

**Thèse – Université Aix-Marseille**

École doctorale  
**ED 251 Sciences de l'environnement**

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

Spécialité  
**Océanographie**

---

**Approche moléculaire et mécaniste de la réponse  
transgénérationnelle lors d'une irradiation gamma chronique chez  
le cladocère *Daphnia magna***

---

Par  
**Marie Trijau**

Thèse dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenance publique le 18 décembre 2018

Devant le jury d'examen composé de :

Dr. Céline Cosseau	MCF, Université Perpignan Via Domitia	Rapporteur
Pr. Marie-Laure Delignette-Muller	Professeur, VetagroSup, Lyon 1	Rapporteur
Dr. Teresa Mathews	Oak Ridge National Laboratory, Etats-Unis	Examineur
Pr. Peter Kille	Professeur, Université de Cardiff, RU	Examineur
Pr. Jean-Christophe Poggiale	Professeur, Université Aix-Marseille	Directeur de thèse
Dr. Frédéric Alonzo	Chercheur, IRSN, Cadarache	Tuteur de thèse



*"Nous n'avons pas hérité la Terre de nos ancêtres, mais l'empruntons à nos enfants"*

Proverbe ancestral dont l'origine exacte reste inconnue



---

# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je tiens à remercier l'IRSN d'avoir financé cette thèse. Merci à **Christelle Adam-Guillermin** pour son accueil chaleureux au laboratoire LECO et son soutien durant ces 4 années.

Je voudrais tout particulièrement remercier **Jean-Christophe Poggiale** et **Frédéric Alonzo** pour leur encadrement tout au long de cette thèse. Jean-Christophe, merci pour ta gentillesse, ton écoute et tes conseils. Frédéric, merci pour ta bonne humeur, ta patience et ton pragmatisme. Face aux retards, aux difficultés techniques et à mes éternelles interrogations, tu m'as sans cesse encouragée et aidée à garder confiance en moi et dans le projet de recherche. Merci également d'avoir sacrifié un certain nombre de tes weekends durant la phase expérimentale. Merci aussi de m'avoir fait partager ta passion, très contagieuse, du DEB. Le travail et les échanges que nous avons eus sur cette partie modélisation resteront parmi mes meilleurs souvenirs de thèse et m'ont convaincue sur l'orientation de mes futurs travaux de recherche.

Je voudrais ensuite exprimer ma gratitude à **Céline Cosseau** et **Marie Laure Delignette-Muller** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Leurs remarques et leurs conseils m'ont permis de prendre plus de recul sur mon travail et d'améliorer substantiellement mon manuscrit. J'adresse également mes remerciements à **Teresa Mathews** et **Peter Kille** qui sont venus de loin pour endosser le rôle d'examineurs lors de ma soutenance de thèse.

Je tiens ensuite à remercier tous ceux qui ont contribué de près à ce travail de thèse. Tout d'abord, merci à **Karel De Schamphelaere** et **Jana Asselman** de l'université de Ghent pour leur collaboration sur les modifications épigénétiques chez *Daphnia magna*. Merci de m'avoir accueillie pendant trois semaines dans votre laboratoire en 2016 et de d'avoir partagé vos connaissances et votre savoir-faire sur l'analyse du séquençage bisulfite. Thanks a lot ! Ensuite je voudrais remercier **Elise Billoir** de l'université de Metz pour sa collaboration sur le modèle DEBtox. Son expertise sur le DEBtox et sur l'inférence bayésienne m'a beaucoup apporté. Je garde de très bons souvenirs de nos intenses sessions de travail, avec Frédéric et Antoine, à Cadarache ou à Metz où nous discutons passionnément de modélisation, les idées fusaient et

Marie Trijau

nous trouvions efficacement solutions à nos interrogations. Je voudrais remercier **Olivier Armant** qui a été, au sein du LECO, mon précieux guide à travers le monde de la biologie moléculaire, de l'épigénétique et de la bio-informatique, domaines que je connaissais peu au début de ma thèse. Merci pour ton aide et ton soutien tout au long de l'analyse du séquençage bisulfite et de la réaction de l'article. Je tenais également à remercier **Nicolas Dubourg** pour son travail en dosimétrie et sa disponibilité pendant la phase expérimentale.

