

**IRSN**INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

**Toxicité et mode d'action du  
tritium seul et en mélange avec du  
cuivre sur l'algue verte  
*Chlamydomonas reinhardtii***

**Céline RÉTY**

Juin 2010

N° ISRN/IRSN-2011/138

Laboratoire de Radioécologie et d'Écotoxicologie





## *Thèse*

Présentée à

*L'université Montpellier 1 (UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques)*

*École doctorale : SIBAGHE*

Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences, Environnements

Par

**Céline RETY**

Pour l'obtention du grade de

*Docteur de l'Université Montpellier 1*

**Spécialité : Eaux continentales et société**

---

# **TOXICITE ET MODE D'ACTION DU TRITIUM SEUL ET EN MELANGE AVEC DU CUIVRE SUR L'ALGUE VERTE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

---

Soutenue le 4 juin 2010 à Cadarache

**Devant la commission d'examen formée de :**

<b>Pr Mylène WEILL</b>	Chercheur à l'ISEM, UM2	Présidente
<b>Dr Elena GOMEZ</b>	Maître de conférences, Laboratoire hydrosience, UM1	Directrice de thèse
<b>Pr Jean-François FÉRARD</b>	Université Paul Verlaine CNRS UMR 7146, Metz	Rapporteur
<b>Pr Claude FORTIN</b>	Professeur/Chercheur à l'INRS-ETE, Quebec (Canada)	Rapporteur
<b>Dr Rodolphe GILBIN</b>	Chercheur à l'IRSN, Saint Paul Lez Durance	Tuteur IRSN
<b>Dr Philippe CIFFROY</b>	Chercheur à EDF, Chatou	Examineur







## **Remerciements**

*En premier lieu, je tiens à remercier **Elena GOMEZ** (directrice de thèse) et **Rodolphe GILBIN** (co-directeur IRSN), qui m'ont permis par leur encadrement, leurs encouragements et leurs points de vue, de bien cadrer ce travail de thèse et d'orienter mes recherches. Leur confiance et la liberté accordée m'ont permis d'acquérir une autonomie appréciable.*

*Je remercie les rapporteurs de cette thèse : **Claude FORTIN** et **Jean François FERARD**, pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : **Mylène WEILL** et **Philippe CIFFROY**. Vos remarques ont complété les idées apportées au cours des comités de pilotage par **Mathias GROTE**, **Annette BERARD**, **Christelle ADAM**, **Catherine PRADINES**. Toutes vos suggestions m'ont permis d'aboutir à ce manuscrit.*

*Aux cours de ces trois années de thèse, la chance m'a été donnée d'encadrer deux stagiaires : **Aurélié SEVESTRE** et **Pauline FRIZET**. Merci à vous deux pour votre travail efficace. Je n'oublierai pas votre sympathie et nos nombreuses discussions.*

*Mon travail de thèse s'est déroulé au Laboratoire de Radioécologie et d'Écotoxicologie de l'IRSN. Au sein de ce laboratoire, j'ai une pensée particulière pour **Jérôme MICHON** et nos nombreuses pauses café. Merci pour ces moments de détente, pour ton écoute et tes conseils. Quant à toi, **Nadine CAUVIN**, je garderai en mémoire ta bonne humeur. Un grand merci également à notre secrétaire, **Claudine VAN CRASBECK** qui en plus des prérogatives administratives indispensables a réalisé l'impression de ce document. J'adresse également mes remerciements à **Marcel MORELLO** et **Daniel ORJELLET** qui ont réalisé les dosages en tritium. Je garderai également en mémoire l'accueil chaleureux de l'ensemble du personnel du LRE.*

*Une dernière pensée pour les différentes personnes rencontrées au cours de mon cursus scolaire : **Jean Louis BERTHON**, **Esteban RAYMOND**, **Olivier FAURE**, **Peter CAMPBELL**. Vous avez su susciter ma curiosité scientifique.*

*D'un point de vue moins scientifique, mais à mes yeux tout aussi important à la concrétisation de ce travail, ces trois années ont été l'occasion de créer des amitiés sincères. Parmi ces amis, je souhaite remercier **Matthieu CAVARO** (et son mal de mer) et **Anne BARREAU** (et son paréo) pour tous ces moments passés ensemble, tous ces fous rires et tous ces week-end de « décompression » sous marine. J'espère pouvoir plonger de nouveau bientôt avec vous.*

*Pour tous ces jeudis soir de détente et pour ces nombreux moments musicaux partagés, j'ai une pensée particulière aux flûtistes de l'harmonie municipale d'Aix en Provence et plus particulièrement à **Valérie MEYER**, **Lucie HADDOU**, **Lucile BRUN**. Merci également à cette association et à ses musiciens de m'avoir accueilli dans ses rangs pendant ces trois années.*

*Je n'oublierai pas non plus toutes les randonnées en aviron réalisées dans les gorges du Verdon avec mon ami **Jean Pierre CORIC**. Merci également à son épouse pour sa gentillesse et ses talents culinaire. Une pensée spéciale à **Serge ESCALLON** qui nous a quittés depuis, pour son accueil au sein de cette association et pour son aide et sa gentillesse. Depuis ta disparition, le club a perdu de son âme...*

*Je tiens tout particulièrement à remercier mon ami **Alain BEAUTE**. Comment oublier toutes ces plongées partagées (mon N3, toutes ces photos sous marine, ma 100<sup>ème</sup> plongée fêtée dignement sous l'eau, ...), tous ces fous rires, les journées ski, nos repas du midi, nos entraînements piscine (oui je sais je parle plus que je nage !!!), ...C'est certain, je ne t'oublierai pas de si tôt et je te dis à bientôt*

*Enfin, je tiens à remercier ma « Tat's », **Laurence**, qui a relu nombreux de mes rapports scientifique dont cette thèse. Ton point de vue m'a été très utile à de nombreuses reprises. C'est en suivant tes pas que j'ai atteint le diplôme de doctorat.*

*Merci également à **Patrick** et à **Marie Lyne** qui ont relu une bonne partie de ce manuscrit afin d'enlever la majeure partie des fautes d'orthographe.*

*Et comment finir ces remerciements sans citer **mes parents et ma famille** qui m'ont supporté au long de toutes ces années.*



# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
1.1. CONTEXTE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE .....	5
1.1.1. <i>Les rejets liquides des Centres Nucléaires de Production d'Électricité : Rejets chimiques et radioactifs, contamination de l'environnement et identification des substances d'intérêt.</i> .....	5
1.1.1.1. Les rejets par type de réacteur.....	8
1.1.1.2. Niveaux environnementaux.....	12
1.1.1.3. Indice de risque des substances rejetées.....	14
1.1.2. <i>Interactions entre substances en mélange : Méthodes et interactions connues</i> .....	16
1.1.2.1. Définition des termes employés .....	16
1.1.2.2. Modèles de mélange.....	18
1.1.2.3. Interactions connues entre substances.....	20
1.1.3. <i>Objectifs généraux</i> .....	23
1.2. EFFETS ATTENDUS ET CONNUS DU CUIVRE ET DU TRITIUM SUR L'ALGUE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII 26	
1.2.1. <i>Exposition et effet du cuivre</i> .....	27
1.2.1.1. Internalisation du cuivre chez Chlamydomonas reinhardtii .....	27
1.2.1.2. Stress oxydatif.....	31
1.2.1.3. Activité des photosystèmes .....	34
1.2.1.4. Inhibition de la croissance et volume cellulaire .....	36
1.2.2. <i>Exposition et effet du tritium</i> .....	37
1.2.2.1. Métabolisation, internalisation et dose déposée .....	38
1.2.2.2. Stress oxydatif.....	40
1.2.2.3. Autres effets du tritium et des radiations.....	42
1.3. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES .....	44
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>46</b>
2.1. MODÈLE BIOLOGIQUE, CONDITIONS DE CULTURE, ET MATÉRIELS UTILISÉS .....	47
2.1.1. <i>Culture de Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	47
2.1.1.1. Culture mère.....	47
2.1.1.2. Culture pour les mesures expérimentales .....	47
2.1.2. <i>Milieux utilisés</i> .....	48
2.1.2.1. HSM.....	48
2.1.2.2. HSM <sub>mod</sub> .....	49
2.1.3. <i>Réipients utilisés</i> .....	51
2.2. CARACTÉRISATION DES EXPOSITIONS DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (HTO, CUIVRE ET RADIATIONS $\gamma$ ) 52	
2.2.1. <i>Dosage de l'HTO et du cuivre dans les différentes matrices</i> .....	52
2.2.1.1. Préparations des échantillons et dosage du tritium en scintillation liquide.....	52
2.2.1.2. Dosage du cuivre par absorption atomique .....	55
2.2.2. <i>Calcul de dose</i> .....	57

2.2.2.1.	Débit de dose lors d'exposition à l'HTO : logiciel EDEN .....	58
2.2.2.2.	Débit de dose lors d'exposition au <sup>137</sup> Cs- <sup>137</sup> Ba : logiciel MCNP-4C (magelis, 2009).....	58
2.3.	PARAMETRES D'EFFET MESURES .....	61
2.3.1.	<i>Taux de croissance</i> .....	61
2.3.1.1.	En Erlenmeyers .....	61
2.3.1.2.	En microplaque .....	61
2.3.1.3.	Traitement des résultats.....	62
2.3.2.	<i>Activité du PSII</i> .....	62
2.3.3.	<i>Production d'ERO</i> .....	65
2.3.3.1.	Protocole .....	65
2.3.3.2.	Déacétylation de la sonde H <sub>2</sub> DCF-DA par le NaOH.....	65
2.4.	ANALYSES STATISTIQUES .....	67
2.4.1.	<i>Analyse d'une déviation entre effet mesuré et effet prédit par l'hypothèse d'additivité</i> .	67
2.4.2.	<i>Autres analyses statistiques</i> .....	67
<b>3.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>69</b>
3.1.	MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE SUR L'ALGUE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> PAR UTILISATION DE LA SONDE FLUORESCENTE H <sub>2</sub> DCF-DA .....	70
3.1.1.	<i>Optimisation du protocole de Knauert et Knauer (2008) pour la mesure de la cinétique de production d'ERO chez l'algue Chlamydomonas reinhardtii exposée au cuivre</i> .....	74
3.1.1.1.	Résultats obtenus suivant le protocole de Knauert et Knauer (2008).....	74
3.1.1.2.	Optimisation du protocole.....	77
3.1.1.3.	Conclusion : choix d'un protocole optimal pour la mesure d'ERO.....	82
3.1.2.	<i>Validation du protocole optimisé pour la mesure de la cinétique de production d'ERO lors d'une exposition à des rayonnements ionisants</i> .....	83
3.1.2.1.	Test de la dégradation de la sonde par des rayonnements ionisants .....	84
3.1.2.2.	Effet des rayonnements $\gamma$ sur la production d'ERO par Chlamydomonas reinhardtii .....	86
3.2.	CARACTERISATION DE L'EXPOSITION ET DES EFFETS DE L'EAU TRITIEE SUR L'ALGUE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> .....	90
3.2.1.	<i>Caractérisation de l'exposition externe et interne de l'algue Chlamydomonas reinhardtii à l'eau tritiée : conséquences sur le calcul de débits de dose d'exposition</i> .....	92
3.2.1.1.	Vérification des concentrations en HTO dans les milieux d'exposition de Chlamydomonas reinhardtii	93
3.2.1.2.	Estimation de la métabolisation de l'HTO sous forme de tritium organique chez Chlamydomonas reinhardtii	94
3.2.1.3.	Calcul de la dose d'exposition au tritium de Chlamydomonas reinhardtii .....	96
3.2.2.	<i>Effet de l'HTO sur Chlamydomonas reinhardtii : sensibilité des paramètres d'études</i> 100	
3.2.2.1.	Effet de l'HTO sur le taux de croissance et le diamètre cellulaire de Chlamydomonas reinhardtii 100	
3.2.2.2.	Effet de l'HTO sur l'activité des photosystèmes.....	104
3.2.2.3.	Production d'ERO .....	105
3.2.3.	<i>Discussion : Effet de l'HTO chez Chlamydomonas reinhardtii : sensibilité des paramètres de mesure et comparaison à l'effet d'un rayonnement <math>\gamma</math></i> .....	107

3.3. IDENTIFICATION DES INTERACTIONS POTENTIELLES DU MELANGE BINAIRE HTO/Cu (EXPOSITION ET EFFETS)	111
3.3.1. <i>Internalisation du cuivre en présence d'HTO : effet comparé à une exposition simple au cuivre</i>	112
3.3.1.1. Détermination des flux d'internalisation du cuivre	113
3.3.1.2. Détermination des concentrations internalisées en cuivre après 96h d'exposition	115
3.3.1.3. Discussion : effet de l'HTO sur le flux d'internalisation du cuivre	115
3.3.2. <i>Effet du tritium en mélange avec du cuivre</i>	118
3.3.2.1. Effet du mélange HTO/Cu sur le taux de croissance et le diamètre cellulaire	118
3.3.2.2. Effet du mélange HTO/Cu sur la production d'ERO	120
<b>4. DISCUSSION GENERALE</b>	<b>128</b>
4.1. ANALYSE CRITIQUE DES OUTILS ET DES APPROCHES UTILISEES	131
4.1.1. <i>Dispositif d'irradiation <math>\gamma</math> continue en microplaque (potentiels et limitations)</i>	131
4.1.2. <i>Mesure des ERO par utilisation de H<sub>2</sub>DCF-DA (avantages et limitations)</i>	132
4.2. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LES EFFETS DE L'HTO	134
4.2.1. <i>Exposition à l'HTO (difficultés expérimentales et caractérisation du débit de dose)</i>	134
4.2.2. <i>Production d'ERO</i>	135
4.2.3. <i>Efficacité biologique de l'HTO</i>	135
4.3. ANALYSE DES EFFETS DES SUBSTANCES EN MELANGE	137
4.3.1. <i>Modèle d'analyse d'une déviation depuis l'hypothèse d'additivité</i>	137
4.3.2. <i>Effet de l'HTO en mélange avec du cuivre</i>	137
4.3.3. <i>Implication en radioécologie</i>	138
4.4. IMPLICATION EN TERME D'EVALUATION DES RISQUES ECOLOGIQUES	140
4.4.1. <i>Niveaux d'effets observés au regard de l'exposition des écosystèmes aquatiques à l'HTO</i>	140
4.4.2. <i>Niveau de sensibilité des producteurs primaires à l'HTO en comparaison des autres organismes aquatiques et implications en termes d'évaluation du risque pour le cuivre</i>	141
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>145</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>158</b>
ANNEXE 1 : TEST TEMPS ET CONCENTRATION DES RINÇAGES A L'EDTA	159
ANNEXE 2 : EFFET DES RADIATIONS $\gamma$ SUR LA CROISSANCE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	162
ANNEXE 3 : TOXICITE DU CUIVRE SUR LA CROISSANCE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> APRES 96H D'EXPOSITION EN MICROPLAQUE	165
ANNEXE 4 : ÉVOLUTION DE LA FRACTION EN CUIVRE ADSORBEE ET INTERNALISEE DANS LE TEMPS ...	166
ANNEXE 5 : LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION ET D'EMISSION DE LA DCF	168
ANNEXE 6 : EVOLUTION DE LA FLUORESCENCE DE LA DCF LORS D'UNE PRE-EXPOSITION DES CELLULES AU CUIVRE PUIS EXPOSITION A L'HTO	170
ANNEXE 7 : EVOLUTION DE LA FLUORESCENCE DE LA DCF LORS D'UNE EXPOSITION SIMULTANEE DES CELLULES AU CUIVRE ET A L'HTO	173

## *Liste des figures*

<i>Figure 1: Schéma de fonctionnement d'un CNPE de type REP (source : <a href="http://www.cea.fr">www.cea.fr</a>)</i>	7
<i>Figure 2 : ΔPAF calculé à partir des substances radioactives rejetées sur une période d'une année par les CNPE rejetant dans le Rhône (Garnier-Laplace et al., 2009)</i>	15
<i>Figure 3 : ΔPAF calculé à partir des substances stables rejetées sur une période d'une année par les CNPE rejetant dans le Rhône (Garnier-Laplace et al., 2009)</i>	15
<i>Figure 4 : Effet d'interaction mesuré en fonction du nombre de composés dans le mélange (d'après Warne et Hawker, 1995)</i>	22
<i>Figure 5: Photo (a) et schéma représentatif de la structure et des organites (b) de Chlamydomonas reinhardtii (source : <a href="http://www.biology-blog.com/images/blogs/10-2007/Chlamydomonas-2941.jpg">http://www.biology-blog.com/images/blogs/10-2007/Chlamydomonas-2941.jpg</a>) et <a href="http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/images/chlamydomonas.gif">http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/images/chlamydomonas.gif</a>)</i>	26
<i>Figure 6 : Courbe de croissance cellulaire représentant la densité cellulaire de Chlamydomonas reinhardtii en fonction du temps.</i>	27
<i>Figure 7 : Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution (Twiss et al., 2001)</i>	28
<i>Figure 8 : Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (Campbell et al., 2002)</i>	29
<i>Figure 9 : Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques – mécanismes généraux (Campbell et Couillard, 2003)</i>	30
<i>Figure 10 : Mécanismes de réponse des systèmes antioxydants dans une cellule végétale (adapté pour une cellule végétale d'après Cossu et al., 1997)</i>	32
<i>Figure 11 : Organisation du système photosynthétique dans la membrane d'un thylakoïde (d'après Campbell et Reece, 2002)</i>	35
<i>Figure 12 : Excitation et désexcitation d'une molécule de chlorophylle isolée (d'après Campbell et Reece, 2002)</i>	35
<i>Figure 13: Internalisation et métabolisation théorique d'HTO dans une cellule végétale d'après (1) Spencer et al., 1988 ; Amano et al., 1995 ; McCubbin et al., 2001 (2) Inomata et Higuchi, 1982 ; Baumgartner et Kim, 2000 ; Baumgärtner et Donhaerl, 2004 (3) Bonotto et al., 1984 ; Belot, 1986 ; Diabaté et Strack, 1997.</i>	39
<i>Figure 14 : Mécanismes potentiels d'induction du stress oxydant par les radionucléides (d'après Bensasson et al., 1993 ; Strid et al., 1994 ; Wada et al., 1998)</i>	41
<i>Figure 15 : Action des rayonnements sur un organisme végétal et mécanismes de détoxification des ERO générés, d'après Wada et al., 1998. (Par soucis de clarté, la réaction de Fenton n'est pas représentée ici mais aura lieu comme présenté sur la Figure 10)</i>	41
<i>Figure 16 : Niveau d'effet mesuré dans cette étude</i>	45
<i>Figure 17: Cuivre libre (<math>Cu^{2+}</math>) dans les milieux HSM et HSM<sub>mod</sub> calculé avec le logiciel JChess en fonction de la concentration en cuivre total (<math>Cu_{tot}</math>).</i>	50
<i>Figure 18: Action des rayonnements sur le liquide scintillant et dosage de l'HTO en scintillation liquide</i>	53
<i>Figure 19: Protocole d'exposition et de dosage du tritium organique dans les cellules algales</i>	54
<i>Figure 20: Poids sec des cellules en fonction de leur volume (gamme étalon)</i>	55
<i>Figure 21: Protocole d'exposition et de dosage du cuivre adsorbé et du cuivre internalisé</i>	57
<i>Figure 22: Localisation de la source d'irradiation et des unités expérimentales sur une microplaque</i>	59

Figure 23 : Représentation des puits d'une microplaque avec le logiciel MCNP-4C	59
Figure 24 : Courbe de croissance et paramètres de croissance calculé à partir du modèle logistique à 3 paramètres.	62
Figure 25: Paramètre obtenu suite à une induction de pulse lumineux en utilisant un PAM	63
Figure 26 : Schéma du mécanisme de transformation de la sonde 2'-7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate ( $H_2DCF-DA$ ) en DCF fluorescente au sein de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	71
Figure 27 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm) au cours du temps chez des algues contrôle (Cu 0) ou exposées à 250 (Cu 250) et 500 (Cu 500) nmol L <sup>-1</sup> de cuivre total ou à 5 mol L <sup>-1</sup> d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Contrôle positif; moyenne, SEM<10% non représenté, n=4). Les témoins 250 et 500 sont des conditions similaires à Cu 250 et Cu 500 mais ne contiennent pas d'algue. Les lettres représentées des différences significatives entre conditions (ANOVA 1 facteur).	76
Figure 28 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm) en fonction de la concentration en cuivre dosée (15 min, n=8, moyenne +/- IC95; ANOVA 1 facteur, p<0,05)	78
Figure 29 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm) chez des algues exposées à une concentration en cuivre nominale de 500 nmol L <sup>-1</sup> comparé à une condition non exposée au cuivre (60 min après resuspension dans du HSM <sub>mod</sub> ) après 2 h de pré-incubation avec 20 ou 40 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> DCF-DA (moyenne +/- IC95%, ANOVA 1 facteur, n=6 (20 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ) et 8 (40 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ), p<0,05. « a » représente la différence significative entre les conditions de pré-incubation et * représente les différences significatives entre condition exposée et non exposée au cuivre.)	80
Figure 30 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm; mesure toutes les 2 min) au cours du temps chez des algues exposées à 28 (contrôle), 714 et 5 154 nmol L <sup>-1</sup> de cuivre total (moyenne, SEM<10% non représenté, n=8 (contrôle) et 12).	81
Figure 31 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm) après oxydation par les rayonnements $\gamma$ (3 278 $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> ) de la molécule H <sub>2</sub> DCF en absence d'algue en fonction du temps (n=3, * = différence significative par rapport à t=0, p<0,05 anova 1 facteur, SEM < 10%).	84
Figure 32 : Fluorescence de la DCF après oxydation par les rayonnements $\beta$ de H <sub>2</sub> DCF (sans algue) à 100 min d'exposition (ANOVA 1 facteur, p<0,05, moyenne +/- IC95, n=4, * = différence significative par rapport à la fluorescence mesurée en absence d'exposition à l'HTO).	85
Figure 33 : Production d'ERO (UA fluorescence $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530$ nm) après expositions à 0 (contrôle); 0,33; 3,3; 33 et 3 278 $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> de rayonnements $\gamma$ . Les lettres indiquent les différences statistiques entre conditions (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple avec correction de Tukey, p<0,05, n=8; SEM < 30 %).	87
Figure 34 : Tritium organique dans les cellules algales en fonction de la concentration en HTO d'exposition (48 et 72h) des cellules suivant deux protocoles différents de séchage des algues (activités dosées : <LD; 0,82; 8,1; 91; et 879 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 48h et passées au bain de sable; <LD; 0,94; 8,6; 88 et 894 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 72h et passées au bain de sable; <LD, 0,77; 7,5; 72 et 767 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 72h et lyophilisées; exposition en Erlenmeyers de 50 mL, n=3).	96
Figure 35 : Effet de l'HTO sur le diamètre des cellules (moyenne +/- IC95, bootstrap) lors d'exposition à 85,1 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO comparée à des algues contrôle non exposées (<0,06 kBq mL <sup>-1</sup> ). Les lettres représentent les différences significatives par rapport au diamètre mesuré à t=0 (ANOVA 2 facteurs, p<0,05, n=3).	101

Figure 36 : Densité cellulaire en fonction du temps lors d'une exposition à différentes activités d'HTO (12 – contrôle - 758, 4 243, et 52 195 kBq mL <sup>-1</sup> – n=6). Les courbes représentent le modèle logistique à 3 paramètres.	103
Figure 37 : Activité des photosystèmes (Fv/Fm et Φs) lors d'expositions à 14 400 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO comparé à des algues non exposées (moyenne +/- IC95, n=3 ; bootstrap, ANOVA 2 facteur, p<0,05).	105
Figure 38 : Production d'ERO (λ <sub>ex</sub> 505 / λ <sub>em</sub> 530 nm) lors de l'exposition des cellules à différentes concentration en HTO (16 -contrôle-, 40, 158 et 2 849 kBq mL <sup>-1</sup> ) en fonction du temps (ANOVA 1 facteur à 15 et 100 min, p<0,05, n=8 -contrôle- et 16 pour les trois conditions exposées). Les lettres représentent des différences significatives entre conditions.	106
Figure 39: Flux d'internalisation du cuivre dans les cellules après 40 min d'exposition à des concentrations en cuivre libre allant de 14 à 346 nmol L <sup>-1</sup> en présence ou non d'HTO (1 132 ± 25 kBq mL <sup>-1</sup> ; moyenne, n=3 ou 4). Les lignes représentent le modèle de Michaelis-Menten.	114
Figure 40: Cuivre internalisée après 96h d'exposition au Cu et à l'HTO (85,1 +/- 2,3 kBq mL <sup>-1</sup> ) ou au Cu seul en Erlenmeyer (moyenne +/- SEM; n=2 ou 3) (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple de Tukey, p<0,05). Les lettres représentent des différences significatives entre conditions.	115
Figure 41: Densité cellulaire en fonction du temps pour une exposition des cellules au cuivre (1,15 μmol L <sup>-1</sup> ) ou au tritium (85,1 kBq mL <sup>-1</sup> ) seuls, au mélange HTO/Cu, et dans un contrôle non contaminé. Le modèle logistique à 3 paramètres a été ajusté aux données (n=3).	119
Figure 42: Production d'ERO en fonction du temps, mesurée par la fluorescence de la DCF (λ <sub>ex</sub> 505 / λ <sub>em</sub> 530 nm) après pré-exposition au cuivre (714 nmol L <sup>-1</sup> – 0 à 1h40) puis exposition à l'HTO (158 et 2 849 kBq mL <sup>-1</sup> – 1h50 à 3h30) de cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (moyenne, n=4).	122
Figure 43 : Production d'ERO en fonction du temps, mesurée par la fluorescence de la DCF (λ <sub>ex</sub> 505 / λ <sub>em</sub> 530 nm) après exposition simultanée au cuivre (28 ou 5 154 nmol L <sup>-1</sup> ) et à l'HTO (158 kBq mL <sup>-1</sup> , moyenne, n=4)	124
Figure 44 : Utilisation du pool de GSH par les diverses activités antioxydantes cellulaires (d'après Ahner et al., 2002)	127
Figure 45 : Action simultanée supposée de substances en mélange avec des radionucléides au niveau de la production d'ERO (d'après Salbu, 2009)	138
Figure 46 : Évolution de la concentration en cuivre internalisée en fonction du volume de rinçage à l'ETDA (moyenne +/- SEM; n=3 ou 4) après 1h d'exposition des cellules à [1 – 1.1] μmol L <sup>-1</sup> (Cu <sub>tot</sub> ).	160
Figure 47 : Modélisation de la densité cellulaire estimée par mesure de la fluorescence de la chlorophylle lors d'exposition des cellules dans l'incubateur délivrant 1 000 μGy h <sup>-1</sup> (château de plomb fermé = bruit de fond ; château de plomb ouvert = 1 000 μGy h <sup>-1</sup> ). Ajustement du modèle logistique à 3 paramètres aux données (moyenne +/- SEM ; n=54).	164
Figure 48 : Toxicité du cuivre envers <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mesurée sur la croissance cellulaire lors d'exposition en Erlenmeyers. Calcul des CE50 et CE95 réalisé à l'aide du logiciel regtox (CE50 = [728 – 858] nmol L <sup>-1</sup> et CE95 = [1 925 – 2 781] nmol L <sup>-1</sup> ).	165
Figure 49: Cuivre intracellulaire et adsorbé (nmol μm <sup>-2</sup> ) mesuré en fonction du temps après exposition à 481 nmol L <sup>-1</sup> de Cu <sub>tot</sub> . (Cu <sup>2+</sup> = 66 nmol L <sup>-1</sup> ). Modèle linéaire ajusté aux données intracellulaire et modèle logistique à 3 paramètres ajusté aux données cuivre adsorbée (moyenne +/- SEM; n=3 ou 4).	167
Figure 50 : Spectre d'excitation et d'émission de la DCF réalisé au spectrofluorimètre	168

Figure 51 : Linéarité de la fluorescence de la DCF en fonction des concentrations de DCF dans du milieu HSMmod ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ , sans algue).	169
Figure 52 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $28 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (moyenne, $n=4$ ).	170
Figure 53 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $146 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (moyenne, $n=4$ ).	171
Figure 54 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $714 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (moyenne, $n=4$ ).	171
Figure 55 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $5\,154 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (moyenne, $n=4$ ).	172
Figure 56 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $28 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO ( $16, 158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne, $n=4$ ).	173
Figure 57 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $146 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO ( $16, 158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne, $n=4$ ).	173
Figure 58 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $714 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO ( $16, 158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne, $n=4$ ).	174
Figure 59 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $5\,154 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO ( $16, 158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne, $n=4$ ).	174

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Répartition des réacteurs dans le monde par type et puissance associée ( <a href="http://www.iaea.org">www.iaea.org</a> )	6
Tableau 2 : Rejets liquides radioactifs pour l'ensemble des CNPE français en 2005 (EDF, 2005)	9
Tableau 3 : Éléments stables rejetés par les REPs français en fonctionnement normal dans les effluents liquides (EDF, 2005)	10
Tableau 4 : Activité sous forme liquide rejetée par différents réacteurs de type REB dans l'Atlantique nord en 2004 (OSPAR, 2006).	11
Tableau 5 : Rejets liquides radioactifs réels pour le CNPE de Gentilly en 2003 (Commission Canadienne Sûreté Nucléaire, 2003)	12
Tableau 6 : Définitions des actions combinées connues entre composants d'un mélange (US EPA, 2000)	17
Tableau 7 : Classification du genre <i>Chlamydomonas</i> dans le règne végétal	25
Tableau 8 : Nom et symbole des différentes ERO (Halliwell et Gutteridge, 2007)	31
Tableau 9 : Composition des solutions concentrées constituant le milieu de culture HSM	48
Tableau 10 : Composition des milieux de culture HSM et HSM <sub>mod</sub> en mol L <sup>-1</sup>	49
Tableau 11 : Définition et correspondance des paramètres mesurés par le PAM (Kooten et Snel, 1990 ; Buschmann, 1995 ; Roháček, 2002 ; Juneau et al., 2005)	64
Tableau 12 : Synthèse des conditions de dosage des ERO par utilisation de H <sub>2</sub> DCF-DA recensées dans la littérature	73
Tableau 13 : Concentration d'exposition au cuivre (libre et total) utilisées par Knauert et Knauer (2008) sur les algues <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> et <i>Chlorella vulgaris</i> comparées aux concentrations nominales utilisées dans cette étude sur notre modèle biologique	74
Tableau 14 : Viabilité des cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> après 1 à 4h d'exposition à 500 nmol L <sup>-1</sup> de cuivre (concentration totale nominale ; dénombrement par comptage avec une cellule de Malassez et coloration au bleu Trypan)	79
Tableau 15 : Production d'ERO ( $\lambda_{ex}$ 505 / $\lambda_{em}$ 530 nm ; IC95) après 16 et 44 min d'expositions à 0 (contrôle) ; 0,33 ; 3,3 ; 33 et 3 278 $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> de radiation $\gamma$ . Les lettres indiquent les différences statistiques entre conditions au même temps (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple avec correction de Tukey, $p < 0,05$ ).	88
Tableau 16 : Concentration initiale et finale (96h) d'HTO mesurées en microplaque lors de la détermination de la croissance sur 96 heures (n=3 réplicats, moyenne +/- SEM)	94
Tableau 17 : Concentration initiale et finale (4h) d'HTO mesurées en microplaque lors de la détermination de la production d'ERO sur 4 heures	94
Tableau 18 : Conditions d'exposition à l'HTO en fonction des temps et des dispositifs d'expérimentation en kBq mL <sup>-1</sup> et correspondance en $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> (calculé avec le logiciel EDEN)	99
Tableau 19 : Paramètre du modèle logistique obtenus pour la croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> durant 96 h d'exposition à 12 (contrôle), 758, 4 243 et 52 195 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO ([IC95], comparaison multiple et correction de Holm). Alpha $\leq 0,05$ (*) et $\leq 0,001$ (***)	103
Tableau 20 : Paramètres d'internalisation (Michaelis-Menten) du cuivre chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> après exposition au cuivre seul ou en mélange avec 1 132 kBq mL <sup>-1</sup> d'HTO et comparaison aux valeurs obtenues par Hill et al. (1996) ([IC95] bootstrap). * = valeur significativement différente par rapport à une exposition simple au cuivre, bootstrap)	114



Tableau 21: Paramètres de croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> obtenus suite à 4 jours d'exposition au cuivre ( $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou au tritium ( $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) seuls, au mélange HTO/Cu, et pour un contrôle non contaminé. ([IC95], comparaison multiple et correction de Holm). * : différence significative par rapport au contrôle avec $\alpha \leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***). _____	120
Tableau 22 : Production d'ERO mesurée après pré-exposition au cuivre puis exposition à l'HTO en mélange avec du Cu, et valeur correspondante du coefficient d'interaction pour chaque ratio HTO/Cu. Les valeurs indiquées correspondent à l'IC95; (***) indique les différences statistiques par rapport à la condition contrôle/contrôle ; $p < 0,001$ (Test non paramétrique de Wilcoxon) _____	123
Tableau 23 : Production d'ERO obtenue après 1h40 min d'exposition au cuivre et à l'HTO en mélange, et valeur correspondante du coefficient d'interaction Kw . Les valeurs indiquées correspondent à IC95; (*) indique les différences statistiques par rapport au contrôle ( $\alpha \leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (**), comparaison multiple et correction de Holm). _____	125
Tableau 24: Température et luminosité mesurées dans l'incubateur en début d'exposition pour les deux expériences réalisées (château de plomb ouvert et fermé) _____	163
Tableau 25: Paramètres de croissance estimés d'après le modèle logistique à 3 paramètres lors d'exposition des cellules dans l'incubateur délivrant $1\,000 \mu\text{Gy h}^{-1}$ (château de plomb fermé = bruit de fond ; château de plomb ouvert = $1\,000 \mu\text{Gy h}^{-1}$ ). _____	164

## **Liste des équations**

Équation 1 : Équation du modèle d'additivité des concentrations _____	18
Équation 2 : Équation définissant le modèle de mélange nommé action indépendante _____	19
Équation 3 : Formule de calcul du coefficient d'interaction Kw _____	20
Équation 4 : Formation de radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss _____	33
Équation 5: Modèle mathématique de Michaelis-Menten _____	57
Équation 6: Modèle logistique à 3 paramètres avec $d$ la densité cellulaire maximale atteinte au pallier (cellules $\text{mL}^{-1}$ ), $\mu$ le taux de croissance intégré sur la pente maximale (division par jour) et $e$ le temps nécessaire pour obtenir 50% de la densité cellulaire maximale ( $\text{jours}^{-1}$ ). _____	62
Équation 7 : Détermination de l'erreur-type de la moyenne (SEM) à partir du nombre de réplicats ( $n$ ) et de l'écart type des données ( $s$ ). _____	67

## *Abréviations*

- AAP (American Algal Protocol) = solution de métaux traces concentrés
- AMM = Activité Maximale Manipulable
- ASN = Autorité de Sûreté Nucléaire
- Bq = becquerel
- CA = modèle d'addition des concentrations
- CANDU = CANadian Deuterium Uranium
- CAT = enzyme catalase
- CM H<sub>2</sub>DCF-DA = chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
- CNPE = Centre Nucléaire de Production d'Électricité
- Cu<sub>tot</sub> = cuivre total
- DCC = coefficient de conversion des concentrations en dose
- DCF = dichlorofluorescein
- DDD = débit de dose
- DMSO = diméthylsulfoxyde
- CE50 = concentration effective induisant une réduction de 50% d'un paramètre mesuré
- EDTA = acide éthylène diamine tetra acétique (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)
- ERO = espèces réactives de l'oxygène
- GCR (Gaz Cooled Reactor) = réacteur refroidit au gaz
- GPXs = glutathion peroxydase
- GR = glutathion réductase
- GSH = glutathion peroxydase
- GSH = glutathion réduit
- GSSG = glutathion oxydé
- H<sub>2</sub>DCF = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein
- H<sub>2</sub>DCF-DA = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
- HSM = High Salt Medium.
- HTO = eau tritiée
- IA = modèle d'action indépendante
- LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) = plus faible concentration induisant un effet mesurable
- LOEDR (Lowest Observed Effect Dose Rate) = débit de dose le plus faible induisant un effet
- LWGRG (light water cooled graphite moderated reactor) = réacteur de grande puissance à tube de force
- N = Neutron
- NOEC (No Observed Effect Concentration) = plus faible concentration testée sans effet
- NQE = Norme de Qualité Environnementale, définie par la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement
- OBT (Organic Bound Tritium) = tritium lié à la matière organique de manière non échangeable

OECD = Organisation for Economic Cooperation and Development

P = proton

PAM = fluorimètre à amplitude pulsée modifiée

PHWR (Pressurized Heavy Water Reactor) = Réacteur à eau lourde

PNEC (Predicted No Effect Concentration) = concentration prédite sans effet

REB = Réacteur à eau bouillante

REP = Réacteur à eau pressurisée

RNR = réacteur à neutrons rapides

SEM (Standard Error of the Mean) = erreur type de la moyenne

SOD = super oxyde réductase

TFWT (Tissue Free Water Tritium) = eau libre tritiée des cellules

UA = unité arbitraire

$\Delta$ PAF = fraction d'espèces potentiellement affectées





# **INTRODUCTION**



Les industries rejettent dans les écosystèmes différents types de polluants (métalliques, organiques, ...). Dans une première étape d'évaluation des risques de ces rejets, les méthodes d'évaluations actuelles évaluent séparément le risque de chaque substance par rapport à un niveau de référence (NOEC, PNEC, NQE...). Ces valeurs étant protectrices (car estimées avec un facteur de sécurité), on considère que si le niveau de référence n'est pas dépassé pour chacune des substances, alors le risque est acceptable. Or, des études ont montré que des interactions entre substances peuvent conduire à une surestimation ou à une sous estimation des effets en mélange (Vasconcelos et Leal, 2001 ; Franklin *et al.*, 2002 ; Charles *et al.*, 2006). L'approche d'évaluation des risques ne prend pas en compte ces interactions, notamment celles synergiques. De ce fait l'évaluation des risques pourrait ne pas garantir la protection des écosystèmes, même dans le cas où aucune des substances ne dépasse le niveau de référence.

En parallèle des substances stables, les écosystèmes sont exposés à des rayonnements ionisants. Ces rayonnements ont plusieurs origines, naturelles ou anthropiques. Parmi les sources d'exposition anthropique figurent les retombées liées aux essais nucléaires, les rejets liés à l'utilisation de radionucléides en médecine et dans l'industrie ainsi que des expositions résultant des rejets de Centres Nucléaires de Production d'Électricité (CNPE). Concernant ces derniers rejets, ceux-ci sont majoritairement dus au fonctionnement normal des CNPE.

De façon spécifique, les rejets de CNPE en fonctionnement normal sont effectués sous deux formes : liquides et gazeuses. Les rejets liquides vont augmenter de façon significative les niveaux de concentrations de certains radionucléides dans le milieu aquatique. Ces rejets sont constitués d'un mélange de substances stables et radioactives (EDF, 2005). Parmi ces substances, le tritium (élément radioactif) et le cuivre (élément stable) sont parmi celles qui constituent la principale source d'exposition des écosystèmes en termes de rejets et de toxicité potentielle associée (Garnier-Laplace *et al.*, 2009). Le cuivre est un élément dont la toxicité est bien documentée seule et en mélange (Rai *et al.*, 1995 ; Rai *et al.*, 1998 ; Charles *et al.*, 2006 ; Bhargava *et al.*, 2008). En ce qui concerne le tritium, la toxicité de cet élément est peu documentée. De plus, la toxicité de cet isotope lourd de l'hydrogène n'a jamais été envisagée en mélange à notre connaissance. En effet, seules quelques études ont été réalisées à ce jour afin de mesurer la présence d'interactions entre substances stables et radioactives. Bien que ces aspects de mélange soient documentés dans des études concernant les effets sur l'homme (UNSCEAR, 2000), le parallèle avec les effets des radionucléides en mélange sur les écosystèmes aquatiques est assez récent. Pourtant, cette prise en compte des effets de mélange



dans le cas des radionucléides a été identifiée comme un des enjeux de recherche actuel en radioécologie (Salbu, 2009).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel d'interaction d'un mélange binaire composé de substances stables et radioactives rejetées par les CNPE en fonctionnement normal : le mélange tritium (sous forme d'eau tritiée, HTO) et cuivre. Ce travail se présente en quatre chapitres.

Dans le premier chapitre, les informations disponibles sur la composition des rejets de CNPE en France et dans le monde ont été analysées de manière à justifier le choix des contaminants étudiés (HTO/Cu) parmi ceux rejetés en quantités significatives. Par ailleurs, pour mettre en évidence une interaction, des modèles ont été développés en écotoxicologie. Ces modèles sont présentés ainsi que leur contexte d'application. A partir de ces éléments de contexte, des objectifs généraux sont dégagés. Au vu de ce contexte général, les effets du mélange HTO/Cu seront recherchés envers un organisme aquatique, l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. La présentation de ce modèle ainsi que les modes d'actions connues des deux substances séparément (cuivre et tritium) sont de ce fait exposés afin d'arriver aux objectifs spécifiques.

Le deuxième chapitre présente l'ensemble des protocoles utilisés à savoir les conditions de culture, la caractérisation des expositions réalisées (dosage et internalisation des substances, débit de dose d'exposition) ainsi que les différents paramètres d'effet mesurés (croissance, activité photosynthétique et production d'Espèces Réactives de l'Oxygène ; ERO). Dans ce chapitre figure également l'ensemble des analyses statistiques réalisées afin de mettre en évidence les effets ou les interactions éventuelles.

La présentation des résultats est réalisée dans le troisième chapitre. Ce chapitre est divisé en trois parties afin de présenter au mieux les résultats suivant les objectifs spécifiques de ce travail. La première partie regroupe les résultats concernant la mise au point d'une méthode de dosage des ERO lors d'expositions constantes au cuivre, à l'HTO et aux radiations  $\gamma$ . Dans la seconde partie, les résultats relatifs aux effets de l'eau tritiée sur les différents paramètres d'effet chez *Chlamydomonas reinhardtii* sont présentés et discutés. Enfin, la troisième partie regroupe les résultats concernant les effets du mélange HTO/Cu envers notre modèle biologique.

Pour finir, un quatrième chapitre permettra de discuter de façon générale de la question scientifique posée et sera l'occasion de présenter les avancées réalisées avant de mettre en évidence les perspectives ouvertes par ce travail.

**1. SYNTHÈSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



## 1.1. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

---

### 1.1.1. Les rejets liquides des Centres Nucléaires de Production d'Électricité : Rejets chimiques et radioactifs, contamination de l'environnement et identification des substances d'intérêt.

Aujourd'hui, 14% de l'énergie électrique mondiale provient de l'énergie nucléaire (IAEA, 2008). Cette production est à l'origine de rejets aussi bien sous forme gazeuse que liquide. En ce qui concerne les rejets gazeux, ceux-ci vont se disperser rapidement après émission dans l'atmosphère avant de retomber sur les écosystèmes terrestres et aquatiques par dépôts secs et dépôts humides. L'impact de ces rejets va donc être diffus et le plus souvent indétectable (Duffa *et al.*, 2004). En ce qui concerne les rejets sous forme liquide, ceux-ci vont principalement avoir lieu en rivière et en mer, et occasionneront une contamination ponctuelle importante des écosystèmes aquatiques. Les rejets liquides sont responsables d'un marquage de l'environnement aquatique mis en évidence par la détection de faibles activités de  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{110\text{m}}\text{Ag}$  et  $^{54}\text{Mn}$  (radionucléides négligeables ou absents à l'état naturel) ainsi que par des différences significatives du rapports d'activités  $^{137}\text{Cs}/^{134}\text{Cs}$  (par rapport aux bruits de fond résultant des rejets de Tchernobyl), tout ceci mesuré en aval des Centres Nucléaires de Production d'Électricité (CNPE) français (Duffa *et al.*, 2004).

A l'heure actuelle, dans le monde, plusieurs familles de réacteurs sont en opération. En décembre 2009, l'AIEA recensait dans le monde 437 CNPE opérationnels pour une puissance totale de 370 187 GW. Le Tableau 1 détaille le nombre de tranches (réacteurs et installations) en fonction du type de famille de réacteur. Dans cet inventaire mondial, les réacteurs à eau pressurisée (60,6%), les réacteurs à eau bouillante (21,1%) et les réacteurs à eau lourde pressurisée (10,3%) représentent 92 % de l'ensemble des tranches et 95 % de la puissance totale fournie.

Tableau 1 : Répartition des réacteurs dans le monde par type et puissance associée (www.iaea.org)

Types de réacteur	Nombre de tranche		Total MW
	(réacteurs et installations)	%	
Réacteurs à eau pressurisée (REP)	265	60,6	244 070
Réacteurs à eau bouillante (REB)	92	21,1	83 656
Réacteurs à eau lourde pressurisée (PHWR)	45	10,3	22 643
Réacteurs refroidit au gaz (GCR)	18	4,1	8 909
Réacteurs de grande puissance à tube de force (LWGR)	15	3,4	10 219
Réacteurs à neutrons rapides (RNR)	2	0,5	690
	total	437	370 187

Ces familles de réacteurs sont caractérisées par :

- la nature des matières fissiles utilisées qui servent de combustible au réacteur (oxyde d'uranium naturel ou enrichi, mélange d'oxydes d'uranium)

- la nature du caloporteur qui va transporter la chaleur fournie par la réaction de fission vers un système de production d'électricité (eau lourde, eau ordinaire, gaz, métaux liquides,...)

- la nature du modérateur qui va influencer la vitesse des neutrons dans le cœur du réacteur (eau ordinaire, eau lourde, graphite).

Pour les REP, la matière fissile est contenue dans le cœur du réacteur (Figure 1). Le caloporteur et le modérateur sont, dans le cas de réacteur à eau pressurisé comme ceux en fonctionnement en France, de l'eau sous pression. Cette eau est contenue dans deux circuits fermés distincts. Le premier circuit dit « primaire » passe dans le cœur du réacteur. Un second circuit (secondaire) est utilisé pour récupérer la chaleur du circuit primaire et la transporter sous forme de vapeur vers des turbines afin de produire de l'électricité. Ce circuit secondaire et donc indirectement l'ensemble du réacteur est refroidi par contact avec de l'eau de mer ou l'eau d'un fleuve (circuit et tour de refroidissement).

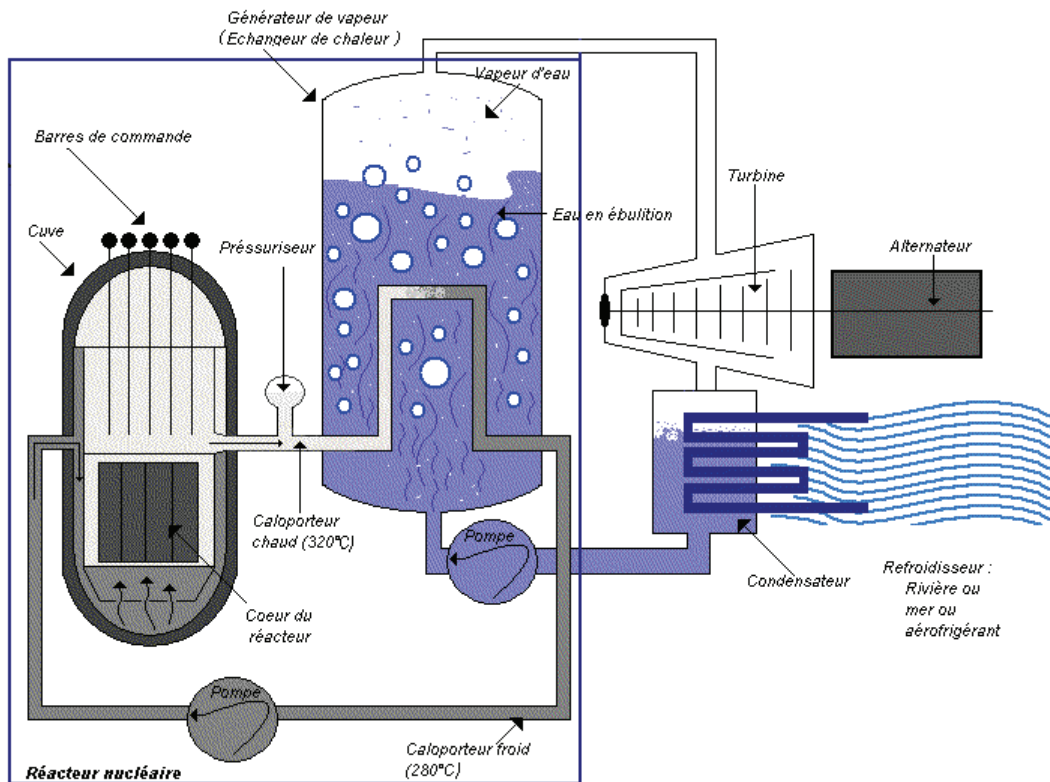


Figure 1: Schéma de fonctionnement d'un CNPE de type REP (source : [www.cea.fr](http://www.cea.fr))

C'est de ces circuits (primaire et secondaire) que proviennent les rejets liquides de CNPE. En effet, bien qu'étant fermés, ces circuits vont être renouvelés afin d'assurer le bon fonctionnement du réacteur. Avant le rejet de ces liquides dans le milieu naturel, ceux-ci sont stockés dans des réservoirs afin de permettre l'analyse des substances. Le rejet dans le milieu aquatique ne pourra avoir lieu que si les limites de rejets fixées par les autorisations préfectorales françaises ne sont pas dépassées. Ces cuves de stockage seront ensuite vidangées de façon ponctuelle. Au cours du fonctionnement normal des CNPE, aux contenus initiaux des circuits (caloporteur, modérateur, désinfectants, antibactériens, fongicides, ...) viennent s'ajouter des substances provenant de la dégradation des circuits (exemple : cuivre dans le cas de circuit de refroidissement en lait). De plus, les atomes contenus dans ces circuits vont être potentiellement activés via leur passage à proximité du cœur du réacteur (exemple : le tritium provient essentiellement des réactions d'activations sur le  $^{10}\text{B}$  et le  $^6\text{Li}$  présent dans l'eau du circuit primaire des REP ; Pierrard, 2008). De ce fait, le contenu des circuits est différent en fonction de la famille de réacteur et de la matière constitutive des circuits et est constitué de substances stables et de substances radioactives.

Afin d'avoir une vision globale des rejets de CNPE, les rejets liquides des trois familles de réacteurs les plus répandues à l'heure actuelle (REP, REB et PHWR) sont présentés.

Comme nous l'avons vu précédemment, les rejets liquides des CNPE sont composés de substances radioactives et de substances non radioactives. Ces deux types de substances sont répertoriés séparément afin de différencier quantités émises dans le cas des substances stables et activités rejetées dans le cas des substances radioactives.

#### *1.1.1.1. Les rejets par type de réacteur*

##### *Réacteur à eau pressurisée (REP)*

En France, les 58 tranches en opération sont des REPs. Ce sont les rejets de ces REPs français qui sont analysés dans la suite de ce paragraphe. Ce type de réacteur utilise comme combustible de l'oxyde d'uranium faiblement enrichi. Le caloporteur et le modérateur sont de l'eau sous pression contenus dans des circuits fermés. Le circuit dit « primaire » est additionné de bore.

Les rejets liquides réels de l'ensemble des REPs français en fonctionnement en 2005 (EDF, 2005) ont été additionnés de façon à obtenir les activités rejetées par élément (Tableau 2). Dans les rejets liquides des CNPE, les éléments radioactifs représentant la plus grande activité sont le  $^3\text{H}$  et le  $^{14}\text{C}$  (~99,9% de l'activité totale), tous deux émetteurs  $\beta$  pur (émission uniquement de radiations  $\beta$ ). Les autres radionucléides représentent une fraction infime de l'activité (<0,01%) (Tableau 2) et regroupent essentiellement des émetteurs  $\beta / \gamma$ . L'ensemble de ces éléments appartient à différentes familles du tableau périodique. On retrouve des non métaux ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ), un halogène ( $^{131}\text{I}$ ) mais surtout des métaux de transition ( $^{60}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{110\text{m}}\text{Ag}$ ,  $^{63}\text{Ni}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ), des métalloïdes ( $^{125}\text{Sb}$ ,  $^{124}\text{Sb}$ ,  $^{123\text{m}}\text{Te}$ ) et un métal alcalin ( $^{134}\text{Cs}$ ). Ces propriétés chimiques confèrent à ces éléments, excepté le  $^3\text{H}$  et le  $^{14}\text{C}$ , une double toxicité :

- toxicité liée aux rayonnements ionisants (radiotoxicité)
- toxicité liée à la nature chimique de l'élément (notamment toxicité des métaux et métalloïdes ; chimiotoxicité)

Tableau 2 : Rejets liquides radioactifs pour l'ensemble des CNPE français en 2005 (EDF, 2005)

Éléments	Activité des rejets effectués en 2005 en Bq par GW (activités réelles rejetées en GBq)		Classification périodique	Rayonnements
<sup>3</sup> H	1,5 x 10 <sup>10</sup>	(947 700)	Non métaux	β
<sup>14</sup> C	1,0 x 10 <sup>7</sup>	(639)	Non métaux	β
<sup>60</sup> Co	7,1 x 10 <sup>4</sup>	(4,5)	Métaux de transition	γ β
<sup>58</sup> Co	5,3 x 10 <sup>4</sup>	(3,3)	Métaux de transition	γ β
<sup>110m</sup> Ag	4,8 x 10 <sup>4</sup>	(3)	Métaux de transition	γ β
<sup>63</sup> Ni	4,2 x 10 <sup>4</sup>	(2,7)	Métaux de transition	β
<sup>125</sup> Sb	2,5 x 10 <sup>4</sup>	(1,6)	Métalloïde	γ β
<sup>124</sup> Sb	1,4 x 10 <sup>4</sup>	(0,91)	Métalloïde	γ β
<sup>137</sup> Cs	1,4 x 10 <sup>4</sup>	(0,86)	Métaux alcalins	γ β
<sup>123m</sup> Te	8,9 x 10 <sup>3</sup>	(0,56)	Métalloïde	γ
<sup>54</sup> Mn	8,3 x 10 <sup>3</sup>	(0,52)	Métaux de transition	γ
<sup>134</sup> Cs	7,9 x 10 <sup>3</sup>	(0,50)	Métaux alcalins	γ β
<sup>131</sup> I	5,9 x 10 <sup>3</sup>	(0,37)	Halogène	γ β
Autres	1,7 x 10 <sup>3</sup>	(0,11)		

Les rejets radioactifs des REPs sont également accompagnés de substances chimiques stables (EDF, 2005). Parmi ces substances stables rejetées figurent tout d'abord des substances dont la présence a une influence directe sur la croissance des organismes, notamment les végétaux (217 T de sulfates, 28 T de chlorure, 14 T de sodium, 4 T de nitrates, 4 T de bore, 1 T d'ammonium, 0,2 T de phosphates et 0,04 T de potassium ; masse rejetée sur l'ensemble de la France en 2005 rapportée à 1 GW ; EDF, 2005). Ces substances sont toxiques mais à des concentrations élevées. En ce qui concerne le Tableau 3, celui-ci reprend les substances toxiques rejetées pour l'ensemble des REPs français en fonctionnement normal en 2005 et ce, en masse réelle rejetée sous forme liquide (rapportée à 1 GW).



Tableau 3 : Éléments stables rejetés par les REPs français en fonctionnement normal dans les effluents liquides (EDF, 2005)

Éléments	Rejets français en T pour une puissance de 1 GW (poids réels rejetés en kg)	
Cuivre	1 262	(79 480)
Polyacrylates	1 238	(78 000)
Zinc	423	(26 620)
Fer	421	(26 507)
Morpholine	110	(6 911)
Hydrocarbures	66	(4 188)
Nitrites	64	(4 063)
Détergents	17	(1 101)
Hydrazine	5,3	(336)
Lithine	0,25	(15,5)

Le cuivre est un des éléments les plus rejetés par les REPs sous forme liquide (la toxicité de cette substance sera détaillée dans la suite de ce manuscrit ; paragraphe 1.2.1). En effet, les circuits de refroidissement de certains CNPE sont constitués de laiton (alliage de cuivre et de zinc). Le cuivre ayant des propriétés antibactériennes, cet alliage permet de réduire l'utilisation de produits bactéricides ce qui maintient la circulation de l'eau dans les circuits de refroidissement.

La morpholine (ou tetrahydro-4,4-oxazine) est la molécule organique que l'on rencontre en plus grande quantité dans les rejets liquides (NOEC sur *Scenedesmus subpicatus* = 229.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ; Charton et Mauraus, 2004). La morpholine est utilisée à l'heure actuelle dans les circuits secondaires de refroidissement des centrales afin de limiter la corrosion et maintenir le pH aux alentours de 9. On retrouve ensuite une autre molécule qui est utilisée en temps qu'antibactérien dans les circuits secondaires, l'hydrazine (72h-NOEC sur *Selenastrum capricornutum* = 0.002  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ; Harrah, 1978 ; néanmoins de premières expérimentations réalisées au cours de cette thèse n'ont pas permis de confirmer cette forte toxicité).

### Réacteur à eau bouillante (REB)

Ce type de réacteur a été construit et est en cours de fonctionnement dans des pays tel que les États-Unis, le Japon, l'Allemagne, la Suède,.... Contrairement au REP, dans ce type

de réacteur, le circuit primaire et le circuit secondaire ne sont pas différenciés. L'eau circule dans l'ensemble de ce circuit sous forme de vapeur allant du cœur du réacteur (uranium enrichi) jusqu'aux turbines de production d'électricité. L'eau de ce circuit unique est directement refroidie dans un cours d'eau ou un océan.

Les documents de la convention OSPAR (2006), présentant les rejets de substances radioactives dans l'Atlantique nord, ont permis de mettre en évidence que la majeure partie de l'activité de ces rejets est due au  $^3\text{H}$  (>70% par rapport aux autres émetteurs  $\beta$  ; Tableau 4). Notons cependant que dans l'activité totale, les émetteurs  $\gamma$  purs (tel que  $^{123\text{m}}\text{Te}$  et  $^{54}\text{Mn}$ ) ne sont pas pris en compte ce qui pourrait induire une surestimation de la proportion en tritium de ces rejets.

Tableau 4 : Activité sous forme liquide rejetée par différents réacteurs de type REB dans l'Atlantique nord en 2004 (OSPAR, 2006).

