	0.699	
	0.65	0.846	4.254	0.170		111.900	5.130		21.000	0.000	
	4.70	0.806	4.541	0.134		113.300	5.658		21.200	0.421	
	35.4	0.793	4.480	0.135	*	104.900	8.646	**	21.400	0.516	
F2	0	0.868	4.668	0.129		138.222	6.280		21.000	0.000	
	0.007	0.842	4.501	0.143		135.000	9.018		22.000	0.942	*
	0.070	0.879	4.624	0.122		138.400	7.042		22.900	0.568	***
	0.65	0.837	4.518	0.134		130.100	9.780		21.300	0.675	
	4.70	0.829	4.419	0.139	*	132.440	14.782		22.600	0.699	***
	35.4	0.820	4.683	0.113	**	118.700	39.883		22.900	0.568	***

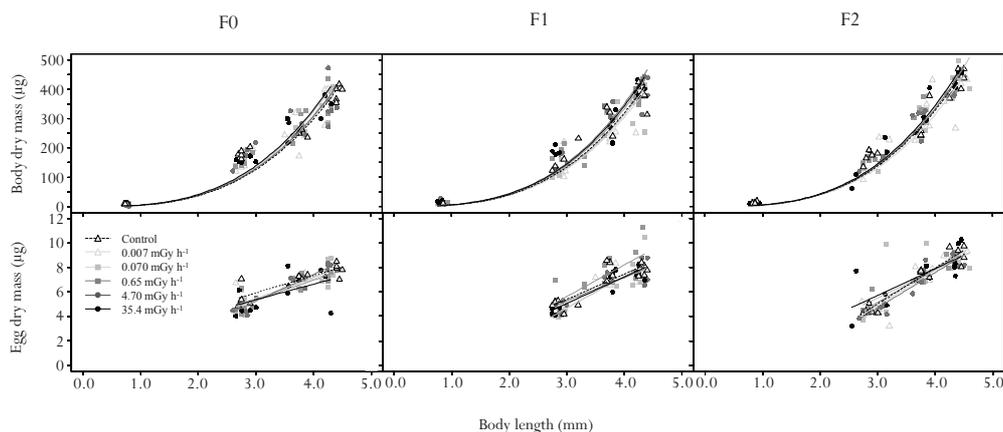


Fig. 4. Daphnid body dry mass (μg) and dry mass per egg (μg) in relation to body length (mm) in the three successive generations (F0, F1 and F2) exposed to Cs-137 gamma dose rates of 0, 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h^{-1} . Experimental data and curves (fitted using Eqs. (2) and (3), Table 2) are represented by symbols and lines, respectively. Significant differences with the control (Holm's multiple tests): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 19$ for body dry mass and $n = 14$ for egg dry mass.

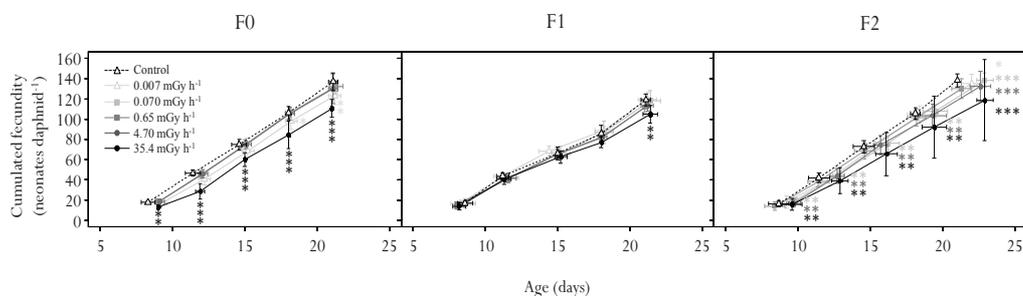


Fig. 5. Cumulated production of neonates per daphnid in relation to age (days) in the three successive generations (F0, F1 and F2) exposed to Cs-137 gamma dose rates of 0, 0.007, 0.070, 0.65, 4.70 and 35.4 mGy h^{-1} . Vertical and horizontal error bars indicate standard deviations in the number of neonates per brood and in the age at brood release, respectively. Vertical and horizontal asterisks indicate significant differences with the control in cumulated reproduction (ANOVA; Dunnett's post hoc test) and in age at brood release (Kruskal–Wallis test), respectively (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 10$).

respectively), was observed in exposed daphnids independent of the dose rate (Table 3). No delay in brood release was observed in generation F1. In generation F2, brood production was significantly delayed at 0.070, 4.70 and 35.4 mGy h^{-1} ($p < 0.001$), with delay reaching a maximum of 2 days at the end of the generation exposed to the highest dose rate. Delay became significant at a dose rate as low as 0.007 mGy h^{-1} ($p < 0.05$) at release of brood 5 in generation F2. This increasing delay was in good agreement with the observed increasing reduction in body length at birth Lb and von Bertalanffy growth rate r_B (Table 3).