Je voudrais remercier tous les membres du LECO, et du SRTE en général, pour leur accueil, leurs conseils et les échanges que j'ai pu avoir avec eux. Merci à **Karine, Olivier S., Rodolphe, Cathy, Béatrice, Magali, Jean-Marc, Sandrine, Virginie, Isabelle, Laureline, Pascale, Arnaud...** Merci à **Clara** pour son support administratif, sa gentillesse et sa disponibilité.

Un grand merci à tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai pu côtoyer durant cette thèse. Merci à **Alexandre, Amine, Antoine, Audrey, Caroline, Cécile, Florian, Hamza, Ingrid, Kéwin, Laure, Léa, Loïc, Lucie, Marine, Rémi, Roxanne, Sophia, Thomas F., Yvan...** J'espère que je n'oublie personne ! Je commencerai par **Florian** bien sûr, une des premières personnes que j'ai rencontrées à l'IRSN. Je garderai toujours de très bons souvenirs de l'année où nous avons partagé notre bureau, de nos longues conversations aussi bien scientifiques que personnelles et de nos gros fous rires. Merci aussi de m'avoir appris à prendre soin des daphnies et pour ton aide et tes conseils pendant la première année de thèse. Merci à **Kéwin** pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Je me souviendrai longtemps du « pont d'à Vinon » et du fou rire qui a suivi... Merci à **Cécile**, ma copine de « promo » en thèse, pour sa gentillesse, sa franchise et son amitié. Tu m'auras beaucoup fait rire avec toutes tes histoires incroyables qui n'arrivent qu'à toi 😊 Merci à **Caroline**, ma co-bureau préférée, pour tous ces moments d'amitié que nous avons partagés à l'IRSN, à Aix ou à Manosque. Merci d'avoir été une oreille attentive et de m'avoir soutenue et réconfortée dans les moments difficiles. Un merci tout spécial aux doctorants de ma dernière année de thèse : **Alexandre, Audrey, Caroline, Cécile, Hamza, Marine, Rémi, Sophia** qui m'ont permis à de nombreuses reprises de m'évader de la rédaction et de mes soucis au cours de weekends ski, sortie cheval, soirée halloween, repas raclette et bien d'autres encore... Je garde précieusement cette photo des journées des thèses 2017 où nous nous sommes déguisés en 101 dalmatiens !

Je voudrais remercier l'association de thésards de Cadarache (ASTHEC) et tous ses membres qui m'ont permis de faire de nombreuses rencontres et de passer de très bons moments. Merci à **Timothée K., Desi, Céphise, Antoine, Vincent A.** avec lesquels on s'est occupés de l'association pendant 1 an et merci à tous les autres : **Alan, Marie, Lilian, Nicolas, Louis, Arno, Jean-Eric, Thomas C., Thomas F, Coralie** et beaucoup d'autres encore !

Pour finir, je voudrais remercier tous ceux qui, en dehors de la sphère professionnelle, ont représenté un soutien moral au quotidien. Merci aux colocs de l'avenue Blondel (**Victor, Anne-Sophie, Nirina, Maïa**) qui m'ont permis dès le jour de mon arrivée de m'intégrer et d'avoir une vie sociale bien remplie. Merci pour tous ces moments de vie partagés, pour votre écoute et votre amitié. J'en profite pour remercier mon groupe d'amis « aixois » : **Olivier C., Florent, Lucas...** Merci à mes amies de longue date sans lesquelles la vie n'aurait pas la même saveur, **Marion C., Anne-Flore, Alexia, Isabelle D., Claire-Alix, Anne, Diane...** Merci à ma famille, à mon frère **Nicolas** et à ma sœur **Sophie**. Merci à **mes parents** de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mes choix d'études et dans la vie en général, ce qui m'a permis d'être là où j'en suis aujourd'hui. Enfin et surtout, merci à **Vincent** pour sa présence et son amour. Tu as été pour moi une source de conseils scientifiques et réconfort incroyable. Merci de croire de moi.