Réacteur	Pays	$^3\text{H}$ en Bq par GW (activités réelles rejetées en GBq)		Autre radionucléides émetteur $\beta$ ( $^{58}\text{Co}$ , $^{60}\text{Co}$ , $^{65}\text{Zn}$ , $^{90}\text{Sr}$ , $^{95}\text{Zr/Nb}$ , $^{110\text{m}}\text{Ag}$ , $^{125}\text{Sb}$ , $^{134}\text{Cs}$ , $^{137}\text{Cs}$ ) en Bq par GW (activités réelles rejetées en GBq)		% de $^3\text{H}$ par rapport aux autres émetteur $\beta$
Brunsbüttel	Allemagne	$6,3 \times 10^5$	(4,4)	$3,0 \times 10^2$	$(2,1 \times 10^{-3})$	100%
Kahl	Allemagne	$1,1 \times 10^1$	$(8 \times 10^{-5})$	4,3	$(3,0 \times 10^{-5})$	73%
Krümmel/Geesthacht	Allemagne	$8,0 \times 10^5$	(5,6)	$7,5 \times 10^{-1}$	$(5,3 \times 10^{-6})$	100%
Lingen	Allemagne	5,7	$(4,0 \times 10^{-5})$	$7,3 \times 10^{-1}$	$(5,1 \times 10^{-6})$	89%
Philippsburg	Allemagne	$6,5 \times 10^5$	(4,6)	$2,0 \times 10^2$	$(1,4 \times 10^{-3})$	100%
Würgassen/Beverungen	Allemagne	$4,0 \times 10^4$	$(2,8 \times 10^{-1})$	$5,0 \times 10^1$	$(3,5 \times 10^{-4})$	99,9%
Doodewaard	Pays bas	$1,4 \times 10^4$	$(1,0 \times 10^{-1})$	$7,1 \times 10^3$	$(5,0 \times 10^{-2})$	67%
Barsebäck	Suède	$4,6 \times 10^5$	(3,2)	$5,7 \times 10^3$	$(4,0 \times 10^{-2})$	99%
Ringhals	Suède	$1,0 \times 10^6$	(7,1)	$1,0 \times 10^4$	$(7,0 \times 10^{-2})$	99%
Leibstadt	Suisse	$2,8 \times 10^6$	$(2,0 \times 10^1)$	$2,7 \times 10^2$	$(1,9 \times 10^{-3})$	100%
Mühleberg	Suisse	$2,1 \times 10^5$	(1,5)	$7,1 \times 10^3$	$(5,0 \times 10^{-2})$	97%

En ce qui concerne les rejets de substances stables de ces réacteurs, aucune information n'est disponible.

### Réacteur à eau lourde pressurisée (PHWR)

Le combustible de cette famille de réacteur est l'uranium naturel. Le caloporteur est de l'eau lourde (D<sub>2</sub>O). Les réacteurs CANDU (CANAdian Deuterium Uranium) sont des réacteurs à eau lourde pressurisée. Les rejets liquides radioactifs de ces réacteurs (exemple : Gentilly-2) sont reportés dans le Tableau 5. Dans le cas du CNPE de Gentilly (Canada), en 2003, l'activité totale provenait à plus de 99,99% de la présence de <sup>3</sup>H dans les rejets liquides.

Aucune information n'est disponible quant aux rejets de substances stables pour ce type de réacteur.

Tableau 5: Rejets liquides radioactifs réels pour le CNPE de Gentilly en 2003 (Commission Canadienne Sûreté Nucléaire, 2003)

Éléments	Activité des rejets de 2003 pour le CNPE de Gentilly-2 en Bq par GW (activités réelles rejetées en GBq)		Rayonnements
<sup>3</sup> H	7,4 x 10 <sup>11</sup>	(500 000)	β
<sup>14</sup> C	3,9 x 10 <sup>7</sup>	(26)	β
autres	1,9 x 10 <sup>6</sup>	(1,3)	γ β

En conclusion de cet inventaire des rejets liquides de CNPE en fonction de la famille de réacteur, on note que tous ces rejets sont constitués de mélanges de substances radioactives et stables. En ce qui concerne les substances radioactives, les trois familles de réacteurs étudiées qui constituent 92% des CNPE mondiaux rejettent principalement (en termes d'activité) du tritium (<sup>3</sup>H). Cet élément radioactif d'une demi-vie courte (12,3 ans) présente notamment l'avantage de ne pas avoir de chimiotoxicité ce qui permet d'étudier la radiotoxicité de cet élément. Le reste de l'activité des rejets est due à un autre émetteur β, le <sup>14</sup>C. Les émetteurs γ représentent une activité minimale (<0,01%). Concernant les rejets de substances stables suite au fonctionnement normal des CNPE, seules les valeurs des REPs français ont pu être analysées. Ces données indiquent la présence de substances toxiques telles que le cuivre (qui reste majoritaire).

#### 1.1.1.2.

#### Niveaux environnementaux

La contamination des milieux récepteurs par les rejets va être très variable et dépendante du milieu. Ces rejets liquides de CNPE vont être, après leur rejet, dilués dans

l'eau des fleuves notamment. Cette dilution aura pour effet de diminuer l'activité jusqu'à la rendre indétectable dans certain cas. En effet, les eaux de surface de la rivière Vltava en Tchéquie ont été analysées avant et après l'ouverture du CNPE de Temelin. Cette étude menée par Hanslík *et al.* (2005) a montré que la contribution de ce REP était non mesurable (confondu dans le bruit de fond résiduel des rejets de Tchernobyl) concernant les radionucléides  $^{90}\text{Sr}$  et  $^{137}\text{Cs}$ . Seule la concentration en  $^3\text{H}$  avait augmenté significativement après mise en service des réacteurs et début des rejets. En effet à environ 20 km du REP, la concentration en  $^3\text{H}$  est passée de  $1,42 \text{ Bq L}^{-1}$  en 2001 à  $9,0 \text{ Bq L}^{-1}$  pour la période de 2002 à 2005. Cet effet de marquage de l'hydrosphère est encore mesurable à une distance supérieure à 250 kms du point de rejet avec une concentration en  $^3\text{H}$  de  $1,68 \text{ Bq L}^{-1}$  en 2001 qui est passée à  $3,3 \text{ Bq L}^{-1}$  pour la période 2002-2005 (Hanslík *et al.*, 2009).

Le même phénomène de marquage des eaux de surface en aval de CNPE a également pu être mesuré dans le réservoir d'Arrocampo en Espagne. Les rejets du REP d'Almaraz ont induit une augmentation significative de la concentration en  $^3\text{H}$ . La concentration des eaux de surface mesurée variait de 53 à  $433 \text{ Bq L}^{-1}$  (Baeza *et al.*, 2009) alors que les autres rivières d'Espagne et du Portugal ont des activités naturelles respectives (fond géochimique) de l'ordre de  $0,6 \text{ Bq L}^{-1}$  et  $1 \text{ Bq L}^{-1}$  (Carreiro et Sequeira, 1999). De plus, la rivière Tage qui est le milieu récepteur de trois CNPE à eau lourde voit la concentration en  $^3\text{H}$  de ces eaux de surface varier de 2 à  $600 \text{ Bq L}^{-1}$  de 150 à 0 km du CNPE le plus en aval des trois (Baeza *et al.*, 2001). Pour ce qui est des niveaux mesurés dans les rivières françaises, le niveau naturel en tritium avant essais nucléaires était de  $0,3\text{-}0,8 \text{ Bq L}^{-1}$  (Belot *et al.*, 1997). La dilution des effluents dans le milieu est importante puisque les activités en tritium dans les effluents bruts varient de 600 000 à 4 000 000  $\text{Bq L}^{-1}$  (Pierrard, 2008) alors que les mesures réalisées entre 1993 et 1996 ont montré que sur cette période, les teneurs en tritium des rivières françaises étaient inférieures à  $20 \text{ Bq L}^{-1}$  (Tort *et al.*, 1997). Néanmoins certaines valeurs dépassant ce seuil ont été mesurées dans la rivière Doubs ( $280 \text{ Bq L}^{-1}$ ) et dans la Seine ( $190 \text{ Bq L}^{-1}$ ). Ces valeurs sont cependant inférieures à certaines mesures réalisées par exemple aux États-Unis. En effet, dans les affluents drainant le site nucléaire de Savannah des concentrations en tritium variant de 29 à 7 905  $\text{Bq L}^{-1}$  ont été mesurées (Makhijani et Boyd, 2004). A noter que dans les eaux potables, la concentration en tritium est limitée à  $100 \text{ Bq L}^{-1}$ .

Même si le  $^3\text{H}$  semble être le radionucléide engendrant le plus fort marquage des eaux de surface, Duffa *et al.* (2004) ont observé la présence d'émetteurs  $\gamma$  tel que le  $^{60}\text{Co}$ , le  $^{58}\text{Co}$ , l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$  ou le  $^{54}\text{Mn}$  dans des matrices végétales d'une activité maximale de  $64 \text{ Bq kg}^{-1}$  de bryophytes et phanérogames pour le  $^{58}\text{Co}$ . A titre comparatif, sur les mêmes sites l'activité en

radionucléides d'origine naturelle induit une activité chez les bryophytes et phanérogames de  $526 \text{ Bq kg}^{-1}$  ( $^{40}\text{K}$ ).

Enfin concernant les éléments stables, les autres industries contribuant également à l'augmentation des concentrations rencontrées, il est donc difficile de dégager une augmentation caractéristique dans les eaux de surface. Néanmoins, une étude de Ciffroy *et al.* (2000) a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration en cuivre dans la Seine en aval d'un CNPE (concentration en cuivre à l'amont = 9 à 13  $\text{nmol L}^{-1}$  ; concentration en cuivre à l'aval = 126 à 330  $\text{nmol L}^{-1}$ ).

### **1.1.1.3. Indice de risque des substances rejetées**

Afin de définir des substances d'intérêts, les toxicités et les quantités de substances rejetées doivent être pris en compte en parallèle. C'est ce qui a été fait dans une étude de 2009 réalisées par Garnier-Laplace *et al.*. Ces auteurs ont calculé un indice appelé  $\Delta\text{PAF}$  (fraction d'espèces potentiellement affectées). Cet indice est déterminé à partir des quantités rejetées par les CNPE dans la rivière Rhône et à partir de données de toxicités des substances (données présentes dans la littérature). Cet indice permet ainsi de classer les substances suivant un pourcentage de risque. Plus la valeur de cet indice est forte plus la substance aura un effet potentiel sur les organismes aquatiques soumis à ces rejets. Ces  $\Delta\text{PAF}$  sont représentés séparément pour les substances radioactives (Figure 2) et pour les substances stables (Figure 3). Cet indice nous permet de mettre en évidence l'importance du cuivre dans les rejets de CNPE. Pour ce qui est des substances radioactives, le  $^{14}\text{C}$  et le  $^3\text{H}$  ont les  $\Delta\text{PAF}$  les plus élevés.

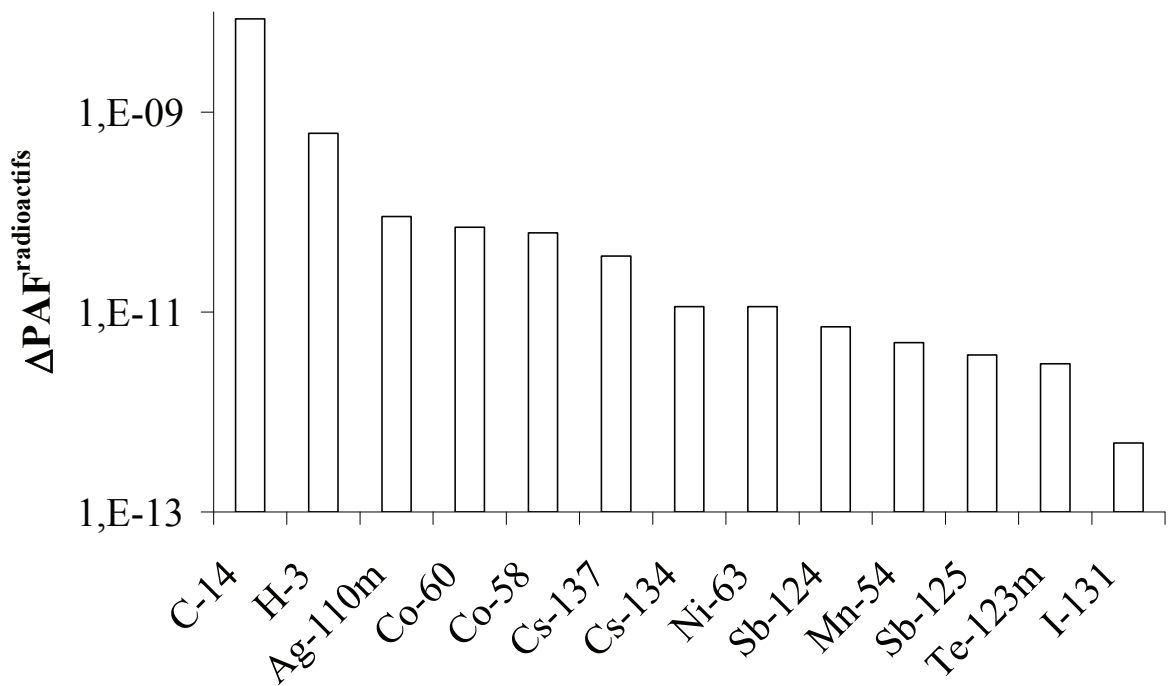


Figure 2 :  $\Delta\text{PAF}$  calculé à partir des substances radioactives rejetées sur une période d'une année par les CNPE rejetant dans le Rhône (Garnier-Laplace et al., 2009)

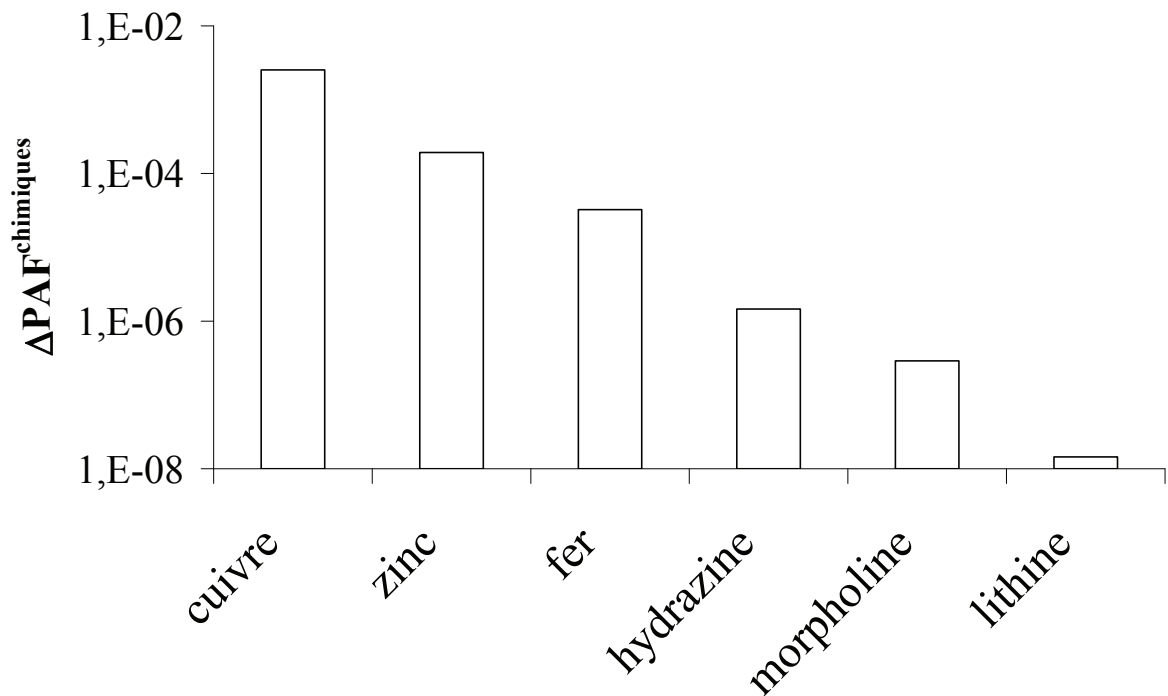


Figure 3 :  $\Delta\text{PAF}$  calculé à partir des substances stables rejetées sur une période d'une année par les CNPE rejetant dans le Rhône (Garnier-Laplace et al., 2009)

### 1.1.2. Interactions entre substances en mélange : Méthodes et interactions connues

Afin de déterminer la présence d'interaction entre substances en mélange, l'écotoxicologie a repris des méthodologies développées initialement en pharmacologie afin d'estimer l'action simultanée ou séparée dans le temps de deux ou plusieurs substances. Cette base méthodologique n'est cependant pas tout à fait applicable au problème environnemental étant donné les différences dans les contextes d'applications. C'est pourquoi, aucun consensus n'existe encore dans le domaine de l'application de ces méthodes en écotoxicologie. Notamment, la terminologie peut varier suivant les auteurs. C'est pourquoi, par souci de clarté, la terminologie des mélanges sera tout d'abord présentée. Dans un second temps, les modèles d'études seront cités ainsi que leurs limites d'utilisations. Enfin, quelques exemples d'interactions connues seront présentés.

#### 1.1.2.1. Définition des termes employés

##### Notion de mélange

Un mélange est une combinaison de deux ou plusieurs substances chimiques simultanément présentes dans le temps et l'espace. Plus précisément, un mélange dont la composition quantitative et qualitative est connue avec exactitude sera appelé « mélange défini » (de 2 (mélange binaire) à 10 substances ; Konemann et Pieters, 1996) alors qu'un mélange dont la composition est indéterminée et variable dans le temps sera nommé « mélange complexe » (plus de 10 substances).

##### Notion d'interaction

Dans le milieu naturel, les composés chimiques sont toujours en mélange. La toxicité de ces substances en mélange peut être additive ou des interactions peuvent survenir au sein de ces mélanges. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'interactions : physicochimiques/biologiques (entrée, distribution, métabolisme, excrétion,...) ou toxicodynamiques (effet sur un récepteur, cible cellulaire ou organe). Mwense *et al.* (2006) excluent les processus physicochimiques du terme interaction. L'interaction entre deux molécules donnant une troisième molécule plus ou moins toxique que les deux premières ne sera donc pas considérée comme une interaction mais comme une réaction chimique formant un composé dont la toxicité n'aura rien d'une interaction. De plus, en ce qui concerne l'entrée

des substances dans les cellules, on parlera de compétition. Tout autre effet (exemple = formation d'ERO) induit par des molécules en mélange sera dénommé : « interaction ». Ce terme est empirique et ne laisse pas présager des mécanismes sous jacents engendrant cette observation.

Une « action combinée » fera référence à tout type d'effet (interaction ou additivité) résultant de l'exposition (simultanée ou séquentielle) à deux ou plusieurs substances chimiques (Konemann et Pieters, 1996). Différents types d'actions combinées ont été mises en évidence. Les noms de ces actions sont repris dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Définitions des actions combinées connues entre composants d'un mélange (US EPA, 2000)

Plus que l'additivité = supra-additivité (Interactions)	Synergie	L'effet combiné des composés est plus important que l'addition des effets de chaque composé
	Potentiation	L'effet d'un composé est augmenté par un composé qui seul, n'a pas d'effet
	Coalition	L'effet des composés en mélange est observé, alors que les composés seuls n'ont pas d'effet
Additivité (pas d'interaction entre les composés)	Additivité stricte = l'effet observé d'un mélange correspond à l'effet attendu en se basant sur les concepts d'addition des concentrations ou d'action indépendante (cf. paragraphe 1.1.2.2)	
Moins que l'additivité = sub-additivité (Interactions)	Antagonisme	L'effet des deux composés est moins important que l'addition des effets de chaque composé
	Inhibition	L'effet d'un composé est diminué par un composé qui seul, n'a pas d'effet
Sans influence apparente		Les composés sont sans effet, seuls et en mélange

Les modèles d'étude de mélange cité paragraphe 1.1.2.2 ne permettent pas de discerner une potentiation d'une synergie. Il sera donc plus aisé de parler d'effet additif et d'effet supra ou sub-additif selon si l'effet observé lors du mélange est plus important ou plus faible



respectivement que celui prédit par l'additivité. Cette dénomination est en accord avec le rapport UNSCEAR (2000).

### **1.1.2.2. Modèles de mélange**

Le principe des modèles utilisés consiste dans un premier temps à modéliser l'effet prédit d'un mélange en se basant sur l'absence d'interaction entre les substances (hypothèse d'additivité). Dans le cas de substances ayant un mode d'action similaire (action sur le même site biologique et suivant le même mode d'action, par exemple : action au niveau des photosystèmes (Konemann et Pieters, 1996 ; Mwense *et al.*, 2006), le modèle prédictif utilisé reposera sur l'hypothèse d'addition des concentrations (CA). Si le mode d'action des substances est dissimilaire : action sur des systèmes physiologiques différents ou sur le même système mais molécule fonctionnellement indépendante (Konemann et Pieters, 1996 ; Mwense *et al.*, 2006), l'hypothèse de base sera l'action indépendante (IA) par addition des effets (Vighi *et al.*, 2003). Ces valeurs prédictives sont calculées à partir des données (courbe dose-réponse) de toxicité des substances seules. Dans un deuxième temps, la toxicité du mélange est déterminée expérimentalement et comparée à la valeur prédite.

Si le mode d'action des substances n'est pas connu précisément, les deux hypothèses (CA et IA) seront comparées aux valeurs expérimentales de toxicité du mélange. Pour déterminer l'occurrence d'une additivité, deux grands modèles (IA et CA) ont été développés. En plus de ces modèles, des indices simplifiés permettent de tester ces hypothèses.

#### **Modèle basé sur l'hypothèse d'addition des concentrations (CA)**

Le modèle d'addition des concentrations est connu sous plusieurs noms : addition des doses, action similaire simple, Loewe additivité. Les composés ainsi mélangés sont alors considérés comme des dilutions d'une même substance (pondération de la toxicité des substances entre elles ; Altenburger *et al.*, 1990 ; Konemann et Pieters, 1996 ; Mwense *et al.*, 2006). L'addition des concentrations peut être observée en dessous du seuil d'effet des composés (Konemann et Pieters, 1996). Ce concept est décrit par la formule suivante :

*Équation 1 : Équation du modèle d'additivité des concentrations*

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

Avec  $c_i$  = concentration de la substance en mélange induisant x% d'effet et  $CEX_i$  = concentration de la substance seule induisant le même effet (Cleuvers, 2003)

### Modèle basé sur l'hypothèse d'action indépendante (IA)

Le modèle d'action indépendante est rencontré sous différentes dénominations : action dissimilaire combinée, Bliss indépendance, addition des réponses ou encore action indépendante (IA). Ce modèle a été développé pour évaluer la toxicité de mélanges dont le mode d'action des substances est dissimilaire. Une substance n'ayant pas d'effet seule (en dessous de la NOEC) ne sera pas considérée comme contribuant à la toxicité du mélange (Konemann et Pieters, 1996 ; Mwense *et al.*, 2004). D'un point de vue mathématique, ce modèle est basé sur l'addition des probabilités d'effet (Mwense *et al.*, 2006). La conceptualisation de ce modèle est exprimée par :

*Équation 2 : Équation définissant le modèle de mélange nommé action indépendante*

$$E_{(C_{mix})} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E_{(C_i)})$$

Avec  $E(C_i)$  = effet de la substance  $i$  seule et  $E(C_{mix})$  = effet total du mélange (Cleuvers, 2003)

### Indices d'interaction utilisés

Afin d'évaluer s'il y a interaction entre les composés d'un mélange, des méthodes graphiques ou utilisant divers indices (unité toxique, index d'additivité) ont été développées ces 25 dernières années à partir de ces deux modèles (Ince *et al.*, 1999). La plupart de ces méthodes ne sont applicables que dans le cas de mélange binaire mais ont été mises en application uniquement dans le cas de mélange de substances stables.

Dans le cas d'absence de courbe dose-réponse concernant la toxicité des substances seules, un indice d'interaction pourra être utilisé afin de conclure quant à une interaction des substances (Geras'kin *et al.*, 2005). Ce coefficient a été utilisé afin de mettre en évidence des interactions entre substances radioactives au niveau de l'induction de dommages génétiques. Ce coefficient est déterminé comme le ratio de l'incrément induit par l'action combinée de 2 substances au niveau  $X_1$  et  $X_2$  sur la somme des incréments de l'effet produit et mesuré pour chaque substance séparément (Équation 3) :

Équation 3 : Formule de calcul du coefficient d'interaction Kw

$$Kw = \frac{I(X_1, X_2)}{I(X_1, 0) + I(0, X_2)}$$

$$I(X_1, X_2) = E(X_1, X_2) - E(0,0)$$

Avec  $E(X_1, X_2)$  la valeur de l'effet biologique étudié et  $E(0,0)$  le niveau basal mesuré chez des organismes non exposés.

D'un point de vue méthodologique et expérimental, l'utilisation de ce coefficient nécessite comme dans le cas de la mise en place des modèle IA et CA de réaliser :

- la mesure de l'effet des substances séparément
- la mesure de l'effet des substances en mélange
- le calcul du coefficient d'interaction

L'effet résultant de l'action combinée est classifié comme étant sub-additif lorsque  $Kw < 1$ , et supra-additif lorsque  $Kw > 1$  ou additif si  $Kw$  n'est pas significativement différent de 1.

### 1.1.2.3.

### Interactions connues entre substances

Dans cette partie une synthèse des effets majeurs observés en mélange est présentée. La plupart des études citées portent sur des organismes unicellulaires tels que les algues mais aussi sur des plantes. En effet, beaucoup d'études environnementales ont été réalisées sur ces modèles biologiques photosynthétiques.

#### Interaction entre substances stables

De nombreuses études ont analysé l'effet de substances stables en mélange notamment envers des espèces algales. Ces études ont permis de mettre en évidence différentes interactions en mélange et ce sur plusieurs paramètres d'effet. Chez *Scenedesmus capricornutum*, un effet additif a été mesuré lors du mélange de deux substances organiques (nonylamine/decylamine) à des concentrations représentant la CE50 et la CE10 alors que le mélange binaire atrazine/decylamine a un effet sub-additif sur le taux de croissance de cette même espèce algale (Christensen *et al.*, 2001). Dans le cas de mélanges binaires constitués de substances herbicide (atrazine), insecticide (chlorpyrifos) ou fongicide (chlorothalonil), le mélange atrazine/chlorothalonil suit l'hypothèse d'additivité des effets. Cependant, le mélange atrazine/chlorpyrifos induit un effet supra-additif après exposition de *Dunaliella tertiolecta* (mesure sur le taux de croissance ; DeLorenzo et Serrano, 2003). Dans le cas de mélange de métaux, l'étude de Fargasova (1999) met en évidence lors de mélanges binaire de

métaux un effet sub-additif au niveau de la croissance de l'algue *Scenedesmus quadricauda* (Cd/Pb, Cd/Cu, Cd/Zn et Cd/Fe). Néanmoins ces observations sont variables selon les concentrations testées. Par exemple pour le mélange Cd/Pb, un effet sub-additif est observé lorsque la concentration en Pb est de 0,1 mg L<sup>-1</sup> alors qu'un effet supra-additif est mesuré lorsque la concentration en Pb du mélange est de 1 mg L<sup>-1</sup>. En effet, les interactions sont connues pour être dépendantes des concentrations des substances présentes dans le mélange (Jonker *et al.*, 2005). Dans cette même étude, Jonker *et al.* (2005) mettent en évidence, en parallèle de l'effet dose dépendant des interactions, un effet dépendant du ratio testé. En effet pour un même mélange de substances, les interactions mises en évidence pourront varier suivant le ratio testé, passant d'effet additif à un effet sub ou supra-additif. Andersen et Dennison (2004) proposent deux explications à ces interactions entre substance en mélange. La première explication est appelée par ces auteurs pharmacocinétique, la présence d'une deuxième substance induisant une variation de la concentration interne de la première substance, en interagissant sur les processus d'absorption, de diffusion, le métabolisme ou encore l'élimination. La seconde explication est de type pharmacodynamique, c'est-à-dire liée aux modes et sites d'actions toxiques des substances. En effet, en mélange, la présence d'une deuxième substance peut induire une variation directe de la réponse induite par la première substance.

Dans le cas de mélanges complexes, Junghans *et al.* (2006) ont montré que le modèle d'IA sous estimait la toxicité d'un mélange constitué de 25 pesticides (*Scenedesmus vacuolatus*). Néanmoins, la sous estimation est de 1,3. De plus le modèle CA prédit de façon fiable la toxicité de ces substances d'actions dissimilaires en mélange. Si l'on considère un mélange dont les substances ont une action supposée dissimilaire (comme par exemple un mélange métal /radiation ionisante), l'effet du mélange sera donc mieux prévue à l'aide du modèle CA. Néanmoins cette constatation reste vrai pour des mélanges complexes.

En analysant l'ensemble des données obtenues concernant l'effet des mélanges, Warne et Hawker (1995) ont mis en évidence que, plus le nombre de composés en mélange augmente, plus l'effet du mélange tend vers l'additivité (hypothèse entonnoir). D'après ces même auteurs, ceci serait dû au fait que plus il y a de composé présents dans le mélange plus les concentrations de ces composés sont réduites. Or, c'est lorsque les concentrations sont importantes que les composés ont le plus de probabilité d'interagir (les molécules sont plus proches les unes des autres). En conclusion, plus le nombre de composés dans le mélange serait important, moins il y aurait d'interactions au sein de ces mélanges. On se rapprocherait alors des hypothèses d'addition des effets ou d'action indépendante. Graphiquement, la

Figure 4 illustre ce phénomène d'effet entonnoir. Au vu de cette représentation, cette hypothèse est à nuancer étant donné le faible nombre de résultats disponibles pour des mélanges de plus de 10 composés.

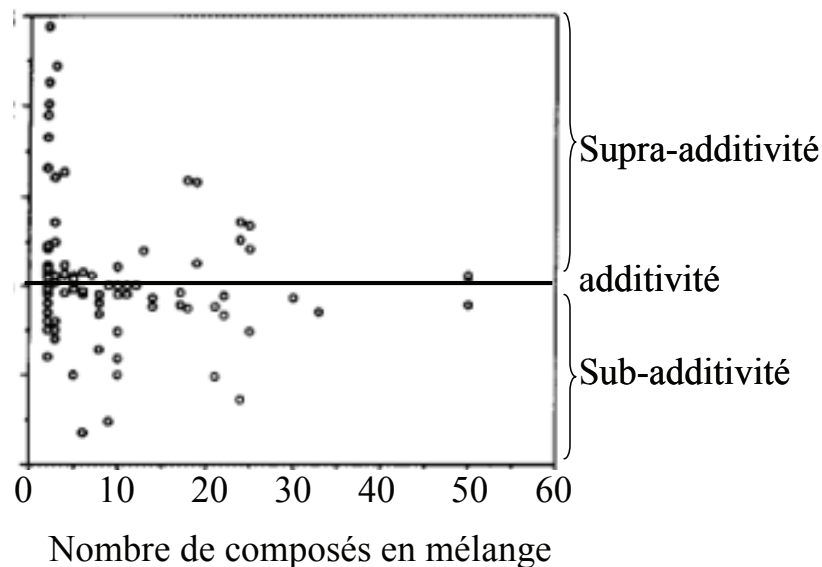


Figure 4 : Effet d'interaction mesuré en fonction du nombre de composés dans le mélange (d'après Warne et Hawker, 1995)

#### Interaction entre substances stables et radioactives

Beaucoup moins d'études ont été réalisées afin de mesurer l'effet de substances radioactives en mélange avec des substances stables. Un effet sub-additif a cependant été démontré entre le cuivre et l'uranium lors d'exposition de *Lemna aequinoctialis* (Charles *et al.*, 2006). Cet effet a été mesuré par test d'inhibition de la croissance après 96h d'exposition. Néanmoins, l'activité résultante de l'uranium naturel est faible (9 Bq L<sup>-1</sup> dans ce cas) et cette interaction est plus proche de l'effet de deux métaux en mélange que d'un métal en mélange avec une substance radioactive. D'autres auteurs (Geras'kin *et al.*, 2005), ont également observé un effet sub-additif entre le <sup>137</sup>Cs (5, 25 et 49 kBq kg<sup>-1</sup> de sol) et les métaux suivants : Cu, Pb, Cd. Cet effet a été mesuré sur des cellules de méristème (fréquence et nombre d'aberration cellulaire) après 21 à 25 jours d'exposition post germination (*Hordeum vulgare*). Dans cet exemple, l'interaction observée souligne l'effet des radiations à faible dose d'un métal en mélange avec un émetteur  $\gamma$  étant donné que l'activité en Cs est faible.

Afin de s'affranchir d'interactions chimiques entre métaux, une recherche des effets de rayonnements en mélange avec des substances stables a été entreprise par certains auteurs. Une augmentation de l'entrée du Cu et du Pb (après 2h d'exposition) a ainsi été reportée suite

à une première exposition des cellules d'*Anabaena doliolum* (cyanobactérie) durant 1h aux UV-B (rayonnements oxydants). Cette supra-additivité est corrélée à une augmentation de la perméabilité membranaire suite à la peroxydation lipidique des membranes, peroxydation engendrée par les UV-B (Rai *et al.*, 1995 ; Rai *et al.*, 1998). Toujours chez *Anabaena doliolum*, une première exposition des cellules au cuivre induit une augmentation de l'effet des UV-B (inhibition de la production d'oxygène, fixation du  $^{14}\text{C}$ ,... ; Bhargava *et al.*, 2008).

Ces résultats suggèrent que les rayonnements oxydants ont en mélange un effet supra-additif sur les substances stables telles que les métaux. Néanmoins trop peu de données existent dans la littérature pour parler de tendance générale.

### 1.1.3. Objectifs généraux

L'étude des substances en mélange peut être abordée de deux façons différentes. La première consiste dans l'étude des mélanges complexes issus d'un CNPE sélectionné. Cette étude serait abordée par dilutions successives du rejet. Une telle approche présente l'avantage d'être au plus proche des conditions réelles en ce qui concerne la composition du rejet mais plusieurs inconvénients existent à cette alternative. Tout d'abord, il serait impossible de concentrer le rejet de manière homogène si aucun effet n'est mis en évidence lors d'exposition au rejet pur. La représentativité du/des rejets sélectionnés resterait restreinte dans l'espace et dans le temps. La caractérisation de la composition exacte des nombreuses substances représenterait un effort expérimental considérable et il serait fort complexe de pouvoir extrapoler les résultats obtenus à d'autres sites et d'attribuer aux différentes substances une part de toxicité. De plus l'application des modèles de mélange présentés plus haut ne nous permettrait pas de façon satisfaisante de déterminer les interactions au sein de tels mélanges. Dans ces conditions, l'approche resterait majoritairement empirique.

L'autre alternative consiste à reconstituer des mélanges en laboratoire. Cette solution permet notamment de mesurer l'effet de chaque substance séparément avant d'expérimenter la toxicité du mélange, tout en maîtrisant les conditions d'exposition des organismes (notamment spéciation métallique). C'est cette alternative qui sera retenue pour cette étude. De plus, étant donné l'apparition d'interactions de façon ratio dépendante, l'étude sera réalisée pour différents ratios de mélange. Afin d'exclure des interactions potentielles les phénomènes de compétition, notre étude s'attardera à mesurer l'internalisation des substances lors de l'exposition en mélange. De plus, afin d'éviter des changements de spéciation dans le milieu, un radionucléide non-métallique sera choisi. Ce choix permettra de déterminer l'effet

de radiation en mélange en s'affranchissant des interactions chimiques potentielles (complexation, compétition...). Concernant enfin le nombre de substances en mélange, étant donné que les mélanges binaires de substances stables et radioactives ont été peu étudiés, l'obtention de nouvelles informations dans ce domaine paraît un préalable à toute étude de mélange complexe. Pour finir, une approche par mélange binaire permet d'aborder l'étude des mécanismes d'action impliqués dans les effets observés. C'est pourquoi nous choisirons d'analyser plus précisément, en conditions de laboratoire, les effets de différents ratios d'un mélange binaire HTO/Cu, représentatif d'un rejet reconstitué.

Pour mener à bien cette étude et mettre en évidence les niveaux d'effets et les mécanismes d'action impliqués, le travail sur un organisme modèle s'impose. Étant donné le contexte de l'étude, à savoir les rejets sous forme liquide de CNPE, un modèle aquatique a été choisi. En effet, les rejets de CNPE sous forme liquide induisent une contamination de ces écosystèmes. Notre choix s'est porté sur les organismes photosynthétiques puisque ceux-ci sont situés à la base des écosystèmes aquatiques. Tout effet mesuré sur ces organismes met en évidence un impact potentiel plus général sur l'ensemble de l'écosystème. De plus, afin de réaliser cette étude en condition de laboratoire, le modèle algue unicellulaire semble être le choix le plus adapté de par le taux de division rapide de ces organismes. Le modèle biologique retenu pour cette étude est l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Tableau 7). Cette espèce est un modèle couramment utilisé pour les études écotoxicologiques et a été utilisée pour mesurer :

- le taux d'internalisation des substances (Hill *et al.*, 1996 ; Macfie *et al.*, 2000 ; Fortin *et al.*, 2004 ; Morlon *et al.*, 2005 ; Morlon *et al.*, 2006)
- l'atteinte des photosystèmes (Juneau *et al.*, 2002 ; Geoffroy *et al.*, 2007)
- l'inhibition de la croissance (Prasad *et al.*, 1998)
- la production de stress oxydatif (Yoshida *et al.*, 2003 ; Forster *et al.*, 2005)
- les dommages à l'ADN (Erbes *et al.*, 1997),...

Ce modèle biologique est particulièrement intéressant dans ce contexte où la toxicité des substances sera recherchée à différents niveaux cellulaires. En effet, la ressemblance du système photosynthétique des algues et des plantes supérieures (conservation forte) ainsi que la possibilité de cultiver cette espèce en absence de lumière (carbone provenant d'une source d'acétate) permet de nombreuses études. De plus, ce modèle a permis ces dernières décennies de mieux comprendre différents processus cellulaires (assimilation des nutriments, homéostasie, étude des rythmes circadiens, assemblage et fonction des flagelles, ...), d'autant plus, le génome de cette espèce est entièrement séquencé. Enfin, la méthode de culture de

*Chlamydomonas reinhardtii* en milieu artificiel (milieu inorganique) est bien documentée, ce qui permet de maîtriser la spéciation théorique des métaux dans le milieu de culture. Cette espèce colonise plus particulièrement les écosystèmes d'eau douce mais également les zones d'estuaires (espèce euryhaline) et les sols, elle est dite ubiquiste, c'est-à-dire qu'elle colonise différents écosystèmes.

Tableau 7: Classification du genre *Chlamydomonas* dans le règne végétal

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Chlorophyta</i>
Classe	<i>Chlorophyceae</i>
Ordre	<i>Volvocales</i>
Famille	<i>Chlamydomonadaceae</i>

A la suite de cette partie sont présentés de façon spécifique les éléments bibliographiques nécessaires à cette étude de l'effet du mélange HTO/Cu. En effet, les données de la littérature concernant les effets du tritium et du cuivre seuls, nous permettrons de déterminer les paramètres d'effets qu'il sera pertinent d'étudier en mélange. Dans la partie suivante, les effets connus de ces substances sont détaillés séparément. En parallèle, les critères d'effet sensible à ces substances sont explicités.



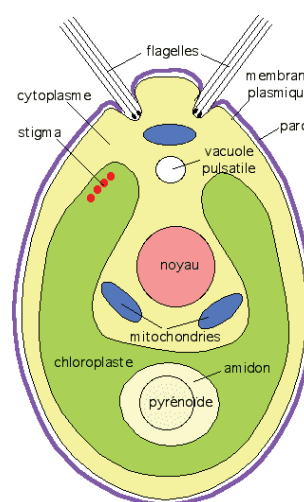
## 1.2. EFFETS ATTENDUS ET CONNUS DU CUIVRE ET DU TRITIUM SUR L'ALGUE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

---

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue de forme ovale bi-flagellée (Figure 5). Une description détaillée de l'ultrastructure de ce modèle a été publiée en 1989 par Harris. Les cellules sont entourées d'une paroi cellulaire rigide, principalement formée de glycoprotéines, qui double la membrane plasmique. Environ 40% du volume cellulaire est occupé par le chloroplaste, en forme de U, qui entoure le noyau. Cet organite est composé du stroma, des thylakoïdes et du pyrénoïde. Enfin, le noyau est entouré de l'enveloppe nucléaire et contient le nucléole.



a)



b)

Figure 5: Photo (a) et schéma représentatif de la structure et des organites (b) de *Chlamydomonas reinhardtii* (source : <http://www.biology-blog.com/images/blogs/10-2007/Chlamydomonas-2941.jpg>) et <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/images/chlamydomonas.gif>)

Son diamètre est d'environ 4-6  $\mu\text{m}$ , les cellules étant plus volumineuses avant la division cellulaire. Sa croissance se déroule en trois phases (Figure 6) :

- phase de développement « lag » ou phase de latence (de 0 à 8,25 h)
- phase de croissance exponentielle (de 8,25 h à 70,5 h)
- phase de développement stationnaire dès la 70,5<sup>ème</sup> heure de culture (l'un des éléments du milieu est devenu limitant).

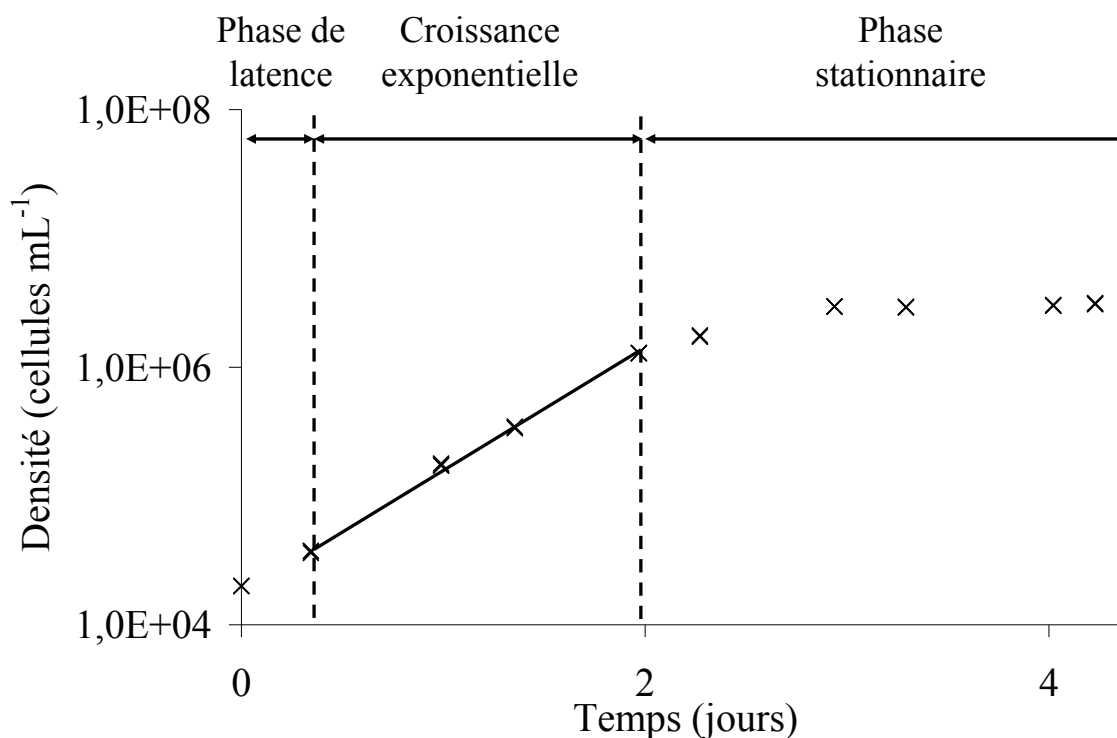


Figure 6 : Courbe de croissance cellulaire représentant la densité cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du temps.

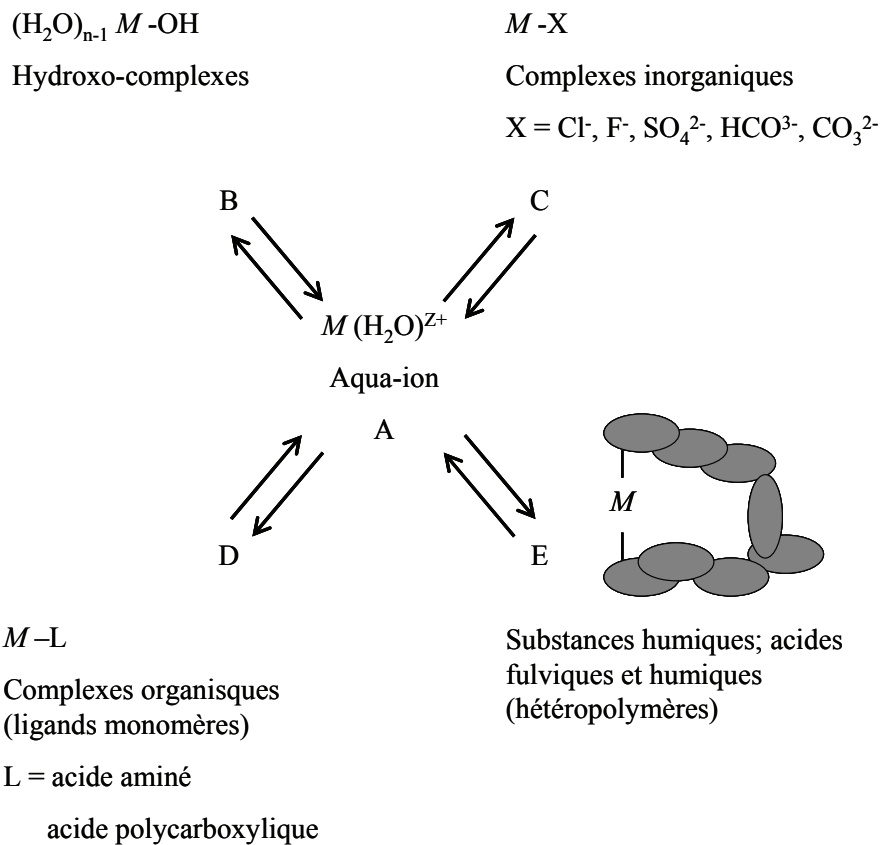
Ces valeurs peuvent varier en fonction des conditions de culture, du nombre de génération de la souche ainsi que du milieu de culture employé et de la densité cellulaire initiale d'inoculation.

## 1.2.1. Exposition et effet du cuivre

### 1.2.1.1. *Internalisation du cuivre chez Chlamydomonas reinhardtii*

#### Généralités

L'internalisation d'un métal dans un organisme va dépendre de la spéciation. La spéciation se définit par la répartition entre différentes formes physiques (particulaires, colloïdales ou dissoutes) ou chimiques (formation de complexes ; Templeton *et al.*, 2000). Un métal cationique va former différents types de liaison avec les molécules présentes dans le milieu et ce en fonction de certains facteurs tels que le pH, la température, leur potentiel d'oxydoréduction, la présence de matière organique, la salinité, l'alcalinité, la conductivité, la concentration en nutriments, ... (Figure 7 ; Fernandez-leborans et Novillo, 1995).

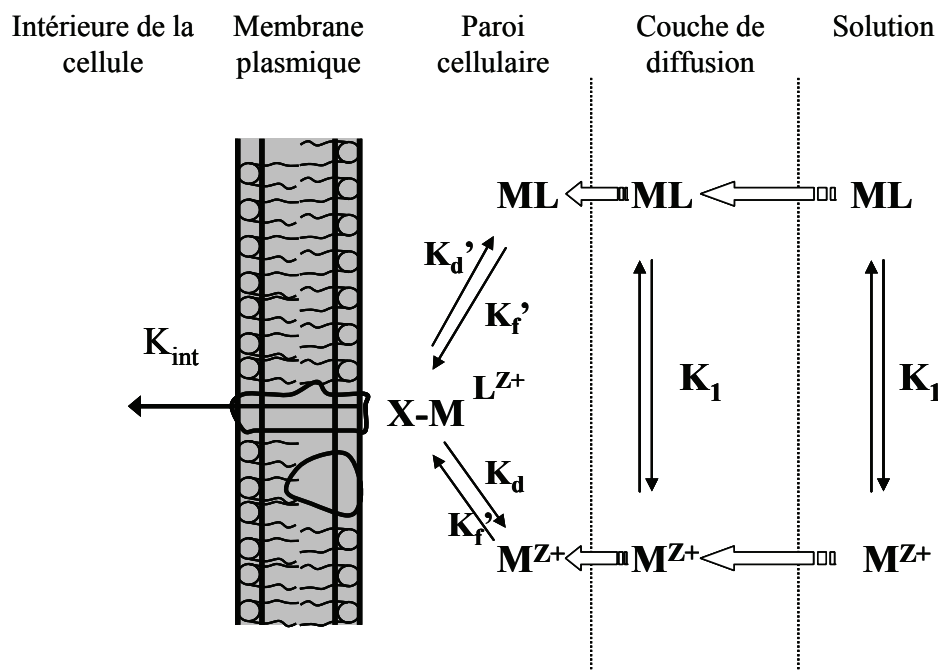


La répartition du métal sous forme libre hydraté (A) entre les formes dissoutes B, C, D et E peut se calculer à l'aide de la modélisation des équilibres chimiques.

Figure 7 : Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution (Twiss et al., 2001)

L'ensemble des formes représentées est en équilibre avec les autres (autant de formation que de dissociation des composés). La concentration totale du métal est donc répartie entre ces différentes formes. L'aqua-ion (A) est la forme ionique du métal ( $M^{Z+}$ ) (lié à des molécules d'eau d'hydratation) qui joue un rôle central dans la spéciation du métal. C'est cette espèce libre qui, indirectement, définit la toxicité du métal puisqu'elle est en équilibre constant avec les autres complexes.

La toxicité d'un métal va dépendre indirectement de sa concentration libre dans le milieu. En effet, au contact avec les membranes cellulaires, qui sont le lieu clé de l'interaction métal-organisme aquatique, les ions libres vont former un complexe de surface ( $\{M-X\text{-cellule}\}$ ). La toxicité est directement liée à la concentration de ce complexe, elle-même proportionnelle à la concentration en métal libre (Figure 8 ; Campbell *et al.*, 2002).

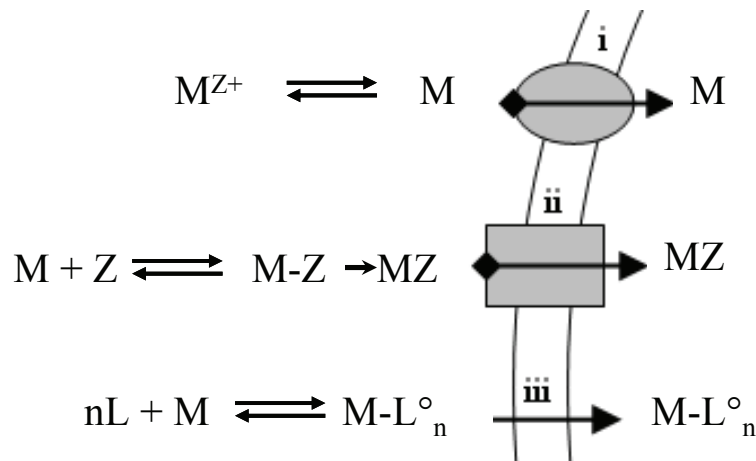


$M^{Z+}$  = ion métallique libre ; ML = complexe métallique en solution ;  $K_1$  = constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML ;  
 M-X-membrane = complexe métallique de surface ;  $k_f, k_f'$  = constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface,  $k_d, k_d'$  =  
 constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface ;  $k_{int}$  = constante de vitesse pour l'internalisation du métal. Les charges sur  
 les complexes ne sont pas indiquées.

Figure 8 : Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques  
 (Campbell et al., 2002)

Le métal peut agir directement avec un site physiologiquement actif (récepteur) présent sur la surface membranaire, ou être internalisé puis interagir avec un site fonctionnel intracellulaire. Dans le second cas de figure, qui est le plus courant, l'internalisation peut se faire de trois façons (Figure 9) :

- transport facilité de cations (transporteur transmembranaire protéique ou canal transmembranaire)
- transport accidentel de cations liés à des anions (transport facilité d'un complexe anionique)
- transport passif (par simple diffusion) = complexe neutre et lipophile (Campbell et Couillard, 2003)



i) transport facilité de cations ; ii) transport accidentel de cations liés à des anions ; iii) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles.

Figure 9 : Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques – mécanismes généraux (Campbell et Couillard, 2003)

Étant donné la nature hydrophobe des membranes biologiques et hydrophiles de la plupart des métaux, la voie i) est la plus courante dans l'internalisation des métaux (sauf pour le  $HgCl_2^0$  qui entrera par diffusion passive).

Une fois internalisée dans les cellules, la substance sera métabolisée (macro et micronutriments notamment), séquestrée et/ou excrétée (cas des substances toxiques = mécanismes de défenses).

### Le cas du cuivre

Le cuivre est un métal de masse molaire de  $63,536 \text{ g mol}^{-1}$  possédant deux états d'oxydation (+1 et +2). C'est un oligoélément essentiel pour les organismes (croissance optimale de *Chlamydomonas reinhardtii* =  $10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  ; Knauer *et al.*, 1997b). L'entrée de cuivre se fait chez *Chlamydomonas reinhardtii* via des transporteurs saturables (équilibre atteint après environ 20 min d'exposition) ayant une forte affinité pour  $Cu^{2+}$  ( $0,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ; Hill *et al.*, 1996). Comme pour les autres métaux, l'entrée du cuivre est restreinte par la paroi cellulaire qui joue le rôle de barrière (Prasad *et al.*, 1998 ; Macfie et Welbourn, 2000).

Une fois dans les cellules le cuivre aura de nombreux effets toxiques. La toxicité de cet élément est très bien documentée sur les algues vertes en particulier en ce qui concerne les effets sur le stress oxydatif, sur la photosynthèse et sur la croissance.

### 1.2.1.2.

### Stress oxydatif

#### Définition

Différents processus cellulaires (processus endogène comme la respiration, la photosynthèse, fonctionnement des mitochondries, ...) consomment de l'oxygène et vont induire des sous produits appelé ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène). Ces molécules ainsi formées, sont classées en deux groupes : les radicaux et les non-radicaux (Tableau 8).

Tableau 8 : Nom et symbole des différentes ERO (Halliwell et Gutteridge, 2007)

	Molécules	Noms
Radicaux	$O_2^{\bullet -}$	Radical superoxyde (décomposition de l'eau)
	$HO_2^{\bullet}$	Radical perhydroxyle
	$HO^{\bullet}$	Radical hydroxyle (décomposition de l'eau)
	$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxyde
	$RO^{\bullet}$	Radical alkoxyl
Non radicaux	$^1O_2$	Oxygène singulet
	$H_2O_2$	Hydroperoxyde (décomposition de l'eau)
	$ONOO^-$	peroxynitrite

Avec R = radical libre de carbone

La présence des ERO dans la cellule va engendrer des dommages (peroxydations). Afin de se protéger de ces peroxydations, les cellules ont développé des systèmes de défense, systèmes nommé antioxydant. Dans une cellule végétale, deux types d'antioxydants permettent de réduire le taux d'ERO cellulaire :

- les antioxydants enzymatiques, qui s'organisent comme indiqué sur la Figure 10, avec notamment la metalloenzyme superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase (GPX<sub>S</sub>), la catalase, le glutathion réductase (GR). Ces antioxydants vont permettre de transformer les radicaux libres oxygénés en molécule d'eau.

- les antioxydants non-enzymatiques ont un faible poids moléculaire et vont soit réduire le taux d'ERO soit piéger les métaux toxiques. Ils sont hydro ou liposolubles ce qui permet une protection des membranes et des lipoprotéines contre la peroxydation. Les antioxydants non-enzymatiques comprennent le glutathion réduit et oxydé (GSH et GSSG), la vitamine C, la vitamine E, la provitamine A, la vitamine A, et l'ubiquinol.

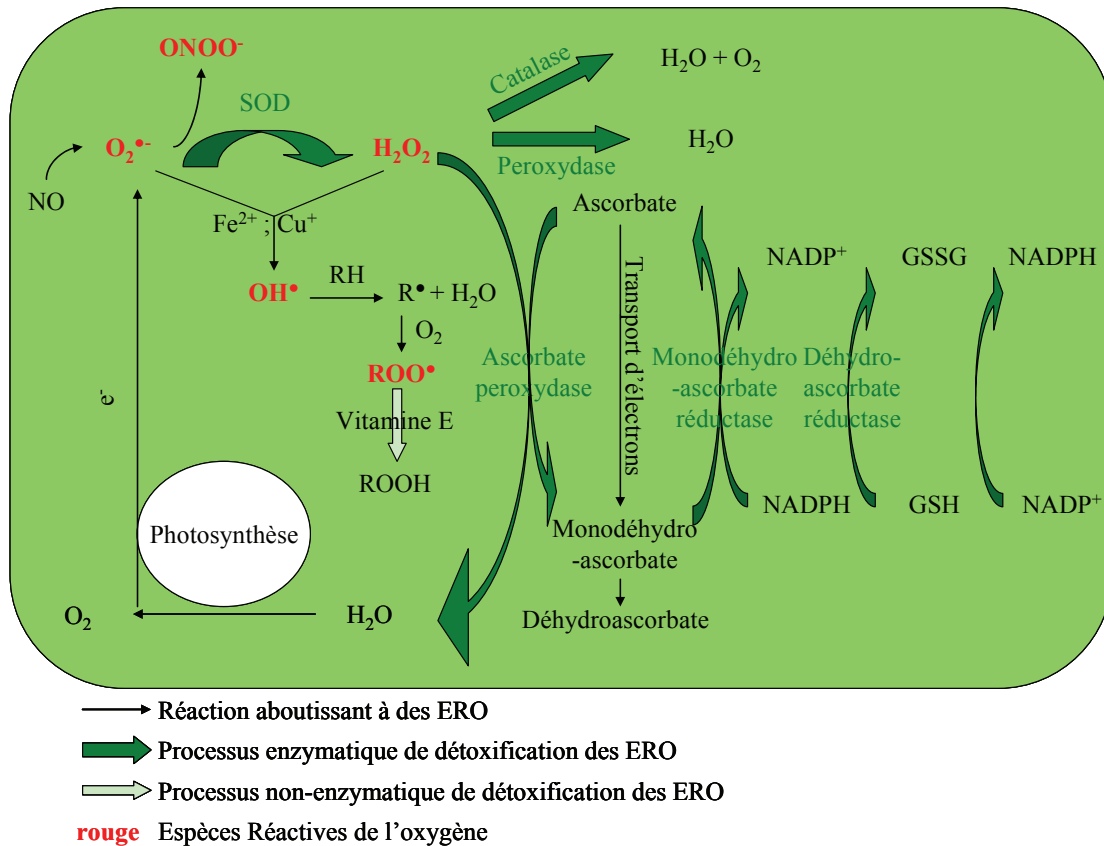


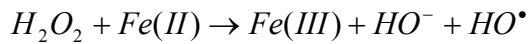
Figure 10 : Mécanismes de réponse des systèmes antioxydants dans une cellule végétale (adapté pour une cellule végétale d'après Cossu et al., 1997)

En parallèle de ces moyens de lutte contre les ERO, les cellules mettent en place des systèmes de protection tels que les phytochélatines (chez les cellules végétales, dérivé du glutathion) ou bien encore des systèmes de réparation des dommages causés par les ERO.