Fecundity was significantly reduced in generation F0, as early as brood 1 at 35.4 mGy h^{-1} and from brood 4 at 0.007 mGy h^{-1} , with respective reductions in cumulated fecundity over 5 broods of 19% and 11% compared to the control ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) (Table 3). A significant decrease of 12% in total fecundity was observed at 35.4 mGy h^{-1} in generation F1 ($p < 0.01$). Cumulated fecundity was also reduced by 14% in generation F2 at 35.4 mGy h^{-1} but this reduction was not significant due to a high variability among exposed daphnids.

Increase in dry mass per egg with mother body length (Table 2 – Eq. (3)) did not differ between control and exposed daphnids independent of the generation (Fig. 4), suggesting that differences in egg dry mass might be a mere consequence of the differences in body length.

3.4. Genotoxicity analysis

RAPD-PCR results for OPA9 and OPB10 probes including the number of hybridization sites per genome (threshold cycle Ct)

and the composition in PCR products (frequency distribution of melting temperatures T_m) are detailed in Supplementary material (Table A.2–A.5). Statistical analyses are summarized in Table 4.

Significant DNA alterations (Table 4A) were detected as early as hatching in generation F0 at the two highest dose rates of 4.70 mGy h^{-1} (with OPB10 only) and 35.4 mGy h^{-1} (with both probes). Later in generation F0, significant DNA alterations were observed at decreasing dose rates, at 0.65 mGy h^{-1} in adult releasing brood 1 (with OPA9 only), and as low as 0.007 mGy h^{-1} in adults releasing brood 5 (with both probes). DNA alterations were significant at every dose rate upon hatching in generation F1 (Table 4A). In adults releasing brood 1, significant DNA alterations were detected (with both probes) at the two highest dose rates only (4.70 and 35.4 mGy h^{-1}) whereas they were not at dose rates $< 0.65 \text{ mGy h}^{-1}$. DNA alterations became significant again at 0.070 mGy h^{-1} in F1 adults releasing brood 5 and remained so upon hatching of generation F2 (with OPB10 only). DNA alterations became significant at every dose rate (with both probes in most cases) on release of broods 1 and 5 (Table 4A).

Significant DNA alterations (Table 4A) were detected at the same dose rate in neonates from brood 5 as in adult females (0.007 mGy h^{-1} from in F0 females and F1 neonates; 0.070 mGy h^{-1} from in F1 females and F2 neonates; 0.007 mGy h^{-1} from in F2 females and F3 neonates) reflecting a potential transmission of DNA alterations from one generation to the next. However, significant DNA alterations (Table 4B) were detected at a lower dose rate in neonates from brood 1, (respectively, at 0.070 mGy h^{-1} in F1' and at 0.65 mGy h^{-1} in F2') than in females (at 0.65 mGy h^{-1} in F0

Table 4

Summary of RAPD-PCR results. Significant DNA alterations compared to the control, detected with probes OPA9 and OPB10, on a range of Cs-137 gamma dose rates, (A) in generations P, F0, F1, F2 and F3: neonates (at hatching), B1 and B5 (adults at release of broods 1 and 5, respectively); (B) in generations F1', F2' and F3': neonates from brood 1 (at hatching). Generation P = parent of F0 exposed during brood 5 incubation only. Results with OPA9 and OPB10 reported on the left- and right-sides of the slash, respectively, (OPA9/OPB10): single asterisk (*) indicates detection on either Ct or Tm ($p < 0.05$); double asterisks (**) indicate detection on both Ct and Tm ($p < 0.05$ and $p < 0.05$); slash without asterisks (/) indicates no significant DNA alterations (with both probes).