## SOMMAIRE

---

Remerciements.....	i
Liste des Figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xxi
Liste des annexes.....	xxv
Glossaire.....	xxvii
Liste des acronymes et des abréviations.....	xxix
Introduction.....	1
PARTIE A. Synthèse bibliographique.....	7
Chapitre I. Les radiations ionisantes dans l'environnement.....	9
1. Généralités sur les radiations ionisantes.....	9
1.1. La découverte de la radioactivité.....	9
1.2. Les différents types de radiations ionisantes issues de la radioactivité.....	10
1.3. Les unités de mesure de la radioactivité.....	12
2. Les sources de radiations ionisantes dans l'environnement.....	12
2.1. Les sources naturelles.....	12
2.2. Les sources artificielles.....	13
3. L'exposition des organismes aux radiations ionisantes.....	15
3.1. Voies d'exposition.....	15
3.2. Doses d'irradiation dans l'environnement.....	16
3.2.1 Doses d'irradiation naturelles.....	16
3.2.2 Doses d'irradiation artificielles.....	16
4. Radioprotection de l'environnement.....	17

Chapitre II. La toxicité des radiations gamma.....	21
1. Mécanismes de toxicité.....	21
1.1. Les lésions moléculaires.....	21
1.1.1 Les dommages radio-induits à l'ADN.....	21
1.1.2 Effets sur les autres biomolécules.....	22
1.2. Les réponses cellulaires et tissulaires.....	22
1.3. Synthèse des mécanismes de toxicité.....	23
1.4. Caractéristiques cellulaires et physiologiques déterminant la radiosensibilité des espèces.....	24
2. Les effets biologiques des radiations gamma.....	25
2.1. Toxicité aigüe.....	25
2.2. Toxicité chronique.....	26
2.3. Effets multigénérationnels.....	28
2.3.1 À l'échelle moléculaire.....	28
2.3.2 À l'échelle macroscopique.....	29
2.4. Confrontation des études en laboratoire avec les données de terrain.....	30
Chapitre III. <i>Daphnia magna</i> , comme modèle biologique.....	33
1. Caractéristiques biologiques et écologiques.....	33
1.1. Habitat.....	33
1.2. Morphologie.....	33
1.3. Cycle de vie et reproduction.....	34
1.3.1 Reproduction parthénogénétique.....	35
1.3.2 Reproduction sexuée.....	35
2. <i>Daphnia magna</i> en écotoxicologie.....	36
2.1. Utilisation et atouts.....	36

2.2. Utilisation dans des études multigénérationnelles et transgénérationnelles .....	37
Chapitre IV. L'épigénétique en écotoxicologie.....	39
1. Petit historique de l'épigénétique.....	39
2. Un mécanisme épigénétique : la méthylation de l'ADN.....	41
2.1. La méthylation de l'ADN chez les mammifères.....	41
2.2. La méthylation de l'ADN chez les invertébrés .....	43
3. La mémoire épigénétique .....	44
3.1. Mémoire épigénétique à l'échelle de l'individu .....	45
3.2. Mémoire épigénétique transgénérationnelle .....	47
4. Radiations ionisantes et modifications épigénétiques.....	49
Chapitre V. La modélisation mécaniste des effets en écotoxicologie.....	51
1. Méthode classique d'évaluation des effets en écotoxicologie .....	51
2. Les modèles TKTD.....	52
2.1. Les modèles toxicocinétiques .....	52
2.2. Les modèles toxicodynamiques.....	53
2.2.1 Métrique de dose.....	53
2.2.2 Modèles TKTD pour la survie.....	54
2.2.3 Modèles TKTD pour les effets sublétaux.....	55
3. Le modèle DEBtox.....	55
3.1. La théorie DEB .....	55
3.2. Application à l'écotoxicologie.....	58
3.2.1 Toxicocinétique.....	58
3.2.2 Toxicodynamique.....	59
3.2.3 DEBtox simplifié et équations des modèles d'effets .....	61
3.3. Application du modèle DEBtox.....	64