En cas de stress exogène important (exposition des cellules à un métal par exemple), les moyens de défenses cellulaires ne permettent plus de maintenir le taux d'ERO à un niveau faible. On parle alors de stress oxydatif (= déséquilibre entre oxydant et antioxydant en faveur des premiers). Ce phénomène va engendrer des dommages à la cellule, dommages pouvant entraîner sa mort.

L'une des molécules induisant la plus forte peroxydation des molécules (ADN, protéines, lipides et glucides) est le radical hydroxyle. Cette molécule est formée à partir de l' $H_2O_2$  via la réaction d'Haber-Weiss (Équation 4 ; Riley, 1994), réaction qui est catalysée par un métal de transition (Cu, Fe,...), ici le fer.

*Équation 4 : Formation de radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss*



### **Dosage**

Afin d'évaluer ce stress oxydant, différentes techniques ont été développées sur organismes végétaux (par HPLC, cytométrie,...). Parmi la grande variété de méthodes de dosage existantes, beaucoup utilisent des sondes dites « positives » (Bartosz, 2006). Ces sondes sont des composés initialement non-fluorescents (ou très peu fluorescents) qui réagissent avec les ERO pour former un composé hautement fluorescent. Ces techniques sont limitées par la capacité de diffusion plus ou moins homogène de la sonde au sein de l'échantillon étudié. Elles peuvent également être influencées par la teneur en oxygène du milieu, le pH, la présence d'ions métalliques ou de radiations.... Les différentes ERO produites peuvent être déterminées par l'utilisation de sondes comme le luminol, spécifique de l' $H_2O_2$  (Mueller, 2000), la lucigénine, spécifique de l' $O_2^\bullet$  (Rembish et Trush, 1994), l'acide p-hydroxyphenylacétique qui réagit spécifiquement avec l' $H_2O_2$ . Étant donné l'importance du système antioxydant/oxydant, doser une seule molécule n'apporte que peu de renseignement sur l'état général du système. D'autres sondes permettent de mesurer le niveau oxydant global (2'-7'-dichlorodihydrofluorescéine ( $H_2DCF$ -DA) qui est moins spécifique). L'avantage de l'utilisation de sondes réside dans la possibilité de réaliser une mesure dans le temps de la production d'ERO par exemple (Knauert et Knauer, 2008 ; Szivak *et al.*, 2009).

### **Le cas du cuivre**

Dans le cas particulier du cuivre, une étude récente a mis en évidence que la toxicité du cuivre est majoritairement induite par la production d'espèce réactive de l'oxygène (Knauert et Knauer, 2008). En effet, ce métal induit un dysfonctionnement des principaux systèmes antioxydants cellulaires avec une diminution des enzymes CAT et ascorbate peroxydase lors d'exposition de cellules de *Scenedesmus* à  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cuivre (Tripathi *et al.*, 2006) et des variations importantes des niveaux de GSH et CAT lors d'exposition de cellules de *Chlorella* à  $47 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cuivre total (Mallick, 2004). Les phytochélatines présentes dans les cellules



et synthétisées à partir du glutathion vont chélater le cuivre, réduisant ainsi la production d'ERO (Morelli et Scarano, 2004) mais de façon insuffisante puisqu'une production d'ERO a été mesurée pour des concentrations environnementales en cuivre (de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>) sans effet sur les photosystèmes (Szivak *et al.*, 2009). Cette production de phytochélatines est sans effet sur le pool de GSH comme ceci a été montré par Ahner *et al.* (2002) après 2 heures d'exposition au cuivre d'une espèce de phytoplancton (coccolithophore). De plus fortes concentration en cuivre vont cependant engendrer de nombreux effets sur les cellules et organismes. Le premier effet notable est une toxicité au niveau de l'activité des photosystèmes.

### **1.2.1.3. Activité des photosystèmes**

#### **Définition et mesure**

Le siège de l'activité photosynthétique est la membrane des thylakoïdes, au sein des chloroplastes (Figure 11). L'ensemble du processus photosynthétique va permettre aux organismes photoautotrophes tels que les algues de transformer l'énergie lumineuse en énergie permettant de synthétiser des substances organiques. Au cours de la réaction photosynthétique, les molécules de chlorophylle, qui forment des groupements récepteurs de l'énergie lumineuse vont passer d'un état basal (en absence de lumière) à un état excité (en présence de lumière). Lors du retour de cet état excité à l'état initial, il y a perte d'énergie par induction de chaleur et de fluorescence (quenching photochimique ; Figure 12). Toute perturbation des photosystèmes engendrera un dysfonctionnement de ce processus d'excitation/déexcitation ce qui induira une plus grande perte d'énergie par induction de chaleur et/ou de fluorescence. L'état de fonctionnement des photosystèmes peut ainsi être suivi par mesure de la fluorescence et ce au niveau du photosystème I ou du photosystème II.

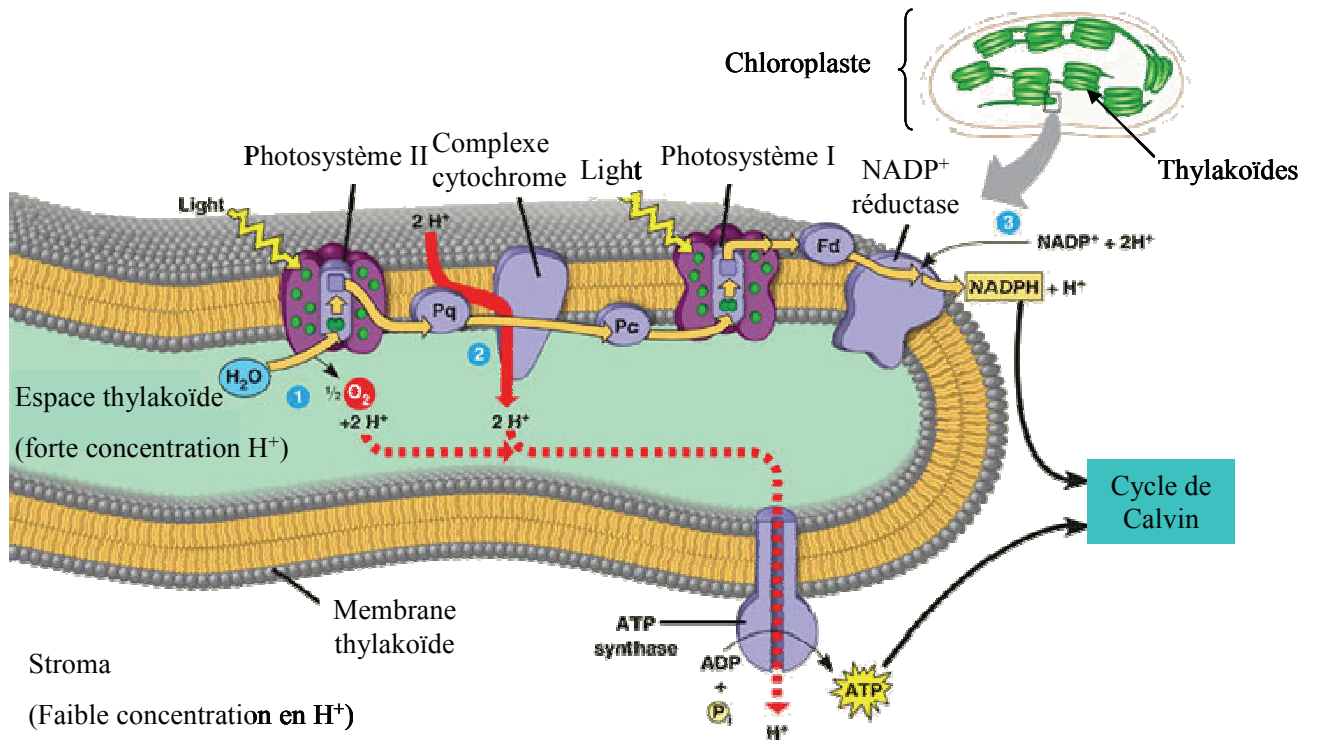


Figure 11 : Organisation du système photosynthétique dans la membrane d'un thylakoïde (d'après Campbell et Reece, 2002)

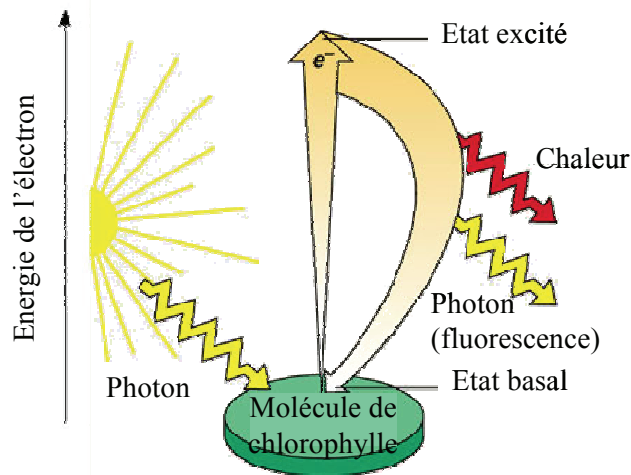


Figure 12 : Excitation et désexcitation d'une molécule de chlorophylle isolée (d'après Campbell et Reece, 2002)

Les paramètres de mesure de l'activité photosynthétique sont des marqueurs précoces lors d'exposition à un toxique notamment lors d'expositions à des métaux. En effet, une interruption du transfert des électrons dans le centre réactionnel du PSII ainsi qu'une réduction du rendement photosynthétique opérationnel a été mesurée chez *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'exposition (48 h) au sélénate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ; Geoffroy *et al.*, 2007). Un effet sur le

rendement opérationnel et sur le rendement maximal photosynthétique des cellules algales de *Pseudokirchneriella subcapitata* a été obtenues suite à 5h d'exposition au Cu (Juneau *et al.*, 2002) et au Hg (Juneau et Popovic, 1999). Enfin, l'action des métaux au niveau du site de dissociation de l'eau est indéniable (Cu, Cr, Ni, Cd et Zn) après 1h d'exposition (Mallick et Mohn, 2003).

### **Le cas du cuivre**

Chez *Anabaena doliolum* (cyanobactérie), le cuivre à faible concentration induit un blocage du flux d'électrons au niveau du site de dissociation de l'eau (Rai *et al.*, 1995). La même constatation a été faite chez *Scenedesmus* par Mallick et Mohn (2003). En ce qui concerne l'atteinte des photosystèmes de *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de cuivre, une étude de Juneau *et al.* (2002) a montré une baisse de la fluorescence dès une exposition au cuivre de 157 nmol L<sup>-1</sup> (5h d'exposition). De plus *Chlamydomonas reinhardtii* s'est révélée plus sensible au cuivre que *Chlorella vulgaris* et *Selenastrum capricornutum* (Juneau *et al.*, 2002).

#### **1.2.1.4. Inhibition de la croissance et volume cellulaire**

##### **Généralités**

La mesure du taux de croissance consiste généralement dans le cas de cellules algales, à dénombrer à intervalles de temps régulier la densité cellulaire (par comptage des cellules ou par mesure de la fluorescence afin d'estimer la biomasse). A partir de ces données une courbe dose-réponse reprenant la densité cellulaire obtenue après 72 ou 96h d'exposition en fonction des concentrations d'exposition permettra d'obtenir des paramètres tels que la concentration la plus faible sans effet (NOEC), la plus faible concentration induisant un effet (LOEC) ainsi que la concentration réduisant de 50% la densité maximale atteinte (CE50). De plus un autre paramètre peut être déduit à partir de courbes de croissance (densité cellulaire en fonction du temps). Ce paramètre est le taux de croissance exprimé en nombre de division par jour (div j<sup>-1</sup>). Ces paramètres de mesure de la croissance et notamment la CE50 sont les plus couramment employés concernant la mesure de toxicité d'une substance envers des algues unicellulaires (Macfie *et al.*, 1994 ; Knauer *et al.*, 1997b ; Geoffroy *et al.*, 2007). En effet, tout dysfonctionnement de la cellule (ERO, atteinte des photosystèmes, dommage à l'ADN,...) impliquant une perte d'énergie pour la restauration d'un mécanisme cellulaire, se répercutera au niveau de ces paramètres. Le taux de croissance et la croissance sont en

conséquence des marqueurs sensibles et représentatifs de la toxicité d'une substance, ils ne sont cependant pas des marqueurs précoces puisque mesurés après en moyenne 72 à 96h.

### **Le cas du cuivre**

La toxicité du cuivre envers *Chlamydomonas reinhardtii* mesurée à partir du taux de croissance est de : CE30 = 0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (pH = 6,8 ; Macfie *et al.*, 1994). De plus, une baisse du volume cellulaire a été observée lors d'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à des concentrations en cuivre de 50 et 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Prasad *et al.*, 1998). Chez *Chlorella sp.* une augmentation du volume cellulaire de 50 % a été observée lors de l'exposition des cellules à 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}_{\text{tot}}$ . (Franklin *et al.*, 2002 ; Wilde *et al.*, 2006). Cette augmentation de volume pourrait résulter de l'effet du cuivre sur la capacité de division des cellules (Wilde *et al.*, 2006). L'effet du cuivre sur le volume cellulaire est donc controversé et pourrait varier (augmentation/diminution) d'une espèce algale à une autre.

En conclusion, ce chapitre nous permet de montrer que la toxicité du cuivre est bien connue envers des algues unicellulaires. Les effets du cuivre sont supposés résulter des dommages engendrés par les ERO induite par cet oxydant (mécanisme d'action). La mesure de l'activité photosynthétique est un paramètre d'effet précoce (5h-CE50 > 24h CE50 mesuré lors d'autres bioessais). Néanmoins, la mesure du taux de croissance est plus sensible (Wilde *et al.*, 2006). En effet, Girling *et al.* (2000) ont calculé à partir du rendement de la photosynthèse une CE10 de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  alors que la CE10 calculée à partir d'un test statique de l'inhibition de la croissance est de 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 1.2.2. Exposition et effet du tritium

Le tritium est un élément radioactif d'une période de 12,3 ans. Lors de la désintégration de cet élément en hélium, un électron est libéré (énergie cinétique moyenne = 5,7 keV) ainsi qu'un antineutrino électronique de faible énergie. Le tritium est donc un émetteur  $\beta^-$ . L'activité massique du tritium est de  $3,59 \times 10^{14}$  Bq  $\text{g}^{-1}$ . Cet élément est composé d'un proton et de 3 neutrons et sa masse molaire est de 3,0160492  $\text{g mol}^{-1}$ . Étant un isotope de l'hydrogène (au même titre que le deutérium), le tritium suivra chez les organismes les mêmes voies de transport, métabolisation,...que le tritium. La différence de masse molaire entre l'hydrogène et le tritium va induire cependant un ralentissement des transports par rapport à l'hydrogène (effet isotopique). En effet, le flux d'entrée du tritium dans des cellules

algales (*Chlorella perenoidosa*) sera inférieur de 1/3 à 1/2 par rapport à celui de l'hydrogène (Weinberger et Porter, 1953).

En ce qui concerne l'effet du tritium, celui-ci s'assimile à l'effet de radiations. En effet, contrairement à d'autres radioéléments dont la toxicité est double (radiotoxicité et chimiotoxicité notamment dans le cas de métaux comme l'uranium), la toxicité du tritium est uniquement due à sa radiotoxicité. La toxicité du tritium résulte ainsi de l'ionisation directe des molécules induite par le rayonnement émis ou provient indirectement de la production d'un stress oxydatif engendrant des dysfonctionnements cellulaires. Ces effets directs et indirects des radiations vont dépendre en premier lieu de la dose déposée dans l'organisme.

### **1.2.2.1. Métabolisation, internalisation et dose déposée**

Dans l'environnement, deux types de molécule tritiée sont naturellement rencontrée : l'oxyde de tritium (TO) et l'eau tritiée (HTO). Dans les effluents liquides de CNPE le tritium est rejeté sous forme d'oxyde de tritium (TO ; Higuchi *et al.*, 1980). Cette forme chimique est rapidement transformée dans les milieux aquatiques en eau tritiée (HTO). Au niveau des organismes, HTO sera incorporé dans les cellules. Cette HTO internalisée dans les tissus et les cellules sera nommée « tissue free-water tritium » ou eau libre tritiée (TFWT ; Figure 13). Un rapide équilibre entre HTO et l'eau tritiée libre dans les cellules est d'ailleurs observé (Spencer *et al.*, 1988 ; Amano *et al.*, 1995 ; McCubbin *et al.*, 2001). Dans un second temps, cette eau libre pourra être métabolisée en matière organique (Belot, 1986 ; Vichot *et al.*, 2008). Parmi ce tritium organique, une distinction opérationnelle est faite entre :

- le tritium organique échangeable (par exemple lié aux atomes d'hydrogène, d'azote et de soufre...),
- le tritium organique non échangeable (lié notamment par liaison covalente aux atomes de carbone).

Le terme OBT pour « Organic Bound Tritium » a été utilisé aussi bien pour parler de la totalité du tritium organique, ou de manière plus restrictive uniquement pour décrire la fraction non échangeable du tritium organique. Néanmoins, dans un souci de clarté, nous utiliserons le terme tritium organique pour parler des fractions échangeable et non échangeable additionnées et le terme OBT uniquement dans le cas du tritium organique non échangeable (Pointurier *et al.*, 2004).

En ce qui concerne le taux de métabolisation de TWFT en tritium organique, celui-ci est différent d'une espèce végétale à une autre (Amano *et al.*, 1995). Lors de cette métabolisation,

le facteur isotopique n'est pas toujours conservé avec des concentrations de tritium observées au niveau de l'ADN (rapport tritium/hydrogène = 1,917 ; Baumgartner et Kim, 2000). La métabolisation du tritium en tritium organique va varier de 84% à 38% chez des cellules bactériennes photosynthétiques en fonction de leur état physiologique (respectivement photosynthèse et respiration ; Inomata et Higuchi, 1982). Des résultats similaires ont été mesurés chez le blé (incorporation de l'ordre de la moitié de celle qui était mesurée lors d'exposition à la lumière ; Diabaté et Strack, 1997). Ce résultat semble indiquer que dans le cas du blé des métabolismes indépendants de la lumière entrent en jeu. Chez d'autres végétaux (algues unicellulaires), un meilleur rendement d'incorporation a été mesuré à la lumière qu'à l'obscurité (Bonotto *et al.*, 1984) ce qui indique que la voie principale d'incorporation du tritium organique est la photosynthèse (Belot, 1986 ; Figure 13).

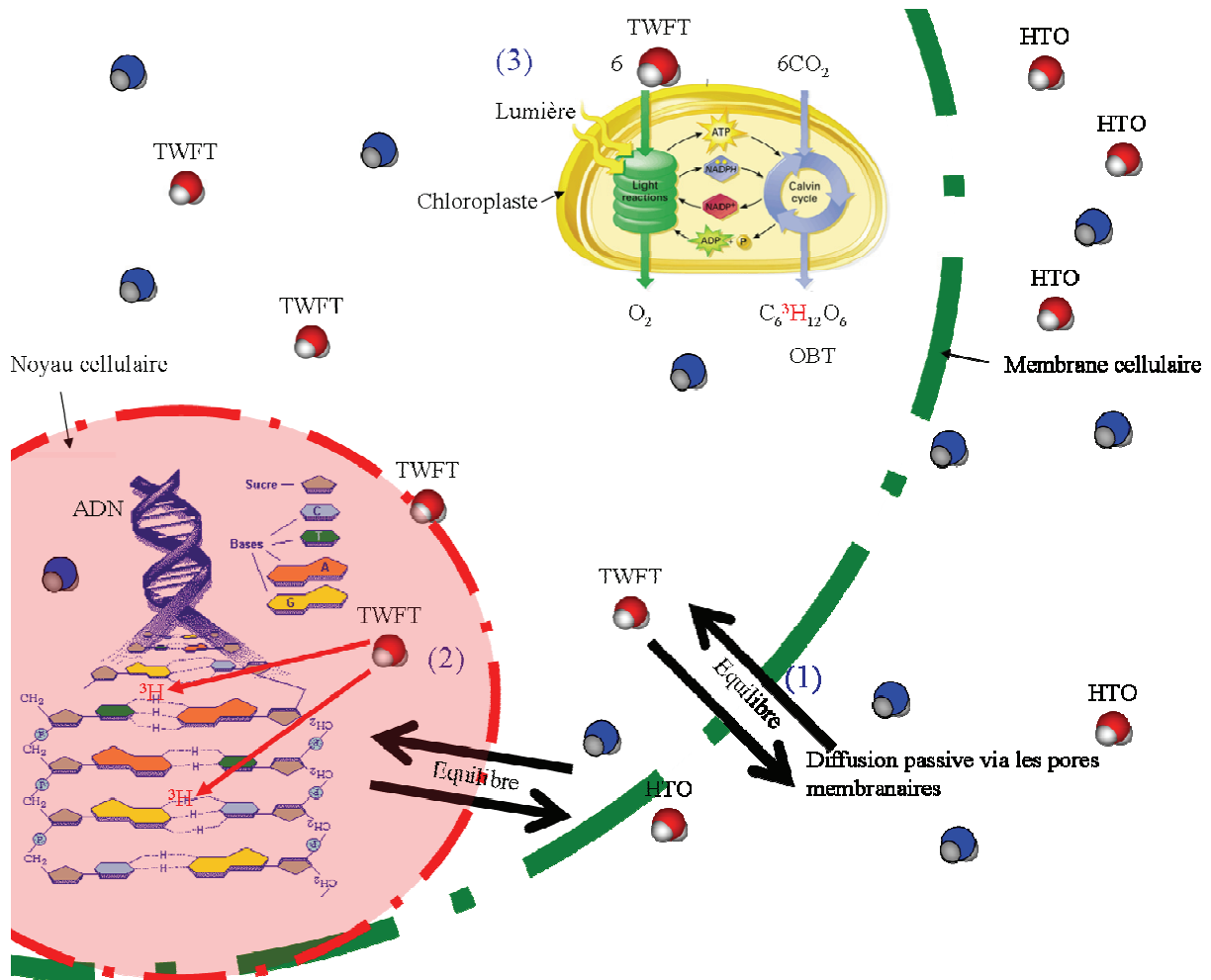


Figure 13: Internalisation et métabolisation théorique d'HTO dans une cellule végétale d'après (1) Spencer *et al.*, 1988 ; Amano *et al.*, 1995 ; McCubbin *et al.*, 2001 (2) Inomata et Higuchi, 1982 ; Baumgartner et Kim, 2000 ; Baumgärtner et Donhaerl, 2004 (3) Bonotto *et al.*, 1984 ; Belot, 1986 ; Diabaté et Strack, 1997.

Cette accumulation de tritium sous forme de tritium organique chez les organismes aura un effet non négligeable sur la dose reçue comme cela a été mesuré chez le poisson (Galeriu *et al.*, 2005). En effet, dans le cas d'exposition d'organismes à des radiations par contamination, ceux-ci vont recevoir une dose de radiation provenant du milieu d'exposition (dose externe) mais également une dose provenant de la quantité de substance internalisée dans l'organisme (dose interne). Cette dose interne proviendra alors de l'eau libre des cellules mais également du tritium organique. Cette dose sera augmentée dès lors qu'il y aura métabolisation du tritium sous forme organique. Cette métabolisation du tritium sous forme organique n'est plus à démontrer dans le cas d'organismes photosynthétiques comme nous venons de le présenter. Cependant, ce taux de métabolisation varie en fonction de l'espèce exposée au tritium. De ce fait, et afin de mieux estimer la dose reçue par les cellules algales (*Chlamydomonas reinhardtii*) lors des expositions qui seront réalisées, le taux de métabolisation de notre modèle biologique devra être connu et mesuré.

#### **1.2.2.2. Stress oxydatif**

##### **Généralités**

Les radiations reçues par les organismes lors d'exposition à des radionucléides vont agir directement sur le potentiel redox du milieu et peuvent endommager les systèmes antioxydants des cellules de façon directe (Figure 14). La voie principale de formation de ces ERO suite à une irradiation sera cependant induite par la radiolyse de l'eau (Figure 15). En effet, plus de 80% de l'énergie déposée dans les cellules par les rayonnements ionisants va induire l'éjection d'un électron de la molécule d'eau ; Bensasson *et al.*, 1993). Tous ces phénomènes auront comme conséquences de faire augmenter le taux d'ERO intracellulaire (Figure 14). Si le stress oxydatif est trop important, la cellule sera endommagée par les ERO (altération membranaire, dysfonctionnement enzymatique, altération de l'ADN, ...). De plus, les rayonnements ont potentiellement une action directe sur les sites biologiques actifs des cellules (Wada *et al.*, 1998 ; Figure 14).

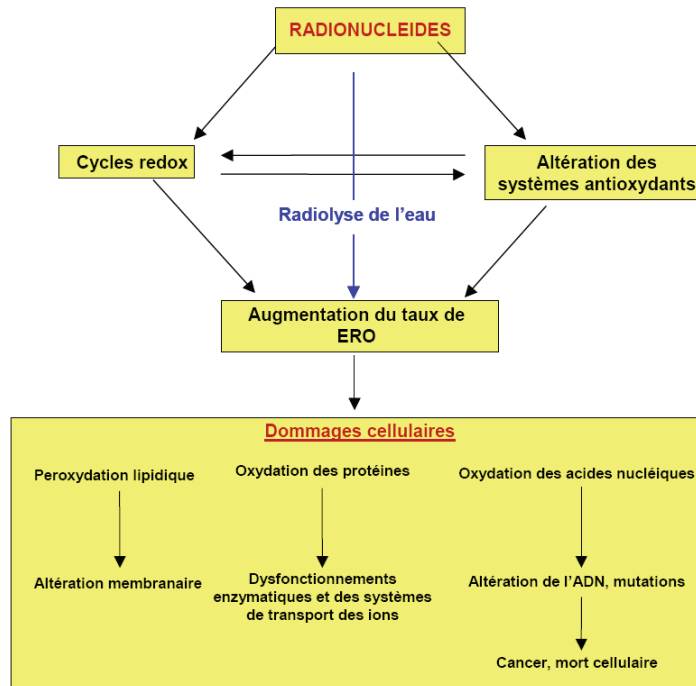


Figure 14 : Mécanismes potentiels d'induction du stress oxydant par les radionucléides (d'après Bensasson et al., 1993 ; Strid et al., 1994 ; Wada et al., 1998)

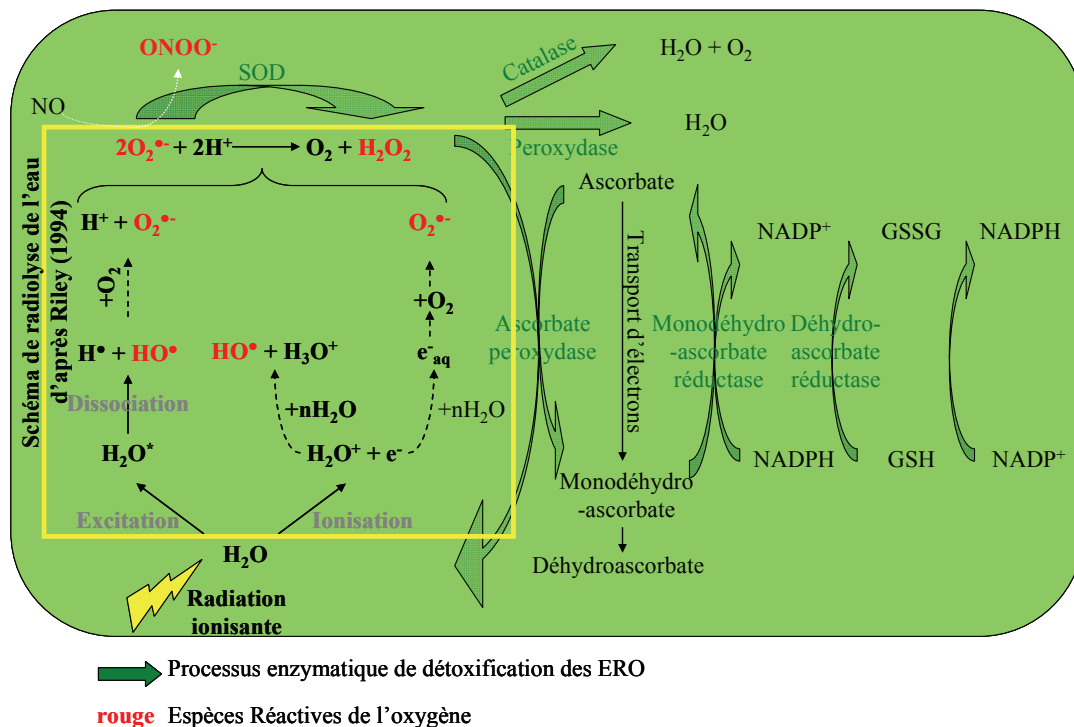


Figure 15 : Action des rayonnements sur un organisme végétal et mécanismes de détoxification des ERO générés, d'après Wada et al., 1998. (Par soucis de clarté, la réaction de Fenton n'est pas représentée ici mais aura lieu comme présenté sur la Figure 10)



Dans le cas d'exposition de cellules cyanobactériennes à de brèves irradiations par des UV, la production d'ERO est significative dès 15 min (He et Hader, 2002a). La production d'ERO par les cellules est le plus souvent considérée comme une source de dommage pour l'intégrité cellulaire même si la cellule est capable de détoxifier en partie ces ERO. Cependant, une autre hypothèse a vu le jour ces dernières années. En effet, certains résultats semblent démontrer que les ERO, du moins en quantité ne dépassant pas les capacités antioxydantes des cellules, pourraient agir dans les cellules en tant que médiateur d'un stress. Ceci permettrait ainsi aux cellules de mettre en place le système antioxydant dès une faible production d'ERO ou bien de déclencher différents processus cellulaires. En effet, Leach *et al.* (2001) ont mis en évidence une transmission et une amplification d'un signal induit par une production d'ERO par des rayonnements  $\gamma$  et ce entre mitochondries. Cette mesure fait suite à une irradiation faible dose (1-10 Gy) de cellules cancéreuses.

#### **Le cas du tritium**

Bien que l'induction d'un stress oxydant soit bien documentée lors de l'exposition de cellules à des radiations, quasiment aucune donnée relative à l'effet du tritium sur ce paramètre d'effet n'est disponible dans la littérature. A notre connaissance, seule une étude sur des organismes vertébrés supérieurs (rat) a permis de montrer une augmentation du stress oxydatif (enzyme G<sub>6</sub>PDH) lors de contamination interne via l'eau de boisson à 9,27 Bq mL<sup>-1</sup> (4,2 Gy ; Savu *et al.*, 1999).

#### **1.2.2.3.**

#### **Autres effets du tritium et des radiations**

#### **Chez les végétaux**

Peu d'études sont disponibles quant à la toxicité chronique d'HTO sur des paramètres tel que la croissance ou de l'activité photosynthétique. Chez des organismes végétaux, 1 850 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO n'auront pas d'effet sur la germination de céréales (blé, orge ; Papageorgakopoulou *et al.*, 1998). Sur l'algue verte unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa*, l'HTO (185 000 kBq mL<sup>-1</sup>) induit une réduction du taux de croissance de façon dose dépendante. Le diamètre des cellules est également impacté et augmente lors d'une exposition à 1 480 000 kBq mL<sup>-1</sup> (Porter et Knauss, 1953). Concernant l'effet des radiations sur l'activité des photosystèmes, Kim *et al.* (2005) ont mis en évidence chez le poivron rouge une réduction de cette activité après 1 jour d'exposition à une dose de 2 Gy.

### Chez les animaux

D'autres études réalisées sur invertébrés ont enregistré les effets de l'HTO sur différents critères tels que la survie des organismes, la reproduction, la structure des cellules et des tissus et les dommages à l'ADN. Sur la daphnie (*Daphnia magna*), l'HTO n'a pas d'effet toxique aiguë (après 72h d'exposition). Mais lors d'exposition de ces organismes durant cinq générations, 0,5 Bq mL<sup>-1</sup> d'HTO induisent le développement d'œufs anormaux ainsi qu'une forte réduction de la fécondité additionné d'un raccourcissement de la durée de vie des individus (Gudkov et Kipnis, 1996). Des anomalies histologiques au niveau du tractus digestif de l'escargot (*Pila luzonica*) ont été mesurées lors d'expositions supérieures à 370 Bq mL<sup>-1</sup> d'HTO (Cruz-Ramos et Carino, 1989). Sur *Pollicipes polymerus* (barnacle), Abbott (1979) a observé un effet sur l'« index de mue » (pourcentage de larve qui ont mué au moins une fois) après 32 jours d'exposition à 0,26 Bq mL<sup>-1</sup>. La relation dose réponse entre la concentration en HTO et la diminution du pourcentage de mue est exponentielle pour des expositions de 0,26 à 37 000 Bq mL<sup>-1</sup>. Enfin, une étude plus récente sur la larve de moule (*Mytilus edulis*) a montré un effet dose dépendant de l'HTO (à partir de 370 Bq mL<sup>-1</sup>) sur le développement anormal des individus, ainsi que sur l'augmentation de la mortalité. Des dommages cytogéniques ont également été mesurés lors d'exposition à des concentrations d'HTO supérieure à 3 700 Bq mL<sup>-1</sup> (Hagger *et al.*, 2005). Sur les adultes de *Mytilus edulis*, 3 700 Bq mL<sup>-1</sup> d'HTO ont des effets cytogéniques et cytotoxique (induction de micronoyaux, cassure simple brin de l'ADN). Cette toxicité est dose dépendante (Jha *et al.*, 2005).

En conclusion, l'effet du tritium n'est que peu documenté en particulier sur les végétaux. Avant de mesurer sa toxicité en mélange, une étude de l'effet de ce radionucléide devra donc être entreprise.

### 1.3. OBJECTIFS SPECIFIQUES

---

Les rejets de CNPE sous forme liquide sont constitués d'un mélange de substances stables et radioactives. Peu de données toxicologiques sont disponibles concernant le tritium. Or actuellement et dans un futur proche les rejets en tritium vont augmenter (démantèlement des CNPE, cycle du combustible allongé induisant des rejets en tritium supérieurs, construction du futur réacteur ITER qui rejettera de plus grande quantité de tritium que les CNPE actuels...). Parmi les rejets de substances stables, c'est le cuivre, dont la toxicité et les masses rejetées sont supérieures à ceux des autres substances caractéristiques de ces rejets liquides, qui présente un intérêt. La toxicité des substances en mélange est bien documentée dans le cas de mélanges de substances stables. Cependant, peu d'informations sont disponibles dans le cas de mélanges de substances radioactives et stables.

Dans ce contexte l'objectif spécifique de cette étude a été de déterminer l'effet du mélange HTO/Cu envers un organisme aquatique (*Chlamydomonas reinhardtii*) représentatif des écosystèmes aquatiques dans lesquels les rejets sous forme liquide ont lieu. La recherche de ces effets en mélange a été effectuée lors d'expositions à des mélanges simultanés ou suite à une pré-exposition des cellules au cuivre afin de reproduire les scénarios environnementaux d'expositions connus : à savoir une pollution chronique des milieux aquatiques par le cuivre et des rejets ponctuels en eau tritiée par les CNPE. L'étude du mélange a porté sur deux points majeurs :

- l'influence du tritium sur l'entrée du cuivre dans les cellules afin de mettre en évidence un éventuel effet au niveau de l'entrée des composés,
- la mesure des effets aux niveaux de la production d'ERO et du taux de croissance, l'étude de deux paramètres en parallèle permettant de comparer leur sensibilité.

Néanmoins, avant de mener à bien cet objectif, une mise au point expérimentale a été nécessaire afin de mesurer les ERO (évolution dans le temps) chez notre modèle biologique. Afin de déterminer d'éventuelles interactions, il a été également nécessaire de compléter les données présentes dans la littérature afin de mieux connaître la toxicité de l'eau tritiée seule (taux de métabolisation du tritium sous forme organique, effets sur le taux de croissance, effet sur l'activité des photosystèmes ou bien encore effets sur la production d'un stress oxydant). De plus, les effets de l'HTO sur la production d'ERO seront comparés avec ceux induits par des débits de dose  $\gamma$  constants.

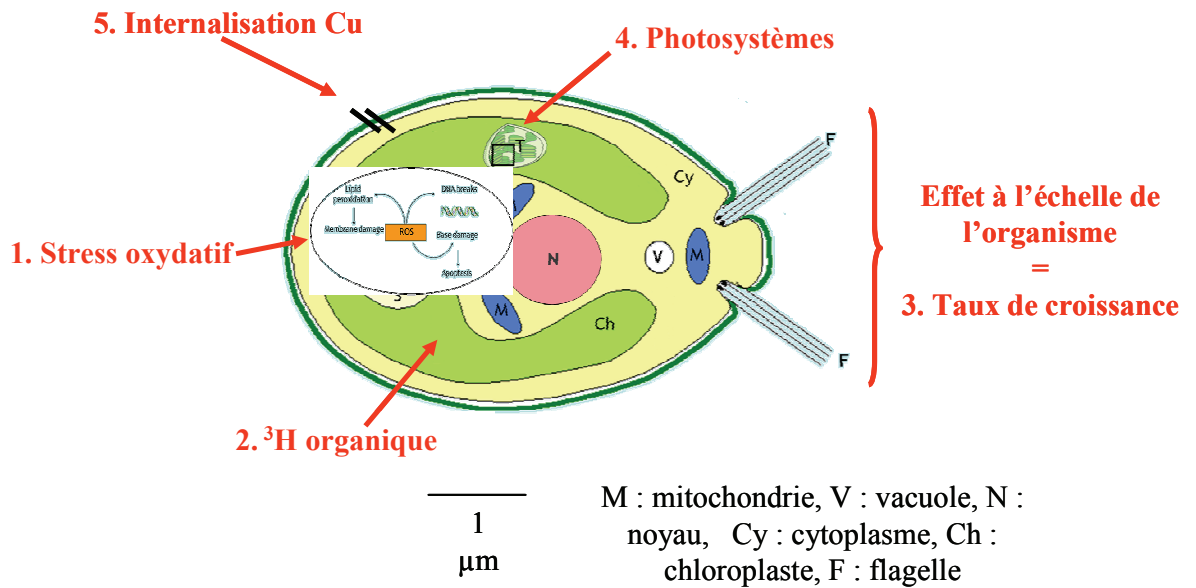


Figure 16 : Niveau d'effet mesuré dans cette étude

L'ensemble de ces données est présentée dans 4 parties distinctes regroupées dans le chapitre « Résultats ». La première partie reprend les mises au point concernant la mesure des ERO. La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée à la détermination du taux de métabolisation de l'eau tritiée (2 ; Figure 16) nécessaire à une évaluation précise des débits de dose reçue. Cette partie présente également les effets mesurés de l'HTO (effet sur la croissance (3 ; Figure 16), effet sur les photosystèmes (4 ; Figure 16), effet sur la production d'ERO (1 ; Figure 16) envers *Chlamydomonas reinhardtii*. Les deux dernières parties regroupent l'ensemble des données relatives aux effets du mélange HTO/Cu, avec, dans un premier temps les effets mesurés au niveau de l'entrée du cuivre dans la cellule (5 ; Figure 16) et, dans un second temps les effets mesurés sur la production d'ERO et sur le taux de croissance.



## **2. MATERIELS ET METHODES**



## 2.1. MODELE BIOLOGIQUE, CONDITIONS DE CULTURE, ET MATERIELS UTILISES

---

### 2.1.1. Culture de *Chlamydomonas reinhardtii*

#### 2.1.1.1. Culture mère

Afin d'avoir toujours à disposition une culture d'algue axénique en état de croissance exponentielle, une culture mère de *Chlamydomonas reinhardtii* est maintenue en division. La souche de départ utilisée (11/32B) provient de « Culture Collection of Algae and Protozoa » (Cumbria, UK) sous forme liquide. Après dilution, la culture est maintenue sous illumination constante ( $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) apportée par une lumière blanche permettant la photosynthèse (Sylvania® GroLux F 36W) dans un incubateur (Innova 44 R orbital shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). La température est maintenue à  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  et les récipients sont agités (100 rpm). Chaque semaine, une nouvelle génération est créée par ensemencement de 1 mL de la culture de la semaine précédente dans 100 mL de milieu de culture frais en conditions stériles. Ce type de repiquage est effectué jusqu'à la génération 14. Lorsque cette génération est atteinte, une nouvelle culture est initiée à partir d'une culture sur gélose. Cette culture sur gélose a été réalisée par ensemencement de la solution mère d'algues (génération 2 ou 3) sur de l'agar (milieu HSM additionné de  $8 \text{ g L}^{-1}$  d'agar SIGMA pour plantes). Les algues sont ensuite laissées à croître avant d'être conservées à  $4^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Ceci permet de garantir l'intégrité de la souche. Les cultures ne sont jamais utilisées à des fins expérimentales avant d'avoir atteint la 4<sup>ème</sup> génération.

#### 2.1.1.2. Culture pour les mesures expérimentales

Dans un premier temps, les algues sont repiquées dans un milieu de culture frais environ 72 h avant le début des expériences. Le jour de l'expérience, les algues sont centrifugées durant 15 min à 3 500 g. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du milieu d'exposition (concentration résiduelle en EDTA estimée par calcul à  $1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ ; cette concentration résiduelle maximale est considérée sans effet sur la spéciation du cuivre du fait de la différence d'ordre de grandeur, le cuivre étant présent au minimum à  $28 \text{ nmol L}^{-1}$ ).



## 2.1.2. Milieux utilisés

### 2.1.2.1. HSM

Le milieu de culture utilisé est un milieu inorganique défini par Harris (1989) se nommant High Salt Medium (HSM). La préparation de ce milieu se fait par dilution de deux solutions concentrées d'éléments nutritif dans de l'eau UHQ (>18 MΩ cm) : Beijerink (5 mL L<sup>-1</sup>) et Phosphates (25 mL L<sup>-1</sup>) dont les compositions sont reportées dans le Tableau 9.

Tableau 9: Composition des solutions concentrées constituant le milieu de culture HSM

Solutions Stock	Éléments	Concentrations
Phosphates	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,6 g L <sup>-1</sup>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57,6 g L <sup>-1</sup>
Beijerink	NH <sub>4</sub> Cl	100 g L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4 g L <sup>-1</sup>
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2 g L <sup>-1</sup>
AAP	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186 mg L <sup>-1</sup>
	Solution de Mn (10 g L <sup>-1</sup> )	115 mg L <sup>-1</sup>
	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	160 mg L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> EDTA, 2H <sub>2</sub> O	300 mg L <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	7 mg L <sup>-1</sup>
	Solution de Co (1 g L <sup>-1</sup> )	0,64 mg L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	7,26 mg L <sup>-1</sup>
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,018 mg L <sup>-1</sup>

Après autoclavage de cette solution, 1 mL L<sup>-1</sup> d'une solution de métaux traces (stérilisée par filtration) est ajoutée (AAP : Tableau 9). Le volume est ensuite complété avec de l'eau UHQ également autoclavée. La composition finale obtenue est reportée Tableau 10. Le pH du milieu final est de 6,8. Le milieu est tamponné grâce à la présence des phosphates.

Tableau 10: Composition des milieux de culture HSM et HSM<sub>mod</sub> en mol L<sup>-1</sup>

Composés (mol L <sup>-1</sup> )	Milieu de culture	
	HSM	HSM <sub>mod</sub> (seules les concentrations modifiées sont reportées)
NH <sub>4</sub>	9,3 x 10 <sup>-3</sup>	
Cl	9,5 x 10 <sup>-3</sup>	
Mg	8,1 x 10 <sup>-5</sup>	
SO <sub>4</sub>	8,1 x 10 <sup>-5</sup>	
Ca	6,8 x 10 <sup>-5</sup>	
K	2,2 x 10 <sup>-2</sup>	
PO <sub>4</sub>	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	1,4 x 10 <sup>-3</sup>
Na	1,3 x 10 <sup>-6</sup>	-
EDTA	6,6 x 10 <sup>-7</sup>	-
Zn	2,4 x 10 <sup>-8</sup>	
BO <sub>3</sub>	3,0 x 10 <sup>-6</sup>	
Mn	2,1 x 10 <sup>-6</sup>	
Fe	5,9 x 10 <sup>-7</sup>	5,9 x 10 <sup>-8</sup>
Co	1,1 x 10 <sup>-8</sup>	
Cu	7,0 x 10 <sup>-11</sup>	0
Mo	3,0 x 10 <sup>-8</sup>	

#### 2.1.2.2. HSM<sub>mod</sub>

Afin d'augmenter la biodisponibilité du cuivre, un milieu d'exposition différent a été utilisé lors des expérimentations : HSM<sub>mod</sub> contient 10 fois moins de fer et de phosphates que le milieu HSM et pas d'EDTA ni de cuivre (niveau résiduel dû aux contaminations ; 28 nmol L<sup>-1</sup>). Les modifications apportées l'ont été sur la base de calcul de spéciation réalisé à l'aide du code de spéciation géochimique JChess (Java Chemical Speciation Equilibrium Speciation with Surfaces ; Van der Lee, 1998) et d'une base de données thermodynamiques compilées (OECD-NEA, 1996). Ce logiciel nous a permis de mettre en évidence la complexation du cuivre libre par les phosphates et par l'EDTA (Tableau 10). Cette absence d'EDTA dans le milieu est en effet préconisé dans certains protocoles standardisés utilisés pour mesurer la toxicité de substances métalliques (ex : CEAEQ, 2005). En effet, la présence d'EDTA

pourrait interagir avec les membranes cellulaires et induire des modifications de l'internalisation des substances dans les cellules. Cependant, la contrepartie de ce choix est qu'il peut induire la formation d'un précipité de fer même dans le cas d'une concentration en fer réduite. Ce précipité pourrait induire une plus faible proportion de cuivre libre dans les milieux d'exposition, réduisant ainsi la toxicité apparente de cette substance. Néanmoins, l'objectif ici est de mesurer le flux d'internalisation du cuivre lors d'exposition de cellule à un mélange cuivre/HTO ou à l'exposition au cuivre seul. Cette comparaison sera réalisable même dans le cas de la formation d'un précipité de cuivre.

La réalisation de ce milieu est faite à partir des solutions de Beijerink (5 mL L<sup>-1</sup>), phosphates (2,5 mL L<sup>-1</sup>) et d'une solution d'AAP<sub>mod</sub> (sans fer ni Cu ni EDTA). Comme pour le milieu de culture HSM, les AAP<sub>mod</sub> sont ajoutés après autoclave en même temps que le fer (solution réalisée le jour même). Du cuivre est également ajouté en fonction des besoins expérimentaux. Le milieu est laissé à équilibrer durant 1h. L'utilisation de ce milieu, permet d'augmenter par 8 la concentration en cuivre libre (Cu<sup>2+</sup>) par rapport au milieu HSM classique (Figure 17).

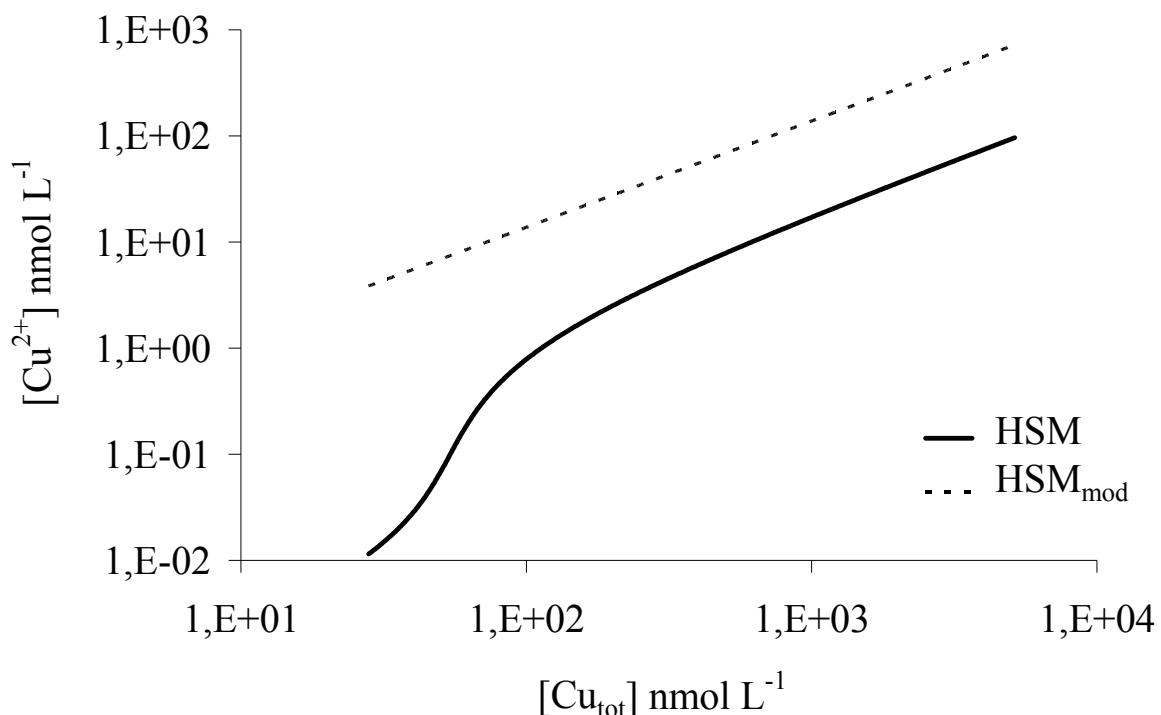


Figure 17: Cuivre libre (Cu<sup>2+</sup>) dans les milieux HSM et HSM<sub>mod</sub> calculé avec le logiciel JChess en fonction de la concentration en cuivre total (Cu<sub>tot</sub>).

### 2.1.3. Récipients utilisés

Les expérimentations ont été réalisées dans des récipients en polycarbonate car de nombreuses études ont montré que les récipients en verre avaient la capacité de fixer les métaux. En effet, le polycarbonate fixe dans une moindre mesure les éléments métalliques (Twiss *et al.*, 2001). De plus, ces récipients ainsi que tout le matériel servant au cours des manipulations ont subi les traitements suivant :

- un lavage à l'eau UHQ
- 24h d'acide nitrique à 10% (v/v)
- 5 rinçages successifs à l'eau déminéralisée
- 2 rinçages successifs à l'eau UHQ
- séchage sous hotte à flux laminaire stérile.

## 2.2. CARACTERISATION DES EXPOSITIONS DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (HTO, CUIVRE ET RADIATIONS $\gamma$ )

---

Pour répondre aux objectifs spécifiques de cette étude, les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposées à deux contaminants et à des rayonnements  $\gamma$  :

- HTO : l'exposition des cellules à l'HTO a été réalisée à l'aide d'une solution d'eau tritiée (HTO) d'une activité moyenne de  $3,7 \times 10^7$  Bq mL<sup>-1</sup> (Perkin-Elmer). La limite d'activité manipulable en zone surveillée sous hotte ventilée est de  $3,5 \times 10^7$  Bq.
- cuivre : pour les expositions des cellules au cuivre, une solution stock à 157 mmol L<sup>-1</sup> a été utilisée (CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O, MERCK proanalysis, 99%)
- rayonnements  $\gamma$  : pour cette irradiation une source de <sup>137</sup>Cs-<sup>137m</sup>Ba (CERCA 72652) d'une activité de  $2,3 \times 10^7$  Bq g<sup>-1</sup> a été utilisée. La limite d'activité manipulable en zone surveillée sous hotte ventilée est de  $1,2 \times 10^7$  Bq.

Étant donné les nombreuses concentrations d'exposition testées afin de mesurer les différents paramètres d'effet, les concentrations d'exposition ne sont pas reportées dans cette partie. Seuls les protocoles généraux sont détaillés. En effet, par souci de clarté, les concentrations d'exposition exactes figurent dans le chapitre 3 « résultats » en amont de la présentation des résultats obtenus.

### 2.2.1. Dosage de l'HTO et du cuivre dans les différentes matrices

#### 2.2.1.1. Préparations des échantillons et dosage du tritium en scintillation liquide

##### Dosage de l'HTO

Afin de doser l'HTO, 0,1 à 1 mL du milieu d'exposition sont déposés dans des flacons à scintillation en verre. Afin de mesurer très précisément le volume déposé, une pesée est réalisée (avant et après ajout du milieu dans le flacon à scintillation). 18 mL de liquide

scintillant (l'Ultima Gold™ XR, Perkin) sont ensuite ajoutés (Figure 18). La quantité de rayonnement émise est mesurée grâce à un spectromètre à faible bruit de fond (Quantulus 1220). La limite de détection de cet appareil est de 40 mBq par flacon pour le tritium. Une courbe d'étalonnage permettra de déterminer l'activité exacte du radioélément dans le milieu (courbe réalisée à partir d'une source certifiée de tritium). Si cela est nécessaire une correction de la mesure est effectuée afin de passer outre le quenching chimique, le quenching étant l'atténuation physico-chimique de l'efficacité du signal lumineux.

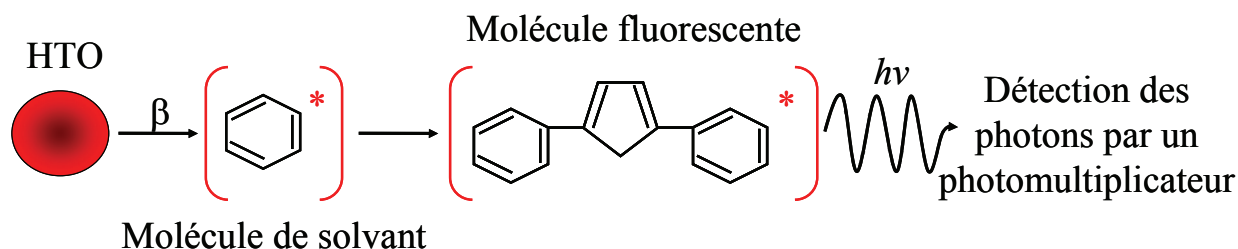


Figure 18: Action des rayonnements sur le liquide scintillant et dosage de l'HTO en scintillation liquide

### Dosage du tritium organique

Des algues ( $d_{\text{initiale}} = 10\,000$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ) sont exposées dans du milieu  $\text{HSM}_{\text{mod}}$  à des concentrations croissantes en HTO. Les cultures sont maintenues pendant 48 à 72h en condition de croissance ( $24^\circ\text{C}$ ,  $\sim 34\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ; 100 rpm). A la fin de l'incubation, 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture sont prélevés afin de déterminer la densité cellulaire (Beckmann Coulter Z2 particle counter ; Beckman Coulter). Le reste de la culture est alors centrifugé (3 000 g, 15 min) afin d'obtenir un culot d'algue. Les culots sont resuspendus dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau UHQ puis sont transférés en totalité dans des flacons à scintillation liquide. 50  $\mu\text{L}$  sont utilisés afin de déterminer la densité cellulaire. Le volume exact restant de cette suspension est déterminé par pesée. Les flacons à scintillation contenant les algues sont ensuite séchés sur bain de sable à  $40^\circ\text{C}$  (24h). Le protocole de séchage sur bain de sable n'ayant été que peu utilisé une expérience parallèle a été réalisée en lyophilisant les cellules selon le protocole d'Inomata et Higuchi (1982) afin de comparer les résultats obtenus. Le protocole est le même que précédemment en ce qui concerne l'exposition des cellules et leur concentration dans un flacon à scintillation. Seule l'étape de séchage est remplacé par 20h de lyophilisation à  $-60^\circ\text{C}$  et  $10^{-3}$  torr.

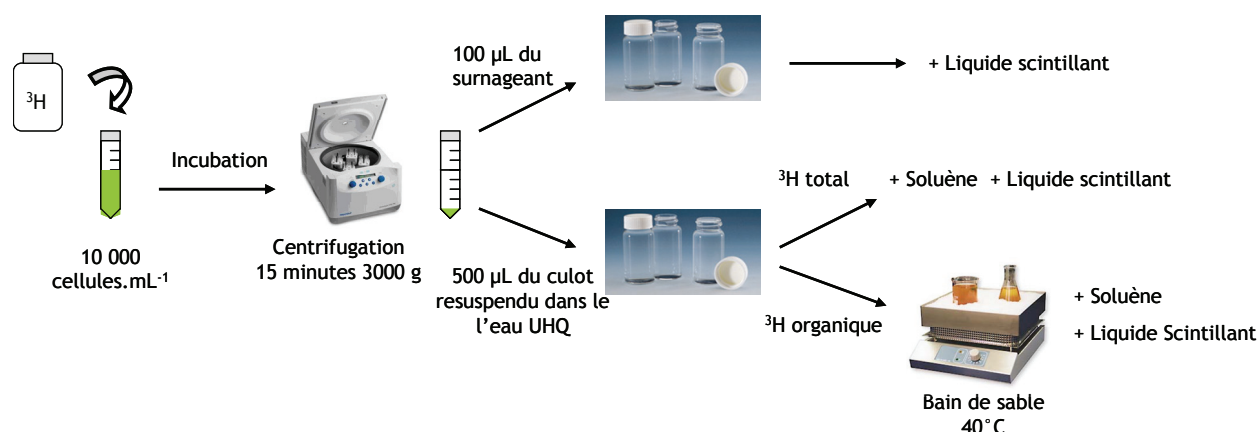


Figure 19: Protocole d'exposition et de dosage du tritium organique dans les cellules algales

1 mL de Soluène-350® (Perkin-Elmer) est ajouté à la matière algale sèche afin de la solubiliser dans une solution compatible avec le liquide de scintillation. Ce traitement est réalisé à température ambiante durant 24h. Du liquide scintillant est ensuite ajouté et la lecture est effectuée. Une correction peut être nécessaire afin de passer outre le quenching couleur (couleur résultant de la concentration algale importante). Cette correction est effectuée à l'aide d'une courbe d'étalonnage reliant l'atténuation du signal en fonction de la couleur. De plus, les échantillons dont l'activité dépasserait  $3\,000 \text{ Bq}$  par flacon sont dilués dans de l'eau UHQ afin de permettre un meilleur comptage. Cette dilution est réalisée avant l'ajout du liquide scintillant (estimation des dilutions à partir des conditions d'exposition théoriques).