(A)											
Generation	P	F0			F1			F2			F3
Dose rates	B5	Neonates	B1	B5	Neonates	B1	B5	Neonates	B1	B5	Neonates
0.007 mGy h ⁻¹	/	/	/	**/**	**/	/	/	/	**/**	*/	/*
0.070 mGy h ⁻¹	/	/	/	**/**	**/*	/	**/	/*	/*	**/**	/
0.65 mGy h ⁻¹	/	/	*/	/*	**/*	/	/	/	**/**	**/**	*/*
4.70 mGy h ⁻¹	/	**	*/	/*	**/*	**/*	/	/	/*	**/**	/*
35.4 mGy h ⁻¹	/	**/**	**/**	**/**	*/	**/*	**/*	/	/*	**/**	**/**

(B)			
Generation	F1'	F2'	F3'
Dose rates			
0.007 mGy h ⁻¹	/	/	**/**
0.070 mGy h ⁻¹	*/	/	**/**
0.65 mGy h ⁻¹	**/**	**/**	**/**
4.70 mGy h ⁻¹	**/*	**/**	*/*
35.4 mGy h ⁻¹	**/**	**/*	**/**

and 4.70 mGy h⁻¹ in F1) suggesting that brood 1 neonates might be more sensitive to genotoxicity than their mothers.

4. Discussion

4.1. Transgenerational changes in effects on survival, growth and reproduction

The present study demonstrated that chronic effects of gamma radiation varied among successive generations in *D. magna*. Results indicated an overall increase in radiotoxicity for survival, growth and reproduction from generation F0 to generation F2 at dose rates > 4.70 mGy h⁻¹, with a transient absence of effects during generation F1 (in adults at release of brood 1). Our observations were consistent with other studies showing reprotoxicity of chronic gamma radiation in the marine polychaetes, *Neanthes arenaceodentata* and *Ophryotrocha diadema*, and the terrestrial oligochaete *Eisenia fetida*, exposed to 13.7 mGy h⁻¹, 0.19 mGy h⁻¹ and 43 mGy h⁻¹, respectively (Harrison and Anderson, 1994; Knowles and Greenwood, 1994; Hertel-Aas et al., 2007). Results in generation F0 were in good agreement with those obtained in *D. magna* at a similar dose rate (31 mGy h⁻¹) by Gilbin et al. (2008). In fact, a comparable reduction in fecundity (~20%) was observed in both studies although the reduction was significant few days earlier in our experiment than in the previous study. Furthermore, we observed a slightly greater mortality, (respectively, 20% and 7.5%). These changes might be imputable to different exposure design, with exposure starting 3 days earlier in our study than in Gilbin et al. (2008) (i.e., at egg deposition and at egg hatching, respectively). The comparison suggested that embryonic exposure in our experiment only slightly increased daphnid radiosensitivity to gamma radiation at environmentally relevant dose rates. This contrasted with the situation in the coleopteran insect *Dermestes maculatus* and in the cyclopoid copepod *P. nana* where eggs were described as potentially sensitive stages compared to adults (Seal and Tilton, 1986; Won and Lee, 2014). These conclusions were drawn for acute exposure at 10-fold greater doses (~100 Gy), compared to our study. Others results suggested that exposure to chronic gamma radiation at a dose rate of 17 mGy h⁻¹ from the larval to the adult stages induced greater effects than exposure during the embryonic stage in *N. arenaceodentata* (Harrison and Anderson, 1988).

Our observation that daphnids were more radiosensitive in generation F0 than in generation F1 contrasted with previous studies showing that effects severity increased continuously over 3 successive generations in *D. magna* exposed to waterborne depleted uranium (U) or americium-241 (Am-241) (Alonzo et al., 2008; Massarin et al., 2010; Plaire et al., 2013). Among the few studies examining chronic gamma radiation effects over several generations, decreasing effects on *E. fetida* reproduction were observed above 4 mGy h⁻¹ between generations F0 and F1 (Hertel-Aas et al., 2007). However, this study was limited to two generations and effects on third generations were not examined. Several processes might explain the observed difference between generations F0 and F1. First, under chronic gamma irradiation, organisms were subjected to a constant radiological stress proportional to exposure dose rate whereas depleted U or Am-241 needed to be bioaccumulated to induce chemical or internal alpha irradiation, following a potential slower kinetics in generation F0 than in generation F1. This explanation was strongly supported by the observed rapid induction of effects (as soon as release of brood 1) in our study. Second, the transient disappearance of effects on survival and reproduction in generation F1 might reflect a late induction of compensatory processes requiring that a sufficient cumulative dose was received to be triggered. The fact that effects on reproduction (reduction in fecundity and/or delay in brood release) became significant again late in generation F1 and continued increasing in severity across generation F2 at highest dose rates (4.70 mGy h⁻¹) suggested that radiotoxicity might become dominant over compensatory processes while the total received dose continued cumulating over time. Third, the reduction in fecundity and occurrence of mortality in generation F0 might lead to the selection of comparatively more resistant daphnids in generation F1. This process was also proposed to explain decreasing radiosensitivity over 7 generations of the marine polychaete *Ophryotrocha diadema* exposed to dose rates > 7.7 mGy h⁻¹ (Knowles and Greenwood, 1994).