3.3.1 Le DEBtox et les radiations ionisantes .....	65
3.3.2 Modélisation DEBtox dans un contexte multigénérationnel.....	65
4. L'estimation des paramètres du modèle DEBtox.....	68
4.1. L'approche fréquentiste classique .....	68
4.2. L'inférence bayésienne.....	69
PARTIE B. Étude des modifications épigénétiques transgénérationnelles lors d'une irradiation gamma externe chez <i>Daphnia magna</i> .....	71
Chapitre VI. : Matériels et Méthodes.....	75
1. Élevage des daphnies au laboratoire .....	75
2. Dispositif d'irradiation gamma .....	76
2.1. L'irradiateur gamma externe MIRE.....	76
2.2. Un dispositif expérimental d'irradiation pour les daphnies .....	77
3. Design expérimental.....	79
3.1. La mise en évidence d'un effet transgénérationnel lié à l'exposition des daphnies aux radiations gamma.....	79
3.2. Suivi de la survie et de la fécondité.....	80
3.3. Mesure de la taille et de la masse.....	80
4. Analyses statistiques sur les données de croissance et de fécondité.....	81
5. Analyse de la méthylation de l'ADN .....	82
5.1. Choix et préparation des échantillons d'ADN .....	82
5.2. Le séquençage bisulfite .....	82
5.3. Contrôle de la qualité des échantillons séquencés et alignement.....	84
5.4. Détection du polymorphisme nucléotidique.....	84
5.5. Calcul du niveau de méthylation des CpGs .....	84
5.6. L'analyse différentielle de la méthylation.....	85

5.6.1 Analyse différentielle sous DSS.....	85
5.6.2 Taille de la fenêtre de lissage.....	86
5.6.3 Comparaison des échantillons témoins.....	87
5.7. Identification des régions géniques et des gènes concernés par les modifications de la méthylation.....	87
Chapitre VII. Résultats et Discussion .....	89
1. Les modifications de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome.....	89
2. Les modifications de la méthylation de l'ADN à l'échelle des CpG.....	91
3. Les modifications de la méthylation de l'ADN en fonction du débit de dose.....	95
4. Les modifications de la méthylation de l'ADN au fil des générations.....	97
5. Fonctions biologiques des gènes comportant des DMC.....	100
6. Effets à l'échelle de l'organisme .....	102
6.1. Effets sur la survie.....	102
6.2. Effets sur la croissance .....	102
6.3. Effets sur la reproduction.....	103
6.4. Relier les modifications de la méthylation aux effets macroscopiques.....	103
PARTIE C. Modélisation mécaniste des effets transgénérationnels d'une irradiation gamma avec le modèle DEBtox.....	105
Chapitre VIII. : Méthodes - modèle DEBtox.....	109
1. Données .....	109
2. Hypothèses et formulation du modèle.....	109
2.1. Choix de la métrique de dose .....	109
2.2. Un modèle à deux compartiments de dommage.....	110
2.2.1 Cinétiques des niveaux de dommage.....	110
2.2.2 Transmission des niveaux de dommage des parents aux descendants.....	111

2.3. Fonctions de stress .....	112
2.4. Modes d'action testés .....	112
2.5. Équations de croissance et de reproduction.....	113
2.5.1 Individus témoins.....	113
2.5.2 Individus exposés .....	114
2.6. Changement d'unité – reproduction .....	115
3. Inférence bayésienne et estimation des paramètres.....	116
3.1. Structure du modèle bayésien.....	116
3.2. Distributions a priori des paramètres .....	119
3.3. Estimation des paramètres .....	120
4. Evaluation de la qualité d'ajustement du modèle.....	121
4.1. Evaluation graphique et vérification prédictive postérieure .....	121
4.2. Evaluation des modes d'action .....	122
5. Validation du modèle sélectionné.....	122
Chapitre IX. Résultats .....	125
1. Comparaison des modèles : Identification des modes d'action toxique des radiations gamma .....	125
2. Ajustement des modèles sélectionnés .....	125
2.1. Individus témoins .....	125
2.2. Individus exposés.....	126
3. Paramètres du DEBtox estimés .....	129
3.1. Paramètres physiologiques.....	129
3.2. Paramètres toxicologiques .....	132
4. Validation du modèle.....	138
4.1. Paramètres physiologiques estimés à partir de l'étude II .....	138