Les résultats bruts obtenus des dosages de  $^3\text{H}$  sont exprimés en Becquerel (Bq) par flacon. Ces résultats sont convertis en  $\text{Bq mL}^{-1}$  à partir des volumes exacts de solution dosés (pesée). Pour les flacons contenant les algues, la conversion prend en compte le poids sec des algues et/ou leur volume afin d'exprimer les résultats en  $\text{Bq } \mu\text{m}^3$  ou en  $\text{Bq mg}^{-1} \text{ sec}$  d'algue.

Enfin, afin de pouvoir convertir la concentration en tritium organique mesurée par volume de cellule en g de cellules sec, une gamme étalon a été réalisée reliant ces deux paramètres. Pour ceci, des algues (densité =  $[1,8 \pm 0,1] \times 10^6 \text{ cellules mL}^{-1}$ ; diamètre =  $5,518 \pm 0,006 \mu\text{m}$ ; volume =  $8,8 \times 10^{-14} \text{ dm}^3 \text{ cellules}^{-1}$ ) ont été centrifugées puis resuspendues dans de l'eau UHQ. Ensuite, une gamme de densité a été réalisée (toujours dans de l'eau UHQ) et  $200 \mu\text{L}$  de cellules ont été déposés dans des coupelles en aluminium. Ces coupelles ont été laissées à sécher dans une étuve à  $60^\circ\text{C}$  durant 48h. Les poids des coupelles ont été pesés à l'aide d'une microbalance. La gamme étalon obtenue est représentée sur la Figure 20. Une relation linéaire a ainsi été mesurée. Le facteur reliant ces paramètres est de  $1,15 \pm 0,05 \times 10^6 \text{ mg dm}^3$ . La densité des cellules algales est donc de  $1,15 \text{ mg L}^{-1}$ .

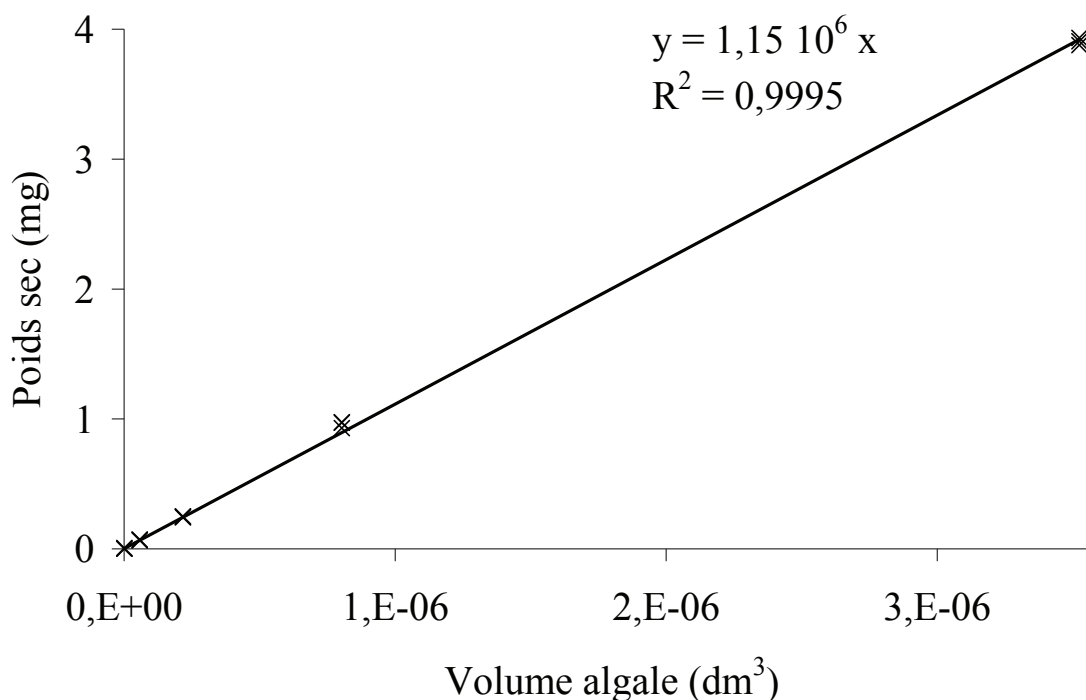


Figure 20: Poids sec des cellules en fonction de leur volume (gamme étalon)

#### 2.2.1.2.

#### Dosage du cuivre par absorption atomique

##### Cuivre dans le milieu d'exposition

10 mL des dilutions intermédiaires ou des milieux d'exposition sont prélevées pour le dosage de la concentration en cuivre total à  $t=0$ . Lorsque cela est possible (dosage du flux d'internalisation du cuivre, mesure de la croissance en Erlenmeyers), un dosage de la concentration dans le milieu à la fin de l'exposition est réalisé. C'est à partir de ces mesures du cuivre total que les concentrations en cuivre libre sont calculées avec le logiciel JChess (cf paragraphe 2.1.2.2).

Afin de doser le cuivre dans nos échantillons, ceux-ci sont acidifiés (0,2% m/v) avec du  $\text{HNO}_3$  de qualité analytique. Ces échantillons sont conservés à  $4^\circ\text{C}$  avant analyse par spectrométrie d'absorption atomique (graphite furnace ; GFAAS 4110-ZL, Perkin Elmer, Shelton, CI, USA). La limite de détection de cet appareil est de  $3,8 \text{ nmol L}^{-1}$  avec une limite de quantification mesurée à  $19,7 \text{ nmol L}^{-1}$ . Une gamme de calibration est réalisée avant chaque groupe de mesure. Les standards sont passés 3 fois avec un écart-type (SD) de  $\pm 1\%$ .



### Cuivre internalisé/adsorbé

Des algues sont resuspendues pour une durée de 24h dans du milieu HSM<sub>mod</sub> non additionné de cuivre. Cette phase permet une dépuración des cellules en cuivre (cette dépuración n'induit cependant pas de carence des cellules du fait de la contamination résiduelle en cuivre dans le milieu de 28 nmol L<sup>-1</sup>). Les cellules sont alors de nouveau centrifugées (15 min ; 3500 g) et resuspendues dans du milieu HSM<sub>mod</sub> (sans cuivre) à une densité de 2 000 000 cellules mL<sup>-1</sup>. 10 mL de cette suspension sont introduit dans des Erlenmeyer en polycarbonate de 50 mL. Différentes concentrations en cuivre sont alors ajoutées, en condition standard de culture. Après 40 min d'exposition, la densité cellulaire et le diamètre des cellules sont mesurés (n=4).

Pour déterminer l'entrée et l'adsorption du cuivre, un protocole dérivé de ceux de Knauer *et al.* (1997a) et Fortin *et al.* (2004) a été utilisé (Figure 21). Après exposition, les cellules sont collectées par filtration sur deux filtres en membranes superposées ayant des pores de 2 µm (pression de filtration <10 cm Hg ; poretics polycarbonate Advantec MFS, Inc). Les cellules sont rincées 4 fois avec 5 mL de milieu HSM<sub>mod</sub> sans cuivre. Afin de différencier le cuivre extracellulaire adsorbé sur les membranes de celui intracellulaire, les cellules sont rincées avec du milieu HSM<sub>mod</sub> contenant 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA (4 fois, 2 min, 5 mL). Le détail des résultats nous ayant conduit à utiliser ce rinçage est repris dans l'Annexe 1 (rinçage mis au point à partir des protocoles de Knauer *et al.* (1997a) et Fortin *et al.* (2004)). La fraction de cuivre adsorbé est mesurée par dosage de la solution de rinçage. Afin de déterminer la fraction intracellulaire, les deux membranes sont séparées et introduites dans 3 mL d'eau UHQ (à partir du filtre du dessous, la quantité de cuivre retenue par le filtre est déterminée et cette valeur est soustraite à celle obtenue pour le filtre supérieur recouvert d'algues). Le filtre est alors retiré et la densité et le diamètre cellulaire sont mesurés (Beckmann Coulter Z2 particle counter ; Beckman Coulter). Les résultats sont exprimés en concentration de cuivre par surface de cellules. Les échantillons sont pesés et 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) et 1 mL d'HNO<sub>3</sub> (65 %) sont ajoutés (minéralisation acide). Ces échantillons sont alors lentement évaporés sur bain de sable à 90°C. Le résidu minéralisé ainsi obtenu est dissout dans 5 mL d'HNO<sub>3</sub> à 0,2 % (m/v), avant analyse. La même procédure est également appliquée aux cellules algales à t=0 afin d'obtenir la concentration initiale en cuivre dans les cellules. Cette valeur est alors soustraite aux mesures réalisées après 40 min d'exposition au cuivre. Enfin, le même protocole a été appliqué après 96h d'exposition au cuivre.

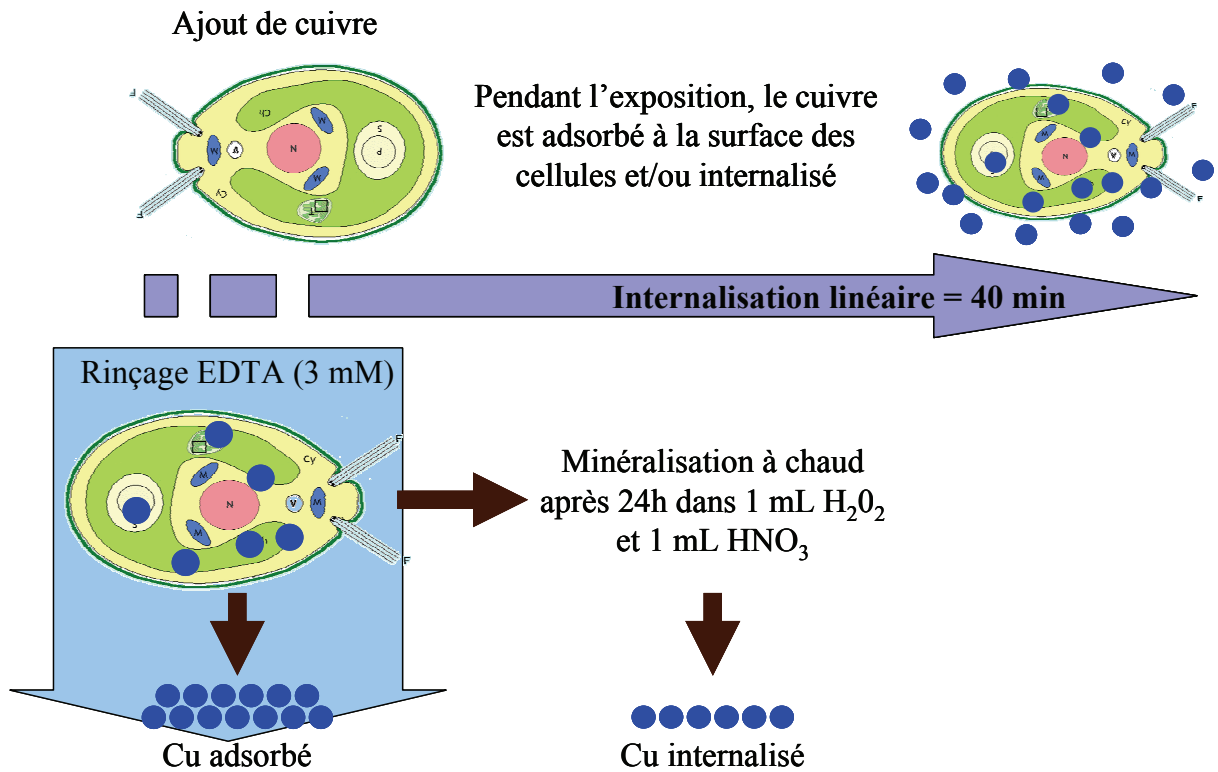


Figure 21: Protocole d'exposition et de dosage du cuivre adsorbé et du cuivre internalisé

A partir des résultats obtenus, le modèle de Michaelis-Menten à 3 paramètres a été ajusté aux données. L'entrée du cuivre est exprimée à partir des paramètres de l'Équation 5 :

Équation 5: Modèle mathématique de Michaelis-Menten

$$v_i = \frac{Cu_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

avec  $v_i$  le flux d'internalisation,  $Cu_{\max}$  le flux d'entrée maximal ( $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$ ),  $[S]$  la concentration en cuivre libre ( $\text{nmol L}^{-1}$ ) et  $K_m$  la constante de demi-saturation (différente pour l'entrée de chaque substance ;  $\text{nmol L}^{-1}$ ). Cette constante est spécifique à l'enzyme et à la substance internalisée. Cette valeur correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à  $\frac{1}{2}$  de la vitesse initiale maximale ( $Cu_{\max}/2$ ). Elle correspond à l'inverse de la constante d'affinité apparente.

### 2.2.2. Calcul de dose

Dans cette étude l'organisme dans lequel le dépôt d'énergie a lieu est une algue unicellulaire de faible taille. Celle-ci sera assimilée à un cylindre de rayon  $3,5 \mu\text{m}$  et de

hauteur  $1,53 \mu\text{m}$  pour un volume de  $59 \mu\text{m}^3$  (volume moyens estimés des cellules ; à noter que ce volume est une approximation étant donné que le volume des cellules peut varier au cours du cycle cellulaire).

#### **2.2.2.1. Débit de dose lors d'exposition à l'HTO : logiciel EDEN**

Afin de quantifier la dose interne provenant de l'HTO sous forme libre dans les cellules ou sous forme organique, différentes hypothèses ont été prises en compte. Tout d'abord le spectre d'HTO est considéré comme un spectre  $\beta$  pur d'une énergie maximale de 18,6 keV. Cette source est considérée comme étant répartie de façon homogène dans la solution. De plus, la concentration d'exposition externe est considérée comme étant à l'équilibre avec l'activité interne à l'algue. Le taux d'internalisation d'HTO sous forme de tritium organique est considéré comme étant nul. Le logiciel EDEN (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2006) obtient dans ces conditions un facteur de conversion (DCC) dose interne/activité d'exposition de  $3,29 \mu\text{Gy h}^{-1}$  par  $\text{Bq mL}^{-1}$  (Les calculs de dose ont été réalisés avec le logiciel EDEN en prenant en compte l'hypothèse de dépôt total de l'énergie).

Le calcul n'aboutit pas pour ce qui est de la dose externe. En effet, l'occurrence de dépôt d'énergie provenant d'une radiation  $\beta$  de faible énergie est très faible lorsque cette radiation est externe à un organisme de faible dimension, et le calcul de probabilité réalisé par le logiciel EDEN ne peut pas converger dans ce cas de figure. Ceci implique que la dose externe ne pourra pas être estimée. Néanmoins, cette dose externe étant considérée comme négligeable devant la dose interne dans le cas d'exposition d'organisme de faible taille (ex : algue unicellulaire) à des radiations  $\beta$  faiblement énergétique (cas du tritium), ceci n'induirait pas de biais majeur dans l'interprétation des niveaux d'exposition induisant un effet.

#### **2.2.2.2. Débit de dose lors d'exposition au $^{137}\text{Cs}$ - $^{137}\text{Ba}$ : logiciel MCNP-4C (magelis, 2009).**

Afin de reproduire un irradiateur capable de soumettre les cellules à un rayonnement  $\gamma$  continue tout en permettant une lecture de la production d'ERO au spectrofluorimètre, une source de  $^{137}\text{Cs}$ - $^{137\text{m}}\text{Ba}$  émettant des rayonnements  $\gamma$  a été introduite dans les quatre puits centraux d'une microplaque noire (Microfluor 2 Black; VWR International) comme cela est représenté Figure 22. Huit puits ou unités expérimentales ( $200 \mu\text{L}$ /puit) sont répartis autour de la source.

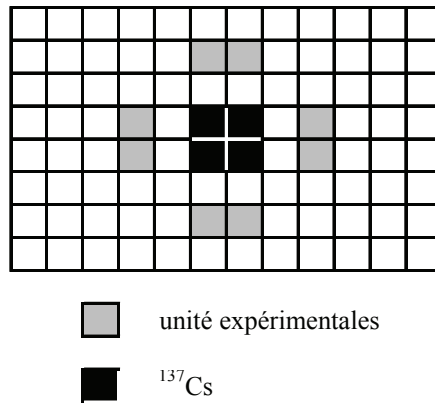


Figure 22: Localisation de la source d'irradiation et des unités expérimentales sur une microplaque

Dans le cas d'expositions de cellules algales à une irradiation  $\gamma$  dans ce dispositif, les hypothèses de calcul sont les suivantes :

- la source est considérée comme étant de densité égale à celle de l'eau,
- la source de  $^{137}\text{Cs}$ - $^{137\text{m}}\text{Ba}$  utilisée a un spectre simplifié à une raie  $\gamma$  d'émission de 662 keV.
- la source est divisée dans 4 puits schématisés par des puits à fond plat (alors que les puits de la microplaque sont ronds) comme cela est représenté sur la Figure 23
- seuls les puits contenant la source et les puits utilisés pour les expositions sont remplis d'eau.

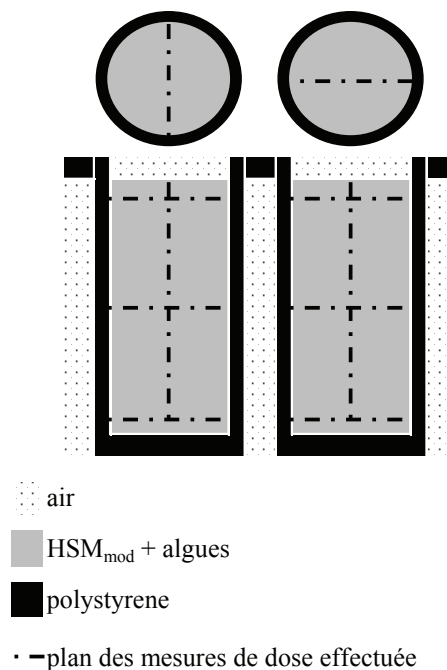


Figure 23 : Représentation des puits d'une microplaque avec le logiciel MCNP-4C

Dans ces conditions, en fonction de la distance entre les puits sources et les unités expérimentales, et en prenant en compte la taille de l'organisme, la dose a été estimée (logiciel MCNP-4C avec le code de simulation Monte-Carlo) à 75 points différents du puits (suivant les axes en pointillés représentés sur la Figure 23). Le débit de dose (DDD) moyen au centre du puits obtenu est de  $2,11 \times 10^{-7}$  mGy h<sup>-1</sup> par Bq. La différence de dose moyenne reçue entre ces 8 puits est de 13%. Ces 8 unités expérimentales seront donc considérées comme des répliqués. En revanche au sein d'un même puits la variation de DDD est de 42 % (entre le centre et l'extrémité du puits).

## 2.3. PARAMETRES D'EFFET MESURES

---

### 2.3.1. Taux de croissance

#### 2.3.1.1. En Erlenmeyers

Des cellules en phase de croissance exponentielle sont centrifugées puis resuspendues ( $2\ 500$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ) dans du milieu  $\text{HSM}_{\text{mod}}$  contenant du tritium et/ou du cuivre. Cette solution est ensuite répartie en  $4 \times 150$  mL et introduite dans des Erlenmeyers de 250 mL placés en condition de croissance. La densité cellulaire et le diamètre des cellules sont mesurés chaque 24h. Ce suivi a été réalisé avec un compteur de particules (Beckmann Coulter Z2 particle counter ; Beckman Coulter). La dilution minimale est de quatre volumes d'Isoton<sup>®</sup> pour un volume de milieu contenant les algues (Beckman Coulter, 2000). Cette méthode demande d'utiliser d'importants volumes de milieu de culture (quatre réplicats  $\times$  quatre conditions  $\times$  150 mL soit un total de 2,4 L de milieu) ce qui réduit d'autant la concentration en tritium d'exposition (en considérant les limites de manipulation).

#### 2.3.1.2. En microplaque

Des expérimentations similaires ont été réalisées en microplaque ce qui permet d'utiliser de plus faible volume de culture et ainsi d'augmenter les activités en HTO d'exposition. Pour ceci, les algues resuspendues dans du milieu  $\text{HSM}_{\text{mod}}$  sont divisées en  $6 \times 300$   $\mu\text{L}$  et introduites dans 6 puits au centre d'une microplaque à fond transparent plat (96 puits). Une plaque différente est utilisée pour chaque traitement afin d'éviter les contaminations entre conditions. De plus, ces plaques sont fermées avec un couvercle, entourés de parafilm pour éviter l'évaporation et les contaminations par les vapeurs de tritium. Les plaques sont ensuite incubées sous illumination continue (conditions identiques à la culture, 2.1.1.1). La densité cellulaire est estimée chaque 24h par lecture de la fluorescence in vivo de la chlorophylle à l'aide d'un spectrofluorimètre (SPECTRAmax GEMINI-XS, Molecular Device) après excitation des cellules à 440 nm et lecture de l'émission à 680 nm. En parallèle une droite d'étalonnage est effectuée permettant de relier la densité cellulaire à l'intensité de la fluorescence mesurée.

### 2.3.1.3.

### Traitement des résultats

Les résultats concernant la croissance des algues ont été analysés à l'aide du modèle logistique à 3 paramètres (Équation 6 et Figure 24) afin d'estimer la densité cellulaire maximale, le taux de croissance et le temps nécessaire pour obtenir 50% de la densité cellulaire maximale en fonction du temps.

Équation 6: Modèle logistique à 3 paramètres avec  $d$  la densité cellulaire maximale atteinte au pallier (cellules  $\text{mL}^{-1}$ ),  $\mu$  le taux de croissance intégré sur la pente maximale (division par jour) et  $e$  le temps nécessaire pour obtenir 50% de la densité cellulaire maximale (jours $^{-1}$ ).

$$f(x) = \frac{d}{(1 + \exp(\mu \times (x - e)))}$$

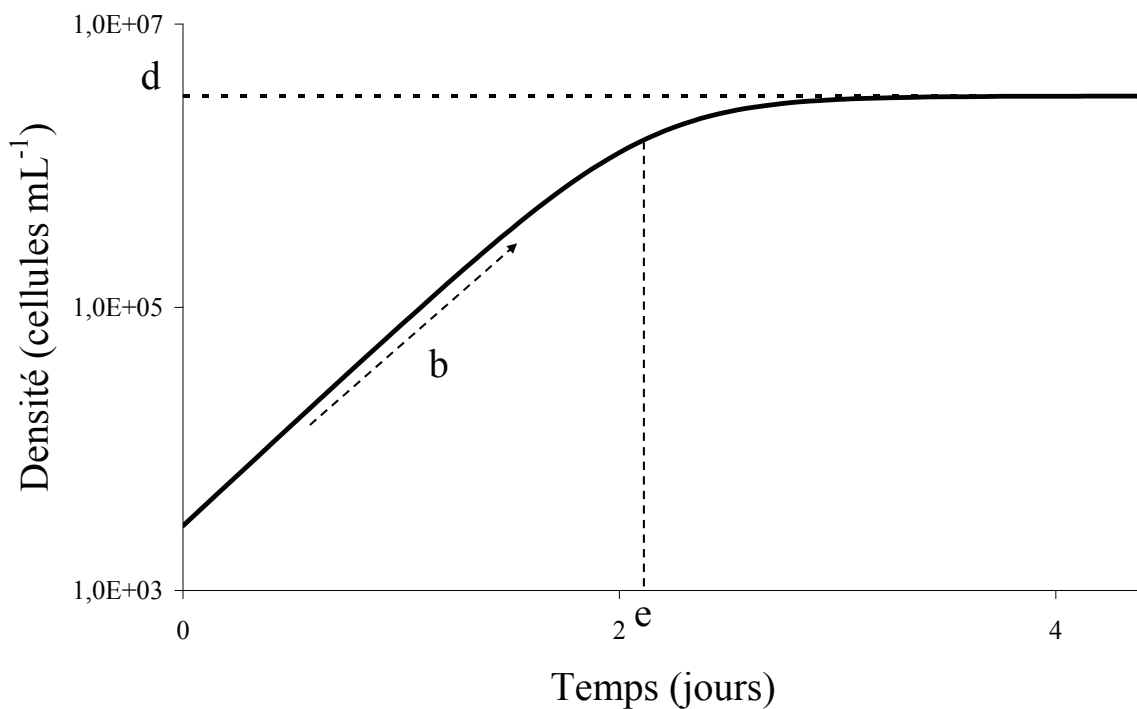


Figure 24 : Courbe de croissance et paramètres de croissance calculé à partir du modèle logistique à 3 paramètres.

### 2.3.2.

### Activité du PSII

Afin de mesurer l'activité et l'intégrité du PSII, la cinétique de modulation de la fluorescence (Figure 25) de la chlorophylle a été analysée en utilisant un fluorimètre à amplitude pulsée modulée (PAM) pendant 10 min (Water-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany ; Roháček, 2002). Un échantillon algal (1 mL d'algue + 1,75 mL milieu

HSM<sub>mod</sub> concentré x2 ; densité finale = 223 000 cellules mL<sup>-1</sup>) est mélangé à 1,75 mL de la source de tritium ou d'eau UHQ pour le témoin. Cette pré-exposition se déroule à l'obscurité durant 10 min puis **F<sub>o</sub>** est mesuré. Cette mesure est réalisée en utilisant une lumière modulée (ML) de faible intensité (1 mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) afin d'éviter la réduction de l'accepteur primaire d'électron du photosystème II. Le rendement maximal de fluorescence, **F<sub>m</sub>**, est mesuré après induction d'un pulse saturant de courte durée (SP) de lumière blanche (2 000 mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 0,7 s). Le rendement quantique maximal est calculé :  $F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m$ . Le rendement de fluorescence à l'état stationnaire a été enregistré (**F<sub>s</sub>**, lié à la fraction du PSII non impliquée dans le transport d'électron) sous illumination actinique continue (100 mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Le rendement de fluorescence maximal **F<sub>m</sub>'** a été induit suite à des pulses de courte durée répétitif (40 s d'intervalle). Enfin, la fluorescence **F<sub>o</sub>** (qui représente le rendement de fluorescence quand tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts) a été mesurée dans des conditions non éclairée par un enregistrement instantané de la fluorescence. Après 6 minutes de lumière actinique (état stationnaire), le rendement quantique opérationnel a été calculé :  $\Phi_s \text{ PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$ . Dans les mêmes conditions, le quenching photochimique a été obtenue par :  $Q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$ , qui représente la proportion de l'énergie d'excitation lumineuse utilisée par les centres réactionnels actifs du PSII (capable de réaliser les processus photochimiques). Le dernier paramètre calculé à partir des valeurs mesurée représente le quenching de fluorescence non relié à la photochimie du PSII et est calculé :  $Q_n = 1 - ((F_m' - F_o') / (F_m - F_o))$  (Van Kooten et Snel, 1990). La signification de ces paramètres est reprise dans le Tableau 11.

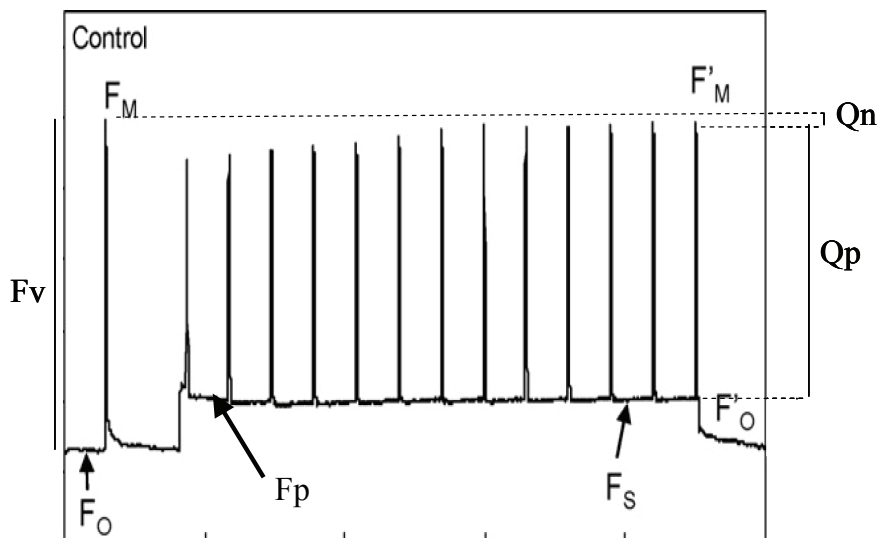


Figure 25: Paramètre obtenu suite à une induction de pulse lumineux en utilisant un PAM



Tableau 11 : Définition et correspondance des paramètres mesurés par le PAM (Kooten et Snel, 1990 ; Buschmann, 1995 ; Roháček, 2002 ; Juneau et al., 2005)

Paramètre de fluorescence	Formule de calcul	Signification
<b>Mesure de la fluorescence d'algues adaptées à l'obscurité</b>		
<b>F<sub>o</sub></b>		Rendement de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnels des PSII sont à l'état ouvert (non excité)
<b>F<sub>m</sub></b>		Fluorescence maximale induite par un pulse saturant de courte durée (SP)
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	(F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )/F <sub>m</sub>	Rendement quantique maximal
<b>Mesure de la fluorescence d'algues exposées à une lumière actinique</b>		
<b>F<sub>p</sub></b>		Rendement de la fluorescence à l'état initial d'illumination
<b>F<sub>s</sub></b>		Rendement de la fluorescence à l'état stationnaire sous illumination (permet de mettre en évidence le nombre de molécule du PSII qui ne participent pas au transport d'électron)
<b>F<sub>m</sub>'</b>		Fluorescence maximale induite par SP à l'état stationnaire (après 6 min d'illumination)
Φ <sub>s</sub>	(F <sub>m</sub> '-F <sub>s</sub> )/F <sub>m</sub> '	Rendement quantique opérationnel
<b>Mesure de la fluorescence après exposition à une lumière actinique</b>		
<b>F'o</b>		Rendement de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnel du PSII retourne à leur état initial ouvert
<b>Paramètres de quenching</b>		
Q <sub>p</sub>	(F <sub>m</sub> '-F <sub>s</sub> )/(F <sub>m</sub> '-F'o')	Proportion de l'énergie d'excitation lumineuse utilisée par les centres réactionnels actifs du PSII afin de réaliser les processus photochimique
Q <sub>n</sub>	1-[(F <sub>m</sub> '-F'o')/(F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )]	Quenching de la fluorescence non relié aux processus photochimique du PSII

### 2.3.3. Production d'ERO

Un protocole dérivé de ceux de Knauert et Knauer (2008) et Yoshida *et al.* (2003) a été utilisé dans cette étude pour doser la production d'ERO chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les sondes fluorescentes utilisées : H<sub>2</sub>DCF-DA et DCF (Sigma Aldrich, 97%, Saint Quentin Fallavier, France) sont diluées dans du DMSO (100%) à une concentration finale de 4,5 mol L<sup>-1</sup> et conservée à -20 °C à l'obscurité.

#### 2.3.3.1. Protocole

Les cellules algales en phase de croissance exponentielle sont resuspendues dans du milieu HSM<sub>mod</sub>. La densité cellulaire est ajustée à 10<sup>7</sup> cellules mL<sup>-1</sup> afin de maintenir au cours des différentes expériences le même ratio algues/H<sub>2</sub>DCF-DA. Comme le cuivre inhibe l'activité des estérases (Franklin *et al.*, 2001), les algues sont pré-incubées avec 40 μmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>DCF-DA (molécule non fluorescente) pendant 2 h à l'obscurité à 24 °C sous agitation (100 rpm ; concentration finale DMSO < 2 %). Cette H<sub>2</sub>DCF-DA va pénétrer les cellules et être déacétylée par l'action des estérases en une molécule non fluorescente nommée H<sub>2</sub>DCF. A la suite de cette incorporation, les algues sont centrifugées 2 fois consécutives (3 500 g, 15 min), afin d'enlever la H<sub>2</sub>DCF-DA extracellulaire encore présente dans le milieu, et resuspendues dans du milieu HSM<sub>mod</sub> à une densité de 10<sup>7</sup> cellules mL<sup>-1</sup>. Finalement les cellules sont réparties dans les puits d'une microplaque noire (microfluor 2 ; volume = 180 μL par puits). Les cellules sont alors exposées à un stress (rayonnement γ, HTO ou cuivre). La H<sub>2</sub>DCF réagissant avec certains ERO va engendrer la formation de DCF (molécule fluorescente). L'intensité de la fluorescence de la DCF est mesurée (λ<sub>ex</sub>505 / λ<sub>em</sub> 530 nm) avec un lecteur spectrofluorimétrique (SPECTRAMax GEMINI-XS, Molecular Devices) toutes les 2 min pendant 45 à 100 min. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence (AU) pour 10<sup>9</sup> cellules.

D'après les tests réalisés en absence d'algue, la mesure permet de connaître la production d'ERO dans la cellule. En effet, la H<sub>2</sub>DCF est présente uniquement dans la cellule. De ce fait, cette molécule va réagir avec les ERO contenu dans la cellule.

#### 2.3.3.2. Déacétylation de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA par le NaOH

Pour obtenir de la H<sub>2</sub>DCF, de la H<sub>2</sub>DCF-DA a été deacétylé avec du NaOH (ratio 5/1) suivant le protocole de Ischiropoulos *et al.* (1999). Cette préparation a été laissée 30 min à

l'obscurité à température ambiante avant d'être exposées à l'HTO ou à des rayonnements  $\beta$  ou  $\gamma$ . La fluorescence de la DCF a été suivie de manière cinétique comme lors d'exposition d'algue.

## 2.4. ANALYSES STATISTIQUES

---

Toutes les analyses statistiques ont été effectués sous le logiciel R 2.8.1 (R Development Core Team, 2008) avec les bibliothèques *drc* (Ritz et Streibig, 2005), *nlstools* (Baty *et al.*, 2009), *car* (Fox, 2009), *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2008) et *nlrwr* (Ritz et Steibig, 2008). Le risque alpha est de  $\leq 0,1$  (\*),  $\leq 0,05$  (\*\*),  $\leq 0,01$  (\*\*\*) et  $\leq 0,001$  (\*\*\*\*).

### 2.4.1. Analyse d'une déviation entre effet mesuré et effet prédit par l'hypothèse d'additivité

Pour mesurer une déviation d'un effet mesuré en mélange par rapport à un effet prédit depuis l'hypothèse d'additivité et ainsi classer les effets produits en additif, supra-additif ou sub-additif, un coefficient d'interaction  $K_w$  a été utilisé. La significativité de ce coefficient  $K_w$  par rapport à 1 a été testé à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon car les données n'étaient pas normales. Lorsque la valeur de  $p$  obtenue est inférieure à 0,05, l'effet résultant de l'action combinée est classifié comme étant sub-additive lorsque  $K_w < 1$ , et supra-additive lorsque  $K_w > 1$ .

### 2.4.2. Autres analyses statistiques

Les résultats obtenus sont présentés en tant que moyenne +/- SEM (standard error of the mean). Cette erreur-type de la moyenne est calculée suivant l'Équation 7 :

*Équation 7 : Détermination de l'erreur-type de la moyenne (SEM) à partir du nombre de réplicats ( $n$ ) et de l'écart type des données ( $s$ ).*

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

En ce qui concerne le taux de croissance et l'entrée du cuivre, l'estimation des paramètres du modèle a été réalisée à partir de l'hypothèse de normalité asymptotique.

Les autres données ont été analysées par des tests ANOVA à un ou deux facteurs. L'hypothèse de normalité des données a été vérifiée graphiquement et par le test de Shapiro-Wilk. L'homogénéité des résidus a été estimée par le test de Bartlett. Lorsqu'au moins l'une de ces hypothèses a été rejetée, une transformation Box-Cox des données a été effectuées

(Box and Cox, 1964). Lorsque le test ANOVA révèle des résultats significatifs ( $p < 0,05$ ), une comparaison multiple a été effectuée via le test post hoc de Tukey's. Les résultats sont représentés comme moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (S.E.M.) ou IC95 (intervalle de confiance à 95% calculé pour 5000 tirages : bootstrap). Si la transformation Box-Cox n'a pas permis d'améliorer la normalité et/ou l'homogénéité alors un test de Kruskal-Wallis a été réalisé. Lorsque le test de Kruskal-Wallis est significatif, une comparaison multiple de Wilcoxon a été appliquée avec une correction de Holm.

## **3. RESULTATS**



### 3.1. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE SUR L'ALGUE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* PAR UTILISATION DE LA SONDE FLUORESCENTE H<sub>2</sub>DCF-DA

---

Des ERO sont produits en permanence en faible quantité dans les cellules par des processus endogènes comme la respiration mitochondriale, la photosynthèse... Cette production de radicaux est contrebalancée par des systèmes de défense cellulaire. Lors du fonctionnement normal des cellules, la balance anti/pro-oxydants est en équilibre dynamique. Cependant, lors de l'exposition des cellules à des composés exogènes (métaux lourds, rayonnements,...), cette balance peut être dépassée et les cellules seront alors exposées à un stress oxydant. Ce stress peut être dû à un déficit en antioxydants et/ou à un excès de radicaux dans la cellule (chapitre 1 paragraphe 1.2.1.2). Ces modifications de la balance oxydative apparaissent précocement avec l'exposition des cellules à une substance toxique (15 min lors de l'exposition de cyanobactérie à des UV-B - He et Häder, 2002b - et 1h lors de l'exposition d'*Euglena* à du cadmium - Watanabe et Suzuki, 2002). De ce fait, notre premier objectif dans cette étude est de mesurer la cinétique de production d'ERO dans le cas d'une exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* au cuivre, à l'HTO ou à un mélange HTO/Cu. De par le peu de données concernant la production d'ERO suite à une exposition à l'HTO et à l'absence de comparatif avec la production d'ERO par d'autres rayonnements, la production d'ERO par une irradiation  $\gamma$  continue sera également expérimentée de manière à faciliter cette comparaison. En effet, les études rapportées dans la littérature ont été réalisées dans des conditions d'exposition brève aux rayonnements.

Différentes techniques sont possibles pour la mesure du stress oxydatif (chapitre 1 paragraphe 1.2.1.2). Parmi ces techniques notre choix s'est porté sur le dosage des ERO par l'utilisation d'une sonde fluorescente : la H<sub>2</sub>DCF-DA. Cette technique présente notamment l'avantage de pouvoir suivre la balance oxydative cellulaire au cours du temps (dosage des radicaux non pris en charge par le système antioxydant). Cette molécule non fluorescente va être déstérifiée dans les cellules via l'activité des estérases. Cette activité estérasique va permettre d'obtenir de la H<sub>2</sub>DCF capable ensuite de réagir avec les ERO produits (Figure 26).



Suite à cette réaction, la H<sub>2</sub>DCF est transformée en DCF dont la fluorescence produite peut être mesurée ( $\lambda_{exc} = 485 - \lambda_{ém} = 530$  nm).

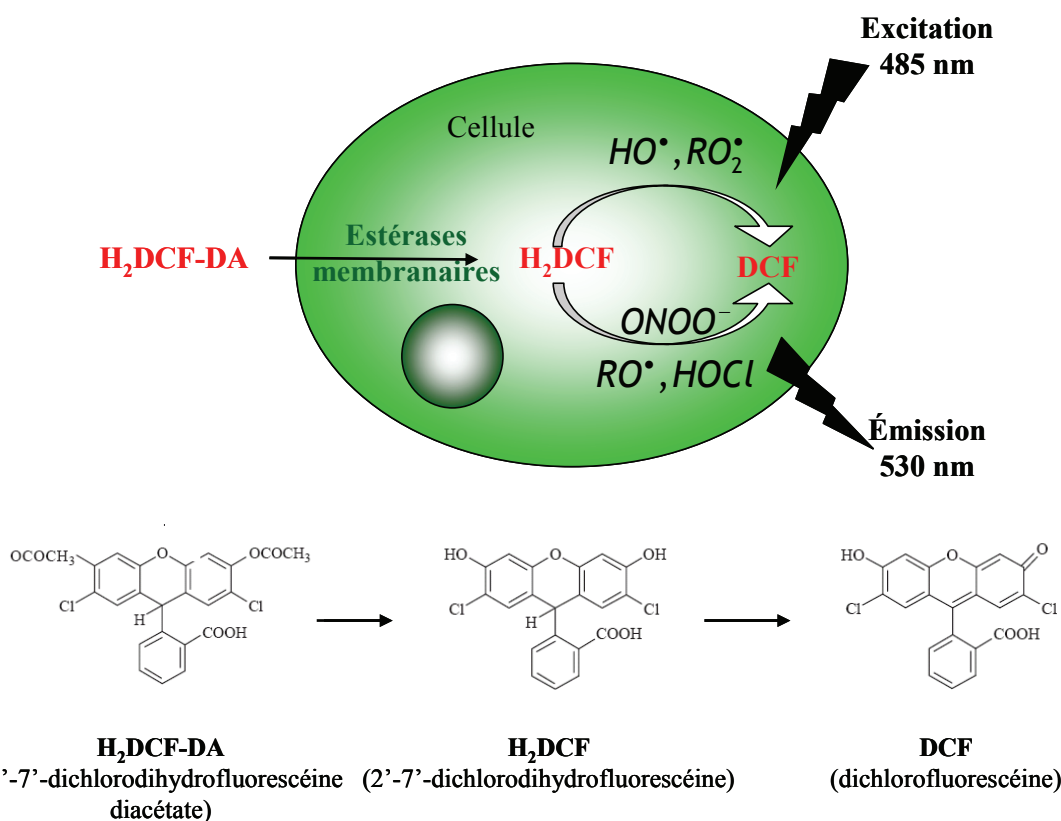


Figure 26 : Schéma du mécanisme de transformation de la sonde 2'-7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (H<sub>2</sub>DCF-DA) en DCF fluorescente au sein de *Chlamydomonas reinhardtii*

Différents auteurs ont déjà utilisé cette méthode pour mesurer le stress oxydant de cellules algales (Tableau 12). Les différents protocoles proposent d'utiliser des concentrations en H<sub>2</sub>DCF-DA variables (de 5 à 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et de pré-exposer ou non les cellules à la sonde avant d'ajouter le toxique. La mesure de la fluorescence est réalisée le plus communément par un cytomètre de flux. La cytométrie de flux permet en effet de mesurer le stress oxydant chez un nombre restreint de cellules ( $10^3$  et  $10^5$  cellules) et de mesurer le statut oxydatif pour chaque cellule individuellement. Cependant, cette méthode permet seulement une mesure ponctuelle des ERO. La mesure spectrofluorimétrique, bien qu'étant moins sensible et nécessitant de ce fait un plus grand nombre de cellules ( $10^7$  cellules), permet quant à elle de mesurer plus facilement la cinétique de production d'ERO. Cette mesure de cinétique est particulièrement intéressante pour comprendre la nature dynamique de l'équilibre entre les ERO et le système antioxydant et les effets potentiels qui en découlent mais également afin de mesurer précisément le temps de réponse du système oxydant suite à une exposition à un

toxique. Bien que l'utilité de cette sonde ne soit plus à démontrer, son utilisation pour mesurer la production d'ERO lors d'exposition à des radiations pose problème. En effet, lors d'une exposition à des radiations ionisantes, une auto oxydation de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA a été reportée dans la littérature (Wan *et al.*, 2003). Ce phénomène réduira le temps de mesure de la production d'ERO.

Dans ce contexte, l'objectif de cette première partie était de mettre au point la mesure cinétique des ERO cellulaires par utilisation de la sonde fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA chez notre modèle d'étude *Chlamydomonas reinhardtii*. Étant donné la similitude entre nos attentes de dosage et le protocole mis au point par Knauert et Knauer (2008), la mise en place et l'optimisation sur notre modèle biologique a été effectuée sur la base de ce protocole. Dans un premier temps, l'optimisation de la méthode a été effectuée lors d'une exposition au cuivre, la production d'ERO étant bien documentée pour ce métal. Dans une deuxième étape, ce protocole a été validé pour le cas d'une exposition continue aux rayonnements ionisants  $\beta$  et  $\gamma$  en vérifiant le maintien de l'intégrité de la H<sub>2</sub>DCF et la faisabilité de l'étude pour une exposition continue de *Chlamydomonas reinhardtii* à l'irradiation  $\gamma$ .

Tableau 12 : Synthèse des conditions de dosage des ERO par utilisation de H<sub>2</sub>DCF-DA recensées dans la littérature

Auteurs	Knauert et Knauer (2008)	Baroli et al. (2003)	Yoshida et al. (2003)
<b>Espèce et milieu de culture</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>et Chlorella vulgaris</i> Milieu = OECD	<i>Chlamydomonas sp</i> Milieu = HSM	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Milieu = Bristol modifié
<b>Sonde</b>	H <sub>2</sub> DCF-DA (5 µmol L <sup>-1</sup> ) diluée dans méthanol (<0,05% / puits)	CM H <sub>2</sub> DCF-DA (10 µmol L <sup>-1</sup> ) diluée dans DMSO	H <sub>2</sub> DCF-DA (20 µmol L <sup>-1</sup> ) diluée dans éthanol
<b>Densité algale</b>	10 <sup>7</sup> cellules	10 <sup>5</sup> cellules	10 <sup>3</sup> cellules
<b>Technique de dosage</b>	Spectrofluorimètre (270 minutes)	Cytomètre de flux	Cytomètre de flux
<b>Toxique</b>	Cuivre (50 et 250 nmol L <sup>-1</sup> )	Lumière	Paraquat
<b>Protocole</b>	<u>Exposition + incubation</u> : cellules + Cu + H <sub>2</sub> DCF-DA (lumière/obscurité, dans la microplaque)	<u>Exposition</u> : lumière forte <u>Incubation</u> : ajout CM H <sub>2</sub> DCF-DA température ambiante, obscurité, 15 minutes Rinçage	<u>Pré-incubation</u> : cellules + H <sub>2</sub> DCF-DA (obscurité, 2h) Rinçages <u>Exposition</u> 1h avec le paraquat, obscurité

### 3.1.1. Optimisation du protocole de Knauert et Knauer (2008) pour la mesure de la cinétique de production d'ERO chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* exposée au cuivre.

Les méthodes générales utilisées (cultures, milieux, appareillages...) sont détaillés dans la partie 2. Néanmoins par soucis de clarté au vu du nombre de méthodes différentes utilisées, les éléments spécifiques nécessaires à la discussion des résultats sont présentés succinctement.

De manière identique au protocole de référence de Knauert et Knauer (2008), 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de H<sub>2</sub>DCF-DA sont ajoutés en même temps que du cuivre dans une solution contenant 10<sup>7</sup> cellules algales par puits. La lecture de la fluorescence de la DCF est mesurée chaque 5 min durant 270 min au spectrofluorimètre (n=4 réplicats par condition, volume final = 200  $\mu\text{L}$  par puits). Les longueurs d'ondes de mesure utilisées ( $\lambda_{\text{exc}} = 505 - \lambda_{\text{ém}} = 530 \text{ nm}$ ) sont celles de la DCF comme cela est préconisé par Gomes *et al.* (2005) et Bartosz (2006). Celles-ci ont été vérifiées expérimentalement (Annexe 2). La plaque est laissée dans le spectrofluorimètre entre chaque mesure (24°C, obscurité).

Tableau 13 : Concentration d'exposition au cuivre (libre et total) utilisées par Knauert et Knauer (2008) sur les algues *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella vulgaris* comparées aux concentrations nominales utilisées dans cette étude sur notre modèle biologique

	Cu <sub>tot</sub> nmol L <sup>-1</sup>	Cu <sup>2+</sup> nmol L <sup>-1</sup>
Knauert et Knauer	50	0,04
(2008)	250	0,33
Cette étude	250	0,8
	500	2,0

#### 3.1.1.1. Résultats obtenus suivant le protocole de Knauert et Knauer (2008).

Différentes conditions ont été mises en place pour ce test :

- des conditions sans algue (Témoins) en présence de 250 ou 500 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre total

- des conditions contenant des algues, dont un contrôle (Cu 0) non exposé au cuivre, deux conditions exposées à 250 (Cu 250) ou 500 nmol L<sup>-1</sup> (Cu 500) de cuivre total et un contrôle positif exposé à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 mol L<sup>-1</sup>

Les deux concentrations en cuivre (250 et 500 nmol L<sup>-1</sup> ; Tableau 13) sont proches de celles utilisées par Knauert et Knauer (2008).

La cinétique de fluorescence de la DCF (fluorescence en unité arbitraire – UA – rapportée pour 10<sup>9</sup> cellules) obtenue en fonction du temps est représentée sur la Figure 27. En ce qui concerne la production de DCF dans les témoins 250 et témoins 500 (sans algue), la fluorescence passe de 2 000 à 10 000 UA au cours des 270 min d'analyse. Cette augmentation de la fluorescence dans les témoins indique une dégradation de la H<sub>2</sub>DCF-DA en absence d'algue et indépendamment des concentrations en cuivre. Cette dégradation est due à la dégradation naturelle de la sonde (température et luminosité). Néanmoins cette augmentation de la fluorescence est bien inférieure à celle mesurée chez les conditions exposées au cuivre (Cu 250 et Cu 500) et contenant des algues. En ce qui concerne la production de DCF dans les différentes conditions en présence d'algues, une augmentation est visible dans le temps. A 270 min, la condition contrôle (Cu 0), comme attendu, a produit significativement moins de DCF que le contrôle positif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En effet, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va, suite à la réaction de Fenton, induire la formation de radicaux qui sont capables d'oxyder la sonde H<sub>2</sub>DCF en DCF (Collen et Davison, 1997). Lors d'une exposition au cuivre (250 et 500 nmol L<sup>-1</sup>), la fluorescence produite est significativement inférieure à celle de la condition contrôle (Cu 0 ; fluorescence induite par le métabolisme normale des cellules : respiration, ...). Or, le cuivre est connu comme étant un oxydant puissant (Yu *et al.*, 2007 ; Knauert et Knauer, 2008). La présence de cuivre devrait donc augmenter la production d'ERO et par conséquent la fluorescence mesurée.

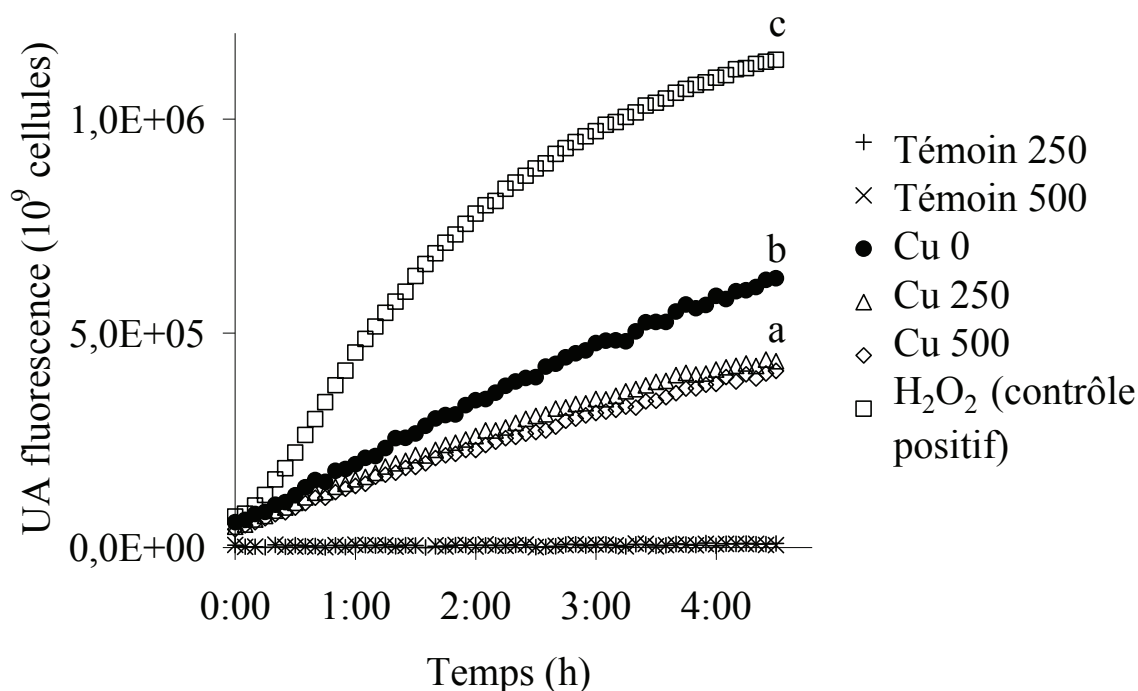


Figure 27 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps chez des algues contrôle (Cu 0) ou exposées à 250 (Cu 250) et 500 (Cu 500)  $\text{nmol L}^{-1}$  de cuivre total ou à 5  $\text{mol L}^{-1}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Contrôle positif ; moyenne, SEM<10% non représenté, n=4). Les témoins 250 et 500 sont des conditions similaires à Cu 250 et Cu 500 mais ne contiennent pas d'algue. Les lettres représentent des différences significatives entre conditions (ANOVA 1 facteur).

En nous basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que le fonctionnement de la sonde est satisfaisant lors d'une exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Néanmoins, en présence de cuivre, le protocole utilisé ne semble pas adapté : la présence de cuivre entraîne une diminution de la production d'ERO par rapport à des cellules non exposées, contrairement à ce qui était attendu (Szivak *et al.*, 2009). Cette diminution de la fluorescence peut avoir plusieurs origines. Premièrement, elle peut résulter de l'effet direct du cuivre sur la mesure de l'intensité de la fluorescence de la DCF. Ce phénomène d'atténuation de l'intensité de la fluorescence mesurée peut résulter de différent processus : formation de complexe entre le cuivre et la sonde ce qui induirait une baisse de disponibilité de la sonde ou atténuation du signal par une substance colorée (couleur verte des algues). Deuxièmement, cette atténuation de la fluorescence de la DCF lors de l'exposition au cuivre peut être expliquée par la diminution de l'activité des estérases. En effet, si cette activité est réduite, la  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  ne pourra pas être transformée par l'action des estérases en  $\text{H}_2\text{DCF}$  et les ERO cellulaires ne pourront donc pas induire la production de DCF. De telles diminutions de l'activité des

estérases sont documentées dans la littérature. Deux phénomènes peuvent en être responsables :

- l'induction d'une forte mortalité cellulaire par le cuivre : le processus de dé-estérification de la H<sub>2</sub>DCF-DA en H<sub>2</sub>DCF est un processus actif nécessitant de l'énergie. Or si la concentration d'exposition au cuivre est trop forte, la viabilité des cellules peut être réduite ce qui expliquerait une diminution de l'énergie disponible pour ce processus et donc une diminution de la fluorescence. Une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition de cellule au cuivre (150 µmol L<sup>-1</sup>) a été mesurée chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Boswell *et al.*, 2002),

- un effet du cuivre sur l'activité estérasique : Yu *et al.* (2007) ont observé après 2h d'exposition au cuivre un effet de celui-ci au niveau de l'activité des estérases chez des algues en culture non mono-spécifique (*Microcystis aeruginosa*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus obliquus*). Pour des concentrations en cuivre total comprises entre 157 et 204 nmol L<sup>-1</sup>, une augmentation de l'activité des estérases est observée, alors que pour des concentrations supérieures à 330 nmol L<sup>-1</sup> une diminution de l'activité des estérases est notée.

Ainsi, le protocole n'ayant pas donné de résultats concluants dans notre cas particulier, des solutions d'amélioration doivent être proposées puis testées afin de valider un protocole opérationnel pour mesurer la production d'ERO lors de l'exposition de cellules au cuivre (le cuivre étant notre substance de référence). Les différentes hypothèses exposées ci-dessus vont être testées : (1) atténuation de la fluorescence due au cuivre, (2) induction de mortalité cellulaire par le cuivre, et (3) effet direct du cuivre sur l'activité estérasique.

### **3.1.1.2. Optimisation du protocole**

#### **Atténuation de fluorescence due au cuivre**

Pour tester l'atténuation de fluorescence de la DCF par le cuivre, une solution de DCF (5 µmol L<sup>-1</sup> ; paragraphe 2.3.3) a été additionnée à du milieu HSM<sub>mod</sub> contenant du cuivre total à des concentrations nominales allant de 250 à 1 000 nmol L<sup>-1</sup>. La mesure a été réalisée après 15 minutes d'exposition. Sur la Figure 28 est représentée la fluorescence de la DCF (en % par rapport au contrôle non exposé au cuivre) en fonction de la concentration en cuivre dans le milieu.