4.2. Accumulation and transmission of DNA alterations across generations

In this study, RAPD results reflected an overall accumulation and transmission of DNA alterations across generations. This was demonstrated through several important points. First, the detec-

tion of significant DNA alterations successively at 4.70, 0.65 and 0.007 mGy h⁻¹, in F0 neonates, F0 adults releasing brood 1 and F0 adults releasing brood 5, respectively, showed that DNA alterations cumulated in daphnids in time- and dose-dependent ways, following a rapid kinetic in generation F0. Second, DNA alterations observed in freshly hatched F0 neonates suggested that genotoxicity was also directly induced during the embryonic stage (because exposure was started after egg deposition, when no altered genetic material could be transmitted from ovigerous females). Consequently, DNA alterations accumulated during the embryonic, the juvenile and the adult stages. Third, the detection of genotoxicity in neonates at decreasing dose rates from generations F0 to F3 showed that DNA alterations affected germinal cells in females and were transmitted to their progeny. Fourth, the comparison of dose rates at which genotoxicity was detected between mothers and neonates (especially between generation P and F0) showed that, at the molecular level, embryos were more radiosensitive than adult females. To date, the majority of studies investigating genotoxic effects of radionuclides in a multigenerational context focused on vertebrates, including mouse and fish models (Kubota et al., 1995; Morgan, 2003; Nomura, 2003; Shimada and Shima, 2004; Barber and Dubrova, 2006; Barber et al., 2006; Tsyusko et al., 2007; Ryabokon, 2010; Grygoryev et al., 2013). In invertebrates, an accumulation of DNA alterations and transmission to their offspring were reported in two successive generations of *D. magna* exposed to depleted U (Plaire et al., 2013) and in the butterfly *Z. maha* exposed to environmental doses of gamma radiation (Hiyama et al., 2013). In agreement with our results, Plaire et al. (2013) observed a greater genotoxicity in neonates than in adult daphnids, suggesting that DNA repair capacity might be greater in adults than in neonates. This assumption was strongly supported by results from David et al. (2011) showing a higher transcription of genes involved in DNA repair in adult daphnids than in neonates after exposure to a mixture of genotoxic contaminants.

In our study, the difference in radiosensitivity between neonates and adults described above might also explain why, at dose rates ≤ 0.65 mGy h⁻¹, DNA alterations were significant in F0 adults and F1 neonates and non-significant later in F1 adults releasing brood 1. This observation, suggesting a non-linear dose-response relationship or a transitorily greater DNA repair, could result from various processes. A previous study suggested that non linearity in molecular responses might result from a lack of DNA repair at very low doses of gamma radiation, repair mechanisms being triggered above a critical threshold level of damage only (Zaichkina et al., 2004). Thus, a gap in time and/or dose might exist between induction of molecular alterations and activation of defense mechanisms and recovery processes (Burlakova et al., 1998). As a consequence, DNA alterations might be significant at low dose rates or early during exposure (like in generation F0 in our study) before they are repaired through DNA repair mechanisms or eliminated via cell death (like in generation F1). Finally, while exposure continued and total dose kept cumulating, lesions might turn dominant over defense and recovery processes, leading to constantly signif