4.2. Prédications de croissance et de reproduction pour les daphnies de l'étude II.....	138
Chapitre X. Discussion.....	141
1. Inférence mécaniste de la dynamique transgénérationnelle des effets sur l'organisme ..	141
2. Mode d'action toxique des radiations gamma.....	145
Conclusions et perspectives.....	149
Valorisation scientifique.....	159
Références Bibliographiques.....	161
Annexes.....	191





---

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1: Hand mit Ringen (Main avec des bagues) : premier cliché radiographique réalisé par Wilhelm Röntgen en 1895 (ENS 2007).....	9
Figure 2 : Chaîne de désintégration de l'uranium 238 (CCSN 2012) .....	10
Figure 3 : Particule alpha .....	11
Figure 4 : Particule beta .....	11
Figure 5 : Rayonnement gamma .....	11
Figure 6 : Le pouvoir de pénétration des différents rayonnements (IRSN, 2016).....	12
Figure 7: Carte des dépôts rémanents du césium-137 et césium-134 suite à l'accident de la centrale de Fukushima en 2011 (A) et de la centrale de Tchernobyl en 1986 (B) (IRSN, 2014).....	15
Figure 8. Lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des radiations gamma....	21
Figure 9. Effets biologiques des radiations ionisantes de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire, en fonction du temps (modifiée d'après(Haton, 2005)) .....	24
Figure 10. Gammes de doses létales entraînant 50 % de mortalité (DL50) pour différents groupes taxonomiques (Copplestone et al., 2001).....	25
Figure 11. Comparaison de la radiosensibilité des espèces, avec en A, la distribution de sensibilité des espèces (SSD) ajustée aux valeurs minimales de EDR <sub>10</sub> (débits de dose à l'origine entraînant 10% d'effets) pour des espèces exposées aux radiations ionisantes en conditions contrôlées au laboratoire, et en B, la SSD ajustée aux valeurs minimales de EDR <sub>10</sub> acquises sur le terrain dans la zone d'exclusion de Tchernobyl (Garnier-Laplace et al., 2013). L'erreur-standard de chaque EDR <sub>10</sub> estimé est représenté par une barre horizontale. ....	31
Figure 12. Morphologie d'une femelle <i>Daphnia magna</i> .....	34
Figure 13 : Cycle de vie de <i>Daphnia magna</i> . On distingue un mode de reproduction sexué et un mode parthénogénétique (Ebert, 2005) .....	34
Figure 14. <i>Daphnia magna</i> femelles au stade adulte, avec une portée d'œufs parthénogénétiques (A), et avec deux œufs de conservation enveloppés dans une poche protectrice, l'éphippie (B) (photos par Dieter Ebert, Bâle, Suisse, CC BY-SA 4.0). ....	35
Figure 15 : le paysage épigénétique de Waddington et les interactions sous-jacentes, d'après	