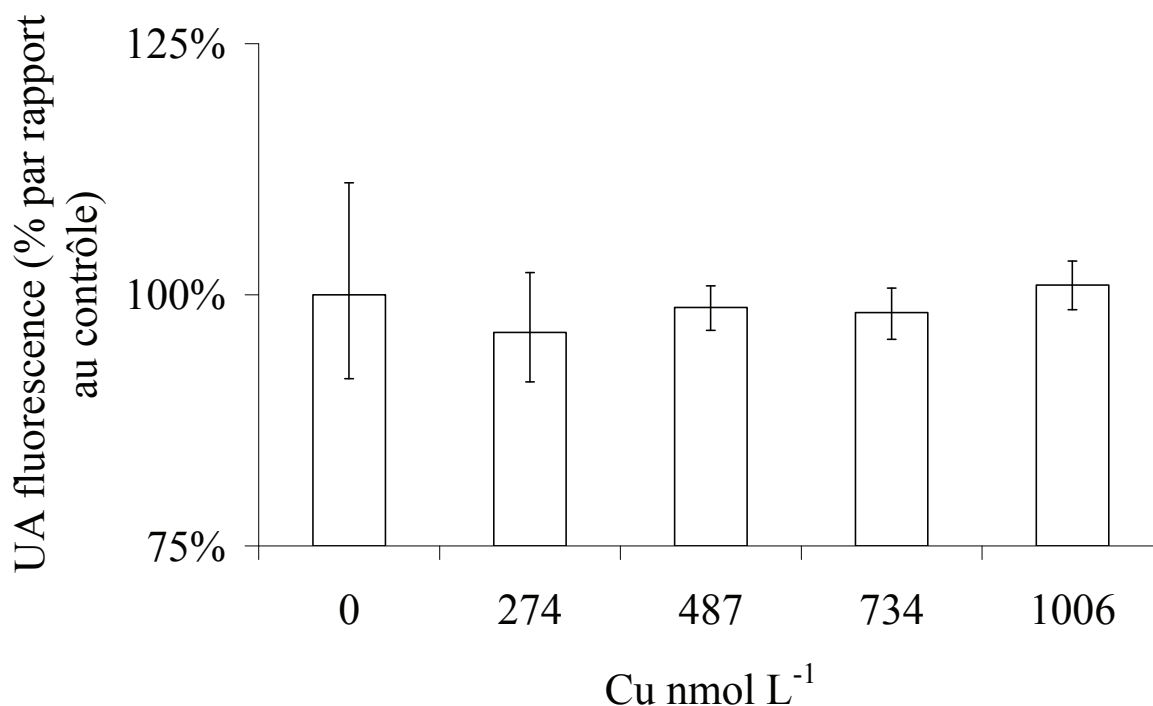


Figure 28 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) en fonction de la concentration en cuivre dosée (15 min,  $n=8$ , moyenne  $\pm$  IC95 ; ANOVA 1 facteur,  $p<0,05$ )

Le pourcentage de perte de signal est inférieur à 7 % entre 0 et 1 006 nmol L<sup>-1</sup> (cuivre total dosé dans le milieu d'exposition). De plus cette perte de signal n'est pas statistiquement significative ( $p<0,001$ ). En conclusion, l'atténuation de la fluorescence par le cuivre ne peut pas être à l'origine de la diminution de fluorescence de la DCF observée précédemment.

#### Viabilité cellulaire suite à une exposition au cuivre

La viabilité des cellules a été mesurée après exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à 500 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre, soit le double de la concentration testée précédemment, à différents temps (1 à 4h). A la fin du temps d'exposition, les cellules sont colorées au bleu Trypan (40  $\mu\text{L}$  de bleu Trypan + 40  $\mu\text{L}$  de suspension algale ; 5 min d'incubation ; comptage (20  $\mu\text{L}$ ) sur cellule de Malassez sous loupe binoculaire ; grossissement x400 ; Tableau 14). Au cours de cette expérimentation, aucune cellule colorée en bleu (cellule morte) n'a été observée. Le nombre de cellule dénombré reste constant ( $1,1 \pm 0,2 \times 10^7$  cellules mL<sup>-1</sup>).



Tableau 14 : Viabilité des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* après 1 à 4h d'exposition à 500 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre (concentration totale nominale ; dénombrement par comptage avec une cellule de Malassez et coloration au bleu Trypan)

Temps (h)	0	1	2	3	4
Nombre de cellules vivantes (non colorées en bleu) – cellules mL <sup>-1</sup>	1,0 10 <sup>7</sup>	1,5 10 <sup>7</sup>	0,9 10 <sup>7</sup>	1,0 10 <sup>7</sup>	1,0 10 <sup>7</sup>
Nombre de cellules mortes (colorées en bleu) – cellules mL <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-

La diminution de fluorescence observée précédemment ne peut donc pas être expliquée par un phénomène d'atténuation ni par une baisse de la viabilité cellulaire. Cette observation est cohérente avec Boswell *et al.* (2002) qui avaient dû exposer des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* durant 3 jours à 150 µmol L<sup>-1</sup> de cuivre total avant d'observer une inhibition de la croissance des algues sur milieu solide. Bien que l'absence de croissance ne permette pas de conclure avec précision de la mortalité des cellules, cet état révèle des dommages cellulaires importants.

#### Effet du cuivre sur l'activité des estérases

Notre dernière hypothèse reposait sur l'inhibition de l'activité estérasique par le cuivre. Afin de s'affranchir de ce phénomène, les cellules algales (*Chlamydomonas reinhardtii*) sont pré-incubées avec de la H<sub>2</sub>DCF-DA, durant 2h à l'obscurité. Ce protocole avait déjà été expérimenté par Yoshida *et al.* (2003) avant d'exposer des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* à un stress oxydant (exposition au paraquat ; Tableau 12). Après cette pré-incubation (H<sub>2</sub>DCF-DA à 20 µmol L<sup>-1</sup>), ces auteurs rinçaient les cellules afin d'éliminer la H<sub>2</sub>DCF-DA encore présente dans le milieu d'exposition. Les cellules étaient finalement resuspendues dans du milieu contenant la substance toxique pendant 1h, pour mesurer ensuite la fluorescence de la DCF par cytométrie de flux. Nous avons appliqué cette approche pour le cuivre chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les deux étapes de pré-incubation et d'exposition au cuivre ont été testées.

#### **Test de l'étape de pré-incubation**

Pour effectuer un test similaire à celui proposé par Yoshida *et al.* (2003) dans nos conditions, et du fait que la lecture de la fluorescence au spectrofluorimètre est moins sensible qu'en cytométrie de flux, les algues ont été exposées à deux concentrations de H<sub>2</sub>DCF-DA

pendant 2h à l'obscurité. Ces concentrations de pré-incubation ont été choisies à partir de celle utilisée par Yoshida *et al.* (2003) et afin de ne pas augmenter significativement la proportion de DMSO dans le milieu d'exposition. Le DMSO étant toxique envers les organismes photosynthétiques, il est préférable de ne pas dépasser les 2 % en DMSO. Des concentrations de pré-incubation de 20 et 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  d' $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , correspondant respectivement à 0,88 et 1,38 % de DMSO, ont donc été testées. Après pré-incubation, les cellules ont été rincées et resuspendues dans du milieu  $\text{HSM}_{\text{mod}}$  contaminé avec 500  $\text{nmol L}^{-1}$  de cuivre ou non contaminé. Sur la Figure 29 est représentée la fluorescence de la DCF mesurée 60 minutes après resuspension. Suite à une pré-incubation des algues avec 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , la fluorescence mesurée ([1 624 – 1 912] UA de fluorescence pour  $10^9$  cellules ; IC95, n=6) présente une grande variabilité et est proche du bruit de fond de la plaque (305 +/- 30 UA de fluorescence; non représenté). Lors d'une pré-incubation avec 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , la fluorescence mesurée est significativement au dessus du bruit de fond ([62 401 – 77 566] UA de fluorescence pour  $10^9$  cellules ; IC95, n=8). La concentration de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  d' $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  apparaît satisfaisante pour une mesure de la fluorescence en conditions d'exposition qui soit significativement différente des conditions non exposées au toxique (dans notre cas, le cuivre). Elle est donc retenue comme concentration de pré-incubation pour la mesure d'ERO.

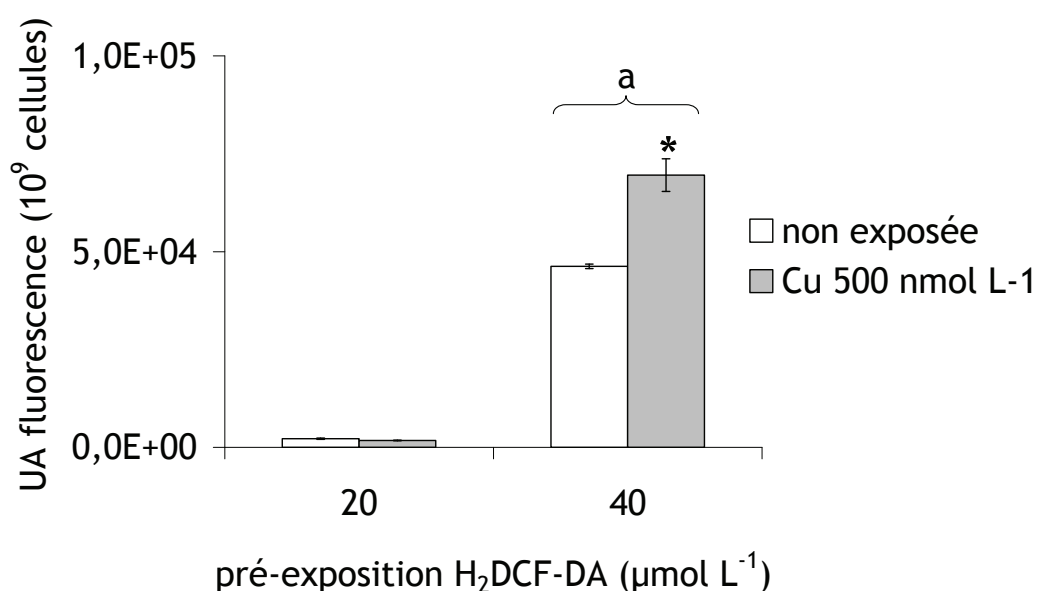


Figure 29 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{\text{ex}} 505 / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$ ) chez des algues exposées à une concentration en cuivre nominale de 500  $\text{nmol L}^{-1}$  comparé à une condition non exposée au cuivre (60 min après resuspension dans du  $\text{HSM}_{\text{mod}}$ ) après 2 h de pré-incubation avec 20 ou 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de

*H<sub>2</sub>DCF-DA (moyenne +/- IC95%, ANOVA 1 facteur, n=6 (20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et 8 (40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $p < 0,05$ . « a » représente la différence significative entre les conditions de pré-incubation et \* représente les différences significatives entre condition exposée et non exposée au cuivre.)*

### Mesure de la production d'ERO induite par le cuivre après pré-incubation avec de la H<sub>2</sub>DCF-DA

Les cellules ont été exposées à deux concentrations en cuivre total (dosé) de 714 et 5 154  $\text{nmol L}^{-1}$ . Ces concentrations ont été choisies car la première correspond à la CE50 mesurée à 96h en Erlenmeyer (CE50 = 728 – 858  $\text{nmol L}^{-1}$  Cu<sub>tot.</sub>) et la seconde est supérieure à l'CE95 (CE95 = 1 925 – 2 781  $\text{nmol L}^{-1}$ ; Annexe 3).

Une augmentation significative de la fluorescence chez des algues exposées par rapport au contrôle a été mesurée (Figure 30). La production d'ERO augmente rapidement entre 0 et 15 minutes d'exposition, puis ralentit avant d'atteindre un niveau stable après 45-60 min d'exposition.

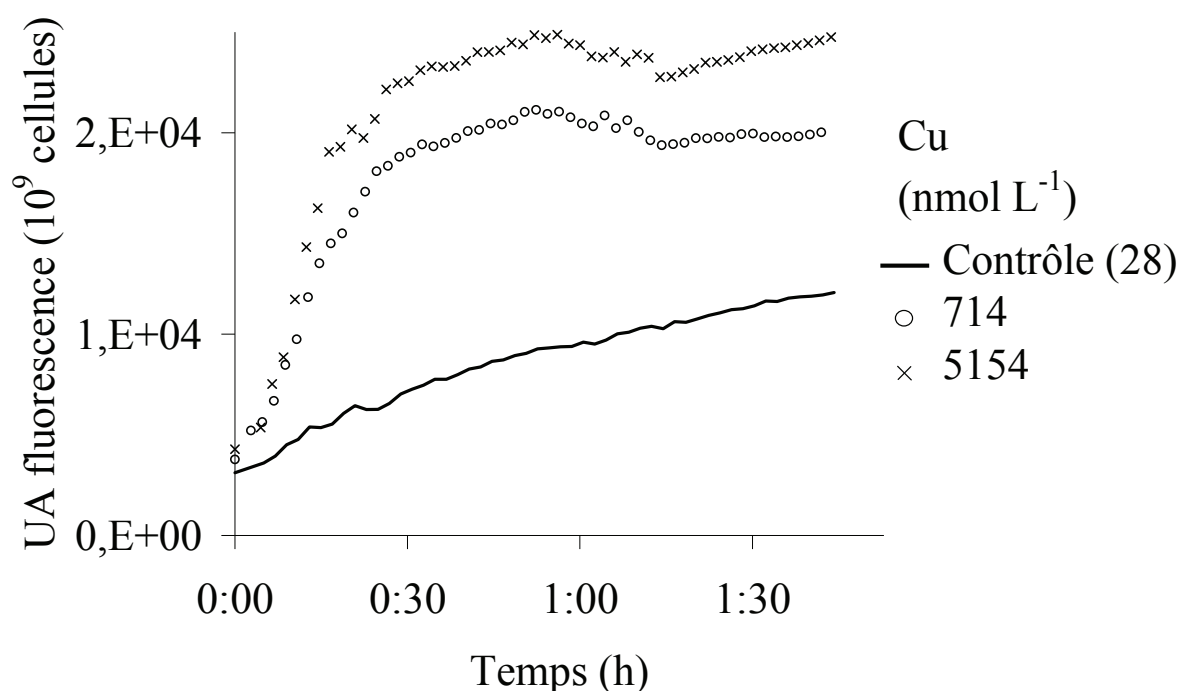


Figure 30 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{\text{ex}} 505 / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$  ; mesure toutes les 2 min) au cours du temps chez des algues exposées à 28 (contrôle), 714 et 5 154  $\text{nmol L}^{-1}$  de cuivre total (moyenne, SEM < 10% non représenté, n=8 (contrôle) et 12).

Même lorsque des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* sont exposées à de fortes concentrations, létales, en cuivre (5 154  $\text{nmol L}^{-1}$ ) la production d'ERO est significativement

supérieure à celle du contrôle. En effet, bien que la plus forte concentration en cuivre testée ait un effet avéré sur la croissance après 96h d'exposition, sur le court terme (2h) l'activité des estérases et la viabilité cellulaire ne sont pas ou peu impactées. Ceci nous permet de mesurer une production d'ERO supérieure après une exposition à 5 154 nmol L<sup>-1</sup> comparé à 714 nmol L<sup>-1</sup>. De plus, étant donné que la sonde est internalisée dans les cellules avant d'être exposées au cuivre (exposition qui réduit l'activité des estérases), celle-ci (H<sub>2</sub>DCF) peut réagir avec les ERO produites suite à l'internalisation du cuivre dans les cellules. Cette interaction H<sub>2</sub>DCF/ERO survient précocement après exposition au cuivre (maximum après 1h puis palier). En effet, la cinétique de production est plus rapide que lorsque les cellules étaient exposées simultanément au cuivre et à la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA (Figure 27). Cette observation est expliquée par le temps d'entrée de la H<sub>2</sub>DCF-DA et par sa déestérification ralentie en présence de cuivre qui ne convenait donc pas à une mesure dans le temps de la production d'ERO suite à ce genre d'exposition chez notre modèle biologique.

**3.1.1.3. Conclusion : choix d'un protocole optimal pour la mesure d'ERO**

En conclusion, nous avons pu vérifier expérimentalement que l'atténuation de la fluorescence de la DCF par le cuivre pouvait être négligée, ainsi que la mortalité des cellules à court terme, jusqu'à des concentrations de 500 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre. Suite à la modification du protocole (en introduisant une étape de pré-incubation comme proposé par Yoshida *et al.*, 2003), nous pouvons supposer que la diminution de la fluorescence de la DCF observée lors de l'exposition de cellule au cuivre et à l'H<sub>2</sub>DCF-DA simultanément (protocole de Knauer et Knauer, 2008) était probablement due à l'effet du cuivre sur l'activité des estérases, ce qui retardait l'entrée de la sonde dans les cellules. Une pré-incubation des cellules avec de la H<sub>2</sub>DCF-DA (40 μmol L<sup>-1</sup>, 2h à l'obscurité) a donc été retenue pour mesurer l'induction d'ERO lors de l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* au cuivre et au tritium, seuls et en mélange (paragraphe 2.3.3).

### 3.1.2. Validation du protocole optimisé pour la mesure de la cinétique de production d'ERO lors d'une exposition à des rayonnements ionisants

Dans le paragraphe 1.2.2.2, nous avons vu que l'effet des radiations ionisantes sur le stress oxydant est bien connu avec une augmentation des ERO ou encore une augmentation des enzymes antioxydantes. Cependant, ces effets ont été rapportés pour une exposition brève des cellules aux rayonnements ionisants  $\gamma$  et à des rayonnements oxydants UV. Les effets sur la production d'ERO de telles expositions uniques et de courtes durées sont ensuite suivies après irradiation à différents intervalles de temps. Les réponses observées sont précoces (ce qui justifie le besoin de mesure expérimentale de la balance oxydative cellulaire en fonction du temps) : par exemple, 15 min après l'irradiation de cellules cyanobactériennes par les UV-B, la production d'ERO augmente (He et Häder, 2002b). Certaines des mesures de la production d'ERO ont été réalisées par utilisation de sondes fluorescentes. Ces études mettent en évidence une auto-oxydation des sondes fluorescentes en présence de radiations, ce qui conduit à une auto-amplification de la fluorescence de la DCF en absence et donc en présence d'algue (Malanga et Puntarulo, 1995 ; He et Häder, 2002a ; Wan *et al.*, 2005). En ce qui concerne la production d'ERO suite à une exposition à l'HTO, seule une mesure chez le rat a été réalisée à notre connaissance (Savu *et al.*, 1999). Celle-ci montre une augmentation d'une enzyme antioxydante ( $G_6PDH$ ) suite à l'ingestion d'eau contaminée (4,2 Gy).

Dans ce contexte, l'un des objectifs de cette étude étant de mettre en évidence la cinétique de production d'ERO lors d'une exposition continue de notre modèle biologique à l'HTO, plusieurs points sont à clarifier en amont. Notamment, cette partie présente l'effet des radiations ionisantes envers la sonde fluorescente utilisée afin de déterminer la validité du protocole, expérimenté pour le cuivre, lors d'une exposition aux rayonnements ionisants. Cette validation se fera en absence d'algue pour mettre en évidence les phénomènes d'oxydation de la sonde suite à l'action directe des rayonnements ionisants sur la molécule ( $H_2DCF$ ). Dans un second temps, la cinétique de production d'ERO obtenue suite à l'exposition continue de cellules algales à des rayonnements  $\gamma$  sera commentée au vu des données bibliographiques concernant cet aspect.

### 3.1.2.1. Test de la dégradation de la sonde par des rayonnements ionisants

#### Dégradation de l'H<sub>2</sub>DCF par les rayonnements $\gamma$

Du milieu HSM<sub>mod</sub> contenant de la H<sub>2</sub>DCF a été soumis à un rayonnement  $\gamma$  de 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ . Ce niveau de rayonnement a été calculé à partir de l'activité maximale manipulable en <sup>137</sup>Cs au laboratoire dans un dispositif microplaque comme celui détaillé paragraphe 2.2.2. Les résultats montrent que la fluorescence de la DCF n'est pas stable dans le temps (Figure 31) lors d'une telle exposition. Elle suit une courbe d'augmentation exponentielle. L'action des radiations  $\gamma$  sur la H<sub>2</sub>DCF est donc confirmée. Néanmoins, la production d'ERO est significativement supérieure à celle de t=0 seulement après 58 min d'exposition continue (respectivement à t=0 et t=58 min [8 934 – 10 741] et [11 189 – 12 327] UA fluorescence pour 10<sup>9</sup> cellules, IC95).

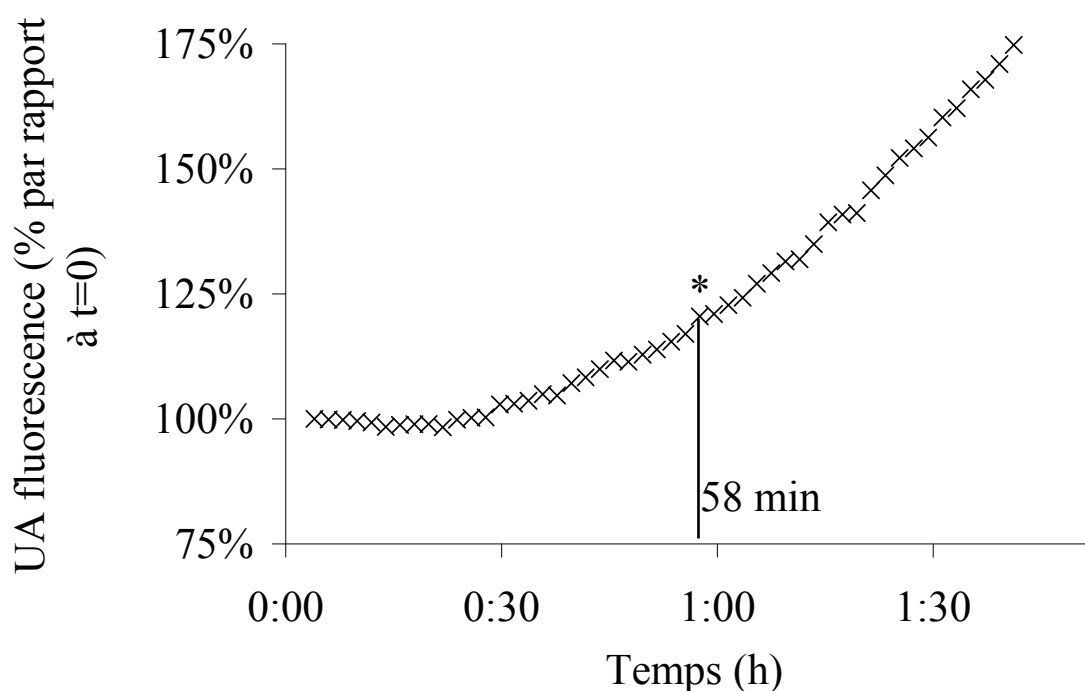


Figure 31 : Fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) après oxydation par les rayonnements  $\gamma$  (3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ) de la molécule H<sub>2</sub>DCF en absence d'algue en fonction du temps ( $n=3$ , \* = différence significative par rapport à t=0,  $p < 0,05$  anova 1 facteur, SEM < 10%).

#### Dégradation de l' H<sub>2</sub>DCF par l'HTO

Afin de mesurer l'action directe des radiations  $\beta$  sur la sonde H<sub>2</sub>DCF (déacétylation de H<sub>2</sub>DCF-DA avec du NaOH ; paragraphe 2.3.3), une solution contenant cette molécule a été

additionnée d'HTO (10  $\mu\text{L}$  pour un volume final dans les puits des microplaques de 200  $\mu\text{L}$ ). Deux activités d'HTO ont été testées (1 500 et 33 300  $\text{kBq mL}^{-1}$ ). Les résultats obtenus sont représentés Figure 32. Les rayonnements  $\beta$  induisent une diminution de la fluorescence de la DCF par rapport au contrôle ([387 – 444] UA de fluorescence) de 6 % après exposition à 1 500  $\text{kBq mL}^{-1}$  ([388 – 405] UA de fluorescence) et de 19 % après exposition à 33 300  $\text{kBq mL}^{-1}$  ([314 – 373] UA de fluorescence). Pour la plus forte concentration d'exposition à l'HTO, la baisse de 19 % mesurée est significativement différente par rapport au contrôle (après 100 min d'exposition).

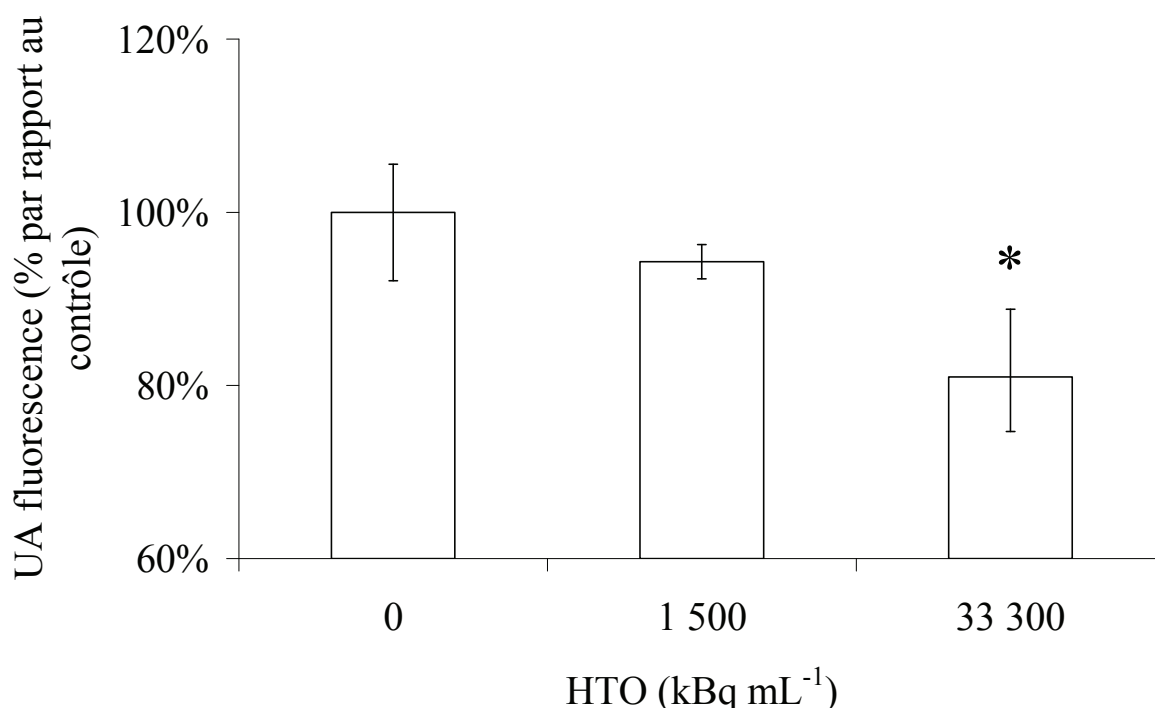


Figure 32 : Fluorescence de la DCF après oxydation par les rayonnements  $\beta$  de  $\text{H}_2\text{DCF}$  (sans algue) à 100 min d'exposition (ANOVA 1 facteur,  $p < 0,05$ , moyenne  $\pm$  IC95,  $n=4$ , \* = différence significative par rapport à la fluorescence mesurée en absence d'exposition à l'HTO).

La dégradation de la sonde observée par une augmentation de la fluorescence de la DCF en absence d'algue sous irradiation  $\gamma$  est cohérente avec l'étude de Wan *et al.* (2003) qui ont montré que les rayonnements  $\gamma$  induisent une dégradation accrue de la  $\text{H}_2\text{DCF}$  en DCF immédiatement après irradiation pour des doses allant de 15 mGy à 2 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ , 1,47 Gy  $\text{min}^{-1}$ ).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l' $\text{H}_2\text{DCF}$  est effectivement sensible aux rayonnements ionisants  $\gamma$ , mais que cette dégradation reste limitée durant une période inférieure à 45 min, pour une exposition à un rayonnement ionisant  $\gamma$  (3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ). Dans le

cas du tritium, la baisse de la fluorescence en présence d'HTO induira une légère sous estimation de la production d'ERO. Cependant, cette sous estimation est significative pour un niveau d'exposition de 33 000 kBq mL<sup>-1</sup>. Or dans les expérimentations réalisées et présentées paragraphe 3.2.2.3, la concentration d'exposition maximale utilisée pour mesurer la production d'ERO est de 2 849 kBq mL<sup>-1</sup>. De ce fait, la mesure de la DCF pourra être interprétée jusqu'à 100 min en négligeant cet effet lors d'exposition à l'HTO.

**3.1.2.2. Effet des rayonnements  $\gamma$  sur la production d'ERO par *Chlamydomonas reinhardtii***

Comme détaillé dans le paragraphe 2.2.2 et 2.3.3, la production d'ERO a été mesurée en microplaque. L'exposition de cellules algales à des débits de dose  $\gamma$  de 0 (contrôle) ; 0,33 ; 3,3 ; 33 et 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  a été réalisée lors de cinq expériences successives (une mesure pour chaque niveau d'exposition, avec huit réplicats et une mesure de la fluorescence toutes les 2 min jusqu'à 100 min ;  $\lambda_{\text{ex}} 505$  /  $\lambda_{\text{em}} 530$  nm). Ces expositions induisent une augmentation significative de la production d'ERO par rapport à des cellules contrôle (Figure 33). Après exposition des cellules à 0,33 ; 3,3 et 33  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ , la production d'ERO suit une courbe sigmoïde monotone qui atteint un maximum après 32 min d'exposition. En revanche, pour une exposition des cellules à 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ , la cinétique de production d'ERO est différente : elle augmente rapidement dans les premières minutes d'exposition pour atteindre une valeur maximale après 16 min. Ce pic est suivi par une décroissance d'ERO durant 16 min environ jusqu'à atteindre un niveau stable.



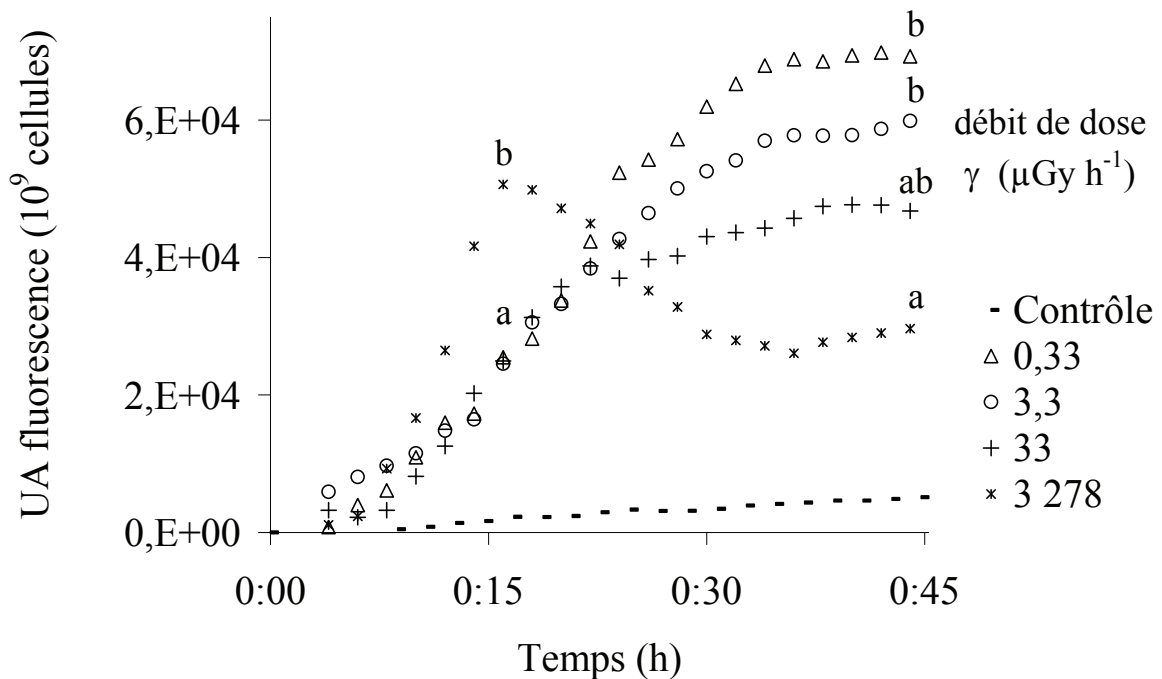


Figure 33 : Production d'ERO (UA fluorescence  $\lambda_{ex}505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) après expositions à 0 (contrôle) ; 0,33 ; 3,3 ; 33 et 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  de rayonnements  $\gamma$ . Les lettres indiquent les différences statistiques entre conditions (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple avec correction de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n=8$  ;  $SEM < 30 \%$ ).

Deux temps caractéristiques peuvent donc être comparés : 16 et 44 min (Tableau 15). A 16 min, la production d'ERO est significativement supérieure après exposition à 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  par rapport aux expositions à 0,33 ; 3,3 ; 33  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ . Après 44 min d'exposition aux rayonnements  $\gamma$ , la production d'ERO induite par 0,33 et 3,3  $\text{Gy h}^{-1}$  est significativement supérieure à celle induite lors de l'exposition à 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ . Une relation linéaire inverse entre les niveaux d'ERO produits et les débits de dose d'exposition (entre 0,3 et 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ) est observée à ce temps ( $y = (-8,922) x + 58\,799$ ,  $R^2 = 0,2235$ ,  $n = 32$ , avec  $x$  la dose d'exposition et  $y$  la fluorescence mesurée en UA pour  $10^9$  cellules). La pente de ce modèle est significativement différente de 0 ( $p < 0,001$ ) ce qui signifie que plus la dose d'exposition aux rayonnements  $\gamma$  est forte, moins il y a de fluorescence mesurée et ce entre les débits de dose testés, à savoir entre 0,33 et 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ .

Tableau 15 : Production d'ERO ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$  ; IC95) après 16 et 44 min d'expositions à 0 (contrôle) ; 0,33 ; 3,3 ; 33 et 3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  de radiation  $\gamma$ . Les lettres indiquent les différences statistiques entre conditions au même temps (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple avec correction de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Débit de dose $\mu\text{Gy h}^{-1}$	16 min	44 min
	UA fluorescence ( $10^9$ cellules ; IC95 bootstrap)	UA fluorescence ( $10^9$ cells ; IC95 bootstrap)
Contrôle	1 445 – 3 122	4 482 – 5 751
0,33	11 856 – 40 846 <sup>a</sup>	48 940 – 91 209 <sup>b</sup>
3,3	12 090 – 21 123 <sup>a</sup>	44 814 – 72 327 <sup>b</sup>
33	10 296 – 41 948 <sup>a</sup>	32 895 – 62 563 <sup>ab</sup>
3 278	38 004 – 64 454 <sup>b</sup>	21 301 – 38 991 <sup>a</sup>

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de la production d'ERO pour une exposition  $\gamma$  de 0,24  $\mu\text{Gy}$  (0,33  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  délivrés durant les 45 min d'exposition). Cette LOEDR (plus faible débit de dose effectif observé) est beaucoup plus faible que celles présentes dans la littérature où une augmentation du stress oxydatif lors d'une irradiation  $\gamma$  a été mesurée pour des débits de dose de 1 500 Gy ( $^{60}\text{Co}$  ; *Anacystis nidulans* ; Agarwal *et al.*, 2009). Cette différence réside dans le fait que l'exposition de nos cellules a été réalisée sous irradiation constante, ce qui n'était pas le cas dans les études précédentes. Ceci nous permet de conclure quant à la sensibilité accrue des cellules aux rayonnements  $\gamma$  lors d'une exposition continue par rapport à des expositions brèves.

Concernant le profil cinétique de la balance oxydative cellulaire lors d'une exposition continue, nous avons observé un pic de fluorescence pour la plus forte dose testée (3 278  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ). Ce pic se situe à 16 min et est suivi par une décroissance. Deux hypothèses peuvent expliquer cette décroissance d'après le fonctionnement de la sonde utilisée pour mesurer la production d'ERO :

- une baisse du niveau d'ERO intracellulaires
- une prise en charge des ERO par les systèmes antioxydants cellulaires.

Cependant, comme l'exposition des cellules est continue, une diminution de la production d'ERO en elle-même paraît peu probable. Seule l'action du système antioxydant pourrait expliquer ce phénomène. En effet, des irradiations  $\gamma$  chroniques ( $^{232}\text{Th}$ , 4 jours à 147  $\mu\text{Gy jours}^{-1}$ ) ont été montrés capables d'activer des enzymes protégeant les cellules contre les

enzymes SOD et glutathion réductase résultant du stress oxydatif engendré chez la cyanobactérie (*Synechococcus lividus*; Conter *et al.*, 1986). La plupart des cellules développent ce phénomène de détoxification sur le long terme (après 96h d'exposition; Conter *et al.*, 1986). Ici, nous avons montré une activation rapide du système antioxydant des cellules algales (dès 15 min) comme cela avait déjà été observé par He et Häder (2002a) suite à une exposition de courte durée de cellules cyanobactériennes à des UV-B. Pour les autres débits de dose  $\gamma$  testés, aucun pic de production d'ERO n'a été enregistré. Cette observation semble être liée à l'action du système antioxydant. En effet, bien que des expérimentations soient nécessaires afin de conclure sur ce point, on peut voir qu'à 44 min ces débits de dose plus faibles induisent plus d'ERO. Dans ce cas, il semble que la réponse du système antioxydant soit absente ou faible contrairement à une exposition à  $3\,278\ \mu\text{Gy h}^{-1}$ . Cette hypothèse nous permet également de discuter de la relation inversement proportionnelle obtenue entre débit de dose d'exposition et production d'ERO après 44 min d'exposition continue. En effet, suivant cette hypothèse plus la production d'ERO est forte (notamment à 16 min), plus la réponse du système antioxydant est élevée. Enfin, ces résultats semblent mettre en évidence l'activation du système antioxydant au-delà d'une certaine vitesse de production d'ERO intracellulaire.

### 3.2. CARACTERISATION DE L'EXPOSITION ET DES EFFETS DE L'EAU TRITIÉE SUR L'ALGUE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

---

Dans la littérature, les effets des radiations ionisantes sont bien documentées (paragraphe 1.2.2). Notamment, ce type de radiation aura une répercussion sur la croissance cellulaire, sur l'activité photosynthétique des organismes végétaux et induira un stress oxydant. Concernant plus particulièrement le tritium, sa toxicité est peu documentée. Néanmoins, les quelques études s'étant intéressées à la toxicité du tritium ont montré des effets sur différents paramètres cellulaires tels que la croissance (Porter et Knauss, 1953) et l'induction d'un stress oxydatif (Savu *et al.*, 1999). Ces résultats proviennent d'études réalisées sur différents organismes modèles (respectivement algue unicellulaire et rat). Étant donné l'absence d'études mesurant les effets de l'HTO à différents niveaux cellulaires pour un même organisme, la sensibilité des paramètres d'effet tels que l'inhibition de croissance, la production d'ERO et l'activité photosynthétique lors d'une exposition à l'HTO n'est pas connue. La précocité d'apparition des effets et leur sensibilité peuvent mettre en évidence des mécanismes d'action résultant de l'exposition à l'HTO. L'apparition de ces effets va dépendre du débit de dose radiologique d'exposition des cellules, lui-même dépendant des concentrations et des voies d'exposition (interne ou externe).

Dans ce contexte, le premier objectif de cette partie était de déterminer les conditions d'exposition (variations dans le temps des concentrations en HTO externe et interne à l'algue pour les différents dispositifs d'exposition) nécessaires au calcul du débit de dose. Cet objectif nécessitait deux mesures :

- la mesure des activités dans le milieu d'exposition en début et en fin d'expérience
- la mesure de l'internalisation de l'HTO et son taux de transformation en tritium organique.

Le second objectif était de déterminer la toxicité de l'HTO chez notre modèle biologique (*Chlamydomonas reinhardtii*) à différents niveaux d'organisation cellulaire afin de mettre en évidence des différences de sensibilité et de précocité de ces paramètres. Dans une première partie, la toxicité de l'HTO était testée sur la croissance des cellules. La deuxième partie consistait à mesurer l'effet de l'HTO sur l'activité des photosystèmes et enfin dans une

troisième partie, la production d'ERO était mesurée comme marqueur de stress oxydatif. Pour finir, l'ensemble des données obtenues furent discutées afin d'évaluer les paramètres d'effet les plus sensibles à l'HTO pour un producteur primaire. Ces données furent également discutées par rapport à l'effet mesuré, de radiation  $\gamma$  de référence sur la production d'ERO.

### 3.2.1. Caractérisation de l'exposition externe et interne de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* à l'eau tritiée : conséquences sur le calcul de débits de dose d'exposition

Pour analyser l'effet d'une substance, les concentrations et voies d'expositions des organismes doivent être connus. Pour les substances radioactives, et particulièrement pour les émetteurs  $\beta$  comme le tritium, la caractérisation de l'exposition nécessite de déterminer les activités externes à l'organisme, mais aussi internes afin de permettre un calcul de dose radiologique réaliste. C'est cette dose (ou débit de dose) qui nous permettra de comparer les résultats obtenus pour le tritium à ceux obtenus lors de l'exposition d'autres organismes à l'HTO ou de comparer ces résultats avec ceux faisant suite à d'autres types de rayonnements ( $\gamma$ , X). Afin d'avoir la meilleure estimation possible des doses d'exposition de nos cellules, l'objectif de cette partie est de déterminer le plus précisément possible les différentes voies d'exposition de notre modèle depuis le tritium présent initialement sous forme d'HTO dans le milieu.

L'incorporation d'HTO dans les cellules algales se fait via la photosynthèse et par échange isotopique (Strack *et al.*, 1980). L'eau tritiée du milieu d'exposition va tout d'abord se mettre à l'équilibre avec l'eau libre de l'algue (TFWT ; Bonotto *et al.*, 1984 ; Blaylock *et al.*, 1986 ; McCubbin *et al.*, 2001). Pour cette forme de tritium, l'hypothèse d'équilibre rapide et proportionnel au volume entre la concentration en HTO dans le milieu d'exposition et en TFWT dans l'algue est généralement retenue. Le processus de métabolisation de l'eau libre de l'algue (TFWT) en tritium organique via la photosynthèse est un processus plus lent (Amano *et al.*, 1995 ; McCubbin *et al.*, 2001). De nombreuses études rapportent une incorporation de l'HTO dans la matière sèche des algues uni- et pluricellulaires lors d'une exposition en laboratoire (Weinberger et Porter, 1953 ; Bonotto *et al.*, 1978 ; Bonotto *et al.*, 1984). Dans le cas d'algues unicellulaires (*Chlorella*), le tritium organique atteint un pallier aux alentours de deux divisions cellulaires (Weinberger et Porter, 1953).

Cette partie présente d'abord les résultats des mesures d'activités dans le milieu et caractérise leur variabilité en fonction du temps et du dispositif expérimental utilisé. Dans un second temps, les résultats concernant l'internalisation du tritium sous forme organique chez *Chlamydomonas reinhardtii* sont présentés. A partir de ces données, les implications de la métabolisation de l'HTO sur l'estimation des doses d'exposition sont discutées.

### 3.2.1.1. Vérification des concentrations en HTO dans les milieux d'exposition de Chlamydomonas reinhardtii

Pour des contraintes de manipulation de l'eau tritiée (risques de volatilisation, de contamination croisée, mais aussi limites imposées par les contraintes de radioprotection), plusieurs dispositifs expérimentaux ont été déployés pour permettre la mesure des différents paramètres d'effet. Les activités en tritium initiales, ainsi que leur évolution dans le temps, ont donc été spécifiques à chacun de ces dispositifs :

- pour la mesure de l'activité des photosystèmes en présence d'HTO, chaque niveau d'activité d'exposition a nécessité une expérience indépendante dans le temps, réalisée directement dans la cuve de lecture. De ce fait, la contamination croisée a pu être évitée. Les résultats obtenus sont présentés en relation avec les activités d'exposition initiales, la mesure ayant été effectuée sur un temps court (45 min). Ainsi, les concentrations suivantes ont été testées pour ce critère d'effet : 0 (contrôle) et 14 400 kBq mL<sup>-1</sup>.

- pour la mesure de la croissance et du diamètre cellulaire en Erlenmeyer, les cellules ont été exposées à l'HTO dans des récipients hermétiquement bouchés. Les concentrations initiales mesurées sont inférieures à la limite de détection (LD) pour le contrôle et sont de 87 kBq mL<sup>-1</sup> pour la condition exposée. Dans ces conditions la variation des concentrations en HTO est faible, ainsi que les contaminations croisées. La concentration en HTO chez le contrôle après 96h d'exposition est inférieure à 0,06 kBq mL<sup>-1</sup> alors que chez les conditions exposées, la concentration fluctue de moins de 5%. Les concentrations mesurées en fin d'expérimentation pour ce critère d'effet ont été : 0,06 (contrôle) et 85,1 kBq mL<sup>-1</sup> (n=3 réplicats).

Cependant, ces conditions d'exposition en Erlenmeyer n'ont pas permis de tester des activités élevées en HTO (maximum 85,1 kBq mL<sup>-1</sup> dû au volume important de milieu nécessaire : 150 ml). De ce fait, dans un second temps, la croissance a été estimée par utilisation du dispositif en microplaque.

- pour le suivi de la densité cellulaire en microplaque, la contamination des témoins s'est avérée plus importante (Tableau 16). En effet, les plus fortes concentrations d'exposition ont vu leur activité diminuer alors que les plus faibles ont été contaminées. Les concentrations suivantes (mesures en fin d'expérimentation) ont été testées pour ce critère d'effet : 12 (contrôle), 758, 4 243 et 52 195 kBq mL<sup>-1</sup> (n=3 réplicats).

Tableau 16: Concentration initiale et finale (96h) d'HTO mesurées en microplaque lors de la détermination de la croissance sur 96 heures (n=3 réplicats, moyenne +/- SEM)

Concentration initiale en HTO mesurée (kBq mL <sup>-1</sup> )	Concentration en HTO mesurée après 96h d'exposition (kBq mL <sup>-1</sup> )
<0,001	11,7 +/- 0,4
867 +/- 17	758 +/- 127
5 516 +/- 95	4 243 +/- 152
62 799 +/- 1 737	52 195 +/- 6 134

- pour la mesure de la production d'ERO en microplaque, la même tendance a été observée. En effet, les concentrations d'exposition d'HTO augmentent pour les plus faibles concentrations alors que les plus fortes concentrations diminuent (Tableau 17). En fonction de la place occupée sur la microplaque (proximité avec les plus fortes concentrations en HTO (paragraphe 2.3.3), les conditions non contaminées initialement atteignent 16 à 40 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO après 4 heures. Ainsi, la gamme de concentrations suivantes (mesures en fin d'expérimentation) a été testée pour ce critère d'effet : 16 (contrôle), 40, 226 et 2 861 kBq mL<sup>-1</sup>.

Tableau 17 : Concentration initiale et finale (4h) d'HTO mesurées en microplaque lors de la détermination de la production d'ERO sur 4 heures

Concentration initiale en HTO mesurée (kBq mL <sup>-1</sup> ) (moyenne +/- écart-type sur la mesure)	Concentration en HTO mesurée après 4h d'exposition (kBq mL <sup>-1</sup> ) (n=4, moyenne +/- SEM)
<0,001	16 +/- 7
<0,001	40 +/- 4
140 +/- 9	226 +/- 10
3 915 +/- 33	2 861 +/- 460

### 3.2.1.2. Estimation de la métabolisation de l'HTO sous forme de tritium organique chez Chlamydomonas reinhardtii

Le dosage du tritium organique a été effectué de deux façons différentes : après séchage des cellules sur bain de sable (après 48 et 72h d'exposition) et après lyophilisation des échantillons (après 72h d'exposition) suivant les protocoles du paragraphe 2.2.1.1. Lors de ces



expérimentations, les cellules ont été exposées dans des Erlenmeyers de 50 mL (10 mL de milieu) à des concentrations nominales en HTO de 0, 0,8, 8, 80 et 817 kBq mL<sup>-1</sup>

Les résultats concernant ces deux temps d'exposition et deux conditions de traitement sont présentés sur la Figure 34. Dans un premier temps, on constate que les concentrations de tritium organique obtenues lors des différents traitements (temps et conditions de séchage) augmentent linéairement en fonction des concentrations d'exposition en HTO. Les ordonnées à l'origine des régressions linéaires obtenues pour chaque condition n'étant pas significativement différentes de 0, ce paramètre a été imposé nul. Les pentes sont significativement différentes entre elles (analyse de covariance ;  $p < 0,05$ ) :

- après 72h d'exposition, les échantillons traités par bain de sable conservent plus de tritium organique que ceux ayant été lyophilisé (variation des pentes = 11%). En effet, la lyophilisation est une des méthodes les plus utilisées pour isoler le tritium organique (Baumgärtner *et al.*, 2001 ; Pointurier *et al.*, 2004 ; Vichot *et al.*, 2008). Cette méthode permet de mieux assécher l'échantillon qu'une simple évaporation, et d'éviter la présence d'un résidu d'HTO lié au tritium organique. Ce résidu d'HTO explique la variation de 11 % entre les deux pentes pour ces deux conditions de séchage. Néanmoins, cette variation est faible, les deux techniques permettant une bonne estimation de l'internalisation de l'HTO sous forme de tritium organique dans les algues.

- lors du séchage sur bain de sable, les résultats obtenus après 48 et 72h d'exposition des cellules à l'HTO montrent des pentes significativement différentes (augmentation de 29% entre 48 et 72h), indiquant que la quantité de tritium incorporé dans la matière organique n'a pas encore atteint un équilibre après 48h d'exposition. Cette observation est cohérente avec la cinétique lente attendue pour la métabolisation de l'HTO dans les cellules algales. Weinberger et Porter (1953) avaient cependant montré un équilibre du tritium organique après deux cycles de division cellulaires chez *Chlorella*. Ici, après 48h d'exposition sous illumination continue, les algues se sont divisées environ 6 fois ( $d_{int} = 7\,500$  cellules mL<sup>-1</sup> et  $d_{48h} = 409\,100$  cellules mL<sup>-1</sup>) et l'équilibre n'est toujours pas atteint. La métabolisation du tritium sous forme de tritium organique chez *Chlamydomonas reinhardtii* dans nos conditions de croissance semble être plus lente de ce qui avait été mesurée chez *Chlorella* par Weinberger et Porter (1953).

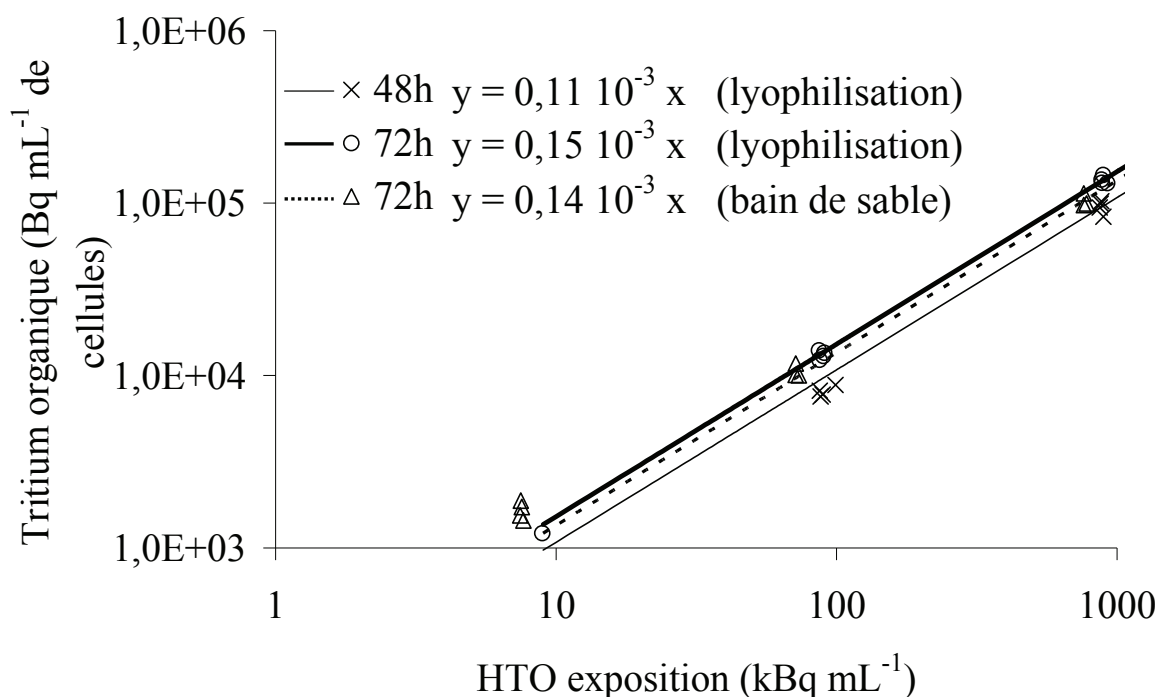


Figure 34 : Tritium organique dans les cellules algales en fonction de la concentration en HTO d'exposition (48 et 72h) des cellules suivant deux protocoles différents de séchage des algues (activités dosées : <LD ; 0,82 ; 8,1 ; 91 ; et 879 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 48h et passées au bain de sable ; <LD ; 0,94 ; 8,6 ; 88 et 894 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 72h et passées au bain de sable ; <LD, 0,77 ; 7,5 ; 72 et 767 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO pour les algues exposées 72h et lyophilisées; exposition en Erlenmeyers de 50 mL, n=3).

Les résultats confirment la présence de tritium sous forme organique dans la matière sèche des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* après 48 et 72h d'exposition à l'eau tritiée. Cette accumulation représente après 72h d'exposition 15% (la valeur maximale mesurée) de la concentration d'exposition. Ce résultat est tout de même à nuancer puisque l'équilibre de métabolisation n'est pas encore atteint après 48-72h. Ce 15% s'ajoute ainsi à l'eau libre tritiée contenue dans la matrice algale et contribue à une augmentation de l'exposition des cellules aux radiations  $\beta$  par voie interne.

### 3.2.1.3. Calcul de la dose d'exposition au tritium de *Chlamydomonas reinhardtii*

Le débit de dose d'exposition des cellules a été estimé via le logiciel EDEN (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2006). De part la très faible taille des cellules algales unicellulaires, seul un débit de dose provenant de la part interne (contenue dans l'algue hors tritium organique) de tritium

est considéré. Deux composantes entrent dans le calcul des débits de dose interne d'exposition des cellules : l'activité en tritium libre (TFWT) contenue dans la matrice algale et l'activité en tritium sous forme organique.

La première composante de ce calcul, à savoir l'activité résultante de l'eau tritiée libre dans les cellules (TFWT), n'a pas pu être dosée. En effet, des difficultés expérimentales ont été rencontrées, notamment lors de la filtration des cellules : une partie du milieu d'exposition reste piégé entre les cellules. Afin de ne pas doser ce tritium résiduel, les cellules ont été rincées avec de l'eau stable. Néanmoins, ce rinçage engendre la désorption de l'eau libre tritiée cellulaire (TFWT) par échange isotopique. Le même problème a été rencontré dans le cas d'une centrifugation. De ce fait, le tritium dosé est très variable entre les réplicats car dépendant du temps de contact avec l'eau de rinçage. Néanmoins, les données présentes dans la littérature s'accordent sur le fait que cette activité est très rapidement en équilibre avec celle du milieu d'exposition (Blaylock *et al.*, 1986 ; Spencer *et al.*, 1988 ; Amano *et al.*, 1995 ; McCubbin *et al.*, 2001). Ainsi, si les cellules sont exposées à 1 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO (milieu d'exposition), l'activité en tritium libre cellulaire sera de 1 kBq mL<sup>-1</sup> de cellule.

En ce qui concerne la contribution du tritium organique, nous venons de mettre en évidence que 15% de l'activité d'exposition est métabolisée après 72h de contamination des cellules à l'HTO. Pour 1 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO dans le milieu d'exposition, les cellules métabolisent 0,15 kBq mg<sup>-1</sup> de cellules sèches.

Cette activité d'exposition peut être convertie en dose d'exposition via un facteur de conversion. Ce facteur de conversion est appelé DCC. Il est obtenu par le calcul. Dans notre cas ce facteur a été obtenu par utilisation du logiciel EDEN en considérant un dépôt total de l'énergie des radiations du tritium dans l'algue (paragraphe 2.2.2). Ce facteur est de  $3,29 \times 10^{-6}$  µGy h<sup>-1</sup> par Bq mL<sup>-1</sup> pour la dose interne. De ce fait, l'activité d'exposition interne à l'algue est proportionnelle à la dose d'exposition. La contribution du tritium organique à la dose interne est donc similaire à celle du tritium organique en termes d'activité (15%). Cet apport est faible même si non négligeable à 72h. Cependant, dans le reste du rapport, le tritium organique ne sera pas pris en compte dans l'estimation de la dose car nous ne disposons de valeur que pour les temps 48 et 72h ce qui ne permet pas de conclure quant à la dose internalisée après 4h. Cette composante sera discutée à la fin du manuscrit.

Dans cette étude, les niveaux de concentrations testés sont variables en fonction des dispositifs expérimentaux. De plus, ces concentrations d'exposition vont varier au cours du temps. Enfin, celles-ci vont engendrer des débits de dose interne précis. Dans un souci de

clarté, l'ensemble des conditions d'exposition et des débits de dose associés sont synthétisées dans le Tableau 18.

Tableau 18: Conditions d'exposition à l'HTO en fonction des temps et des dispositifs d'expérimentation en kBq mL<sup>-1</sup> et correspondance en μGy h<sup>-1</sup> (calculé avec le logiciel EDEN)

Paramètre mesurés (Conditions expérimentales)	Temps (h)	Activité mesurée en kBq mL <sup>-1</sup> (débit de dose en μGy h <sup>-1</sup> )						
		Contrôle	Gamme d'exposition (débit de dose en μGy h <sup>-1</sup> )					
			~10 <sup>-3</sup>	~10 <sup>-2</sup>	~10 <sup>-1</sup>	~1-10	~100	
Croissance et diamètre (Erlenmeyer)	0				87 (0,29)			
	96	0,06 (0,0002)			85,1 (0,28)			
Tritium organique (Erlenmeyer, bain de sable, 48h)	0	0 (0)	0,86 (0,0028)	8,6 (0,028)	91 (0,3)	902 (3,0)		
	48	0 (0)	0,82 (0,0027)	8,1 (0,027)	91 (0,3)	879 (2,9)		
Tritium organique (Erlenmeyer, bain de sable, 72h)	0	0 (0)	0,98 (0,0032)	9,1 (0,030)	89 (0,3)	924 (3,0)		
	72	0 (0)	0,94 (0,0031)	8,6 (0,028)	88 (0,290)	894 (2,9)		
Tritium organique (Erlenmeyer, lyophilisation, 72h)	0	0 (0)	0,8 (0,0026)	7,9 (0,026)	74 (0,243)	775 (2,55)		
	72	0 (0)	0,77 (0,0025)	7,5 (0,025)	72 (0,237)	767 (2,52)		
Activité des photosystèmes (cuve du PAM)	0 (estimé)	0 (0)				14 400 (47)		
Production d'ERO (microplaque, 4h)	0	0 (0)			140 (0,5)	3 915 (13)		
	4	16 (0,05)			40 (0,13)	226 (0,7)	2 861 (9)	
Croissance (microplaque, 96h)	0	0 (0)				867 (2,8)	5 516 (18)	62 799 (207)
	96	12 (0,04)				758 (2,45)	4 243 (14)	52 195 (172)

### 3.2.2. Effet de l'HTO sur *Chlamydomonas reinhardtii* : sensibilité des paramètres d'études

#### 3.2.2.1. Effet de l'HTO sur le taux de croissance et le diamètre cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*

Afin de mesurer l'effet de l'HTO sur la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*, des cellules algales ont été exposées à différentes concentrations en HTO (activité finale : 12 - contrôle -, 758, 4 243 et 52 195 kBq mL<sup>-1</sup> en microplaque et 0,06 et 85,1 kBq mL<sup>-1</sup> en Erlenmeyer). La densité (en microplaque) et le diamètre cellulaire (en Erlenmeyer) ont été suivis au cours de ces expositions (paragraphe 2.3.1). Le choix de ces deux dispositifs a été motivé par l'activité maximale manipulable en laboratoire, qui limite les expérimentations sur le diamètre cellulaire aux plus faibles activités, compte tenu du volume important de milieu nécessaire pour cette mesure au compteur de particules.