icant DNA alterations in F1 adults at 0.070 mGy h⁻¹ (at release of brood 5) and in F2 adults at 0.007 mGy h⁻¹ (at release of brood 1). At dose rates ≥ 4.70 mGy h⁻¹, DNA lesions dominated over defense and repair mechanisms in all generations, leading to constantly significant DNA alterations. Other authors showed that genes involved in DNA repair and antioxidant response were expressed in a dose dependent manner in the marine copepods *T. japonicus* and *P. nana* acutely exposed to ¹³⁷Cs (Han et al., 2014; Won and Lee 2014). Although comparing responses between acute and protracted radiation exposures is certainly complex, one can hypothesize that under chronic irradiation, DNA repair mechanisms become efficient only after organisms receive a sufficient cumulative dose. This hypothesis would explain the greater radiosensitivity observed in generation F0 (due to the absence of DNA repair) than in generation F1. Finally, various studies demonstrated that radiation could induce inheritable epigenetic changes, such as DNA methylation, causing transgenerational changes in genes expression (Dubrova, 2003; Skinner, 2008). These changes might explain variations in chemotoxic or radiotoxic effects over generations of *D. magna* (Vandegheuchte et al., 2010; Sarapultseva and Gorski, 2013). Further molecular analyses would be necessary to quantify the contribution of genetic and epigenetic processes to the response of daphnids to multigenerational gamma irradiation.

4.3. Linking DNA alterations to individual responses over generations

In the present study, radiation-induced alterations at the molecular level became significant at a lower dose rate and after shorter exposure duration than effects on survival, body size and reproduction (Table 5). Previous studies similarly demonstrated that DNA damage was a more sensitive endpoint than effects at the individual level in *D. magna* exposed over several generations to benzo[a]pyrene or depleted U (Atienzar and Jha 2004; Plaire et al., 2013). Plaire et al. (2013) suggested that altered RAPD profiles might be used as powerful predictive tools, serving as early indicators of future effects on fecundity, occurring if exposure of organisms was maintained. With chronic gamma irradiation, delay in observation of effects on organisms after detection of molecular alterations depended on dose rate: few days in generation F0 at the highest tested dose rate (35.4 mGy h⁻¹) and as long as 35 days (more than 1 generation time) at 0.070 mGy h⁻¹. Radiosensitivity at the lowest tested dose rate (0.007 mGy h⁻¹) was more difficult to compare between the molecular and organism levels, with DNA profiles and fecundity affected concomitantly at the end of generation F0. These observations might be a result of unrepaired DNA alterations occurring below the threshold triggering defense and repair mechanisms. Whether DNA alterations observed in F2 adults at 0.007 mGy h⁻¹ might induce later effects on organisms remains to be tested over a greater number of generations. Similarly, an apparent correlation was found between cumulative DNA damage over time and their consequences on reproductive success, as brood size, in the two invertebrates *N. arenaceodentata* and

Table 5
Lowest observed effect dose rates (LoEDR, mGy h⁻¹) causing significant DNA alterations and effects on survival, growth and reproduction, compared to the control, over three successive generations (F0, F1 and F2): neonates (at hatching), B1 and B5 (adults at release of broods 1 and 5, respectively). Asterisks indicate that no significant effect on growth and reproduction was detected at intermediate dose rates (from 0.070 to 4.70 mGy h⁻¹) in generation F0. NE = No observed effects; – = not applicable.

Endpoints	F0			F1			F2		
	Neonates	B1	B5	Neonates	B1	B5	Neonates	B1	B5
DNA alteration	4.70	0.65	0.007	0.007	4.70	0.070	0.070	0.007	0.007
Growth	NE	NE	35.4 0.007*	35.4	35.4	35.4	4.70	4.70	4.70
Reproduction	–	35.4	35.4 0.007*	–	NE	35.4	–	0.070	0.070
Survival	NE	35.4	4.70	NE	NE	NE	35.4	35.4	4.70

Caenorhabditis elegans exposed, respectively, to low doses of ^{60}Co gamma and UV-B radiation (Anderson and Wild, 1994).

Our results described parallel trends in effects at the molecular and the organismal levels, with an overall increase in severity between generations F0 and F2 and a transient decrease in the course of generation F1. The nature of affected endpoints also changed over the course of generations, effects possibly pointing different underlying mechanisms of toxicity, with a reduction in brood size dominating in generation F0 and an increasing delay in growth and brood release in generation F2. These observations were in good agreement with previous results showing increasing effects of depleted U over generations (Plaire et al., 2013), which were best explained by a transgenerational increase in energy costs causing a delay in growth, as a consequence of cumulated DNA alterations (Alonzo et al., 2014).