(Waddington 1947).....	39
Figure 16. Représentation schématique de la méthylation de l'ADN, qui convertit une cytosine en 5' methyl-cytosine, grâce à l'action méthyl-transferase (DNMT). SAM = S-adenosylmethionine; SAH = S-adenosylhomocysteine (Zakhari, 2013).....	41
Figure 17. Reprogrammation d'un embryon de mammifère, par Marius Walter CC BY-SA 4.0 .....	42
Figure 18. Rôle de la méthylation des îlots CpG sur la transcription des gènes (UCSF School of Medicine, 2007).....	42
Figure 19. Profils de méthylation de l'ADN chez les invertébrés et les mammifères. Les zones grises représentent des séquences de méthylation stable, les zones jaunes des séquences non-méthylées et les rectangles rouges, les éléments transposables (Miho M. Suzuki, Bird, 2008)...	43
Figure 20. Conséquences des modifications épigénétiques induites par des stimuli environnementaux dans les cellules somatiques ou dans les cellules de la lignée germinale, modifiée d'après Mirbahai and Chipman (2014).....	45
Figure 21. Mise en évidence de modifications épigénétiques transgénérationnelles chez la souris, dans les cas de l'exposition en génération F0 d'une femelle (en haut) et d'un mâle (en bas) (Nilsson and Skinner, 2014) .....	47
Figure 22: L'approche mécaniste de l'effet des contaminants par les modèles toxicocinétique et toxicodynamique (TKTD), utilisés pour passer de la concentration externe d'exposition à l'apparition des effets au cours du temps (Jager, 2012).....	52
Figure 23 : Structure schématique d'un modèle toxicocinétique-toxicodynamique (TKTD) avec la possibilité d'intégrer un compartiment de dommages pour expliquer la dynamique des effets , d'après (Jager et al., 2011).....	54
Figure 24 : Concept de la théorie du Budget Energétique Dynamique (DEB) avec l'entrée de ressources dans l'organisme et leur distribution entre les principaux processus métaboliques (Kooijman, 2010). .....	55
Figure 25. Représentation schématique du modèle DEB standard. ....	56
Figure 26 : Relation linéaire entre la concentration interne normalisée et le stress toxique dans le modèle toxicodynamique du DEBtox. NEC : No Effect Concentration, b : pente d'intensité de stress .....	60

Figure 27 : Modes d'action métaboliques du modèle DEBtox perturbant les flux d'énergie au sein de l'organisme (Jager and Zimmer, 2012). Il existe 5 modes d'action : 1) Réduction de l'assimilation, 2) augmentation des coûts énergétiques de maintenance somatique et de maturité, 3) augmentation des coûts de croissance et de maturation, 4) augmentation du coût de production des œufs et 5) mortalité lors de l'oogenèse.....	61
Figure 28 : Représentation schématique de l'internalisation de l'uranium appauvri de façon similaire sur trois générations exposées (A), et du stress toxique sur l'assimilation dépendant de la génération afin de décrire l'aggravation des effets selon les hypothèses (Massarin et al., 2011) à partir des données de (Massarin et al., 2010).....	66
Figure 29. Représentation schématique des deux stress toxiques impliqués lors de l'exposition de <i>D. magna</i> à l'uranium appauvri et de leur métrique de dose avec : (A) le stress toxique sur l'assimilation, (B) le stress toxique sur la croissance et la maturation (Alonzo et al., 2014). ....	67
Figure 30. Élevage des daphnies dans des pichets contenant 40 daphnies dans 2 L de milieu M4 , au sein d'une chambre thermostatée (A) et élevage des micro-algues <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (B).....	75
Figure 31. Installation MIRE. A) les cinq chambres thermostatées contenant les sources radioactives (deux seulement sont visibles, les trois autres sont derrière le mur en briques de plomb), B) Chambre thermostatée témoin, ne contenant pas de source radioactive, placée dans la même pièce et protégée par un mur en briques de plomb.....	77
Figure 32. Dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation gamma externe des daphnies lors de l'expérience. Vingt-deux unités expérimentales disposées autour de la source scellée de Césium-137, S4, ont reçu un débit de dose égal à 6,5 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ et 24 (2x12) unités expérimentales disposées autour de chacune des sources S1A ou S1B ont reçu 41,3 $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ . Le rectangle vert sur les faces avant et arrière de l'unité expérimentale représente l'emplacement des dosimètres Radio Photo Luminescents utilisés pour valider la valeur des débits de dose.....	78
Figure 33. Design expérimental utilisé pour mettre en évidence des modifications épigénétiques transgénérationnelles lors d'une irradiation gamma de <i>Daphnia magna</i> . CG : Cellules Germinales, B4 et B5 : 4e ou 5e ponte, utilisée pour la génération suivante. ....	80
Figure 34. Principe du séquençage en paire (paired-end sequencing).....	83
Figure 35 : Principe général de l'analyse différentielle de la méthylation de l'ADN permettant la	