#### Effet de l'HTO sur le diamètre cellulaire

Pour suivre le diamètre des cellules dans le temps, chaque 24h, un volume de milieu a été prélevé et le diamètre des cellules a été mesuré avec un compteur de particules (paragraphe 2.3.1). Pour que ces prélèvements (de 1 mL à 100 µL en fonction de la densité algale, n=3) ne fassent pas varier de façon trop importante le volume de milieu d'exposition, des volumes d'expositions importants ont dû être expérimentés (150 mL). Pour ceci une expérimentation en Erlenmeyer a été réalisée. Étant donné les limites manipulables en HTO sur paillasse en zone surveillée, nos cellules ont été exposées durant 96h à 85,1 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO et un contrôle (cellules non exposées) a été également conduit (n=3).

Sur la Figure 35 est reporté le diamètre mesuré en fonction du temps d'exposition à l'HTO. En ce qui concerne le diamètre des cellules non exposées celui-ci augmente au cours des 24 premières heures d'expérimentation avant de rejoindre à 48h un niveau similaire à celui mesuré à t=0. A 72 et 96h, le diamètre des cellules dans le contrôle est inférieur à t=0. Cette variation du diamètre cellulaire est classique et fait suite au repiquage des cellules dans un milieu contenant à t=0 des nutriments ce qui relance la division cellulaire (augmentation du diamètre des cellules avant division). En ce qui concerne le diamètre des cellules exposées à l'HTO, la même tendance que celle observée chez les algues non exposées est obtenue. De

plus, aucune différence significative du diamètre des cellules exposées par rapport à des cellules non exposées n'a pu être mise en évidence (ANOVA 2 facteurs,  $p < 0,05$ ).

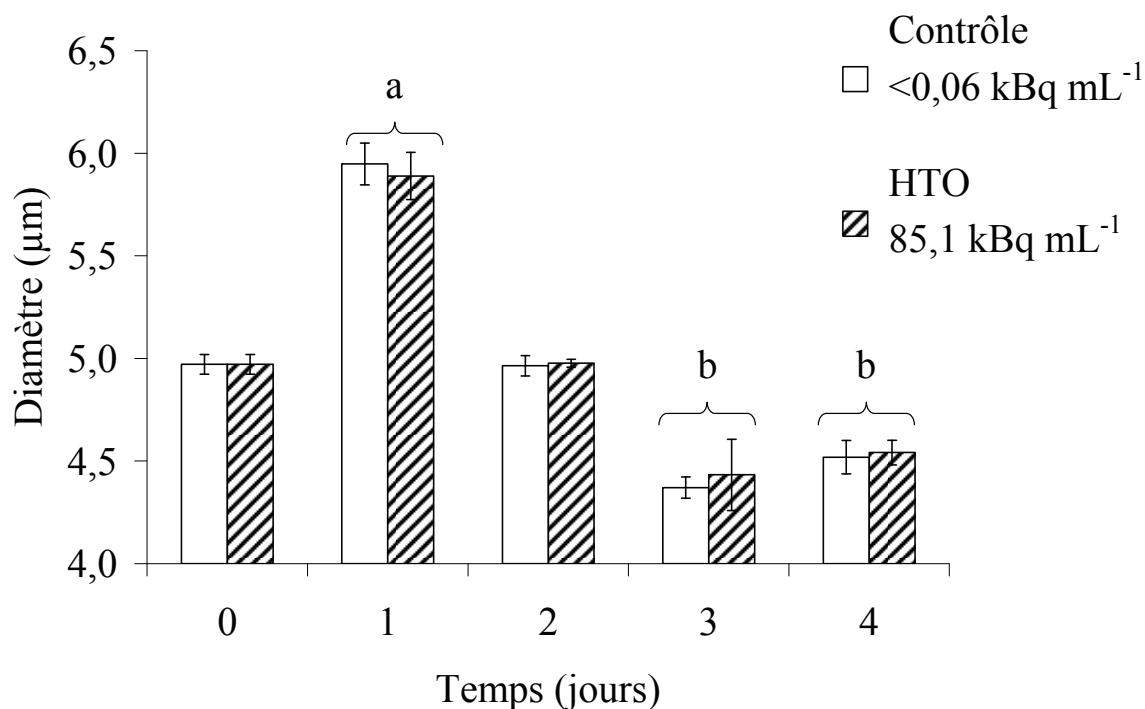


Figure 35 : Effet de l'HTO sur le diamètre des cellules (moyenne  $\pm$  IC95, bootstrap) lors d'exposition à  $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO comparée à des algues contrôle non exposées ( $<0,06 \text{ kBq mL}^{-1}$ ). Les lettres représentent les différences significatives par rapport au diamètre mesuré à  $t=0$  (ANOVA 2 facteurs,  $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

En conclusion, une exposition à  $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO n'induit pas d'effet supplémentaire sur le diamètre cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* comparé aux conditions normales de croissance sans exposition. Ce résultat apporte des informations complémentaires à ceux de l'étude réalisée par Porter et Knauss (1953). Ces auteurs avaient observé une augmentation du diamètre de *Chlorella pyrenoidosa* après 75h d'exposition à une concentration d'HTO bien supérieure à celle testée ici ( $1\,480\,000 \text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO - 40 mCi - ; +54% du diamètre cellulaire).

Une possibilité pour conduire cette expérimentation en limitant la variation du diamètre cellulaire chez notre contrôle dans le temps aurait été une synchronisation des cellules. Cette synchronisation peut notamment être réalisée par une alternance de cycle jour/nuite (Harris, 1989). Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii* plusieurs cycles ont été utilisés dans la littérature (12h/12h, 10h/14h, 8h/16h,...). Ces cycles ont été testés chez notre souche. Il n'a cependant pas été possible de synchroniser les cellules (1 division par jour). Ceci peut être

expliqué par une division rapide des cellules ( $> 1$  par jour) qui aurait nécessité des temps d'éclairement plus courts.

### Effet de l'HTO sur la croissance

Pour suivre la croissance des cellules dans le temps (en microplaque, 200  $\mu$ L par puits), chaque 24h, une lecture de la fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}440 / \lambda_{\text{em}} 680$  nm), permettant de calculer la densité cellulaire, est réalisée (paragraphe 2.3.1). Étant donné les limites manipulables en HTO sur paillasse en zone surveillée et le nombre de conditions (4) et de réplicats testés ( $n=6$ ), nos cellules ont été exposées durant 96h à 12 (contrôle), 758, 4 243 et 52 195  $\text{kBq mL}^{-1}$  d'HTO (activités finales dosées). A partir de l'estimation de la biomasse ainsi obtenue, un modèle logistique à trois paramètres a pu être appliqué aux données afin de définir les paramètres de croissances cellulaires.

Les résultats obtenus montrent que lors de l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à l'HTO, la croissance algale suit une courbe sigmoïdale classique (Figure 36). La densité cellulaire maximale atteinte après 96h d'exposition diffère suivant les concentrations d'expositions à l'HTO. En effet, la densité cellulaire maximale (paramètre d, Tableau 19) est augmentée significativement de 15% après exposition à 758  $\text{kBq mL}^{-1}$  d'HTO alors que ce même paramètre est réduit significativement de 23% lors d'une exposition à 52 195  $\text{kBq mL}^{-1}$  d'HTO. Le taux de croissance maximal (paramètre b, Tableau 19) n'est cependant pas significativement différent après exposition aux quatre différentes concentrations en HTO. Enfin, le temps nécessaire pour atteindre 50% de la densité cellulaire maximale (paramètre e, Tableau 19) est réduit significativement de 15% pour la plus forte concentration en HTO (2,7 jours pour le contrôle contre 2,3 jours pour 52 195  $\text{kBq mL}^{-1}$ ).



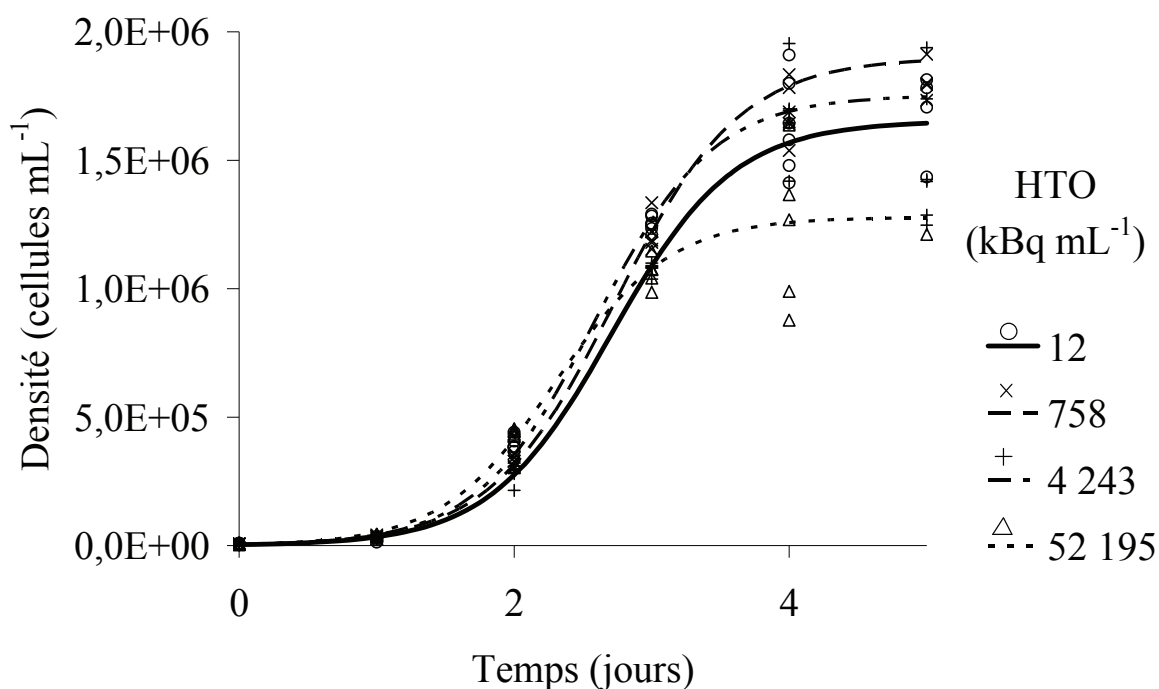


Figure 36 : Densité cellulaire en fonction du temps lors d'une exposition à différentes activités d'HTO (12 – contrôle - 758, 4 243, et 52 195 kBq mL<sup>-1</sup> – n=6). Les courbes représentent le modèle logistique à 3 paramètres.

Tableau 19 : Paramètre du modèle logistique obtenus pour la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* durant 96 h d'exposition à 12 (contrôle), 758, 4 243 et 52 195 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO ([IC95], comparaison multiple et correction de Holm). Alpha ≤ 0,05 (\*) et ≤ 0,001 (\*\*\*)

Paramètres	12 kBq mL <sup>-1</sup>	758 kBq mL <sup>-1</sup>	4 243 kBq mL <sup>-1</sup>	52 195 kBq mL <sup>-1</sup>
b (taux de croissance maximal, division jour <sup>-1</sup> )	2,1-2,4	2,0-2,4	2,2-2,5	2,2-2,6
d (densité cellulaire maximale, 10 <sup>6</sup> cellules mL <sup>-1</sup> )	1,53-1,78	1,76-2,04 *	1,63-1,88	1,17-1,39 ***
e (temps nécessaire pour atteindre 50% de la densité cellulaire maximale, jour)	2,6-2,8	2,6-2,9	2,5-2,7	2,2-2,4***

Les résultats obtenus montrent qu'une exposition des cellules à l'HTO (52 195 kBq mL<sup>-1</sup> ce qui correspond à un débit de dose interne de 172 µGy h<sup>-1</sup>) induit une réduction significative de la croissance algale sur 96h. L'effet mesuré ici montre que la croissance de

*Chlamydomonas reinhardtii* est moins sensible à l'HTO que celle de *Chlorella pyrenoidosa*, comme le montre la LOEC obtenue par Porter et Knauss (1953) sur la mesure de la densité cellulaire après 75h d'exposition à 185 000 kBq mL<sup>-1</sup>.

Enfin, nos résultats mettent en évidence que de plus faibles doses d'HTO, soit n'ont pas d'effet sur les paramètres de croissance (4 243 kBq mL<sup>-1</sup> ce qui correspond à 14 µGy h<sup>-1</sup>), soit induisent une augmentation de la densité cellulaire maximale (758 kBq mL<sup>-1</sup> ce qui correspond à 2,5 µGy h<sup>-1</sup>) après 96h d'exposition.

#### **3.2.2.2. Effet de l'HTO sur l'activité des photosystèmes**

Des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposées à une activité en HTO de 14 400 kBq mL<sup>-1</sup> (4,5 mL d'échantillon à 223 000 cellules mL<sup>-1</sup>, paragraphe 2.3.2). La Figure 37 représente l'évolution des paramètres Fv/Fm et Φs en fonction du temps d'exposition. Les paramètres mesurés sont compris entre 0,7 et 0,8 pour Fv/Fm et entre 0,6 et 0,7 pour Φs ce qui indique un état général de départ satisfaisant des cellules. De plus, ces paramètres sont significativement stables chez le contrôle dans le temps (ANOVA 2 facteurs). En ce qui concerne l'évolution de ces paramètres lors de l'exposition des cellules à 14 400 kBq mL<sup>-1</sup>, aucune différence n'a pu être mise en évidence par rapport à des algues non exposées. De même les paramètres photosynthétiques Qp, Qn et NPQ ne sont pas modifiés (non représenté).

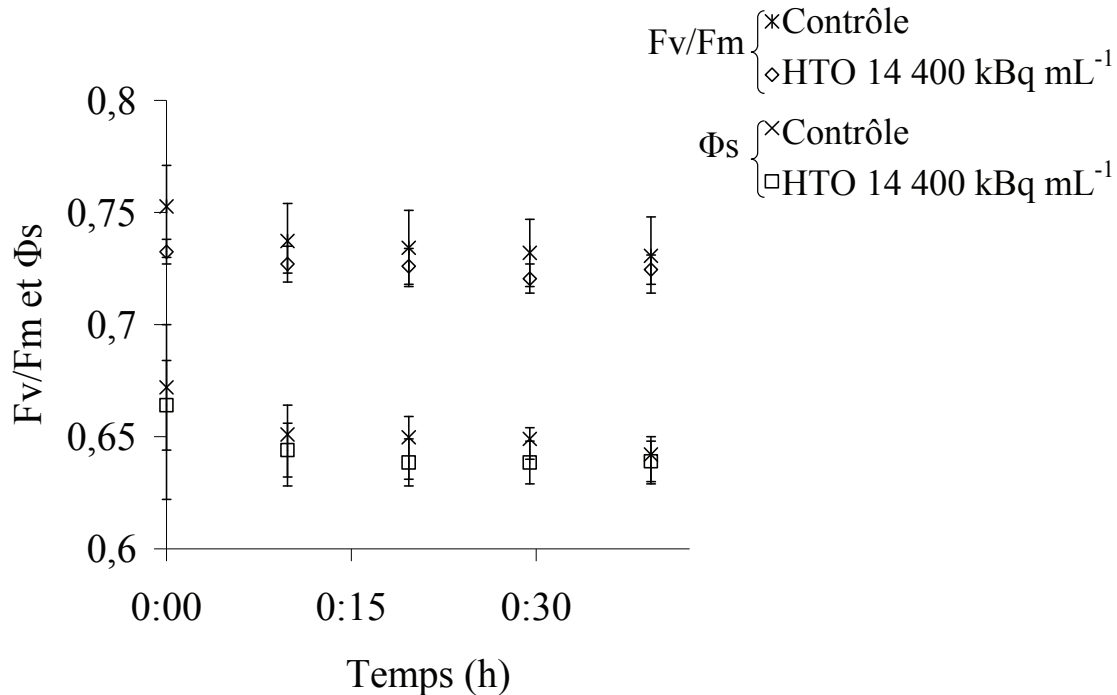


Figure 37 : Activité des photosystèmes ( $F_v/F_m$  et  $\Phi_s$ ) lors d'expositions à  $14\,400\text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO comparé à des algues non exposées (moyenne  $\pm$  IC95,  $n=3$  ; bootstrap, ANOVA 2 facteur,  $p<0,05$ ).

En conclusion, l'exposition à  $14\,400\text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO est sans effet sur l'activité photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce résultat est cohérent avec la réduction de ce paramètre rapportée pour des doses de rayonnements ionisants beaucoup plus fortes (poivron rouge exposé pendant 1 journée à 2 Gy ; Kim *et al.*, 2005). De ce fait, la mesure de l'activité des photosystèmes n'est pas un paramètre précoce dans le cas de l'étude de la toxicité de l'HTO envers notre modèle d'algue unicellulaire.

### 3.2.2.3. Production d'ERO

La production d'ERO a été déterminée par mesure de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{\text{ex}} 505 / \lambda_{\text{em}} 530\text{ nm}$ ) en microplaque (200  $\mu\text{L}$  de suspension algale par puits) suivant le protocole testé dans le paragraphe 3.1.1. Cette mesure a été effectuée toutes les 2 min durant 100 min. Les cellules ont été exposées à des activités d'HTO de 16 (contrôle), 40, 226 et 2 861  $\text{kBq mL}^{-1}$  ( $n=8$  -contrôle- et  $n=16$  pour les trois conditions exposées).

La production d'ERO augmente rapidement après exposition des cellules à l'HTO à 40, 158 et 2 849  $\text{kBq mL}^{-1}$  (Figure 38). Le maximum de production est atteint après 14-15 minutes d'exposition. Les fluorescences moyennes maximales mesurées sont respectivement de 32 501, 43 250 et 58 035 UA de fluorescence pour  $10^9$  cellules ( $n=16$ ). Cette production

d'ERO maximale est significativement différente entre les conditions d'exposition. De plus, une relation linéaire a été observée entre cette production maximale d'ERO et les concentrations d'exposition, relation dont la pente et l'ordonnée à l'origine sont significativement différentes de 0 ( $y = 7,289 \cdot 10^{-3} x + 3,318 \cdot 10^4$ ,  $R^2 = 0,2639$ ,  $n = 48$ ,  $p < 0,001$ ). Ce pic de production est ensuite suivi par une diminution de la fluorescence qui dure environ 45 min. Après 60 min, la production d'ERO dans les cellules atteint une valeur constante, supérieure à celle du contrôle et ce jusqu'à 100 min, mais qui ne présente pas de relation de dose (les productions d'ERO après exposition à 158 et 2 849 kBq mL<sup>-1</sup> ne sont plus significativement différentes entre elles).

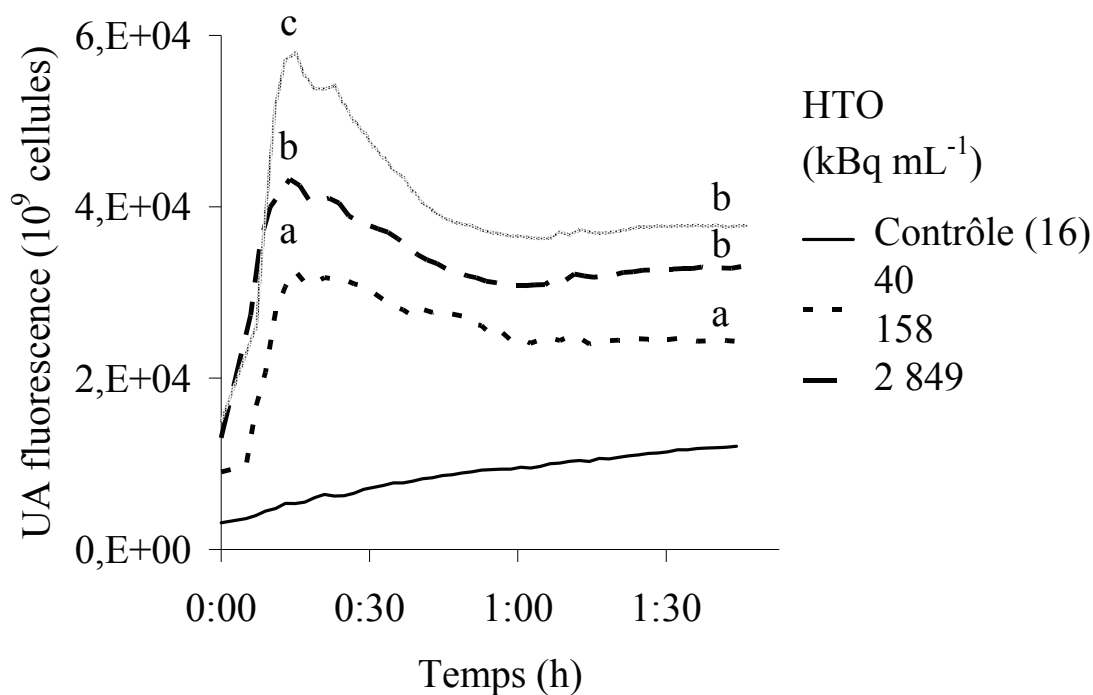


Figure 38 : Production d'ERO ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) lors de l'exposition des cellules à différentes concentration en HTO (16 -contrôle-, 40, 158 et 2 849 kBq mL<sup>-1</sup>) en fonction du temps (ANOVA 1 facteur à 15 et 100 min,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$  -contrôle- et 16 pour les trois conditions exposées). Les lettres représentent des différences significatives entre conditions.

3.2.3. Discussion : Effet de l'HTO chez *Chlamydomonas reinhardtii* : sensibilité des paramètres de mesure et comparaison à l'effet d'un rayonnement  $\gamma$

*Marqueurs précoces d'exposition à l'HTO : sensibilité de la production d'ERO, mais pas de la photosynthèse*

Nos résultats montrent qu'une exposition à l'HTO jusqu'à  $14\,400\text{ kBq mL}^{-1}$  ( $47\ \mu\text{Gy h}^{-1}$  pendant 45 min) n'engendre aucun effet sur l'activité des photosystèmes, alors que la production d'ERO est augmentée dès une exposition à  $40\text{ kBq mL}^{-1}$  d'HTO ( $0,13\ \mu\text{Gy h}^{-1}$ ). Dans la littérature, des résultats similaires ont été observés après exposition au cuivre. Knauert et Knauer (2008) rapportent une production d'ERO après exposition de *Chlorella vulgaris* à une concentration en cuivre total de  $250\text{ nmol L}^{-1}$ , sans effet sur l'activité des photosystèmes.

Cette production rapide d'ERO après une exposition à l'HTO fait de ce paramètre d'étude un indicateur précoce d'exposition des cellules. La cinétique de production d'ERO en présence d'HTO présente un pic qui est dose dépendant. Un tel effet dose dépendant sur la production d'ERO de façon précoce avait déjà été observé suite à l'exposition de cellule épithéliale humaine MCF-10 à des doses allant de 0,15 à 2 Gy par Wan *et al.* (2005). Dans cette étude, la production d'ERO a été mesurée par utilisation d'une sonde fluorescente ( $\text{H}_2\text{CDF-DA}$ ), sonde qui permet de mesurer la balance entre les ERO produits et les mécanismes de défenses du système antioxydant. Dans ce cadre, la décroissance de la production d'ERO après le pic de fluorescence maximal peut être expliquée soit par une baisse de la production d'ERO des cellules, soit par une augmentation de la prise en charge des ERO par le système antioxydant. Étant donné que l'exposition des cellules à l'HTO est continue, la première hypothèse est rejetée. De plus, l'activation du système antioxydant cellulaire sur de courtes échelles de temps a déjà été observée (synthèse de phytochélatines après 1h d'exposition au cuivre chez l'algue *Phaeodactylum tricorutum* ; Morelli et Scarano, 2004) et permet de confirmer que la mise en place du système antioxydant des cellules est précoce après une exposition à l'HTO.

La production d'ERO sous forme de pic semble donc résulter : 1/ d'une exposition des cellules à l'HTO via le tritium externe et interne (une entrée rapide du tritium par équilibre isotopique) à l'algue, 2/ la génération immédiate d'ERO en réponse à l'exposition interne et externe des cellules à l'HTO et 3/ la mise en place des systèmes antioxydants. Pour confirmer

ce scénario de mécanisme d'action, un dosage des enzymes antioxydantes devra être réalisé sur le court terme.

**Inhibition de la croissance : faible sensibilité à l'HTO en lien avec les faibles débits de dose délivrés et à la mise en place d'un système antioxydant efficace**

Si après une exposition des cellules à l'HTO une production d'ERO est mesurée, un faible effet a été reporté sur la croissance même après exposition à de plus forts débits de dose (23% d'inhibition de la densité cellulaire maximale après 96h d'exposition à 52 195 kBq mL<sup>-1</sup>, ce qui correspond à 172 µGy h<sup>-1</sup>). Cette absence de lien entre la production d'ERO et l'inhibition de croissance semble indiquer que la cellule est capable de prendre en charge ces niveaux d'ERO sans conséquences à long terme. L'apparition des effets va être liée au dépassement des capacités antioxydantes cellulaires ainsi qu'au dépassement des mécanismes de réparation cellulaire (des dommages induit par le stress oxydant).

Ces effets sur la croissance ont été mesurés pour des concentrations en HTO (entre 758 et 52 000 kBq mL<sup>-1</sup>) non loin de concentrations environnementales (mais largement supérieures à la limite fixée par l'OMS de 0,01 kBq mL<sup>-1</sup>). En effet, avant dilution des effluents liquides de CNPE, ceux-ci peuvent contenir du tritium à des concentrations allant jusqu'à 4 kBq mL<sup>-1</sup> (Pierrard, 2008). L'effet mesuré dans cette étude montre que la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* est plus sensible à l'effet de l'HTO que celle de *Chlorella* (LOEC 75h après exposition à 185 000 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO ; Porter et Knauss, 1953). Quelles que soient les fortes activités en HTO expérimentées dans cette étude, celles-ci correspondent à de faibles débits de dose avec un maximum de 172 µGy h<sup>-1</sup>. Cette étude confirme donc des données récentes obtenues sur d'autres organismes à différents niveaux d'effet, qui tendent à montrer que l'HTO est toxique dès de faibles doses d'exposition : 1,2 µGy h<sup>-1</sup> (anormalité et mortalité de larve de moule ; Hagger *et al.*, 2005), 12 µGy h<sup>-1</sup> (apparition de micronoyaux et cassure à l'ADN chez la moule adulte ; Jha *et al.*, 2005), 3 µGy h<sup>-1</sup> (développement anormal des œufs, fécondité réduite et durée de vie raccourcie chez la daphnie ; Gudkov et Kipnis, 1996) et 42 µGy h<sup>-1</sup> (effet sur l'index de mue de *Pollicipes polymerus* après 32 jours d'exposition ; Abbott, 1979).

D'autre part, nos résultats montrent que de plus faibles activités d'HTO (0,17 MBq mL<sup>-1</sup>) sont sans effet sur la croissance alors que 0,8 MBq mL<sup>-1</sup> induisent une augmentation de la biomasse algale après 96h d'exposition. Cette dernière activité correspond à un débit de dose de 2,5 µGy h<sup>-1</sup>. Cette stimulation est comparable à la stimulation de la croissance cyanobactérienne observée pour des faibles niveaux de rayonnement γ (6,1 µGy h<sup>-1</sup> ; Conter *et al.*, 1986). L'hypothèse donnée par ces auteurs afin d'expliquer cette stimulation est une activation des enzymes antioxydantes par les radiations ionisantes qui aurait pour effet de protéger les cellules contre les dommages environnementaux, induisant ainsi une augmentation de la croissance.

Néanmoins, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de comprendre cette stimulation de la croissance observée pour des débits de doses inférieurs à 10 µGy h<sup>-1</sup>.

### *Effet de l'HTO sur la production d'ERO chez Chlamydomonas reinhardtii : comparaison à l'effet des rayonnements γ*

La production d'ERO a été déterminée suite à l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à des débits de dose de rayonnement β (paragraphe 3.2.2.3) ou γ (Annexe 2 et paragraphe 3.1.2.2) sans effet sur la croissance. Trois débits de dose β et quatre débits de dose γ ont été testés. Ceci nous permet de discuter de l'efficacité des rayonnements.

Toutes les conditions d'exposition à des rayonnements β (0,13, 0,5 and 9,4 µGy h<sup>-1</sup>) induisent la production d'ERO sous forme de pic. Lors d'exposition des cellules à un rayonnement γ continu, seule le plus fort débit de dose testé (3 278 µGy h<sup>-1</sup>) a induit une cinétique de production d'ERO similaire. La production d'ERO maximale après exposition à 9,4 µGy h<sup>-1</sup> d'HTO (42 952 UA fluorescence; 10<sup>9</sup> cellules) n'est pas différente de celle mesurée après une exposition à 3 278 µGy h<sup>-1</sup> de rayonnement γ (50 639 UA fluorescence; 10<sup>9</sup> cellules). De plus, dans le cas d'exposition à des radiations γ une production d'ERO inversement proportionnelle à la dose a été mesurée après 44 min d'exposition continue alors que dans le cas de radiations β une relation proportionnelle a été mise en évidence entre ces deux composantes et ce 15 min après irradiation, au moment du maximum de production d'ERO. Dans le cas de radiations γ, nous avons émis l'hypothèse d'une action du système antioxydant, se déclenchant lorsque la vitesse de production d'ERO est importante. Il semble ici que quel que soit le débit de dose d'exposition β testé, la vitesse de production d'ERO semble suffisante pour déclencher cet effet. En effet, dans le cas d'une exposition des cellules à l'HTO la production d'ERO est rapide au cours des 15 premières minutes d'exposition.

Cette différence de réponse de la balance oxydative lors d'une exposition  $\beta$  ou  $\gamma$  continue peut notamment être expliquée par la nature des rayonnements. En effet les radiations  $\gamma$  sont des rayonnements purement électromagnétiques. Dans le cas d'exposition des cellules à l'HTO, les cellules sont exposées aux électrons des rayonnements  $\beta$  de façon externe et par voie interne (eau tritiée libre et métabolisation). Ceci peut expliquer des réponses différentes du système antioxydant. Dans notre cas, les rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$  induisent une même production d'ERO. Seul le niveau de débit de dose d'induction d'un pic est différent. Cette différence nous permet de conclure que les rayonnements  $\gamma$  sont moins efficaces à induire une production d'ERO que l'HTO.



### 3.3. IDENTIFICATION DES INTERACTIONS POTENTIELLES DU MELANGE BINAIRE HTO/CU (EXPOSITION ET EFFETS)

---

Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes sont exposés à différentes substances en mélange. Bien qu'à l'heure actuelle l'étude des risques soit basée sur la mesure de la toxicité des substances seules, de nombreuses études ont mis en évidence des interactions entre substances sur un organisme, interactions induisant un effet supérieur ou inférieur à la toxicité attendue suivant l'hypothèse d'additivité des effets ou des réponses (paragraphe 1.1.2). Bien que la plupart des résultats concernant des interactions reposent sur des substances chimiques stables en mélange, des interactions ont déjà été signalées dans le cas de mélanges de substances stables avec des rayonnements. En effet, la toxicité du cuivre en mélange avec l'uranium est inférieure à l'additivité envers *Lemna minor* (Charles *et al.*, 2006). Dans le cas de l'exposition d'*Anabaena doliolum* simultanément à un mélange cuivre/UV-B, un effet supra-additif a été mesuré (Bhargava *et al.*, 2008). Cet effet supra-additif des rayonnements oxydants en mélange avec le cuivre a également été observé suite à une pré-exposition de *Lemna minor* au cuivre (Babu *et al.*, 2003) sur le taux de croissance et sur la production d'ERO.

Au sens strict du terme, une interaction ne peut être mesurée que sur un paramètre d'effet, toute modification de l'internalisation d'une substance en présence d'une seconde substance étant considérée comme une compétition. De ce fait, en amont d'une analyse des effets du mélange HTO/Cu sur un même récepteur ou cible cellulaire (production d'ERO, effet sur la croissance), il est indispensable de connaître l'impact des rayonnements  $\beta$  sur l'entrée du cuivre chez notre modèle biologique afin de pouvoir dissocier ces deux phénomènes (compétition/interaction).

Le but des recherches présentées dans ce chapitre est de vérifier s'il y a un effet de l'HTO sur la vitesse d'internalisation du cuivre dans les cellules ou un effet sur la concentration en cuivre internalisé dans les cellules. Dans un second temps, des interactions des substances sur cet organisme seront recherchées sur la croissance et sur la production d'ERO.

### 3.3.1. Internalisation du cuivre en présence d'HTO : effet comparé à une exposition simple au cuivre

La prise en charge du cuivre dans les cellules est un des éléments dont va dépendre la toxicité de ce métal. Cette prise en charge est caractérisée par le flux d'internalisation dans les cellules. Ce flux est déterminé avant la mise en place des systèmes de détoxification des métaux dans les cellules (court terme, pendant l'entrée linéaire du cuivre dans la cellule ; Annexe 4). En effet, à plus long terme, des processus d'externalisation vont se mettre en place. C'est alors que la concentration en cuivre intracellulaire, qui résulte des processus d'internalisation et d'externalisation, sera mesurée afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de la concentration en cuivre. Alors que la fraction en cuivre adsorbée sur la surface cellulaire va rapidement atteindre un équilibre (5 min ; Knauer *et al.*, 1997a), l'internalisation est un processus limitant. De ce fait, la fraction internalisée augmentera plus lentement lors d'exposition au cuivre de *Chlamydomonas reinhardtii* (Hill *et al.*, 1996). Ces deux approches apporteront des informations différentes. Le flux d'internalisation permettra de mesurer les paramètres d'entrée du métal dans les cellules. Le niveau de cuivre intracellulaire après une exposition plus longue permettra de visualiser l'efficacité des processus de détoxification des cellules.

La prise en charge de ce métal par des cellules algales est bien connue lors d'une exposition simple au cuivre (Hill *et al.*, 1996). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence que la concentration en cuivre intracellulaire pouvait être modifiée en présence d'autres stressseurs, comme par exemple lors de l'exposition de cellules cyanobactériennes simultanément aux UV et au cuivre (4,6 et 7,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  ; Rai *et al.*, 1995). Ces auteurs ont pu montrer que pour une concentration d'exposition donnée en cuivre, la concentration internalisée (dont dépend la toxicité) sera augmentée d'un facteur compris entre 1,32 et 1,85. Cette observation est corrélée avec des effets supra-additifs mesurés sur la fixation du carbone, l'évolution de la production d'oxygène ou bien encore sur l'activité du PSII.

Dans ce contexte, l'objectif est ici de déterminer le taux d'internalisation du cuivre dans les cellules lors d'une exposition au cuivre seul et de comparer ce flux à celui obtenu lors d'une exposition au mélange HTO/Cu. En effet, Rai *et al.* (1995 ; 1998) ont déjà mis en évidence un changement de la concentration en métaux internalisés lors de l'exposition conjointe de cellules cyanobactériennes à des métaux et à des radiations ionisantes. Le second

objectif est de déterminer la concentration en cuivre internalisé lors d'une exposition au mélange HTO/Cu toujours en comparaison avec une exposition au cuivre seul.

Afin de mesurer le cuivre internalisé dans les cellules algales, différents facteurs doivent être pris en compte. Notamment, la différenciation du cuivre adsorbé sur la paroi autour des cellules et du cuivre réellement internalisé dans la cellule doit être déterminée. La cinétique d'entrée du cuivre dans les cellules doit être analysée avant de mesurer la dépendance d'accumulation en fonction de la concentration dans le milieu afin de se placer dans la zone linéaire d'entrée du cuivre dans les cellules (c'est-à-dire avant la mise en place des systèmes de détoxification et d'efflux, ...). D'autres facteurs peuvent influencer l'entrée du cuivre dans les cellules comme le pH ou d'autres facteurs influants sur les transporteurs.

### **3.3.1.1. Détermination des flux d'internalisation du cuivre**

Les cellules ont été exposées durant 40 min (exposition en Erlenmeyer, temps déterminé depuis des expérimentations présentée en Annexe 5) à différentes concentrations de cuivre total comprises entre 100 et 2 490 nmol L<sup>-1</sup> (soit de 14 à 346 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre libre ; concentration en cuivre non toxique à toxique ; CE50 = 728 – 858 nmol L<sup>-1</sup> Cu<sub>tot.</sub>) en présence ou non d'HTO (1 132 kBq mL<sup>-1</sup>). Une mesure de la concentration en cuivre internalisé a également été réalisée avant exposition des cellules, à t=0, afin de déterminer le niveau initial résiduel en cuivre. Cette valeur ([48 +/- 12] x 10<sup>-11</sup> nmol μm<sup>-2</sup>) a été soustraite aux résultats afin de visualiser le flux d'internalisation dû à l'ajout de cuivre.

Le flux d'internalisation du cuivre suite à ces expositions est représenté sur la Figure 39. Après une exposition simple des cellules au cuivre, les paramètres de Michaelis-Menten obtenus par analyse des données sous R (Tableau 20) sont du même ordre de grandeur que ceux obtenu par Hill *et al.* (1996) sur le même modèle biologique. En effet,  $K_m$  qui est la constante de demi-saturation n'est pas significativement différente dans ces deux études. De plus, la concentration en cuivre maximale atteinte est légèrement supérieure à celle de Hill *et al.* (1996) mais non significativement différente. Cette différence peut s'expliquer par les conditions de culture (milieu utilisé) ainsi que par la souche utilisée (Hill *et al.*, 1996 = CC124 ; notre étude = 1132B). Néanmoins ceci valide le protocole utilisé.

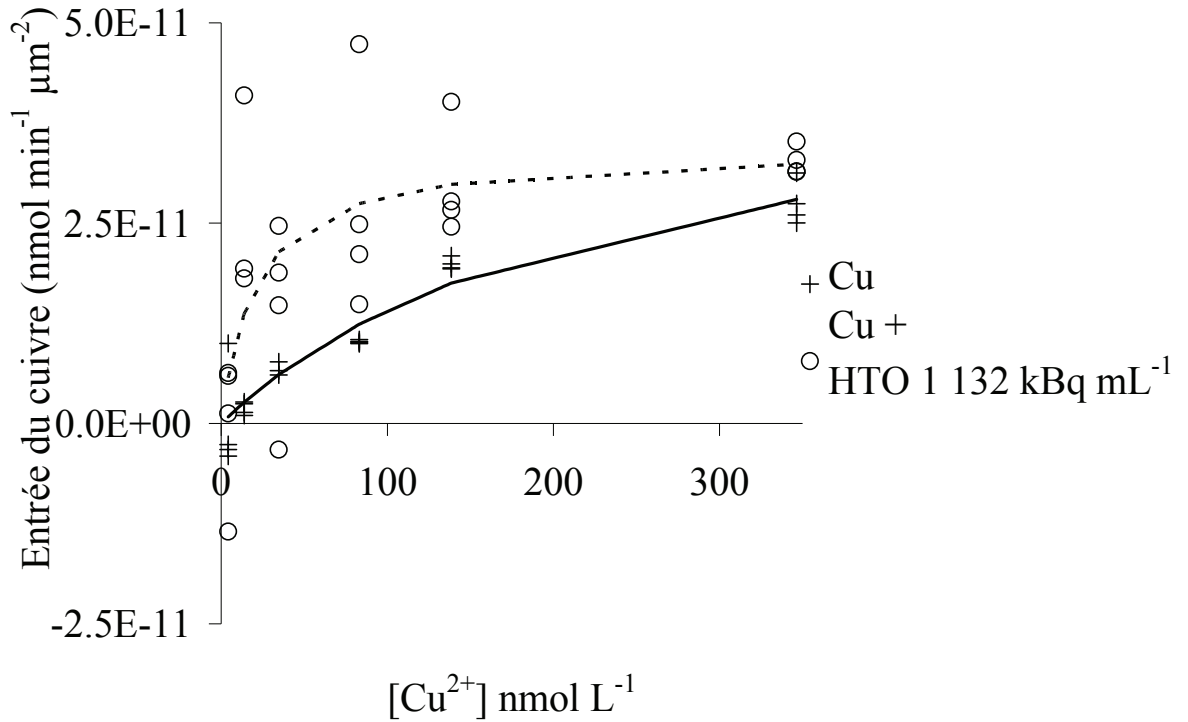


Figure 39: Flux d'internalisation du cuivre dans les cellules après 40 min d'exposition à des concentrations en cuivre libre allant de 14 à 346 nmol L<sup>-1</sup> en présence ou non d'HTO (1 132 ± 25 kBq mL<sup>-1</sup> ; moyenne, n=3 ou 4). Les lignes représentent le modèle de Michaelis-Menten.

Tableau 20: Paramètres d'internalisation (Michaelis-Menten) du cuivre chez *Chlamydomonas reinhardtii* après exposition au cuivre seul ou en mélange avec 1 132 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO et comparaison aux valeurs obtenues par Hill et al. (1996) ([IC95] bootstrap). \* = valeur significativement différente par rapport à une exposition simple au cuivre, bootstrap)

	Cuivre (Hill et al., 1996)	Cuivre	Cuivre + HTO 1 132 kBq mL <sup>-1</sup>
$Cu_{max}$ (10 <sup>-11</sup> nmol min <sup>-1</sup> μm <sup>-2</sup> )	3,55 - 3,95	3,59 - 5,14	2,67 - 3,78
$K_m$ (Cu <sup>2+</sup> nmol L <sup>-1</sup> )	180 - 240	130 - 277	5,7 - 21*

La présence d'HTO induit une plus grande variabilité des résultats comme cela est visible sur la Figure 39. Même si cette variabilité est importante, la réduction significative de 4 à 48 fois (IC95) de la constante de demi-saturation révèle une augmentation de l'affinité des cellules envers le cuivre en présence de rayonnement β. En revanche, aucune différence significative n'a pu être observée concernant le flux d'internalisation maximal ( $Cu_{max}$ ) après 40 min d'exposition au cuivre en présence ou non d'HTO (1 132 kBq mL<sup>-1</sup>).

### 3.3.1.2. Détermination des concentrations internalisées en cuivre après 96h d'exposition

Afin de mesurer la concentration en cuivre internalisée, les algues ont été exposées à 28 (contrôle) ou 334 nmol L<sup>-1</sup> (CE10 = [315 – 402] nmol L<sup>-1</sup> ; Annexe 3) de cuivre total en Erlenmeyers en présence ou non de 85,1 kBq mL<sup>-1</sup> d'HTO et ce pendant 96h. Le protocole de détermination de la concentration en cuivre intracellulaire est détaillé dans le paragraphe 2.2.1.2. Une analyse statistique des concentrations internalisées mesurées a été réalisée.

Les cellules exposées à 28 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre total (contrôle) internalisent moins de cuivre que des cellules exposées à 334 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre (Figure 40). L'exposition à l'HTO (85,1 kBq mL<sup>-1</sup>) induit une augmentation significative de la concentration en cuivre internalisée uniquement pour la plus faible exposition au cuivre (28 nmol L<sup>-1</sup>).

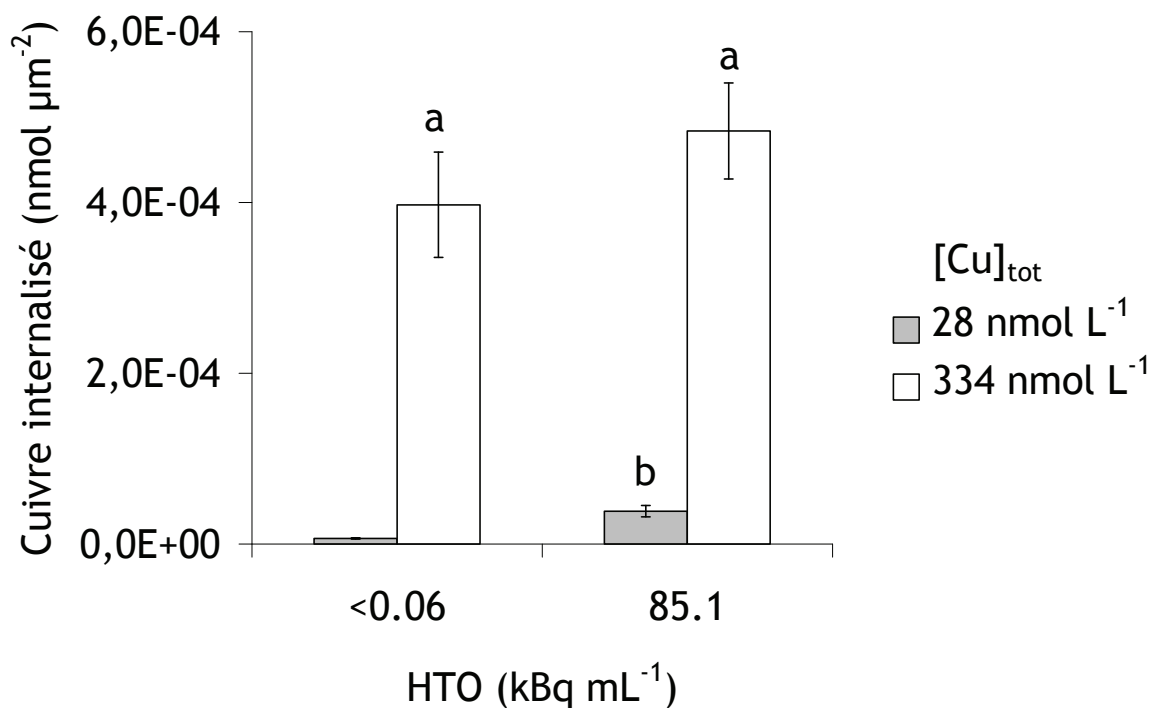


Figure 40: Cuivre internalisée après 96h d'exposition au Cu et à l'HTO (85,1 +/- 2,3 kBq mL<sup>-1</sup>) ou au Cu seul en Erlenmeyer (moyenne +/- SEM; n=2 ou 3) (ANOVA 1 facteur et comparaison multiple de Tukey, p<0,05). Les lettres représentent des différences significatives entre conditions.

### 3.3.1.3. Discussion : effet de l'HTO sur le flux d'internalisation du cuivre

Concernant l'entrée du cuivre, nos résultats soulignent une augmentation de l'affinité du cuivre par les cellules après 40 min en présence d'HTO. Sur le long terme, la concentration

internalisée après 96h d'exposition en présence d'HTO augmente également par rapport à des conditions non exposées à l'HTO lors d'une exposition à 28 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre. Des variations de flux d'internalisation suite à une exposition *in vivo* de rats à l'HTO ont déjà été observées (Petcu *et al.*, 1997 ; Savu *et al.*, 1999). La première observation (Savu *et al.*, 1999) révèle une inhibition de l'incorporation de thymidine résultant de l'irradiation. Dans le second cas, Petcu *et al.* (1991) ont mesuré une inhibition de la perméabilité à l'eau des membranes des érythrocytes (-40%) après irradiation à 100 mGy.

Les membranes cellulaires sont le lieu clef de l'interaction métal-organisme aquatique. Les ions libres vont former un complexe de surface ({M-X-cellule}) avant leur internalisation. Etant donné la nature hydrophobe des membranes biologiques et hydrophiles de la plupart des métaux, le transport facilité de cations est la voie la plus courante d'internalisation. Dans ce contexte, l'augmentation de l'affinité du cuivre par les cellules en présence de rayonnements peut être expliquée soit par une modification de l'efficacité des transporteurs membranaire soit par un changement de la perméabilité membranaire.

En ce qui concerne les modifications de la perméabilité membranaire, Rai *et al.* (1998) ont montré qu'une peroxydation lipidique des membranes de cellules cyanobactériennes par les UV-B peut être reliée à l'augmentation de la concentration en cuivre cellulaire. Dans notre cas, seule une augmentation de l'affinité des cellules envers le cuivre a été observée, le flux d'internalisation maximal restant inchangé. L'augmentation de la concentration en cuivre internalisé dans les cellules exposées au tritium peut laisser supposer, plutôt qu'une modification de la perméabilité membranaire, une action des rayonnements ionisants de l'HTO directement sur les transporteurs membranaires.

Dans le cas du cuivre chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, le transport a lieu via un transporteur unique et saturable dont l'expression est régulée par la disponibilité du cuivre (Hill *et al.*, 1996). Ce transporteur unique résulte de trois transporteurs de la famille CTR qui agissent en parallèle et sont encodés par 4 gènes distincts (COPT1, CTR1, CTR2 et CTR3 ; Page *et al.*, 2009) dont l'activation transcriptionnelle dépend de l'activateur CRR1. Ces domaines CTR sont composés notamment d'un motif Cystéine-Méthionine. Ces deux acides aminés possèdent des groupements thiol. Dans ce contexte, la modification de l'affinité du cuivre envers ce transporteur peut résulter de dommages engendrés par les rayonnements  $\beta$  sur les groupements thiol. En effet, des changements de conformation des protéines aboutissant à des variations des propriétés membranaires ont été observée sur des érythrocytes (Yonei *et al.*, 1979). Ces auteurs ont également montré que des changements similaires résultaient de l'exposition de ces cellules à des substances actives envers les groupements

thiol. Yonei *et al.* (1979) en concluent donc que le changement de conformation des protéines aboutissant à des variations des propriétés membranaires lors d'exposition à des radiations X faible dose résulte de l'action de ces radiations sur les groupements thiol. Cette hypothèse a depuis été confirmée par Strid *et al.* (1994), qui ont montré que les thiols étaient sensibles aux radiations telles que les UV-B.

Ces dommages des groupements thiol peuvent résulter d'une action directe des radiations ou d'une action indirecte via la production d'ERO. En effet, une production d'ERO a déjà pu être reliée à l'activation de canaux potassium lors d'exposition de cellules humaines à des doses allant de 10 à 150 cGy dès 5 min post irradiation par Kehrer (2000).

### 3.3.2. Effet du tritium en mélange avec du cuivre

L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence d'éventuelles déviations par rapport à l'hypothèse d'additivité lors de l'exposition des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* à un mélange HTO/Cu. Des interactions seront recherchées sur deux paramètres : la croissance et la production d'ERO. Afin de prédire la toxicité des mélange de substances sur les organismes, des modèles de toxicité (Independent Action model - IA ; Bliss, 1939 - et Concentration Addition model - CA ; Loewe and Muischnek, 1926)) ont été développés. Cependant, ces modèles requièrent des courbes dose-réponse pour chaque substance séparément. Dans notre étude, les expositions des cellules à l'HTO ne nous ont pas permis d'obtenir une courbe dose-réponse complète de part la faible toxicité de l'HTO envers notre modèle biologique. De ce fait, afin d'identifier des interactions lors d'exposition de ce modèle au mélange HTO/Cu, un coefficient, proche de l'approche probabiliste (modèle IA) a été calculé. Ce coefficient est appelé  $K_w$  et a été décrit par Geras'kin *et al.* (2005).

#### 3.3.2.1. Effet du mélange HTO/Cu sur le taux de croissance et le diamètre cellulaire

Afin de mesurer l'effet du mélange HTO/Cu sur le taux de croissance et le diamètre cellulaire, des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposées simultanément à ces deux substances. En parallèle de la densité cellulaire, le diamètre des cellules a été mesuré. L'exposition a été réalisée en Erlenmeyer.

Après 4 jours d'exposition simultanée des cellules au cuivre ( $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) et à l'HTO ( $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$ ), le diamètre des cellules ( $6,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) n'est pas différent d'une exposition simple au cuivre ( $6,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ). Le diamètre des cellules est de  $4,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  après expositions à l'HTO ( $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) et de  $4,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  chez des algues non exposées toujours après 4 jours. A partir de ces données un  $K_w$  de  $[0,99 - 1,28]$  (IC95) est obtenu. Celui-ci, n'est statistiquement pas différent de 1 (i.e. pas de déviation depuis l'effet prédit avec l'hypothèse d'additivité des effets).

En parallèle, la densité cellulaire, reportée à la Figure 41, suit une allure sigmoïde classique pour les quatre conditions d'expositions. Les paramètres de croissance de ces courbes sont reportés au Tableau 21. La densité cellulaire maximale et le taux de croissance sont significativement différents lors d'une exposition au cuivre ou au mélange HTO/Cu en comparaison aux algues contrôle. L'exposition des cellules à l'HTO seul n'a pas d'effet.



Enfin, toutes les conditions atteignent les 50% de croissance au même temps. Le  $K_w$  calculé à partir des données de croissance est de [1,02 – 1,33] (IC95). Ce facteur n'est pas significativement différent de 1 (i.e. pas de déviation depuis l'effet prédit avec l'hypothèse d'additivité des effets).

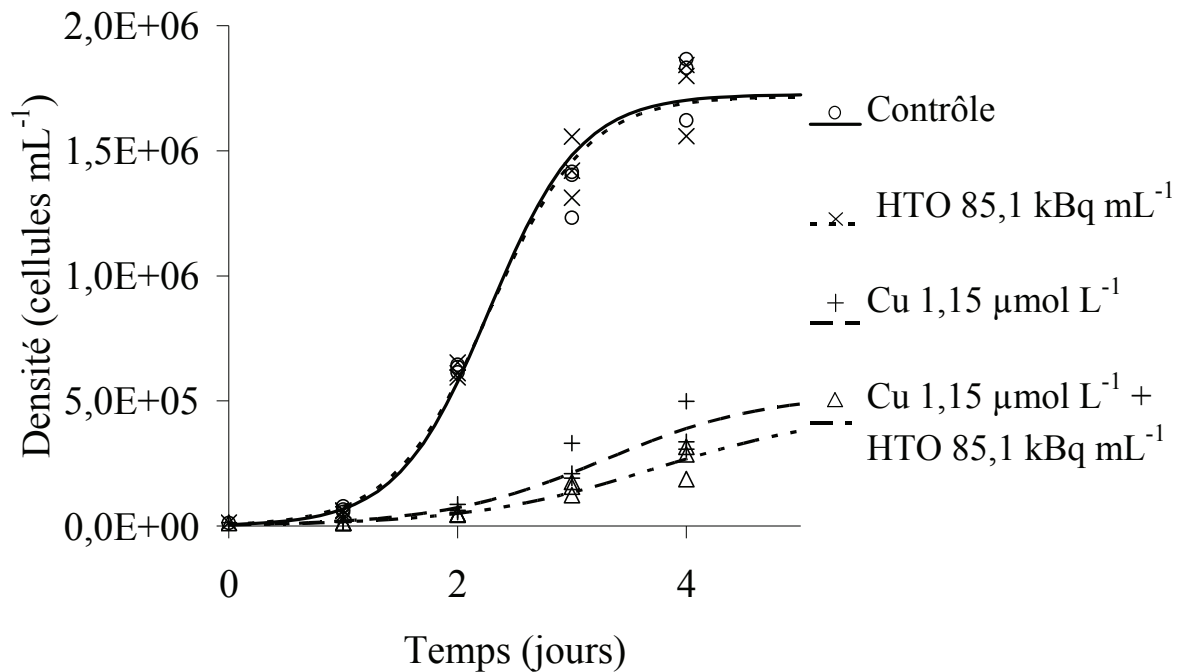


Figure 41: Densité cellulaire en fonction du temps pour une exposition des cellules au cuivre (1,15 µmol L<sup>-1</sup>) ou au tritium (85,1 kBq mL<sup>-1</sup>) seuls, au mélange HTO/Cu, et dans un contrôle non contaminé. Le modèle logistique à 3 paramètres a été ajusté aux données (n=3).

Tableau 21: Paramètres de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenus suite à 4 jours d'exposition au cuivre ( $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou au tritium ( $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) seuls, au mélange HTO/Cu, et pour un contrôle non contaminé. ([IC95], comparaison multiple et correction de Holm). \*: différence significative par rapport au contrôle avec  $\alpha \leq 0,05$  (\*,  $\leq 0,01$  (\*\*),  $\leq 0,001$  (\*\*\*)).

Paramètres	Contrôle	HTO $174 \text{ kBq mL}^{-1}$	Cu $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$	Cu $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ + HTO $174 \text{ kBq mL}^{-1}$	$K_w$ (IC95)
b (taux de croissance maximal, division jour <sup>-1</sup> )	2,1 – 2,9	2,0 – 2,8	1,0 – 1,8**	0,8 – 1,6***	
d (densité cellulaire maximale, $10^6$ cellules mL <sup>-1</sup> )	1,5 – 2,0	1,5 – 2,0	0,3 – 0,8***	0,04 – 0,89***	1,02 – 1,33
e (temps nécessaire pour atteindre 50 % de la densité cellulaire maximale, jour)	2,1 – 2,5	2,1 – 2,5	2,5 – 4,1	2,3 – 5,2	
Diamètre cellulaire ( $\mu\text{m}$ )	4,6 – 5,3	4,7 – 5,3	6,1 – 6,5	6,2 – 6,7	0,99 – 1,28

Aucun effet supra-additif du mélange HTO ( $85,1 \text{ kBq mL}^{-1}$ )/Cu ( $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) n'a été observé sur le taux de croissance ni sur le diamètre cellulaire. D'autres ratios de mélange devraient être cependant testés afin de conclure quant à une absence d'interaction de ces substances.

### 3.3.2.2. Effet du mélange HTO/Cu sur la production d'ERO

L'objectif de cette partie est de mesurer l'effet du mélange HTO/Cu sur la production d'ERO. Des expositions simultanées ou en deux temps (en microplaque) seront réalisées afin de mesurer l'effet de ces différents scénarios environnementaux. Ces résultats sont obtenus suivant le protocole décrit paragraphe 2.3.3.

Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées deux fois consécutives afin de valider les résultats. Cependant, dans un souci de clarté, seule l'une des deux expériences réalisées est présentée, les deux expériences donnant les mêmes résultats. Les statistiques ont été réalisées à partir des résultats à 1h40 d'exposition (résultats présentés ici). Des résultats similaires ont été obtenus en intégrant l'ensemble des données entre 0 et 1h40 min.