5. Conclusion

This study provides evidence that DNA alterations were accumulated and transmitted across three generations of daphnids exposed to low doses of gamma radiation, in parallel of an increase in sensitivity of organisms. DNA alterations and associated effects at the individual level were reported at a dose rate as low as 0.007 mGy h^{-1} , below the internationally proposed radioprotection reference benchmark of $10\text{ }\mu\text{Gy h}^{-1}$ (Garnier-Laplace et al., 2010). Ionizing radiation might have significant genetic consequences at lower doses than expected based on extrapolation models from acute dose (Coppelstone et al., 2001), the relevance of such genetic alterations for environmental risk assessment remaining controversial. In this context, further mechanistic approaches could help understanding the link between molecular- and organism-level responses.

Acknowledgments

We thank Nicolas Dubourg for technical support for MCNP calculation and dosimetry measurement, and Laurent Garcia-Sanchez for statistical validation and advice on data analysis. We are particularly grateful to Sandrine Pereira and Kewin Gombeau for their helpful technical assistance. This research was supported by the EC EURATOM Seventh Framework programme STAR (Strategy for Allied Radioecology, Fission-2010-3.5.1-269672, www.star-radioecology.org) and was part of the Envirhom-Eco research programme supported by the French Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). We would like to thank two anonymous reviewers who greatly contributed to improve the manuscript.

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.aquatox.2015.03.002>.

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. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 220, 67–103.

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

Alonzo, F., Zimmer, E., Plaire, D., Buisset-Goussen, A., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., Horemans, N., 2014. STAR Deliverable (D-N(5.4). Understanding the Metabolic Mode of Actions of Two Different Types of Radiation Using Biokinetics/Deb-Tox Models. European Commission, 69 pp.

Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102, 9.

ASTM, 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and amphibians. In: Annual Book ASTM Standards, pp. 271–296.

Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random-amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2275–2282.

Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 125–140.

Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 613, 76–102.

Barber, R.C., Dubrova, Y.E., 2006. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 598, 50–60.

Barber, R.C., Hickenbotham, P., Hatch, T., Kelly, D., Topchuy, 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.

Brown, F.B., 2003. MCNP – A General Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5. Los Alamos National Laboratory, Oak Ridge, TN.

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

Burlakova, E., Goloshchapov, A., Gorbunova, N., Gurevich, S., Zhizhina, G., Kozachenko, A., Konradov, A., Korman, D., Molochkina, E., Nagler, L., 1998. Peculiarities of biological action of low irradiation doses and their probable relation to the health state of participants of chernobyl accident liquidation. In: Imanaka, T. (Ed.), Research Reactor Inst. Report. Kyoto Univ., Kumatori, Osaka (Japan), pp. 223–234.

Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Bourdineaud, J.P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 312–319.

Chen, Y., Huang, J., Xing, L., Liu, H., Giesy, J.P., Yu, H., Zhang, X., 2014. Effects of multigenerational exposures of D. magna to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 234–243.

Coppelstone, D., Bielby, S., Jones, S., 2001. Impact Assessment of Ionising Radiation on Wildlife. Environment Agency, London, United Kingdom.

Dallas, L.J., Keith-Roach, M., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates. *Crit. Rev. Radiat. Res.* 177, 693–716.

David, R.M., Dakic, V., Williams, T.D., Winter, M.J., Chipman, J.K., 2011. Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquat. Toxicol.* 104, 192–204.

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

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

Elenit, B.P., Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing: effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of D. magna. *Water Res.* 24, 1157–1167.

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

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

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.

Grygoryev, D., Moskalenko, O., Hinton, T., Zimbrick, J., 2013. DNA damage caused by chronic transgenerational exposure to low dose gamma radiation in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Radiat. Res.* 180, 235–246.

Han, J., Won, E.-J., Lee, B.-Y., Hwang, U.-K., Kim, I.-C., Yim, J.H., Leung, K.M.Y., Lee, Y.S., Lee, J.-S., 2014. Gamma rays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat. Toxicol.* 152, 264–272.

Harris, E.H., 1989. The Chlamydomonas Sourcebook. Cambridge Univ Press.

Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1988. The Effects of Radiation on Reproductive Success of the Polychaete Worm *Neanthes arenaceodentata*. US Environmental Protection Agency, report EPA/520/1-88-004, Washington, DC.

Harrison, F.L., Anderson, S.L., 1994. Effects of chronic irradiation on the reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiat. Res.* 140, 401–409.