### Effet d'une pré-exposition au cuivre sur la production d'ERO lors d'une exposition à l'HTO

Dans un premier temps, une pré-exposition des cellules au cuivre (28, 146, 714 et 5 154 nmol L<sup>-1</sup>) a été réalisée pendant 1h40 min, à l'obscurité (190 µL par puits). A la fin de cette pré-exposition, de l'HTO (0, 158 ou 2 849 kBq mL<sup>-1</sup>) a été ajouté (n=4, 200 µL par puits). La mesure de la fluorescence de la DCF est réalisée au cours de ces deux périodes successives d'exposition (toutes les 2 min,  $\lambda_{ex}$  505 /  $\lambda_{em}$  530 nm). Seuls les résultats obtenus après pré-exposition à 714 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre sont représentés (Figure 42). Néanmoins, le profil est le même après pré-exposition des cellules à 28, 146 et à 5 154 nmol L<sup>-1</sup> de cuivre (Annexe 6).

Tout d'abord, la sortie de la plaque du spectrofluorimètre et sa mise à la lumière durant environ 10 min lors de l'ajout de l'HTO, engendre une baisse du niveau contrôle de fluorescence (dégradation de la sonde à la lumière). De plus, l'ajout de l'eau (tritiée ou non) dans le milieu induit une production de DCF. Lorsque les cellules sont d'abord pré-exposées au cuivre, la production d'ERO suivant l'ajout d'HTO est différente de celle mesurée après exposition simple à l'HTO (Figure 38 page 106). En effet, aucun pic de production d'ERO n'est visible. De plus, la fluorescence augmente sans atteindre de palier.

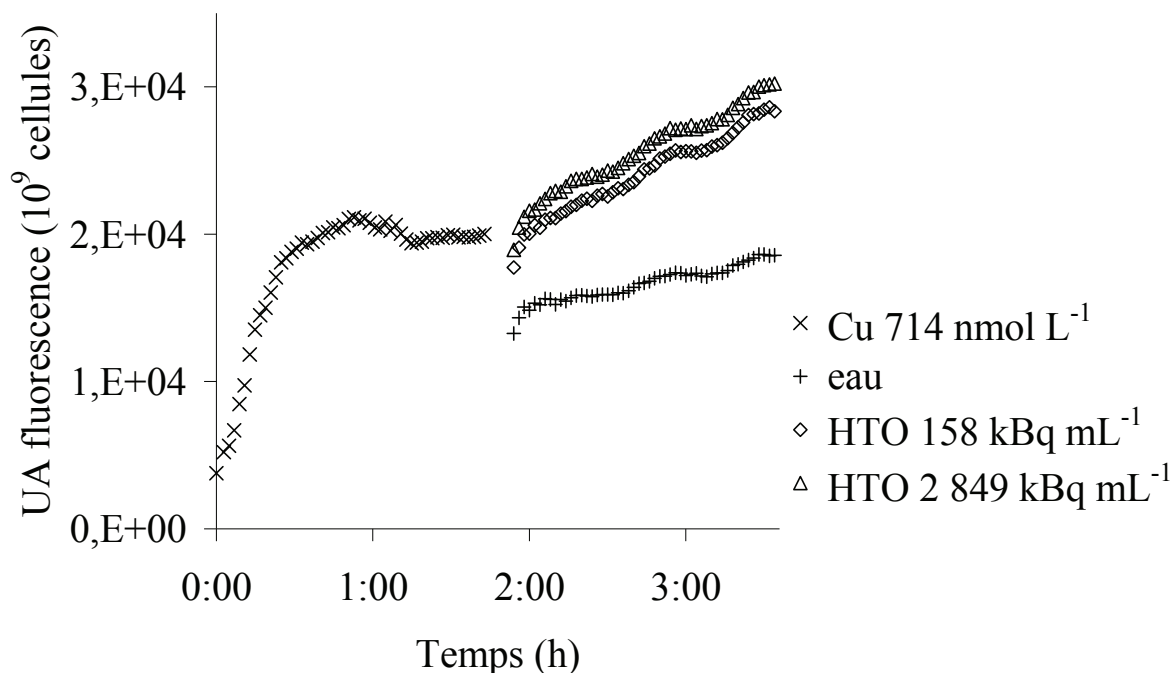


Figure 42: Production d'ERO en fonction du temps, mesurée par la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) après pré-exposition au cuivre ( $714 \text{ nmol L}^{-1} - 0 \text{ à } 1\text{h}40$ ) puis exposition à l'HTO ( $158 \text{ et } 2\,849 \text{ kBq mL}^{-1} - 1\text{h}50 \text{ à } 3\text{h}30$ ) de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (moyenne,  $n=4$ ).

Afin de mettre en évidence une éventuelle interaction suite à la pré-exposition des cellules au cuivre, un coefficient d'interaction a été calculé à partir des données obtenues après 1h40 d'exposition au mélange HTO/Cu (Tableau 22). Ce coefficient a été comparé à 1, Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les différents  $K_w$  par rapport à 1 (manque de données par condition). Néanmoins, si l'ensemble des  $K_w$  (obtenus pour chaque ratio HTO/Cu testés) sont poolées, un  $K_w$  global de [1,3 – 1,6] (IC95) est obtenu. Ce  $K_w$  est significativement supérieur à 1, ce qui indique un effet supra-additif suite à une pré-exposition des cellules au cuivre.

Tableau 22 : Production d'ERO mesurée après pré-exposition au cuivre puis exposition à l'HTO en mélange avec du Cu, et valeur correspondante du coefficient d'interaction pour chaque ratio HTO/Cu. Les valeurs indiquées correspondent à l'IC95; (\*\*\*) indique les différences statistiques par rapport à la condition contrôle/contrôle ;  $p < 0,001$  (Test non paramétrique de Wilcoxon)

		Production d'ERO (x 10 <sup>4</sup> UA fluorescence pour 10 <sup>9</sup> cellules)			Kw	
Cu (nmol L <sup>-1</sup> )	HTO (kBq mL <sup>-1</sup> )	Contrôle (16)	158	2 849	158	2 849
	Contrôle (28)	1,0 – 1,6	1,7 – 2,3	1,4 – 2,1		
	146	1,6 – 2,2	2,6 – 3,0***	2,0 – 3,2***	1,03 – 1,36	1,02 – 1,50
	714	1,5 – 2,2	2,7 – 3,1***	2,6 – 3,4***	1,11 – 1,71	1,36 – 1,66
	5 154	1,8 – 2,8***	3,1 – 3,6***	3,8 – 4,2***	1,11 – 1,46	1,44 – 2,32

En conclusion, comme l'avaient observé Bhargava *et al.* (2008) sur des cellules cyanobactériennes (inhibition de la production d'oxygène, de la fixation du carbone et du contenu en ATP et en NADPH), une pré-exposition de cellules photosynthétiques au cuivre induit une augmentation de la toxicité des rayonnements (ici  $\beta$ ). De plus, l'absence de pic de production d'ERO suite à une exposition à l'HTO (après 1h40 de pré-exposition des cellules au cuivre) est à discuter vis-à-vis de l'action du système antioxydant des cellules résultant d'une pré-exposition au cuivre.

#### Effet d'une exposition simultanée au mélange HTO/Cu sur la production d'ERO

Les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposées simultanément à un mélange HTO/Cu. Les résultats de ces expositions simultanées sont représentés à la Figure 43 pour deux conditions (HTO 158 kBq mL<sup>-1</sup> + Cu 28 nmol L<sup>-1</sup> et HTO 158 kBq mL<sup>-1</sup> + Cu 5 154 nmol L<sup>-1</sup>), les profils des autres conditions étaient similaires (Annexe 7). Lorsque les cellules sont exposées simultanément à ces mélanges, un pic de production d'ERO est mesuré après 17-21 min d'exposition. Après ce pic, la production d'ERO décroît durant 25 min (entre 20 et 45 min d'exposition). La dernière partie de la courbe (45 min – 1h40) montre une augmentation lente mais continue de la production d'ERO.

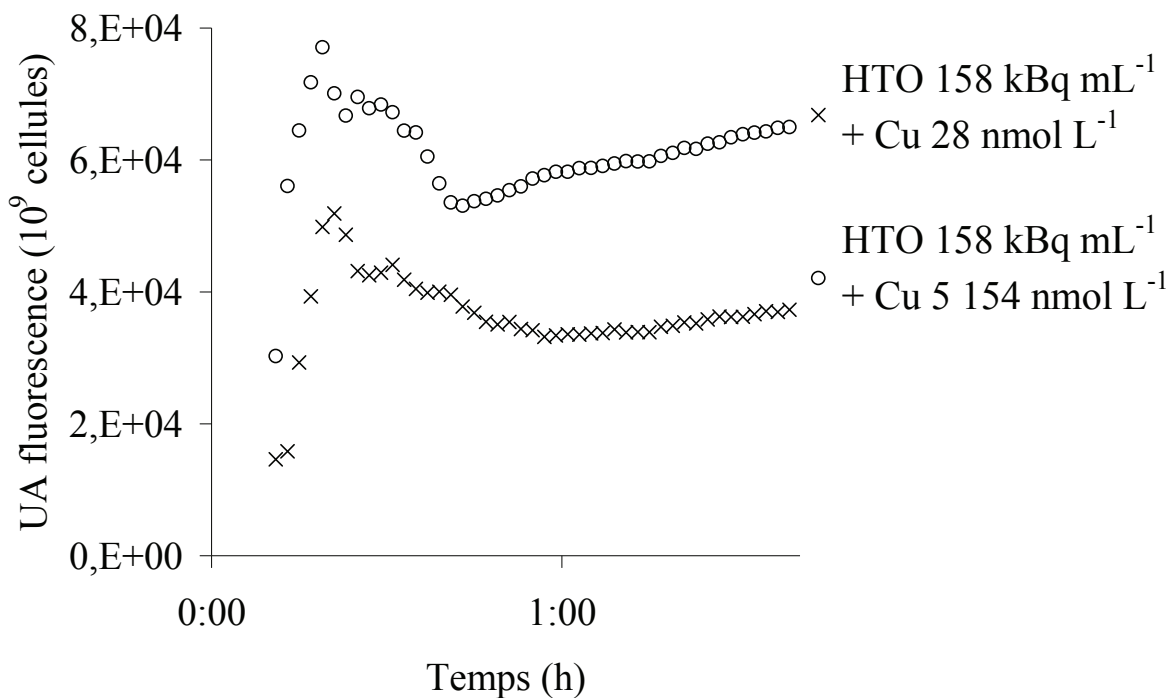


Figure 43 : Production d'ERO en fonction du temps, mesurée par la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) après exposition simultanée au cuivre (28 ou 5 154  $\text{nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO (158  $\text{kBq mL}^{-1}$ , moyenne,  $n=4$ )

Les résultats obtenus ont été utilisés afin de calculer un coefficient d'interaction (Tableau 23). Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les différents  $Kw$  par rapport à 1 (manque de données par condition). Néanmoins, si l'ensemble des  $Kw$  (obtenus pour chaque ratio HTO/Cu) sont poolées, un  $Kw$  global de [1,2 – 1,5] (IC95) est obtenu. Ce  $Kw$  est significativement supérieur à 1 ce qui indique un effet supra-additif suite à une exposition au mélange HTO/Cu.

Tableau 23 : Production d'ERO obtenue après 1h40 min d'exposition au cuivre et à l'HTO en mélange, et valeur correspondante du coefficient d'interaction Kw . Les valeurs indiquées correspondent à IC95; (\*) indique les différences statistiques par rapport au contrôle ( $\alpha \leq 0,05$  (\*),  $\leq 0,001$  (\*\*), comparaison multiple et correction de Holm).

		Production d'ERO (x 10 <sup>4</sup> UA fluorescence pour 10 <sup>9</sup> cellules)			Kw	
		Contrôle (16)	158	2 849	158	2 849
Cu (nmol L <sup>-1</sup> )	HTO (kBq mL <sup>-1</sup> )					
	Contrôle (28)	3,7 – 4,4	4,7 – 5,7	4,8 – 6,0		
	146	4,0 – 5,1	5,7 – 6,5*	5,7 – 7,7***	1,1 – 2,2	1,0 – 1,8
	714	4,6 – 5,6	6,4 – 7,0***	6,4 – 7,4***	1,0 – 1,8	1,2 – 1,6
	5 154	5,9 – 7,6***	8,1 – 9,1***	9,2 – 9,8***	1,1 – 1,4	1,2 – 1,7

Le profil cinétique de production d'ERO est, contrairement aux résultats obtenus après pré-exposition des cellules au cuivre, proche de la cinétique mesurée lors de l'exposition des cellules à l'HTO seul (Figure 38 page 106). Cependant le pic de production maximale est décalé dans le temps de 1 à 5 min environ. Ceci peut s'expliquer par la production accrue d'ERO suite à l'exposition simultanée à deux substances induisant un stress oxydant supérieur. Enfin, dans le cas d'une exposition des cellules à l'HTO uniquement (Figure 38 page 106), un palier de production d'ERO était observé sur la dernière partie de la courbe. De même, une valeur constante était atteinte lors de l'exposition des cellules au cuivre (Figure 30 page 81). La production continue d'ERO lors de l'exposition simultanée au cuivre et à l'HTO semble révéler une incapacité des cellules à prendre en charge sur le long terme la production d'ERO.

En mélange avec le cuivre (simultané ou pré-exposition au cuivre), l'HTO induit donc un effet supra-additif sur la production d'ERO. Ces résultats sont cohérents avec une augmentation similaire mesurée après exposition de cellules cyanobactériennes (*Anabaena doliolum*) aux UV-B faisant suite à une pré-exposition au cuivre obtenus chez des cellules pour différents paramètres de mesure (inhibition de la consommation d'oxygène, fixation du <sup>14</sup>C, contenu en ATP et en NADPH; Bhargava *et al.*, 2008).

Dans notre cas, ce résultat resterait à confirmer par une autre méthode de dosage des ERO. En effet, les métaux de transition, comme le cuivre, constituent des activateurs

potentiels de la réaction d'Haber-Weiss (Riley, 1994; Halliwell et Gutteridge, 2007) engendrant la formation de HO<sup>•</sup> à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Riley, 1994). Notre sonde, H<sub>2</sub>DCF-DA, n'est pas sensible à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Crow, 1997), mais est oxydée par de nombreux ERO (i.e., HO<sup>•</sup>, HOCl, ONOO<sup>-</sup>, ROO<sub>2</sub><sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>), incluant ceux formés via la réaction d'Haber-Weiss. Cette action du cuivre sur la production de radicaux et la spécificité de la sonde utilisée pourraient expliquer l'effet supra-additif observé lors du mélange HTO/Cu sur la production d'ERO.

### Discussion : effet du mélange HTO/Cu sur l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*

L'ensemble de ces expérimentations nous amène à mesurer un effet supra-additif du mélange HTO/Cu envers la production d'ERO de notre modèle biologique. Cet effet supra-additif observé sur la production d'ERO peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, l'augmentation de l'affinité des cellules envers le cuivre en présence d'HTO (1 132 kBq mL<sup>-1</sup>) qui a été établi dans cette partie est une des premières explications possibles. En effet, les cellules sont confrontées à une plus rapide augmentation de la concentration en cuivre intracellulaire (affinité plus forte des cellules vis-à-vis du cuivre en présence d'HTO à 40 min). Étant donné que le cuivre est un oxydant reconnu, cette augmentation à 40 min de la concentration en cuivre internalisé justifie la production accrue d'ERO lors de l'exposition des cellules algales au mélange HTO/Cu.

D'autres explications sont néanmoins envisagées. En effet, cet effet supra-additif du mélange HTO/Cu peut être dû à des interactions spécifiques au niveau de l'efficacité du système antioxydant des cellules:

1)- l'effet du cuivre sur le pool de GSH : les phytochélatines, synthétisées depuis le pool de glutathion (Figure 44), sont connues pour chélater les métaux comme le cuivre quand ceux-ci sont en excès dans une cellule algale (Morelli et Scarano, 2004). De ce fait le pool de glutathion sera moins disponible en présence de cuivre pour le système antioxydant cellulaire. Néanmoins, Ahner *et al.* (2002) ont montré qu'après 2h d'exposition au cuivre d'une espèce de diatomée, le taux de GSH ne diminuait que légèrement. De ce fait, cette première hypothèse ne semble pas pouvoir être la cause d'interaction. Néanmoins, il serait nécessaire de mesurer le taux de GSH lors de l'exposition des cellules aux Cu et à l'HTO, seul et en mélange.



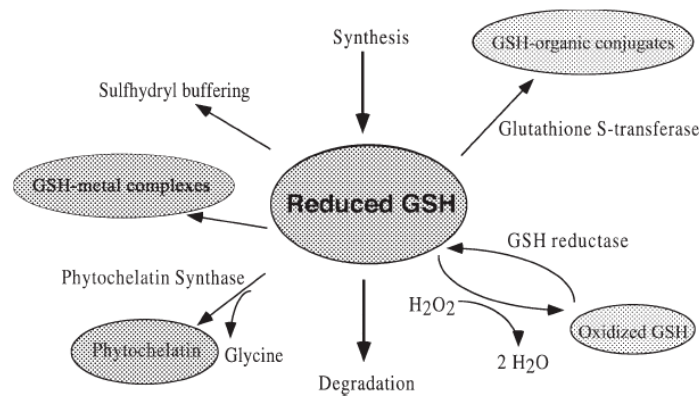


Figure 44 : Utilisation du pool de GSH par les diverses activités antioxydantes cellulaires (d'après Ahner et al., 2002)

2)- l'effet des rayonnements sur les molécules thiol : Strid *et al.* (1994) ont montré que les molécules thiol étaient sensibles aux radiations telles que les UV-B. De la même manière, une altération directe des molécules thiol est possible par les radiations  $\beta$ , ce qui induirait une baisse de l'efficacité du système antioxydant des cellules. Dans cette étude, il n'a pas été possible de mesurer le taux de GSH ou d'autres molécules thiol de faible poids moléculaire en raison des larges volumes d'algues nécessaire pour cette analyse (500 ml ; Ahner *et al.*, 2002). En effet, la manipulation des éléments radioactifs est contrôlée en activité. De ce fait la mise en place de ce protocole nous permettrait d'exposer les algues à une activité en HTO maximum de  $35 \text{ kBq mL}^{-1}$ . Or,  $40 \text{ kBq mL}^{-1}$  est la plus petite concentration testée induisant un effet sur la production d'ERO.

Enfin, cet effet supra-additif du mélange sur la production d'ERO n'est pas répercuté sur le taux de croissance cellulaire. Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'absence d'une augmentation de la concentration en cuivre internalisé sur le long terme chez des cellules exposées à un mélange HTO/Cu.

## **4. DISCUSSION GENERALE**



Afin de répondre à l'objectif de cette étude, à savoir déterminer l'effet du mélange HTO/Cu envers *Chlamydomonas reinhardtii*, au niveau de l'entrée du cuivre et au niveau du taux de croissance et de la production d'ERO, plusieurs étapes ont été nécessaires.

Dans un premier temps, afin de mesurer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez notre modèle biologique, une mise au point expérimentale a été réalisée. La portée expérimentale de ce dosage par utilisation de H<sub>2</sub>DCF-DA sera détaillée afin de faire ressortir les avantages et les limites de cette technique ainsi que de discuter des résultats obtenus au vu de ces limitations. Le dispositif d'irradiation  $\gamma$  continue sera également discuté afin d'évaluer sa réutilisation et de déterminer les mesures complémentaires qu'il serait nécessaire de réaliser pour définir la validité de ce dispositif. L'utilisation de ces deux méthodes nous ont permis de mesurer une prise en charge rapide des ERO par le système antioxydant des cellules algales lors d'expositions continues des cellules à des rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces résultats seront analysés en termes d'efficacité des radiations sur la production d'ERO.

A la suite de ces développements, l'effet de l'HTO ainsi que sa métabolisation ont été mesurés sur notre modèle biologique, *Chlamydomonas reinhardtii*. Le dosage du tritium organique a permis de constater une métabolisation de l'eau tritiée dans la matrice algale (+15%). Cette métabolisation sera évaluée en termes d'exposition des organismes via la chaîne trophique. En ce qui concerne les effets de l'HTO, la production d'ERO s'est révélée un marqueur d'exposition sensible à l'HTO (0,13  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  - 40 kBq mL<sup>-1</sup> - induisent une augmentation significative du stress oxydant) alors que la mesure du taux de croissance est un bon marqueur d'effet, même s'il s'est avéré peu sensible (25 % d'inhibition de la croissance à 172  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  - 52 MBq mL<sup>-1</sup>). Enfin, aucun effet n'a été mesuré sur l'activité photosynthétique lors d'exposition à de si faibles débits de dose (47  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  - 14 MBq mL<sup>-1</sup>). Ces données seront discutées avec les données d'effet de l'HTO présentes dans la bibliographie.

Dans un dernier temps, les effets de l'HTO en mélange avec du cuivre ont été testés afin de répondre à l'objectif général de cette étude. Nos résultats ont mis en évidence une affinité accrue du cuivre pour les cellules lors d'exposition en mélange. Cette augmentation de l'affinité des cellules vis-à-vis du cuivre en présence d'HTO semble pouvoir expliquer l'effet supra-additif observé sur la production d'ERO (que ce soit lors de mélanges simultanés ou après pré-exposition des cellules au cuivre puis exposition à l'HTO). Néanmoins, sur le taux de croissance, l'effet à long terme (96h) du mélange est additif, en lien probable avec une concentration internalisée en cuivre qui reste inchangée à 96h en présence d'HTO. Ces points

seront également détaillés et des hypothèses d'actions seront proposées afin d'expliquer cette interaction en mélange sur la production d'ERO.

L'ensemble de ces points de discussion sont détaillés ci-dessous en quatre parties. Tout d'abord, une analyse critique des méthodes et approches utilisées est réalisée. Ensuite, les effets de l'HTO seul sont évalués en termes de dose et d'efficacité biologique. La production d'ERO sous forme de pic est également abordée en lien avec l'activation du système antioxydant. La troisième partie regroupe les effets du mélange. Sont notamment discutés l'utilisation de l'indice d'interaction utilisé et l'effet de l'HTO sur l'internalisation du cuivre. Enfin, les conséquences de ces résultats en termes d'évaluation des risques écologiques du tritium sont présentées.

## 4.1. ANALYSE CRITIQUE DES OUTILS ET DES APPROCHES UTILISEES

---

Au cours de cette étude, afin d'atteindre les objectifs fixés, un certain nombre de protocoles a dû être testé et développé. Cette partie est consacrée aux avancées permises par ces mises au point, mais aussi les limitations des méthodes utilisées.

### 4.1.1. Dispositif d'irradiation $\gamma$ continue en microplaque (potentiels et limitations)

Afin de pouvoir comparer les effets des radiations provenant de contamination de cellules algales à l'HTO, un dispositif d'irradiation  $\gamma$  continue a été mis en place à partir du protocole de mesure de la production d'ERO en microplaque. L'ajout d'une source de  $^{137}\text{Cs}/^{137\text{m}}\text{Ba}$  au centre d'une microplaque permet d'obtenir un dispositif d'irradiation continue. L'avantage de ce dispositif repose sur le fait que les cellules sont irradiées en continu même pendant la lecture de la fluorescence, dans un spectrofluorimètre. A titre comparatif, les études réalisées jusqu'à ce jour à notre connaissance utilisaient des irradiations brèves de forte dose, découplées de la mesure d'effet effectuée après irradiation. C'est ainsi que par exemple une augmentation du stress oxydatif lors d'irradiation  $\gamma$  ( $^{60}\text{Co}$ , 1 500 Gy) a été mesurée chez *Anacystis nidulans* (Agarwal *et al.*, 2008). Dans notre étude, lors d'exposition continue, dès 15 min d'exposition à des doses de 0,08  $\mu\text{Gy}$  ( $\gamma$  irradiation continue à 0,33  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ) et 0,04  $\mu\text{Gy}$  (HTO irradiation continue à 0,13  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ), une induction significative de la production d'ERO a pu être mesurée. Du fait d'une irradiation continue, les doses induisant un effet sont beaucoup plus faibles.

Bien que les avantages de cette technique soient certains, il est nécessaire de rappeler les limitations mises en évidence. Tout d'abord, les débits de doses testés sur une même plaque sont proches. De ce fait, plusieurs séries d'exposition en parallèle doivent être réalisées. De plus, aucun contrôle ne peut être réalisé puisque tous les puits de la plaque reçoivent une dose non négligeable. Enfin, entre les huit puits considérés comme des répliqués, une variation du débit de dose moyen (au centre du puits) de 13% a été calculé. Ce constat est à mettre en parallèle avec les plus grandes variations de mesure d'ERO (IC95)

obtenues suite à des irradiations  $\gamma$  (50 639 UA fluorescence pour  $10^9$  cellules +/- 27% après 16 min d'exposition à  $3\,278\ \mu\text{Gy h}^{-1}$ ) comparé à des expositions des cellules à l'HTO pour lesquels les variations de débits de doses interpuits sont nulles (42 952 UA fluorescence pour  $10^9$  cellules +/- 14% après 16 min d'exposition à  $9\ \mu\text{Gy h}^{-1}$ ).

En prenant en compte ces limitations, ce type de dispositif pourra cependant être réutilisé pour mesurer le taux de croissance ainsi que pour la mesure de marqueurs nécessitant la lecture d'une émission lumineuse pour divers organismes de petites tailles en microplaque. Une mesure expérimentale des dépôts de dose dans les puits devra cependant être envisagée afin de vérifier les calculs effectués pour estimer les doses d'exposition.

#### 4.1.2. Mesure des ERO par utilisation de H<sub>2</sub>DCF-DA (avantages et limitations)

Les rayonnements ionisants vont agir sur les cellules de deux façons. De manière directe par ionisation des molécules (possibilité de réparation par recombinaison ou don d'électron, en fonction du nombre de groupement thiol dans la cellule) et de façon indirecte par formation de radicaux hydroxyles (à partir des ERO générés par les rayonnements ionisants ; Lee *et al.*, 2001 ; Zaka *et al.*, 2002). La majeure partie des effets dus aux rayonnements ionisants (paragraphe 1.2.2) est transmise par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ceci se fait notamment par la radiolyse de l'eau (Tulard *et al.*, 2003). Le protocole de mesure développé ici a permis de mesurer la production d'ERO dans le temps. Cette mesure a notamment permis de visualiser les temps de réponse rapide des systèmes oxydants et antioxydants cellulaires lors d'exposition des cellules au cuivre et aux radiations.

L'utilisation de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA présente l'avantage de mesurer l'état oxydant général des cellules. En effet, le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre oxydants et antioxydants cellulaires. De nombreuses méthodes de dosage reposent sur la mesure particulière de certaines des enzymes antioxydantes. Or une information ponctuelle sur une enzyme antioxydante ne permet pas de mesurer le dépassement des capacités antioxydantes cellulaires (ERO non pris en charge). C'est ce que nous permet ici l'utilisation de cette sonde, même si cette mesure ne pourra être considérée que comme une première approche. En effet, dans une optique de définir le mode d'action exact de l'HTO sur le stress oxydant, cette méthode ne nous a permis que d'émettre des hypothèses quant à l'origine potentielle de la baisse du niveau d'ERO cellulaire mesuré (probablement dû à la mise en

place du système antioxydant). Afin de confirmer l'action du système antioxydant, une mesure particulière des enzymes impliquées devrait alors être réalisée.

De plus, l'utilisation de la H<sub>2</sub>DCF-DA présente des limitations. Tout d'abord, nous avons mesuré une auto-oxydation de la sonde lors d'expositions à des radiations ionisantes ce qui réduit le temps possible de la mesure de la cinétique de production d'ERO. La sonde se dégrade également en présence de lumière ce qui exclu de réaliser une mesure du stress oxydant lors d'exposition des cellules dans des conditions d'illumination. Or, l'état physiologique des cellules algales est différent à la lumière et à l'obscurité. En effet, à l'obscurité, les cellules sont physiologiquement moins actives ce qui peut induire des différences de production d'ERO. Enfin, lors d'expositions au mélange HTO/Cu, une spécificité de la sonde induit probablement une amplification de la réponse. En effet, le cuivre via la réaction d'Haber Weiss va engendrer la création de radicaux (dosé par la sonde) à partir du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (non reconnu par la sonde).

En conclusion, cette sonde se révèle un outil intéressant afin d'observer la réponse précoce résultant d'un stress oxydant. Néanmoins, son utilisation demande des vérifications préalables dans le cas d'expositions à des rayonnements ionisants et il n'est pas possible de conclure quant aux mécanismes d'action sous-jacent aux observations réalisées sur cette simple mesure.



## 4.2. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LES EFFETS DE L'HTO

---

En amont de ce travail, aucune analyse regroupant plusieurs paramètres d'effet n'avait été entreprise concernant l'effet du tritium sur un même organisme d'étude. De plus, concernant les données sur des organismes végétaux, seule des études concernant les effets sur le taux de croissance ainsi que sur les voies d'exposition avait été réalisées, mais sans lien avec un calcul de débits de dose d'exposition, alors que les effets observés dans la littérature sur d'autres organismes sont reportés pour de faibles doses radiologiques d'exposition qui sont sans effet lors d'exposition à d'autres types de rayonnements (exemple :  $\gamma$ ).

Dans ce contexte, l'effet de l'HTO a été mesuré sur trois paramètres d'effet de notre modèle biologique afin de définir la sensibilité de ces paramètres. En parallèle, une étude approfondie des voies d'exposition a été effectuée afin d'estimer l'impact de la métabolisation du tritium sur les doses d'expositions. Enfin, ces effets ont été comparés à ceux résultants d'irradiation  $\gamma$  (dont les calculs de dose sont plus précis).

### 4.2.1. Exposition à l'HTO (difficultés expérimentales et caractérisation du débit de dose)

Afin de relier les effets de l'HTO à des débits de dose dans l'optique notamment de comparer nos résultats avec ceux obtenus lors d'exposition d'autres organismes à ces mêmes radiations ou bien avec ceux résultant de débits de dose provenant de radiation  $\gamma$ , toute une partie de cette étude a consisté à caractériser les voies et niveaux d'expositions de notre modèle biologique à l'HTO. Les résultats obtenus mettent notamment en évidence la volatilité de l'HTO, ce qui engendre des contaminations inter-conditions ainsi que des fluctuations des conditions d'expositions externe aux cellules au cours du temps. De plus, la métabolisation de l'HTO sous forme de tritium organique dans la matrice algale augmente de façon non négligeable la voie d'exposition interne des cellules (environ 15%). Néanmoins, le problème majeur dans la conversion des activités d'expositions en débit de dose repose sur la taille de l'organisme (5  $\mu\text{m}$  de diamètre environ) par rapport aux parcours libre des rayonnements  $\beta$  du tritium dans l'eau (0,56  $\mu\text{m}$  ; NCRP, 1979). La probabilité de dépôt de l'énergie sera donc très

faible et difficilement calculable. Dans ce contexte, la plupart des études prennent pour mode de calcul l'hypothèse d'un dépôt total (Hagger *et al.*, 2005). Cette hypothèse majore les débits de dose d'exposition en considérant que l'ensemble de l'énergie des radiations sera déposée dans l'organisme. Bien qu'étant conservatrice, dans le cadre d'utilisation en évaluation des risques, cette estimation ne permet pas de connaître précisément les doses reçues par ces organismes. Malgré ce débit de dose majorant, les effets du tritium ont été mesurés à des débits de dose d'exposition beaucoup plus faible que dans le cas d'exposition à des radiations  $\gamma$ , comme le montrent les résultats obtenus dans cette étude sur la production d'ERO.

#### 4.2.2. Production d'ERO

L'effet le plus sensible de l'HTO est une induction de la production d'ERO suite à des expositions de  $40 \text{ kBq mL}^{-1}$ . Bien que l'action du système antioxydant vienne réduire le taux d'ERO cellulaire, ce taux reste important (à 100 min) et pourra engendrer potentiellement des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (paragraphe 1.2.2.2). Cependant seul de faibles effets ont pu être mis en évidence lors d'exposition des cellules à de si faibles doses d'HTO (inhibition du taux de croissance cellulaire après 96h d'exposition à  $59 \text{ MBq mL}^{-1}$  d'HTO,  $14 \text{ MBq mL}^{-1}$  sont sans effet sur l'activité des photosystèmes). Ceci semble plutôt confirmer l'action des ERO lors de leur présence en faible concentration dans les mécanismes de signalisation cellulaire (Leach *et al.*, 2001). Cette action des ERO dans la mise en place précoce de mécanismes de réparation par exemple pourrait ainsi expliquer l'effet protecteur de radiations à faibles doses (Feinendegen, 2005). Bien que ce résultat soit assez nouveau, Knauert et Knauer (2008) et Szivak *et al.* (2009) avaient déjà pu mettre en évidence une augmentation des ERO lors d'exposition de cellules algales au cuivre sans pour autant noter d'effet toxique sur l'activité des photosystèmes.

#### 4.2.3. Efficacité biologique de l'HTO

Les rayonnements  $\beta$  provenant de l'HTO auront de par leur nature particulière (électron) une toxicité forte vis-à-vis des organismes vivants en comparaison à des rayonnements électromagnétiques (exemple : photons,  $\gamma$ ). Sur l'homme, afin de comparer l'ensemble de ces rayonnements entre eux, un facteur d'effet biologique relatif est attribué aux rayonnements en fonction de leur énergie ainsi que de leurs types d'émissions (particulaire ou électromagnétique) : RBE (Relative Biological effectiveness). Ce facteur est

calculé à partir de la dose de rayonnement de référence (le plus souvent X) nécessaire pour produire le même effet biologique que celui mesuré après exposition à un autre rayonnement et ce sur le même paramètre d'effet stochastique (de type cancer). Le RBE des rayonnements est de 1 pour les émetteurs  $\beta$  et  $\gamma$ . Néanmoins, le tritium est une exception puisqu'une pondération de 3 lui est actuellement appliquée (Environnement Canada, 1999). Ce facteur 3 est surtout attribué au tritium par sécurité, étant donné le peu de mesures connues quant à la toxicité de cet élément (Pentreath, 1998). Ce facteur de pondération correspondant à l'effet biologique attendu. Plus ce facteur est important plus la toxicité des rayonnements sera forte.

La validité de l'approche RBE pour des effets déterministes (non stochastiques) sur les espèces non humaine est encore en discussion. Néanmoins, nos résultats permettent d'établir une comparaison de l'effet de l'HTO sur la production d'ERO par rapport à l'effet induit sur ce même paramètre lors d'exposition  $\gamma$  continue. Ceci nous permet de souligner l'effet biologique supérieur de l'HTO. En effet, la même production d'ERO est mesurée après  $9,4 \mu\text{Gy h}^{-1}$  lors d'une exposition à l'HTO et après une exposition de  $3\,278 \mu\text{Gy h}^{-1}$  lors d'une irradiation  $\gamma$ . Bien que des mesures de confirmations pour différents débit de dose soient nécessaires (en particulier un raffinement de la détermination des débits de doses externes et internes), il semble donc que la définition d'un facteur d'efficacité biologique pour le tritium soit justifié.

## 4.3. ANALYSE DES EFFETS DES SUBSTANCES EN MELANGE

---

### 4.3.1. Modèle d'analyse d'une déviation depuis l'hypothèse d'additivité

Pour l'analyse de la toxicité des substances en mélange, l'absence de courbe dose-réponse dans le cas d'exposition de notre modèle biologique à l'HTO a rendu inapplicable les modèles classiques de mélange. Néanmoins, une alternative proposée par Geras'kin *et al.* (2005) nous a permis de mesurer des effets supra-additifs lors du mélange HTO/Cu. Cet indice d'interaction utilisé est proche du modèle IA. Dans notre cas, nous avons dû pooler les  $Kw$  obtenus pour différents ratios de mélange ( $n=4$  pour chaque ratio) entre eux afin de pouvoir mettre en évidence une différence significative par rapport à 1. De ce fait, seul un effet supra-additif global du mélange HTO/Cu a pu être mis en évidence.

Le risque de cette approche est de définir une interaction (effet déviant de l'additivité globale) alors que seuls certains ratios de mélange sont concernés ou que le sens de l'interaction varie (interactions sub-additives ou supra-additives en fonction des ratios d'un même mélange). Or comme cela a été défini dans le paragraphe 1.1.2, les interactions peuvent être ratio-dépendantes. Si nous avions pu utiliser les modèles classiques CA et IA, nous aurions obtenu une information pour chaque ratio séparément.

### 4.3.2. Effet de l'HTO en mélange avec du cuivre

En mélange avec du cuivre, aucune interaction avec de l'HTO n'a pu être mesurée sur le taux de croissance de notre modèle biologique. Cependant sur la production d'ERO, une interaction HTO/Cu a été identifiée pour des expositions à l'HTO de 40, 158 et 59 000 kBq mL<sup>-1</sup>. Cette interaction sur la production d'ERO a été observée lors d'expositions simultanées des cellules au mélange, mais aussi après une pré-exposition des cellules au cuivre avant l'ajout de l'HTO.

Une explication de cette augmentation de l'effet des substances en mélange est apportée par les résultats concernant l'entrée du cuivre en présence d'HTO (1 132 kBq mL<sup>-1</sup>). En effet, l'affinité des cellules pour le cuivre est augmentée lors d'expositions en mélange. Cette

observation a été mesurée sur un temps cohérent avec la production d'ERO (à 40 min) et vient confirmer les observations de différents auteurs concernant l'entrée accrue des métaux lorsque les cellules sont soumises à un rayonnement ionisant (Rai *et al.*, 1998). Cependant, sur le long terme, le cuivre internalisé n'est pas différent (pour des conditions d'exposition spécifiques) ce qui permet d'expliquer l'absence d'effet supra-additif sur le taux de croissance cellulaire.

#### 4.3.3. Implication en radioécologie

Lors de l'exposition d'organismes à des substances stables, des effets supra- et sub-additif ont pu être reportés. Dans le domaine de la radioécologie, la détermination des effets des substances radioactives en mélange est encore peu étudiée. Cet aspect de la radioécologie est cependant un des points à prendre en considération afin de réduire les incertitudes lors de l'estimation de l'impact environnemental des rejets radioactifs (Salbu, 2009). Cet auteur pointe notamment l'importance de mesurer les effets de mélange de substances stables, organiques et radioactives au niveau de la production de radicaux libres. En effet, des effets supra-additif sur ce paramètre, commun pour plusieurs contaminants, entraîneront potentiellement des dommages à l'ADN et aux membranes des organismes, engendrant des dysfonctionnements cellulaire (Figure 45).

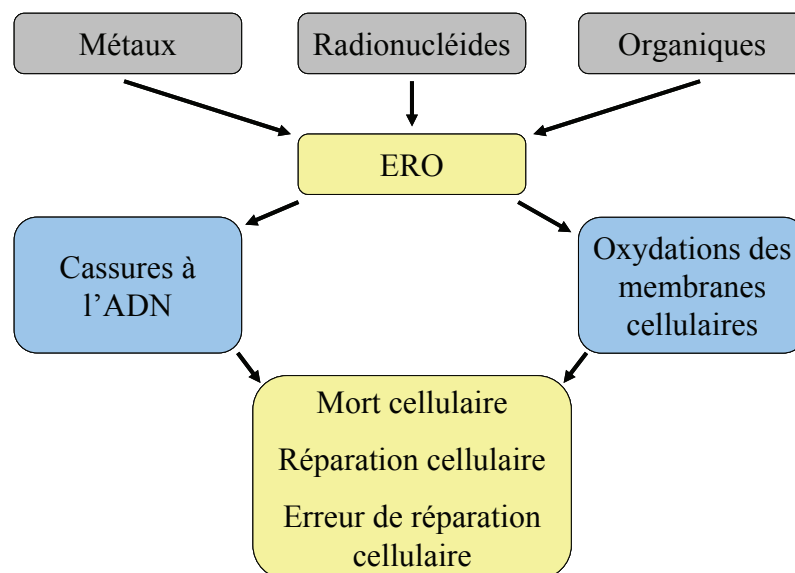


Figure 45 : Action simultanée supposée de substances en mélange avec des radionucléides au niveau de la production d'ERO (d'après Salbu, 2009)

Les résultats obtenus dans notre étude mettent en évidence de telles interactions sur la production d'ERO. De ce fait, le modèle conceptuel proposé par Salbu (2009) est en partie

vérifié pour le cas d'étude traité, à savoir la production d'ERO lors de l'exposition d'organisme à des mélanges métal (cuivre) / radionucléide (tritium). Néanmoins, les conclusions en termes de conséquences (cassures d'ADN, oxydation des membranes...) restent encore à être validées par des mesures complémentaires.

## 4.4. IMPLICATION EN TERME D'ÉVALUATION DES RISQUES ÉCOLOGIQUES

---

Notre étude apporte de nouvelles données sur l'exposition et les effets du tritium envers les producteurs primaires. Ces données seront potentiellement utiles dans le contexte actuel où les rejets environnementaux en tritium sont plus que jamais d'actualité : l'utilisation prolongée des barres de combustibles et démantèlement des CNPE en fin de vie engendrent une augmentation des rejets en HTO ; les rejets du futur réacteur à fusion nucléaire ITER en HTO sont estimés à  $537 \times 10^6$  GBq par an (Guétat *et al.*, 2008). Cette valeur est à mettre en relation avec les 40 000 GBq par an autorisé à être rejeté à l'heure actuelle pour des tranches de 1 450 MWe (Pierrard, 2008).

### 4.4.1. Niveaux d'effets observés au regard de l'exposition des écosystèmes aquatiques à l'HTO

Les effets de l'HTO mesurés dans notre étude l'ont été pour des activités largement supérieures aux valeurs couramment observées dans les cours d'eau en amont des CNPE en termes d'activité d'exposition à l'HTO (paragraphe 1.1). Même si dans les rivières les plus contaminées, des niveaux de  $8 \text{ kBq mL}^{-1}$  ont pu être mesurés (Makhijani et Boyd, 2004), ce niveau est exceptionnel. Les valeurs testées dans notre étude se rapprochent de l'activité des rejets avant leur dilution dans le milieu ( $0,6 - 4 \text{ kBq mL}^{-1}$  ; Pierrard, 2008). Avant dilution, l'effet de ces rejets ne sera donc pas négligeable.

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence une accumulation du tritium organique dans les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*. Comme nous l'avons discuté précédemment, cette accumulation de tritium sous forme organique dans la matrice algale ne sera pas sans effet sur la dose reçue par les organismes (+15%), même si celle-ci reste très faible. De plus ce tritium organique exposera les organismes à plus long terme au tritium. En effet, une fois incorporé à la matière organique, même si les conditions dans le milieu change (baisse de la concentration en HTO dans le milieu d'exposition), les organismes seront toujours exposés au tritium via la consommation d'algue (tritium organique) notamment, puisque le tritium organique est persistant dans ce genre de matrice (Hunt *et al.*, 2010).

#### 4.4.2. Niveau de sensibilité des producteurs primaires à l'HTO en comparaison des autres organismes aquatiques et implications en termes d'évaluation du risque pour le cuivre

En ce qui concerne la sensibilité du modèle d'étude choisi au tritium, les organismes végétaux se révèlent être d'une sensibilité du même ordre de grandeurs que certains invertébrés, c'est-à-dire pour des débits de dose faibles. En effet,  $1,2 \mu\text{Gy h}^{-1}$  (LOEDR) induisent des dommages à l'ADN chez la moule (Jha *et al.*, 2005 ; Hagger *et al.*, 2005),  $3 \mu\text{Gy h}^{-1}$  (EDR<sub>50</sub>) induisent des anomalies du développement chez la daphnie (Gudkov et Kipnis, 1996),  $12,5 \mu\text{Gy h}^{-1}$  (LOEDR) sont responsables d'anomalies histologique chez l'escargot (Cruz-Ramos et Carino, 1989),  $42 \mu\text{Gy h}^{-1}$  (EDR<sub>50</sub>) ont des effets sur le développement chez le pouce pied (Abbott, 1979). Au vu de ces valeurs les paramètres concernant les dommages induit à l'ADN et ceux sur la reproduction des invertébrés surviennent à de très faibles débits de dose.

En termes d'évaluation des risques, les effets mesurés sur la croissance (stimulation et inhibition) de notre modèle photosynthétique sont un signe que le tritium peut potentiellement engendrer des perturbations des écosystèmes aquatiques (apport accru ou manque de matière organique respectivement). Les constatations effectuées pour le mélange binaire de tritium et de cuivre montrent aussi l'effet que pourrait avoir le tritium à augmenter l'internalisation et l'effet des métaux traces. Cependant, ces résultats ne permettent pas de remettre en cause l'évaluation actuelle qui est faite concernant la toxicité du cuivre envers les écosystèmes aquatiques, même en mélange. En effet, l'interaction constatée l'est pour des concentrations en HTO beaucoup plus élevé que les concentrations environnementales. De plus, ces constatations devraient être vérifiées pour d'autres mélange afin de confirmer la nécessité de prendre en compte les interactions entre substances radioactives et chimiques dans les méthodes d'évaluation des risques actuelles.





# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



En conclusion quant aux avancées apportées par cette étude, bien que la production d'ERO engendrée par l'HTO soit sans effet sur la croissance algale, cette production semble être responsable de l'augmentation de l'affinité des cellules pour le cuivre et donc d'interactions résultant du mélange HTO/Cu. Ces résultats apportent donc une observation supplémentaire de l'effet accru des substances en mélange lors d'expositions à un rayonnement ionisant.

Néanmoins, en termes d'évaluation des risques, il est difficile de tirer une conclusion claire de ces données. En effet, cette étude portant sur la recherche d'interaction entre substances rejetées par des CNPE en fonctionnement normal s'est restreinte à l'étude d'un cas particulier qui est le mélange HTO/Cu en condition de laboratoire envers un organisme aquatique modèle. Bien qu'une interaction ait été clairement mise en évidence dans ce cas particulier, celle-ci n'est pas généralisable à l'ensemble des rejets de CNPE qui sont notamment beaucoup plus complexes en termes de composition (mélange de nombreuses substances). Afin de conclure sur la présence d'interaction entre substances présentes dans les rejets de CNPE, une étude de plusieurs mélanges binaires ainsi que de mélanges complexes devrait être réalisée.

Cependant, cette première approche de l'effet de l'HTO seul et en mélange envers un organisme photosynthétique soulève un grand nombre de questions et ouvre de nombreuses pistes de recherche dans l'optique d'une meilleure compréhension des effets du tritium envers les organismes afin de mieux évaluer les risques engendrés par des mélanges de substances stables avec des rayonnements ionisants.

L'une des premières perspectives intéressantes de ce travail serait notamment de mesurer les niveaux de peroxydation des membranes biologiques afin de savoir si l'entrée augmentée du cuivre résulte de ces dommages ou bien d'effet direct des ERO ou des radiations sur les transporteurs membranaires par exemple. Enfin, afin de compléter ces observations, la mesure de l'effet de l'HTO en mélange avec un autre métal permettrait de comparer l'entrée des métaux dans des cellules soumises à un rayonnement.

Dans un second temps, et au vu des connaissances bibliographiques sur ce sujet, il semble essentiel d'analyser les dommages à l'ADN afin de mettre en relation ces dommages avec la production d'ERO. En effet, les rayonnements ionisants ont des effets directs et indirects via les ERO sur l'ADN, dommages qui peuvent engendrer des mutations. A partir de la technique de mesure des ERO il serait ainsi intéressant de distinguer la part de ces deux

sources d'effet sur l'induction de cassures à l'ADN afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'HTO sur un organisme photosynthétique.

Enfin dans un dernier temps, il semble essentiel d'affiner les modèles de calcul de dose afin d'évaluer plus précisément l'efficacité biologique du tritium en comparaison aux rayonnements  $\gamma$ , dans une approche similaire à ce qui a déjà été entrepris dans le domaine de la radioprotection de l'homme. En effet, l'évaluation des risques passe notamment par une connaissance précise des niveaux d'exposition.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abbott DT. 1979. Radiation effects of tritiated seawater on development of the goose barnacle, *Pollicipes polymerus*. *Health Physics* 36:283-287.
- Agarwal R, Rane SS, Sainis JK. 2008. Effects of  $^{60}\text{Co}$  radiation on thylakoid membrane functions in *Anacystis nidulans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 91:9-19.
- Ahner BA, Wei L, Oleson JR, Ogura N. 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series* 232:93-103.
- Altenburger R, Bodeker W, Faust M, Horst Grimme L. 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: Combination effect studies with pesticides in algal biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20:98-114.
- Amano H, Atarashi M, Noguchi H, Yokoyama S, Ichimasa Y, Ichimasa M. 1995. Formation of organically bound tritium in plants during the 1994 chronic HT release experiment at Chalk River. *Fusion Technology* 28:803-808.
- Andersen ME, Dennison JE. 2004. Mechanistic approaches for mixture risk assessments-present capabilities with simple mixtures and future directions. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 16:1-11.
- Babu TS, Akhtar TA, Lampi MA, Tripuranthakam S, Dixon DG, Greenberg BM. 2003. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and Cell Physiology* 44:1320-1329.
- Baeza A, Brogueira AM, Carreiro MCV, Garcia E, Gil JM, Miro C, Sequeira MM, Teixeira MMR. 2001. Spatial and temporal evolution of the levels of tritium in the Tagus river in its passage through Caceres (Spain) and the Alentejo (Portugal). *Water Research* 35:705-714.
- Baeza A, García E, Paniagua JM, Rodríguez A. 2009. Study of the comparative dynamics of the incorporation of tissue free-water tritium (TFWT) in bulrushes (*Typha latifolia*) and carp (*Cyprinus carpio*) in the Almaraz nuclear power plant cooling reservoir. *Journal of Environmental Radioactivity* 100:209-214.
- Baroli I, Do AD, Yamane T, Niyogi KK. 2003. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell* 15:992-1008.
- Bartosz G. 2006. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta*. 368:53.
- Bates SS, Tessier A, Campbell PGC, Buffle J. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal of Phycology* 18:521-529.
- Baty F, Delignette-Muller M-L, Charles S, Flandrois J-P. 2009. nlstools: Tools for nonlinear regression diagnostics. R package version 0.0-8.
- Baumgärtner F, Donhaerl W. 2004. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379(2):204-209.



- Baumgärtner F, Kardinal C, Müllen G. 2001. Distribution of tritium between water and exchangeable hydrogen bridges of biomolecules. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249:513-517.
- Baumgärtner F, Kim M. 2000. Tritium/Protium fractionation near and inside DNA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 243:295-298.
- Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J, Gariel JC. 2006. Modelling the radiological dose in non-human species : principles, computerization and application. *Health Physics* 90: 485-493.
- Belot Y, Caput C, Gauthier D. 1986. Distribution of the organically bound tritium in vegetation exposed to fall-out. *Radiation Protection Dosimetry* 16:111-113.
- Belot Y, Roy M, Métivier H. 1997. Le tritium de l'environnement à l'homme. Les Ulis: Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire. 191p.
- Belot Y. 1986. Tritium in plants: A review. *Radiation Protection Dosimetry* 16:101-105.
- Bensasson RV, Land EJ, Tuscott TG. 1993. Light ionizing. In: *Excited States and Free radicals in Biology and Medicine: contribution from flash photolysis and pulse radiolysis*, Oxford University Press. New York. P 249-289.
- Bhargava P, Kumar A, Mishra Y, Rai LC. 2008. Copper pretreatment augments ultraviolet B toxicity in the cyanobacterium *Anabaena doliolum*: a proteomic analysis of cell death. *Functional Plant Biology* 35:360-372.
- Blaylock BG, Hoffmann FO, Frank ML. 1986. Tritium in the aquatic environment. *Radiation Protection Dosimetry* 16:65-71.
- Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26:585-615.
- Bonotto S, Arapis G, Mellet J, Hoursiangou-Neubrun D, Cinelli F, Belcari P, Gerber GB, Kirchmann R. 1984. Behavior of tritium in the marine environment: Uptake and distribution of tritiated water and of tritiated organic compounds in unicellular and multicellular algae. *Hydrobiologia* V116-117:187-189.
- Bonotto S, Bossus A, Nuyts G, Kirchmann R, Cantillon G, Declerck R. 1978. Contamination d'organismes marins par le  $^3\text{H}$ , le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{60}\text{Co}$ . *Revue Internationale d'Océanographie Médicale* XLIX:127-133.
- Boswell C, Sharma NC, Sahi SV. 2002. Copper tolerance and accumulation potential of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69:546-553.
- Box GEP, Cox DR. 1964. An analysis of transformations. *Royal Statistical Society Series B : Statistical Methodology* 26:296-311.
- Buschmann C. 1995. Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wildtype plants of tobacco and in an aurea mutant deficient of light-harvesting-complex. *Journal of Plant Physiology* 145:245-252.
- Campbell NA, Reece JB. 2002. *Biology*. San Francisco: Benjamin Cummings. 1247 p.

- Campbell P.G.C., Couillard Y. 2003. Prise en charge et detoxification des métaux chez les organismes aquatiques, dans E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (dir.), Ecotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. Sainte-Foy, Presses de l'Université du Québec, 9-61p.
- Campbell PGC, Errecalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 133:189-206.
- Carreiro M C V, Sequiera M M A. 1999. Tritio nos rios Tejo e Zêzere. In 6a Conferência Nacional Sobre A Qualidade Do Ambiente. Lisboa, Portugal.
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec). 2005. Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. MA. 500 – P. sub. 1.0. Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec.
- Charles AL, Markich SJ, Ralph P. 2006. Toxicity of uranium and copper individually, and in combination, to a tropical freshwater macrophyte (*Lemna aequinoctialis*). Chemosphere. 62:1224-1233.
- Charton J, Maurauss S. 2004. Evaluation de la PNEC morpholine pour le milieu aquatique. EDF. 130p.
- Christensen ER, Chen DX, Nyholm N, Kusk KO. 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: Influence of response level and dose-response regression model. Environmental Toxicology and Chemistry 20:2361-2369.
- Ciffroy P, Moulin C, Gailhard J. 2000. A model simulating the transport of dissolved and particulate copper in the Seine River. Ecological Modelling 127:99-117.
- Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicology Letters 142:185-194.
- Collen J, Davison IR. 1997. In vivo measurement of active oxygen production in the brown alga *Fucus evanescens* using 2',7'- dichlorohydrofluorescein diacetate. Journal of Phycology 33:643-648.
- Commission Canadienne de sûreté nucléaire. 2003. Données sur les rejets radioactifs des centrales nucléaires canadiennes de 1994 à 2003. INFO-0210 (Révision 12): 47p.
- Conter A, Dupouy D, Delteil C, Planel H. 1986. Influence of very low doses of ionizing radiation on *Synechococcus lividus* metabolism during the initial growth phase. Archives of Microbiology 144:286-290.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin M.-C, Vasseur P. 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In « Biomaqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux », 125-147. Masson, Paris.
- Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide. 1:145-157.

- Cruz-Ramos B, Carino VS. 1989. Effects of tritiated water on the digestive tract of *Pila luzonica* embryos. The nucleus. 27:63-70.
- DeLorenzo ME, Serrano L. 2003. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Environmental Science and Health Part B : Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes B38:529-538.
- Diabaté S, Strack S. 1997. Organically bound tritium in wheat after short-term exposure to atmospheric tritium under laboratory conditions. Journal of Environmental Radioactivity 36:157-175.
- Duffa C, Masson M, Gontier G, Claval D, Renaud P. 2004. Synthèse des études radioécologiques annuelles menées dans l'environnement des centrales électronucléaires françaises depuis 1991. Radioprotection 39:233-254.
- EDF. 2005. Nucléaire et développement. Division production nucléaire. 28p.
- Environnement Canada. 1999. Priority substances list assessment report.
- Erbes M, Wessler A, Obst U, Wild A. 1997. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. Environmental and molecular mutagenesis 30:448-458.
- Fargasova A. 1999. Toxicity of Cd<sup>2+</sup> in mixture with Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> on growth and chlorophyll content of alga *Scenedesmus quadricauda*. Biologia 54:661-666.
- Feinendegen LE. 2005. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. The British Journal of Radiology 78:3-7.
- Fernandez-Leborans G, Novillo A. 1995. The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community. Ecotoxicology and Environmental Safety 31:29-36.
- Forster B, Osmond CB, Pogson BJ. 2005. Improved survival of very high light and oxidative stress is conferred by spontaneous gain-of-function mutations in *Chlamydomonas*. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 1709:45-57.
- Fortin C, Dutel L, Garnier-Laplace J. 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. Environmental Toxicology and Chemistry 23:974-981.
- Fox J. 2009. car: Companion to Applied Regression. R package version 1.2-12.
- Franklin N, Stauber J, Markich S, Lim R. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). Aquatic Toxicology 48:275-289.
- Franklin NM, Stauber JL, Lim RP, Petocz P. 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. Environmental Toxicology and Chemistry 21:2412-2422.
- Franklin NM, Stauber JL, Lim RP. 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. Environmental Toxicology and Chemistry 20:160-170.

- Galeriu D, Heling R, Melintescu A. 2005. The dynamics of tritium- including OBT- in the aquatic food chain. *Fusion Science and Technology* 48:779-782.
- Garnier-Laplace J, Beaugelin-Seiller K, Gilbin R, Della Vedova C, Jolliet O, Payet J. 2009. A screening level ecological risk assessment and ranking method for liquid radioactive and chemical mixtures released by nuclear facilities under normal operating conditions. *Radioprotection* 44: 903-908.
- Geoffroy L, Gilbin R, Simon O, Floriani M, Adam C, Pradines C, Cournac L, Garnier-Laplace J. 2007. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 83:149-158.
- Geras'kin SA, Kim JK, Dikarev VG, Oudalova AA, Dikareva NS, Spirin YV. 2005. Cytogenetic effects of combined radioactive ( $^{137}\text{Cs}$ ) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586:147-159.
- Girling A, Pascoe D, Janssen C, Peither A, Wenzel A, Schafer H, Neumeier B, Mitchell G, Taylor E, Maund S. 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45:148-76.
- Gomes A, Fernandes E. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65: 45.
- Gudkov DI, Kipnis LS. 1996. Long-term effect of tritiated water on the biological indicators of *Daphnia magna*. *Gidrobiologicheskiz zhurnal* 31:96-103.
- Guétat P, Douche C, Hubinois JC. 2008. Le tritium et l'environnement: sources, mesures et transferts. *Radioprotection* 43: 547-569.
- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. 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, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine* (Fourth edition). Oxford University Press. New York: 851p.
- Hanslík E, Ivanovová D, Juranova E, Simonek P, Jedináková-Krízová V. 2009. Monitoring and assessment of radionuclide discharges from Temelin nuclear power plant into the Vltava river (Czech Republic). *Journal of Environmental Radioactivity* :1-8.
- Hanslík EJ, Jedináková-Krízová V, Brtvová M, Ivanovová D, Kalinová E, Sedlářová B, Svobodová J, Simonek P, Tomásková H. 2005. Observed half-lives of  $^3\text{H}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  and  $^{137}\text{Cs}$  in hydrosphere in the Vltava river basin in vicinity of NPP Temelín (Czechia). *Radioprotection*. 40:S759-S764.
- Harrah CB. 1978. Biological effects of aqueous hydrazine solutions. Conference Environmental Chemistry. Hydrazine fuel sept.13 1977. CEEDO-78-14:167-176.
- Harris EH. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*: Academic Press, Inc. 780 p.
- He Y-Y, Hader D-P. 2002a. Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena sp.* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66:73-80.