Harrison, F.L., Rice Jr, D.W., Moore, D.H., Varela, M., 1983. Effects of Radiation on Frequency of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchange in the Benthic Worm *Neanthes arenaceodentata*. Lawrence Livermore National Lab, CA (USA).

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., Kinjo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A., Otaki, J.M., 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Sci. Rep.* 2, 570.
- Hiyama, A., Nohara, C., Taira, W., Kinjo, S., Iwata, M., Otaki, J.M., 2013. The Fukushima nuclear accident and the pale grass blue butterfly: evaluating biological effects of long-term low-dose exposures. *BMC Evol. Biol.* 13, 168.
- Howard, B., Beresford, N., Andersson, P., Brown, J., Copplestone, D., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Howe, P., Oughton, D., Whitehouse, P., 2010. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context—an overview of the PROTECT coordinated action project. *J. Radiol. Prot.* 30, 195.
- ICRP, 1991. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. Ann. ICRP 21 (1–3).
- ICRP, 2007. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37.
- Iwasaki, T., 1973. The differential radiosensitivity of oögonia and oocytes at different developmental stages of the Brine Shrimp, *Artemia salina*. *Biol. Bull.* 144, 151–161.
- Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J., Oetken, M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environ. Pollut.* 186, 180–186.
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis* genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 586, 47–57.
- Knowles, J.F., Greenwood, L.N., 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, dorvilleidae). *Mar. Environ. Res.* 38, 207–224.
- Kooijman, S.A.L.M., 2010. Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation. Cambridge University Press.
- Kubota, Y., Shimada, A., Shima, A., 1995. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 330–334.
- Larsson, C.-M., 2008. An overview of the ERICA integrated approach to the assessment and management of environmental risks from ionising contaminants. *J. Environ. Radioactiv.* 99, 1364–1370.
- Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermin, C., Bourdineaud, J.-P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 755, 55–60.
- Marshall, J., 1966. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress. *Ecology*, 561–571.
- Marshall, J.S., 1962. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. *Ecology*, 598–607.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 99, 309–319.
- 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. *Radiat. Res.* 159, 581–596.
- Morgan, W.F., Bair, W.J., 2013. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiat. Res.* 179, 501–510.
- Mothersill, C., Seymour, C., 2013. Uncomfortable issues in radiation protection posed by low-dose radiobiology. *Radiat. Environ. Biophys.* 52, 293–298.
- Nomura, T., 2003. Transgenerational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 544, 425–432.
- OECD, 2008. OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot river (France). *Ecotoxicol. Environ. Safte.* 74, 974–983.
- Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 158, 231–243.
- R Development Core Team, 2014. R: A language and environmental for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org/>
- 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., 2010. Multigenerational effects of chronic ionizing radiation in natural populations of model mouse-like rodents living in accidentally radiocontaminated areas. *Rapid Diagnosis Popul. Risk Radiat. Chem.* 73, 277.
- Sarapultseva, E.I., Gorski, A.I., 2013. Low-dose γ -irradiation affects the survival of exposed *Daphnia* and their offspring. *Dose-Response* 11, 460–468.
- Seal, D.R., Tilton, E.W., 1986. Effect of gamma radiation on the metamorphic stages of *Dermestes maculatus* DeGeer (Coleoptera: Dermestidae). *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* 37, 531–535.
- Shimada, A., Shima, A., 2004. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 119–124.
- Skinner, M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod. Toxicol.* 25, 2–6.
- Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T., Glenn, T., 2007. Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 103–110.
- UNSCEAR, 1996. Sources and effects of ionizing radiation. In: Report to the General Assembly, with scientific annex, New York, United Nations: UNSCEAR/United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.
- Vandegehuchte, M.B., Lemièrre, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., Janssen, C.R., 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 151, 278–285.
- Williams, C., 2004. Framework for assessment of environmental impact (FASSET) of ionising radiation in European ecosystems. *J. Radiol. Prot.* 24, A1–177.
- Won, E.-J., Lee, J.-S., 2014. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Aquat. Toxicol.* 150, 17–26.
- Zaichkina, S., Rozanova, O., Aptikaeva, G., Achmadieva, A.C., Klokov, D., 2004. Low doses of gamma radiation induce nonlinear dose responses in mammalian and plant cells. *Nonlinear. Biol. Toxicol. Med.* 2, 213–221.