- He Y-Y, Hader D-P. 2002b. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena sp.*: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-cysteine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66:115-124.
- Higuchi M, Komatsu K, Mukade A. 1980. Assessment of tritium effect on brine shrimp, *Artemia salina*, reared in a model ecosystem contaminated with tritiated water. *Radiation Effects on Aquatic Organisms* :13-25.
- Hill KL, Hassett R, Kosman D, Merchant S. 1996. Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiology* 112:697-704.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* 50:346-363.
- Hunt GJ, Bailey TA, Jenkinson SB, Leonard KS. 2010. Enhancement of tritium concentrations on uptake by marine biota: experience from UK coastal waters. *Journal of Radiological Protection* 30:73-80.
- IAEA. 2008. Annual report
- Ince NH, Dirilgen N, Apikyan IG, Tezcanli G, Üstün B. 1999. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* V36:365-372.
- Inomata T, Higuchi M. 1982. Accumulation and retention of tritium (tritiated water) in *Rhodospseudomonas spheroides* under aerobic condition. *Radiation and Environmental Biophysics* 20:123-136.
- Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow JP. 1999. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods in Enzymology* 301:367-373.
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. 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.
- Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2701-2713.
- Juneau P, El Berdey A, Popovic R. 2002. PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* V42:155-164.
- Juneau P, Green B, Harrison P. 2005. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica* 43:75-83.
- Juneau P, Popovic R. 1999. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application. *Ecotoxicology* 8:449-455.

- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH. 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquatic Toxicology* 76:93-110.
- Kehrer JP. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50.
- Kim J-H, Chung B, Kim J-S, Wi S. 2005. Effects of in planta gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of Plant Biology* 48:47-56.
- Knauer K, Behra R, Sigg L. 1997a. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (chlorophyta). *Journal of Phycology* 33:596-601.
- Knauer K, Behra R, Sigg L. 1997b. Effects of free Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:220-229.
- Knauert S, Knauer K. 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *Journal of Phycology* 44:311-319.
- Konemann WH, Pieters MN. 1996. Confusion of concepts in mixture Toxicol. *Food and Chemical Toxicology* 34:1025-1031.
- Kooten O, Snel JFH. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiol. *Photosynthesis Research* 25:147-150.
- Leach JK, Van Tuyle G, Lin P-S, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research* 61:3894-3901.
- Lee JH, Choi IY, Kil IS, Kim SY, Yang ES, Park J-W. 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1526:191-198.
- Loewe S, Muischnek H. 1926. Über Kombinationswirkungen - Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology* 114:313-326.
- Macfie SM, Tarmohamed Y, Welbourn PM. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27:454-458.
- Macfie SM, Welbourn PM. 2000. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39:413-419.
- Magelis. 2009. Détermination du ratio DCC externe / DCC interne pour une micro algue dans un bain de <sup>3</sup>H et Variation des débits de dose dans des puits d'une microplaque contenant des microalgues pour une source de <sup>137</sup>Cs/<sup>137m</sup>Ba. NT 09/073-002-Rev2. 73p.
- Makhijani A, Boyd M. 2004. Nuclear dumps by the riverside: Threats to the Savannah river from radioactive contamination at the Savannah river site. Institute for energy and environmental research 77 p.

- Malanga G, Puntarulo S. 1995. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*. 94:672-679.
- Mallick N, Mohn FH. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:64-69.
- Mallick N. 2004. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology* 161:591-597.
- McCubbin D, Leonard KS, Bailey TA, Williams J, Tossell P. 2001. Incorporation of organic tritium ( $^3\text{H}$ ) by marine organisms and sediment in the Severn Estuary/Bristol Channel (UK). *Marine Pollution Bulletin*. 42:852-863.
- Morelli E, Scarano G. 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science*. 167:289-296.
- Morlon H, Fortin C, Adam C, Garnier-Laplace J. 2006. Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:1408-1417.
- Morlon H, Fortin C, Floriani M, Adam C, Garnier-Laplace J, Boudou A. 2005. Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquatic Toxicology* 73:65-78.
- Mueller S. 2000. Sensitive and non-enzymatic measurement of hydrogen peroxide in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 410-415.
- Mwense M, Wang XZ, Buontempo FV, Horan N, Young A, Osborn D. 2004. Prediction of noninteractive mixture toxicity of organic compounds based on a fuzzy set method. *Journal of Chemical Information and Computer Science*:1763-1773.
- Mwense M, Wang XZ, Buontempo FV, Horan N, Young A, Osborn D. 2006. QSAR approach for mixture toxicity prediction using independent latent descriptors and fuzzy membership functions. *SAR and QSAR in Environmental Research* 17:53-73.
- NCRP. 1979. Tritium and other radionuclide labeled organic compounds incorporated in genetic material. Bethesda, MD, National Council on Radiation Protection and Measurements.
- OECD-NEA. 1996. Survey of thermodynamic and kinetic databases. Organisation for Economic Cooperation and Development and Development. Nuclear Energy Authority, Paris, France.
- OSPAR. 2006. Liquid discharges from nuclear installations in 2004.
- Page MD, Kropat J, Hamel PP, Merchant SS. 2009. Two *Chlamydomonas* CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation. *Plant Cell* 21:928-943.
- Papageorgakopoulou N, Papaefthymiou E, Topalidou D, Karapanagiotis N, Tsiganos CP. 1998. Tritiated water ( $\text{H}^3\text{HO}$ ) induced changes in enzymes of cereals during germination. *Environmental and Experimental Botany* 39:49-55.

- Pentreath RJ. 1998. Radiological protection criteria for the natural environment. *Radiation Protection Dosimetry* 75:175-179.
- Petcu I, Fologea D, Radu M. 1997. Kinetics of electroinduced pores as a probe of membrane modification produced by ionizing radiation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42:179-185.
- Petcu I, Lupu M, Grosescu R. 1991. In vivo tritium contamination effects on water exchange across the erythrocyte membranes: a nuclear magnetic resonance study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1065:99-102.
- Pierrard O. 2008. Les rejets en tritium par les installations nucléaires françaises. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire. 17p.
- Pointurier F, Baglan N, Alanic G. 2004. A method for the determination of low-level organic-bound tritium activities in environmental samples. *Applied Radiation and Isotopes* 61(2-3):293-298.
- Porter JW, Knauss HJ. 1953. Inhibition of growth of *Chlorella pyrenoidosa* by beta-emitting radioisotops. *Plant Physiology* :60-63.
- Prasad MNV, Drej K, Skawinska A, Stratka K. 1998. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). *Environmental Contamination and Toxicology* 60:306-311.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rai LC, Tyagi B, Mallick N, Rai PK. 1995. Interactive effects of UV-B and copper on photosynthetic activity of the cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Environmental and Experimental Botany*. 35:177-185.
- Rai LC, Tyagi B, Rai PK, Mallick N. 1998. Interactive effects of UV-B and heavy metals (Cu and Pb) on nitrogen and phosphorus metabolism of a N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Environmental and Experimental Botany*. 39:221-231.
- Rembish S J et Trush M A. 1994. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxyde generation in rat alveolar macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*. 17: 117-126.
- Riley PA. 1994. Free Radicals in Biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65:27-33.
- Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12(5).
- Ritz C, Streibig JC. 2008. *Nonlinear Regression with R*. New York.
- Roháček K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40:13-29.
- Salbu B. 2009. Challenges in radioecology. *Journal of Environmental Radioaction* 100:1086-1091.



- Savu D, Moisoï N, Petcu I. 1999. Cellular effects produced by internal contamination of rats with tritiated water. *J. de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique* 96:124-131.
- Singh Ak, Sharma L, Mallick N. 2004. Antioxidative role of nitric oxide on copper toxicity to a chlorophycean alga, *Chlorella*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:223-227.
- Spencer FS, Ogram GL, Brown RM. 1988. Field studies of HT behaviour in the environment: 3. Tritium deposition and dynamics in vegetation. *Fusion Technology* 14:1176-1181.
- Strack S, Bonotto S, Kirchmann R. 1980. Radioactive contamination of the marine environment: Uptake and distribution of  $^3\text{H}$  in *Dunaliella bioculata*. *Helgoland Marine Research* 33:153-163.
- Strid A, Chow WS, Anderson JM. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research* 39:475-489.
- Szivák I, Behra R, Sigg L. 2009. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 45(2):427-435.
- Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, Van Leeuwen HP, Åobinłski R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72:1453-1470.
- Tort V, Lefaire C, Linden G, Herbelet J. 1997. Le tritium dans le milieu aquatique et le risque associé. *Radioprotection* 32:501-519.
- Tripathi BN, Mehta SK, Amar A, Gaur JP. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus sp.* during short- and long-term exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . *Chemosphere* 62:538-544.
- Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A. 2003. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radical Biology and Medicine* 35:68-77.
- Twiss MR, ErrÁcalde O, Fortin C, Campbell PGC, Jumarie C, Denizeau F, Berkelaar E, Hale B, Van Rees K. 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 13:9-24.
- UNSCEAR. 2000. Combined effects of radiation and other agents. In "Sources and effects of ionizing radiation" Annex H. pp 179-271.
- US EPA. 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. 143p.
- Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56:395-411.
- Van der Lee J. 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of Chess. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.

- Van Kooten O, Snel JFH. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25(3):147-150.
- Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow JP. 1999. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Photosynthesis Research* 301:367-373.
- Vasconcelos M, Leal MFC. 2001. Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry* 75:123-139.
- Vichot L, Boyer C, Boissieux T, Losset Y, Pierrat D. 2008. Organically bound tritium (OBT) for various plants in the vicinity of a continuous atmospheric tritium release. *Journal of Environmental Radioactivity* 99:1636-1643.
- Vighi M, Altenburger R, Arrhenius A, Backhaus T, Bodeker W, Blanck H, Consolaro F, Faust M, Finizio A, Froehner K. 2003. Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:139-150.
- Wada H, Koshiba T, Matsui T, Sato M. 1998. Involvement of peroxidase in differential sensitivity to  $\gamma$ -radiation in seedlings of two *Nicotiana* species. *Plant Science* 132:109-119.
- Wan XS, Zhou Z, Kennedy AR. 2003. Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells. *Radiation Research* 160:622-630.
- Wan XS, Zhou Z, Ware JH, Kennedy AR. 2005. Standardization of a fluorometric assay for measuring oxidative stress in irradiated cells. *Radiation Research* 163:232-240.
- Warne MSJ, Hawker DW. 1995. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31:23-28.
- Watanabe M, Suzuki T. 2002. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 131:491-500.
- Weinberger D, Porter JW. 1953. Incorporation of tritium oxide into growing *Chlorella pyrenoidosa* cells. *Science* 117:636-638.
- Wilde K, Stauber J, Markich S, Franklin N, Brown P. 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:174-185.
- Yonei S, Todo T, Kato M. 1979. Radiation effects on erythrocyte membrane structure studied by the intrinsic fluorescence. *International Journal of Radiation Biology* 35:161-170.
- Yoshida K, Igarashi E, Mukai M, Hirata K, Miyamoto K. 2003. Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*. 26:451-457.
- Yu Y, Kong F, Wang M, Qian L, Shi X. 2007. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:49-56.

Zaka R, Vandecasteele CM, Misset MT. 2002. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G<sub>6</sub>PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *Journal of Experimental Botany* 53:1979-1987.

# **ANNEXES**



## ANNEXE 1 : TEST TEMPS ET CONCENTRATION DES RINÇAGES A L'EDTA

---

Le cuivre présent dans le milieu d'exposition va être adsorbé à la surface des parois et des membranes cellulaires. Une partie de cette fraction adsorbée sera ensuite internalisée dans les cellules. Afin de pouvoir doser uniquement le cuivre internalisé, le cuivre adsorbé doit être éliminé. Pour ceci, après filtration, les cellules sont rincées avec du milieu de culture sans cuivre ajouté contenant de l'EDTA (1 ou 3 mmol L<sup>-1</sup>). Cette étape de rinçage est cependant délicate puisque si les cellules sont rincées avec de trop fortes concentrations d'EDTA, les membranes peuvent être endommagées (modification des propriétés de perméabilité membranaire suite à une désorption des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> notamment) et une partie du cuivre internalisé sera alors emporté par ce rinçage, faussant ainsi la mesure (Vaara, 1992).

Différents protocoles de rinçage des cellules à l'EDTA existent : filtration (Fortin *et al.*, 2004), centrifugation (Franklin *et al.*, 2000 ; Franklin *et al.*, 2002). Lors de la désorption du cuivre depuis une paroi algale, des molarités variables d'EDTA ont été utilisées allant de 0.1 mmol L<sup>-1</sup> chez *Chlamydomonas variabilis* (Bates *et al.*, 1982) à 20 mmol L<sup>-1</sup> (Singh *et al.*, 2004 ; Wilde *et al.*, 2006) chez *Chlorella sp.* Macfie *et al.* (1994 et 2000) et Knauer *et al.* (1997) ont respectivement utilisé 1 et 3 mmol L<sup>-1</sup> pour désorber le cuivre des parois de *Chlamydomonas reinhardtii* par filtration. Afin de vérifier que le protocole utilisé par ces auteurs est aussi efficace sur des cellules algales de *Chlamydomonas reinhardtii* (souche 11/32B), les cellules après avoir été exposé à une concentration en cuivre de [1 – 1.1] µmol L<sup>-1</sup> (Cu<sub>tot.</sub>), ont été filtrées, puis rincées avec 5 mL de milieu HSM<sub>mod</sub> contenant 1 mmol L<sup>-1</sup> ou 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA (2 min par rinçage, de 1 à 10 rinçages successifs) comme cela est présenté dans le chapitre 2 paragraphe 2.2.1.2.

Un rinçage des cellules avec 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA engendre une désorption rapide du cuivre jusqu'à une valeur seuil obtenue après 25 - 30 mL de rinçage (5 à 6 x 2 min ; Figure 46). Après le 7<sup>ème</sup> rinçage avec 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA, la quantité en cuivre désorbée augmente brusquement pour atteindre après 10 rinçages une valeur proche de celle dosée dans les cellules à cette même étape (cuivre internalisée = [5.2 – 8.5] x 10<sup>-10</sup> nmol µm<sup>-2</sup>). Étant donné qu'après 50 mL de rinçage, la concentration totale désorbée rejoint la concentration en cuivre

internalisée, on peut supposer que l'intégrité des membranes a été endommagée par les rinçages successifs avec 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA.

Lors du rinçage des cellules avec 1 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA, la quantité de cuivre désorbé augmente progressivement jusqu'à 35 mL de rinçage (7 x 2 min). Après 7 rinçage avec 1 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA, la quantité de cuivre désorbé ( $[2.5 - 3.5] \times 10^{-10}$  nmol  $\mu\text{m}^{-2}$ ) est proche des quantités dosées au pallier (25 mL =  $[2.7 - 3.1] \times 10^{-10}$  nmol  $\mu\text{m}^{-2}$ ; 30 mL =  $[2.9 - 3.3] \times 10^{-10}$  nmol  $\mu\text{m}^{-2}$ ) lors du rinçage avec la solution à 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA. Une valeur moyenne de  $(3.0 \pm 0.4) \times 10^{-10}$  nmol  $\mu\text{m}^{-2}$  a été calculée à partir de ces données et sera attribuée à la quantité totale de cuivre adsorbé aux cellules.

Le rinçage des cellules avec 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA reste le plus efficace puisqu'après seulement 20 mL de rinçage soit 4 x 2 min, 88% du cuivre est désorbé des parois. Lors du rinçage des cellules avec 1 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA, il faut 6 rinçages pour désorber la même quantité de cuivre (87%).

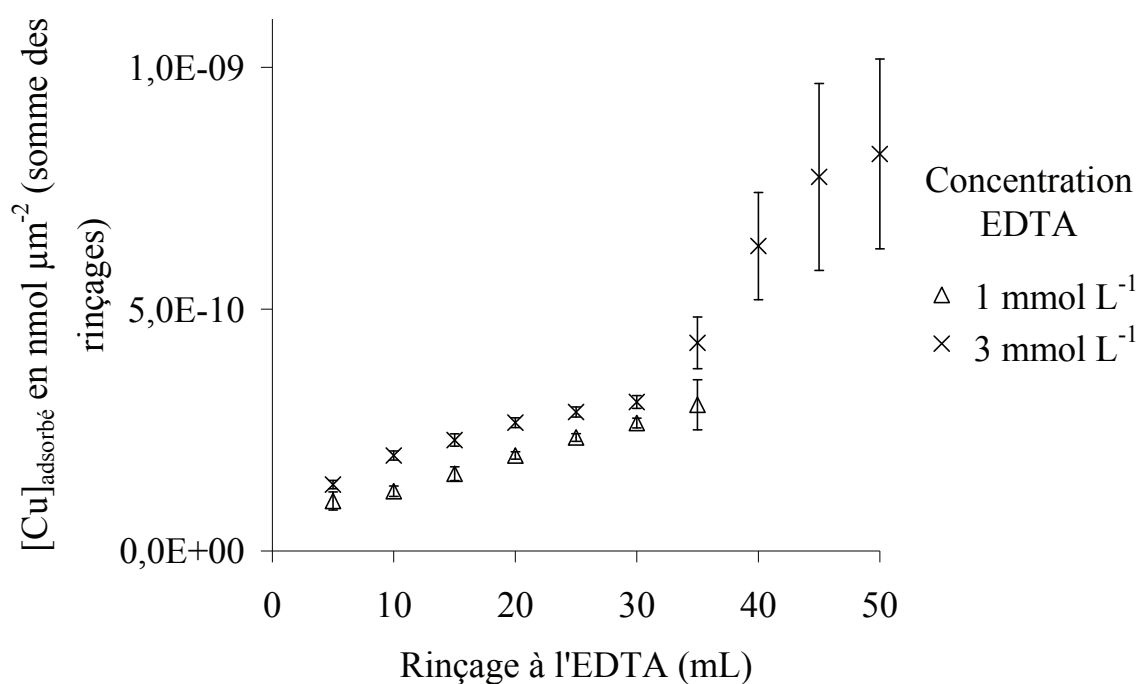


Figure 46 : Évolution de la concentration en cuivre internalisée en fonction du volume de rinçage à l'EDTA (moyenne  $\pm$  SEM; n=3 ou 4) après 1h d'exposition des cellules à  $[1 - 1.1] \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\text{Cu}_{\text{tot}}$ ).

Étant donné que 7 rinçages avec une solution à 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA engendrent des dommages aux membranes cellulaires ce qui entraîne le cuivre intracellulaire en supplément de la fraction de cuivre adsorbé, un nombre de rinçage inférieur à 7 sera utilisé. De plus, un rinçage avec une solution à 3 mmol L<sup>-1</sup> d'EDTA est plus efficace qu'un rinçage avec une

solution contenant  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  d'EDTA. Afin de réduire le nombre de rinçage, la solution à  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  d'EDTA sera utilisée dans cette étude. Pour la suite de cette étude, nous avons retenu un traitement de rinçage par  $4 \times 2$  (5 mL) à  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  d'EDTA dans du milieu HSM<sub>mod</sub> (désorbant 88% du cuivre adsorbé à la surface des cellules de notre modèle biologique).



## ANNEXE 2 : EFFET DES RADIATIONS $\gamma$ SUR LA CROISSANCE DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

---

### Protocole

Afin de mesurer l'effet de rayonnement  $\gamma$  sur la croissance de notre modèle biologique, une expérimentation en microplaque 96 puits a été réalisée. Des microplaques transparentes à fond plat ont pour ceci été utilisées. Dans ces plaques, 200  $\mu\text{L}$  de suspension algale ( $d_{\text{int.}} = 2\,500$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  ;  $\text{HSM}_{\text{mod}}$ ) préparée comme pour les autres expérimentations (chapitre 2 paragraphe 2.1.1.2) ont été introduit dans les 54 puits centraux de la microplaque, les puits du tour ayant été rempli d'eau UHQ afin de réduire l'évaporation lors de l'exposition. L'exposition des cellules à un rayonnement  $\gamma$  a été réalisée via une source de  $^{137}\text{Cs}$  située au centre d'un incubateur disposant d'un système d'éclairage. Les microplaques ont été introduit dans cet incubateur de façon séparée. Dans le premier cas, le château de plomb protégeant la source de  $^{137}\text{Cs}$  a été baissé afin de réaliser un contrôle dans les mêmes conditions de température et d'éclairage. Dans le second cas, le château de plomb était en position haute afin de permettre une irradiation des cellules. Cette irradiation correspondait, en fonction de l'emplacement de la plaque par rapport à la source, à un débit de dose de  $1\,000$   $\mu\text{Gy h}^{-1}$ . La densité cellulaire a été suivie chaque 24h par lecture de la fluorescence de la chlorophylle ( $\sim\lambda_{\text{ex}}440 / \lambda_{\text{em}}680$  nm) comme cela est expliqué chapitre 2 paragraphe 2.3.1. A ces même temps, la solution algale contenue dans les puits est homogénéisée afin d'éviter la sédimentation des cellules et ainsi permettre une croissance optimale.

### Résultats

Dans le Tableau 24 sont reportés les conditions initiale de température et d'illumination lors des deux expositions successives. On peut constater que la température est assez constante. Néanmoins l'illumination est 13 % moindre lors de l'exposition de la microplaque château de plomb ouvert. Cette variation provient du caractère expérimental du dispositif d'irradiation.

Tableau 24: Température et luminosité mesurées dans l'incubateur en début d'exposition pour les deux expériences réalisées (château de plomb ouvert et fermé)

	0 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ (château de plomb fermé)	1 000 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ (château de plomb ouvert)
Température dans l'incubateur à t=0 (°C)	23.7	23.9
Luminosité dans l'incubateur à t=0 ( $\mu\text{E}$ )	47.8	41.4

Sur la Figure 47 est reportée la croissance des cellules exposées ou non à des rayonnements  $\gamma$  (moyenne +/- SEM). La croissance suit une courbe sigmoïde classique. Les paramètres de croissances déterminés à l'aide du modèle logistique à 3 paramètres sont reportés dans le Tableau 25. Une variation significative a été observée lors de l'exposition des cellules à 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  par rapport à des cellules non exposées (château de plomb fermé) mais ces variations sont faibles (30, 11 et 8% pour les paramètres taux de croissance maximal (b), densité cellulaire maximale (d) et temps nécessaire pour atteindre 50% de la densité cellulaire maximale (e)) et résultent principalement des différences d'intensité d'illumination entre les deux conditions d'expositions réalisées à 1 semaine d'intervalle. En conclusion, 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  de rayonnements  $\gamma$  sont sans effet (NOEC) sur la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*.

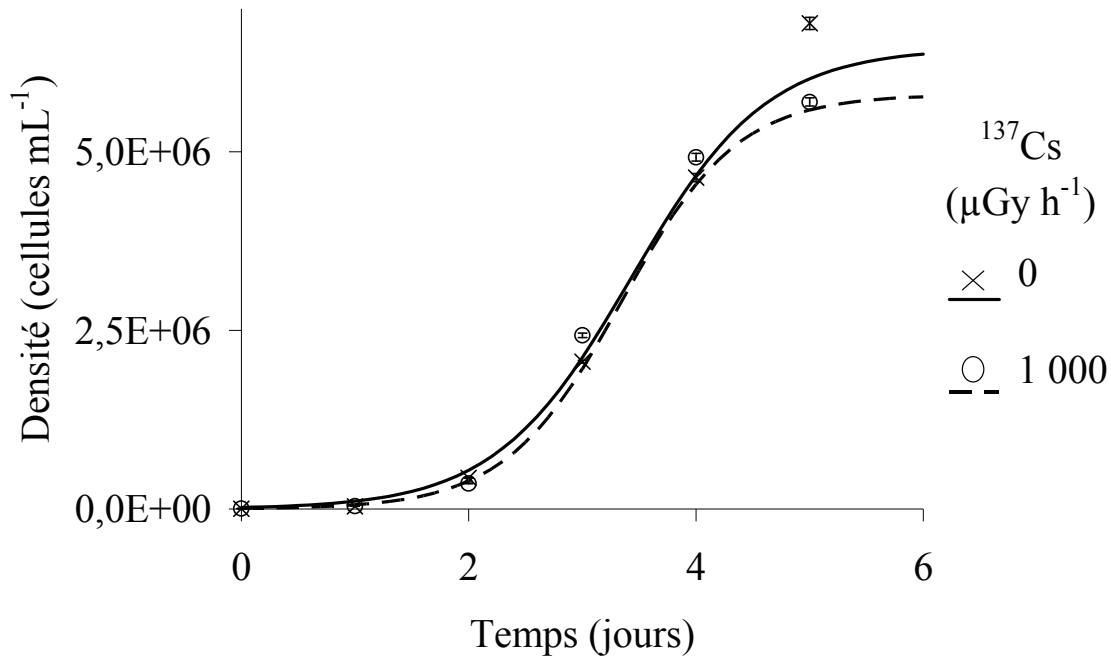


Figure 47 : Modélisation de la densité cellulaire estimée par mesure de la fluorescence de la chlorophylle lors d'exposition des cellules dans l'incubateur délivrant 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  (château de plomb fermé = bruit de fond ; château de plomb ouvert = 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ). Ajustement du modèle logistique à 3 paramètres aux données (moyenne +/- SEM ; n=54).

Tableau 25: Paramètres de croissance estimés d'après le modèle logistique à 3 paramètres lors d'exposition des cellules dans l'incubateur délivrant 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  (château de plomb fermé = bruit de fond ; château de plomb ouvert = 1 000  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ).

Paramètres	0 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ (château de plomb fermé)	1 000 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ (château de plomb ouvert)
b (taux de croissance maximal, division jour <sup>-1</sup> )	1.64 – 1.77	1.93 – 2.04
d (densité cellulaire maximale, 10 <sup>6</sup> cellules mL <sup>-1</sup> )	6.3 – 6.5	5.7 – 5.8
e (temps nécessaire pour atteindre 50% de la densité cellulaire maximale, jour)	3.38 – 3.44	3.32 – 3.35

### ANNEXE 3 : TOXICITE DU CUIVRE SUR LA CROISSANCE DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* APRES 96H D'EXPOSTION EN MICROPLAQUE

---

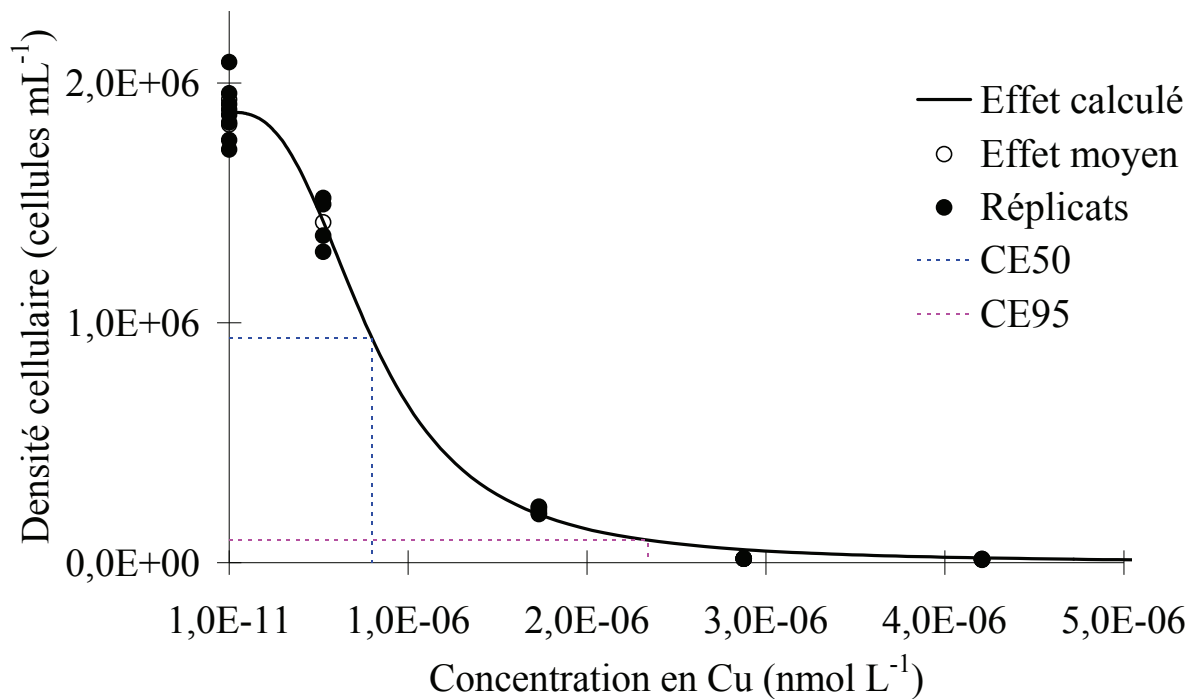


Figure 48 : Toxicité du cuivre envers *Chlamydomonas reinhardtii* mesurée sur la croissance cellulaire lors d'exposition en Erlenmeyers. Calcul des CE50 et CE95 réalisé à l'aide du logiciel regtox (CE50 = [728 – 858] nmol L<sup>-1</sup> et CE95 = [1 925 – 2 781] nmol L<sup>-1</sup>).

## ANNEXE 4 : ÉVOLUTION DE LA FRACTION EN CUIVRE ADSORBÉE ET INTERNALISÉE DANS LE TEMPS

---

Afin de mesurer la cinétique d'adsorption et d'entrée du cuivre dans des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, celles-ci ont été exposées à une concentration en cuivre total de  $481 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $\text{Cu}^{2+} = 66 \text{ nmol L}^{-1}$ ). La fraction intracellulaire et adsorbée a été dosée suite à la séparation réalisée par rinçage des cellules à l'EDTA. La cinétique de la fraction de cuivre adsorbé et internalisé en fonction du temps d'exposition est représentée Figure 49. En ce qui concerne la fraction en cuivre adsorbé, un modèle logistique à 3 paramètres a été ajusté aux données. Ce modèle permet de mesurer un équilibre rapide de la concentration en cuivre adsorbé dès 0.25 h (15 min) d'exposition ce qui confirme les observations de Knauer *et al.* (1997a). De plus, la concentration maximale adsorbée est de  $3.9 \times 10^{-10} \text{ nmol } \mu\text{m}^{-2}$ .

La concentration en cuivre internalisé augmente linéairement entre 0 et 60 min d'incubation (Figure 49). Après 60 min, la concentration en cuivre internalisée atteint une constante. Ce temps d'entrée linéaire dans les cellules est supérieur à celui mesuré par Hill *et al.* (1996) qui était de 5 min seulement. Cette différence peut s'expliquer par la souche de *Chlamydomonas reinhardtii* utilisée (souche 11/32B dans cette étude et CC124 utilisée par Hill *et al.* (1996) ainsi que par les milieux de culture qui étaient différents (HSM<sub>mod</sub> dans cette étude et milieu OECD utilisé par Hill *et al.*, 1996). Néanmoins, cette fraction internalisée est inférieure à la fraction adsorbée (1,7 fois) comme l'avait montré Knauer *et al.* (1997a). Un ratio du même ordre de grandeur entre cuivre adsorbé et cuivre internalisé est obtenu dans cette étude (1,7) et dans l'étude de Knauer *et al.* (1997a ; 1,4)

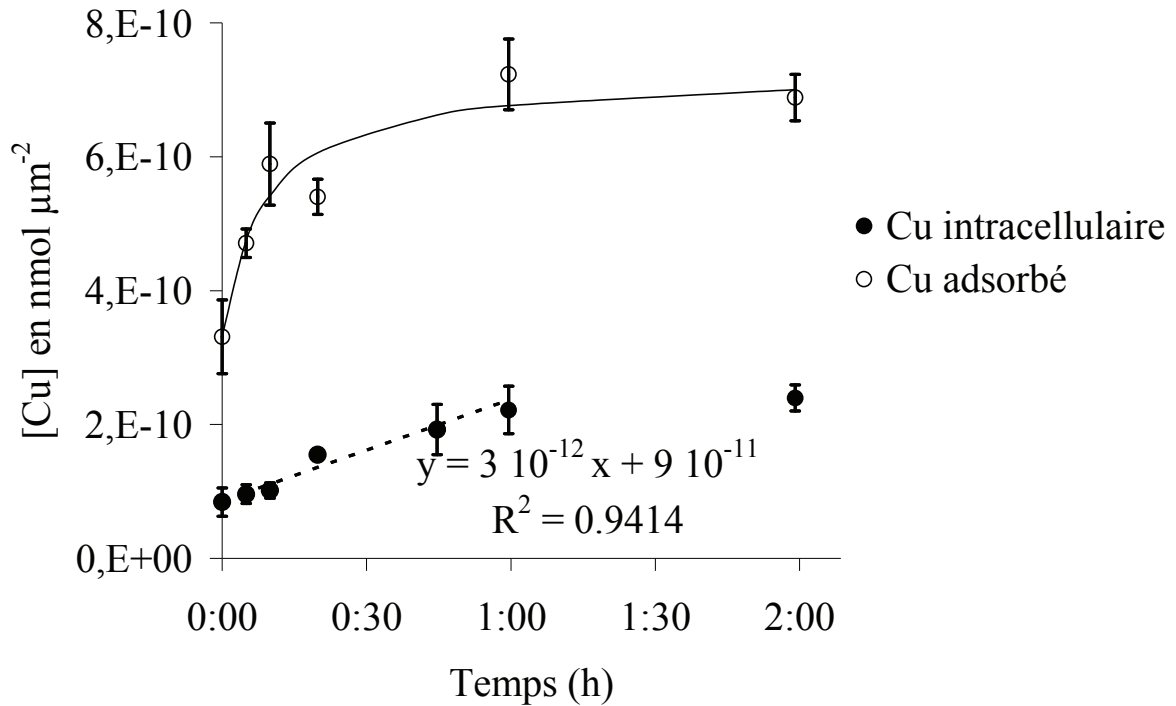


Figure 49: Cuivre intracellulaire et adsorbé ( $\text{nmol } \mu\text{m}^{-2}$ ) mesuré en fonction du temps après exposition à  $481 \text{ nmol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}_{\text{tot}}$ . ( $\text{Cu}^{2+} = 66 \text{ nmol L}^{-1}$ ). Modèle linéaire ajusté aux données intracellulaire et modèle logistique à 3 paramètres ajusté aux données cuivre adsorbée (moyenne  $\pm$  SEM;  $n=3$  ou 4).

L'entrée linéaire du cuivre dans les cellules a lieu entre 0 et 60 min. De ce fait les expérimentations visant à déterminer les paramètres de flux d'internalisation du cuivre sur le court terme peuvent avoir lieu après des expositions au cuivre de 0 à 60 min. Afin de pouvoir doser le cuivre internalisé même lors d'expositions à de faibles concentrations en cuivre, un temps d'exposition de 40 min a finalement été retenu.

## ANNEXE 5 : LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION ET D'EMISSION DE LA DCF

---

Les longueurs d'ondes utilisées dans les expériences pour doser les ERO sont variables. En général deux couples de longueurs d'onde sont utilisés : celui de la H<sub>2</sub>DCF-DA ( $\sim\lambda_{\text{ex}}485 / \lambda_{\text{em}}530 \text{ nm}$ ) (Babu *et al.*, 2003; Tannin-Spitz *et al.*, 2005) ou celui de la DCF ( $\sim\lambda_{\text{ex}}505 / \lambda_{\text{em}}530 \text{ nm}$ ) comme cela est prôné dans deux revues (Bartosz, 2006 ; Gomes *et al.*, 2005). Nous choisissons donc de lire la fluorescence de la DCF en mesurant la fluorescence émise à 530 nm après une excitation à 505 nm comme cela a été vérifié expérimentalement (Figure 50). De plus, on peut voir sur cette même figure que les longueurs d'ondes sont inchangées en présence d'algue (pas d'interférence avec la fluorescence de la chlorophylle). En parallèle, la linéarité de fluorescence de la DCF a été vérifiée (Figure 51). Cette linéarité est conservée entre 0 et 300 nmol L<sup>-1</sup> ( $p < 0.001$ ).

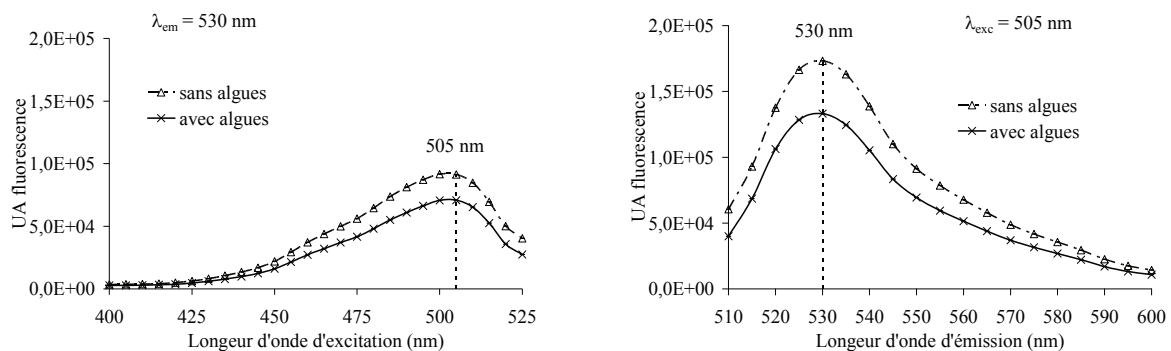


Figure 50 : Spectre d'excitation et d'émission de la DCF réalisé au spectrofluorimètre

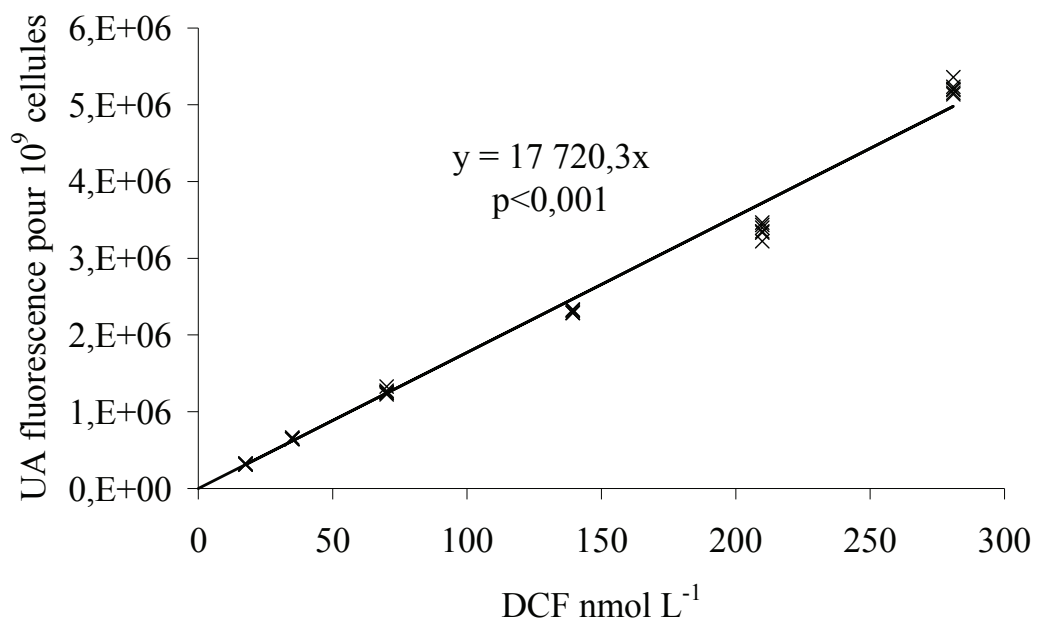


Figure 51 : Linéarité de la fluorescence de la DCF en fonction des concentrations de DCF dans du milieu HSMmod ( $\lambda_{ex}505$  /  $\lambda_{em} 530$  nm, sans algue).



## ANNEXE 6 : EVOLUTION DE LA FLUORESCENCE DE LA DCF LORS D'UNE PRE-EXPOSITION DES CELLULES AU CUIVRE PUIS EXPOSITION A L'HTO

---

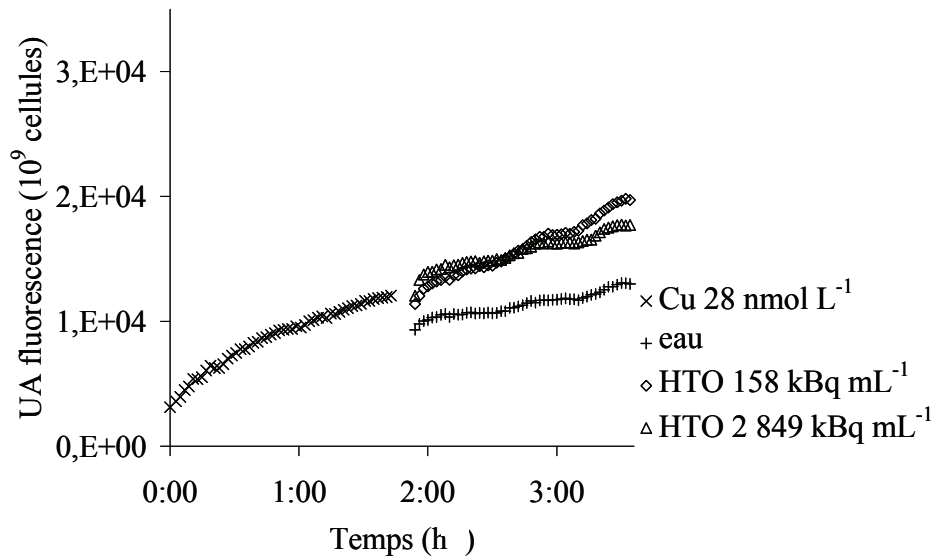


Figure 52 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530$  nm) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $28 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158$  et  $2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (moyenne,  $n=4$ ).

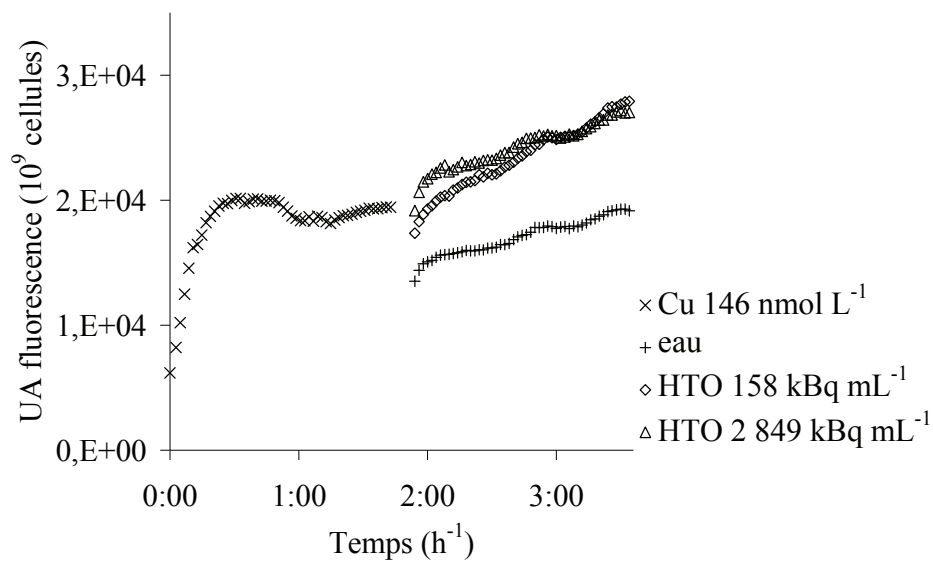


Figure 53 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530$  nm) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $146 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158$  et  $2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (moyenne,  $n=4$ ).

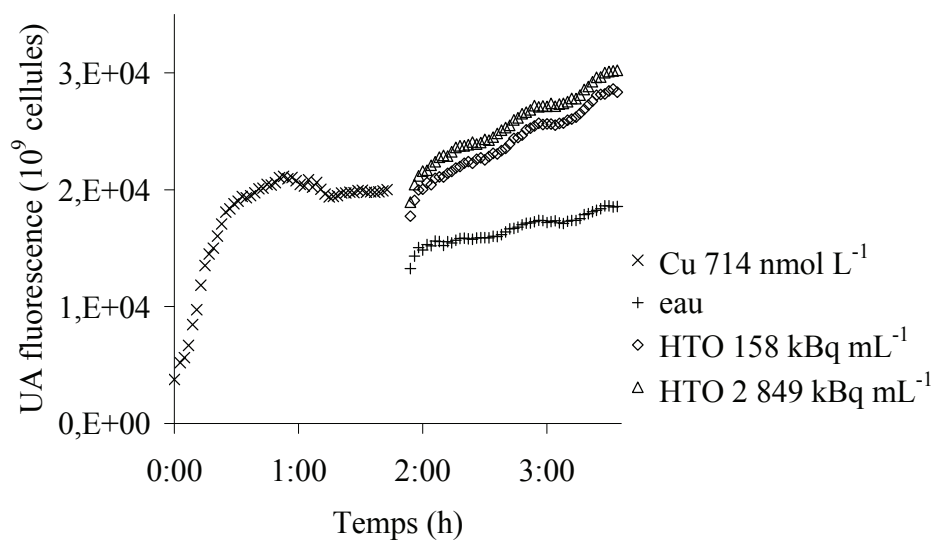


Figure 54 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530$  nm) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $714 \text{ nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158$  et  $2\,849 \text{ kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (moyenne,  $n=4$ ).

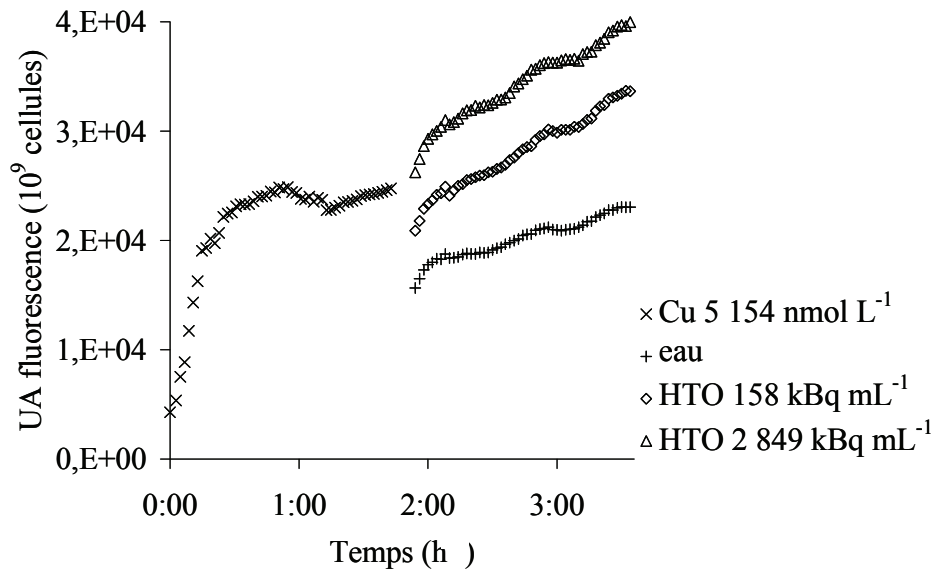


Figure 55 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530$  nm) au cours du temps après pré-exposition au cuivre ( $5\ 154\ \text{nmol L}^{-1}$ ) puis exposition à l'HTO ( $158$  et  $2\ 849\ \text{kBq mL}^{-1}$ ) de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (moyenne,  $n=4$ ).

## ANNEXE 7 : EVOLUTION DE LA FLUORESCENCE DE LA DCF LORS D'UNE EXPOSITION SIMULTANEE DES CELLULES AU CUIVRE ET A L'HTO

---

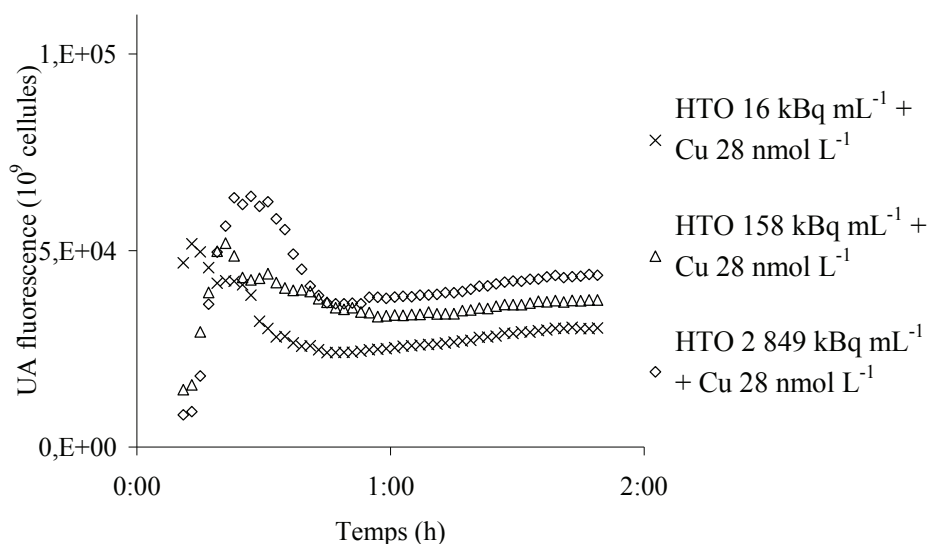


Figure 56 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{\text{ex}} 505 / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $28 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO (16, 158 et 2 849  $\text{kBq mL}^{-1}$ , moyenne,  $n=4$ )

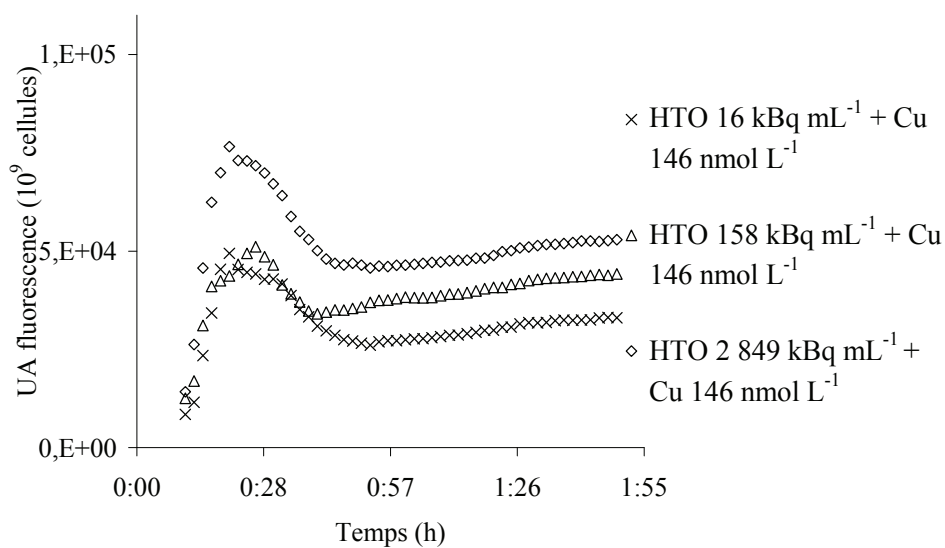


Figure 57 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{\text{ex}} 505 / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $146 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO (16, 158 et 2 849  $\text{kBq mL}^{-1}$ , moyenne,  $n=4$ )

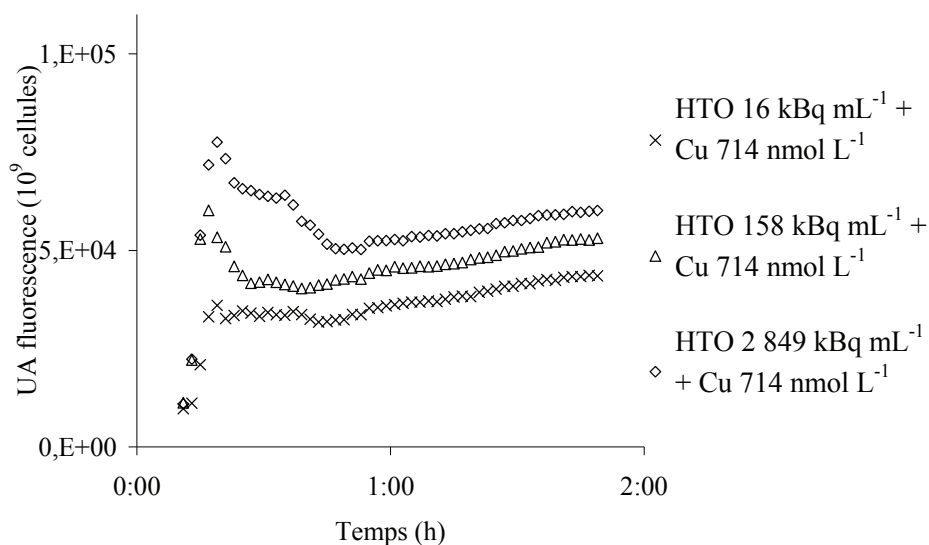


Figure 58 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $714 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO (16, 158 et  $2849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne,  $n=4$ )

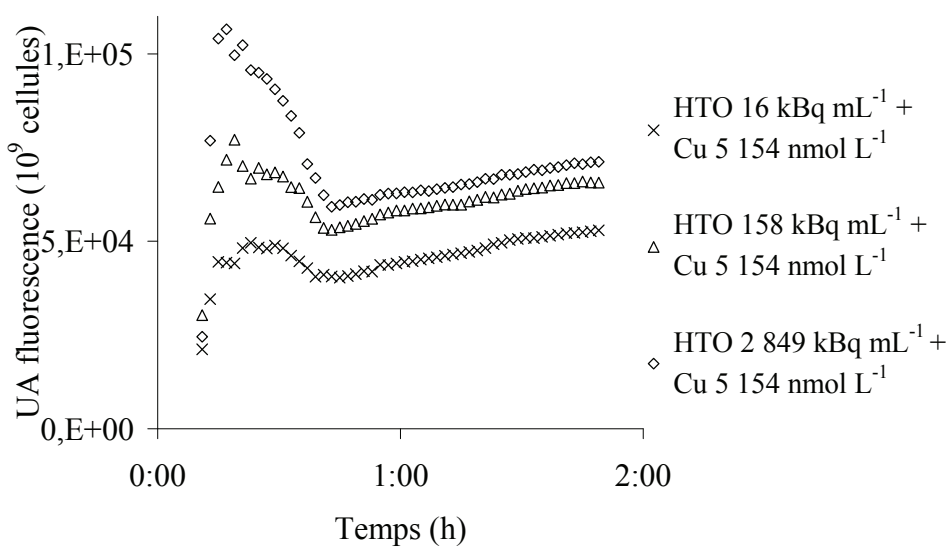


Figure 59 : Évolution de la fluorescence de la DCF ( $\lambda_{ex} 505 / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$ ) au cours du temps après exposition simultanée au cuivre ( $5154 \text{ nmol L}^{-1}$ ) et à l'HTO (16, 158 et  $2849 \text{ kBq mL}^{-1}$ , moyenne,  $n=4$ )



Les rejets d'effluents liquides des Centres Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE) sont constitués d'un mélange de substances stables et radioactives. L'exposition d'organismes à des substances en mélange peut faire l'objet d'interactions diverses, conduisant à une augmentation ou à une diminution des effets observés. Afin d'identifier de possibles interactions dans le cas de mélanges de substances caractéristiques (en termes de toxicité et de quantité) des rejets de CNPE, l'effet d'un mélange binaire composé de cuivre et d'HTO a été étudié sur le modèle d'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans un premier temps, la toxicité de l'HTO a été analysée. L'HTO s'est révélée être peu toxique envers notre modèle biologique. L'effet le plus sensible et le plus précoce est une augmentation du stress oxydant (dès 40 kBq mL<sup>-1</sup> - 0.13 µGy h<sup>-1</sup>). Lors de l'exposition des cellules algales au mélange HTO/Cu, une interaction a été révélée au niveau du stress oxydant cellulaire, celui-ci étant supérieur à une simple addition de l'effet des deux substances. Cette interaction peut s'expliquer par une augmentation de l'internalisation du cuivre en présence d'HTO, mais aussi potentiellement par des interactions toxiques directes (notamment sur les processus de régulation du stress oxydatif). En conclusion, il a été démontré que l'effet de substances stables et radioactives en mélange peut être supérieur à l'addition. Bien qu'étant uniquement représentative du mélange binaire HTO/Cu, cette étude montre néanmoins de potentielles interactions entre substances stables et radioactives, à considérer lors de l'évaluation des risques écologiques relatifs aux rejets de CNPE.

---

**Mots clefs : Cuivre, eau tritiée, mélange, algue unicellulaire, toxicité, internalisation**

Liquid releases by Nuclear Power Plants (NPP) are composed of a mixture of radioactive and non-radioactive substances. When organisms are exposed to mixtures of contaminants the resultant toxicity can be enhanced, or reduced, due to interactions. In order to identify potential interactions between substances released by NPP, two substances representative of such effluents (in term of toxicity and of quantity) were selected for studies: Tritiated water (HTO) and copper (Cu). Effects of this binary mixture were studied on the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. HTO, when examined along, was not very toxic to *C. reinhardtii*. The most sensitive and early effect of HTO was an increase in oxidative stress at concentrations of 40 kBq mL<sup>-1</sup> (0.13 µGy h<sup>-1</sup>). Algae exposure to the binary mixture HTO/Cu induced interactive effects on oxidative stress. Reactive Oxygen Species production was higher from exposure to the mixture of contaminants than the addition of the effect from each substance individually. This interaction was explained by an enhanced copper uptake by the algae when in the presence of HTO. The observed supra-additive effect could also be due to direct toxic interactions, especially on the antioxidant system. To conclude, this study showed that the effects of a mixture of radioactive and non-radioactive substances can be greater than what would be predicted based on mere addition of individual effects. Even though this binary mixture is just a small part of NPP effluents, the study showed that potential interactions should be considered when determining ecological risks too aquatic ecosystems from NPP effluents.

---

**Keywords: Copper, tritiated water, mixture, unicellular algae, toxicity, uptake**