RÉSUMÉ

Les activités anthropiques liées à l'industrie nucléaire contribuent à des rejets continus de radionucléides dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Au cours des dernières décennies, le risque écologique des radiations ionisantes est devenu une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure pour la protection des écosystèmes. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux situations d'exposition chroniques à faibles doses, bien que ces situations soient représentatives des conditions environnementales réelles. Comprendre comment les radiations ionisantes affectent les espèces au cours de plusieurs générations et à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur en radioécologie. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de ce doctorat visent à apporter de nouvelles connaissances relatives aux effets des radiations ionisantes au cours d'une exposition multigénérationnelle de l'invertébré aquatique, *Daphnia magna*. Pour répondre à cet objectif, une stratégie en deux étapes a été mise en place. Tout d'abord, une irradiation gamma externe à des débits de dose pertinents du point de vue environnemental a été réalisée sur *D. magna* pendant trois générations successives (F0, F1 et F2). Les objectifs de cette démarche étaient d'évaluer si de faibles débits de dose d'irradiation gamma externe induisaient une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies au cours des générations et de tester s'il existait une accumulation transgénérationnelle d'altérations à l'ADN. Les résultats mettent en évidence une accumulation et une transmission d'altérations de l'ADN au fil des générations, en parallèle d'une augmentation de la sévérité des effets sur la croissance et la reproduction entre les générations F0 et F2. Toutefois, des effets moins prononcés ont été observés au cours de la génération F1, laissant présager des processus de réparation de l'ADN transitoirement plus efficaces. Dans un second temps, les données d'irradiation gamma externe et celles d'une étude antérieure de contamination alpha interne ont été analysées à l'aide de modèles DEBtox (Budget d'Énergie Dynamique appliqué à la toxicologie), afin d'identifier et de comparer les causes de l'aggravation transgénérationnelle des effets entre les deux types de rayonnements. Dans les deux cas, deux modes d'action métaboliques distincts ont été nécessaires pour expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction de *D. magna* au cours des générations. Les résultats de modélisation suggèrent que les rayonnements alpha et gamma agissent selon deux combinaisons différentes de modes d'action, illustrant toute la complexité des processus biologiques mise en jeu. Ce projet de recherche contribue à apporter des connaissances significatives sur les effets chroniques des radiations ionisantes et indique clairement qu'il est important, à l'avenir, d'étudier et de comprendre les effets transgénérationnels des radiations ionisantes à faibles doses.

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

ABSTRACT

Anthropogenic activities related to the nuclear industry contribute to continuous discharges of radionuclides into terrestrial and aquatic ecosystems. Over the past decades, the ecological risk of ionizing radiation has become a growing public, regulatory and scientific concern for ecosystems protection. Until recently, only few studies focus on exposure situations at low doses of irradiation, although these situations are representative of realistic environmental conditions. Understanding how ionizing radiation affects species over several generations and at various levels of biological organization is a major research goal in radioecology. The aim of this PhD was to bring new knowledge on the effects of ionizing radiation during a multigenerational expose of the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. A two-step strategy was implemented. First, an external gamma radiation at environmentally relevant dose rates was performed on *D. magna* over three successive generations (F0, F1 and F2). The objective of this experiment was to examine whether low dose rates of radiation induced increasing effects on survival, growth and reproduction of daphnids over generations and to test a possible accumulation and transmission of DNA alterations from adults to offspring. Results showed an accumulation and a transmission of DNA alterations over generations, together with an increase in effect severity on growth and reproduction from generation F0 to generation F2. Transiently more efficient DNA repair leading to some recovery at the organism level was suggested in generation F1. Second, data from the external gamma irradiation and those from an earlier study of internal alpha contamination were analyzed with DEBtox models (Dynamic Energy Budget applied to toxicology), to identify and compare the causes of the transgenerational increase in effect severity between the two types of radiation. In each case, two distinct metabolic modes of action were necessary to explain effects on size and reproduction of *D. magna* across generations. Modelling results suggested that alpha and gamma radiation acted on different combinations of modes of action, illustrating the complexity of biological processes. This research contributed to bring significant knowledge on chronic effects of ionizing radiation and clearly indicated the importance, in the future, of further studying and understanding transgenerational effects induced by low doses of radiation.

Keywords : *Daphnia magna*, gamma radiation, alpha contamination, DNA alterations, transgenerational effects, DEBtox.