détection des DMC (Differentially Methylated Cytosines) et des DMR (Differentially Methylated Regions) en comparant les niveaux de méthylation des échantillon ADN témoin et exposé grâce au package DSS sur R (Feng, Conneely, and Wu 2014; Wu et al. 2015).....	85
Figure 36. Autocorrélation des niveaux de méthylation entre des sites CpG séparés d'une distance. Le seuil de significativité, fixé à 0.03, est représenté en pointillés rouge.....	87
Figure 37. Niveau de méthylation moyen (%) calculé sur l'ensemble des sites CpG du génome et dans différentes régions génomiques (exons, introns, régions intergénomiques) pour les traitements témoin, 6,5 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ et 41,3 $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ aux générations F0, F2 et F3.....	89
Figure 38. Proportions de DMC hypométhylées et hyperméthylées (nombre de DMC/nombre total de sites CpG) dans le génome entier et dans différentes régions génomiques (Exons, introns, régions intergénomiques) pour les générations F0, F2 et F3 exposées ou descendant de générations exposées à des débits de dose de 6.5 $\mu\text{Gy}\ \text{h}^{-1}$ et 41.3 $\text{mGy}\ \text{h}^{-1}$ .....	91
Figure 39 : Diagrammes de Venn présentant les DMC communes aux débits de dose 6,5 $\mu\text{Gy}\ \text{h}^{-1}$ (en bleu) et.....	95
Figure 40 : Diagrammes de Venn montrant, pour les DMCs totales, hypométhylées et hyperméthylées, le nombre de DMC communes aux générations F0, F2 et F3 pour les traitements 6,5 $\mu\text{Gy}\ \text{h}^{-1}$ et 41,3 $\text{mGy}\ \text{h}^{-1}$ .....	97
Figure 41. Niveau de méthylation (%) dans les générations F0, F2 et F3 pour des sites CpG localisés dans des régions géniques et correspondant tous à des DMC communes entre les générations F2 et F3, à 6,5 $\mu\text{Gy}\ \text{h}^{-1}$ (de a à e), 41,3 $\text{mGy}\ \text{h}^{-1}$ (de f à k) ou pour les deux débits de dose à la fois (de l à s). Les DMC sont signalées par une étoile. Les Lettres comportant un fond gris correspondent à des sites CpG qui ont été également été détecté comme DMC entre les échantillons témoin des génération F0, F2 et F3. Identification des gènes: a) Dapma7bEVm643574t1; b) Dapma7bEVm006642t1; c) Dapma7bEVm005020t1; d,e) Dapma7bEVm000594t1; f) Dapma7bEVm007421t1; g,h) Dapma7bEVm008419t1; i) Dapma7bEVm004647t1; j) Dapma7bEVm637841t1; k) Dapma7bEVm005882t1; l,m) Dapma7bEVm636207t1; n,o) Dapma7bEVm001664t1; p) Dapma7bEVm004770t1; q,r) Dapma7bEVm004226t1; s) . Dapma7bEVm001898t1.....	99
Figure 42. Nombre de gènes contenant au moins un DMC dans les générations F0, F2 ou F3, exposées ou en récupération après des expositions à 6,5 $\mu\text{Gy}\ \text{h}^{-1}$ et 41,3 $\text{mGy}\ \text{h}^{-1}$ , dans chaque	

catégorie KOG. Seules les 10 catégories KOG les plus représentées (en incluant les ex aequo) ont été considérées. Certains gènes, représentant des proportions de 38 et 12% en génération F0, 26 et 23 % en génération F2 et 28 et 27% en génération F3 à 6,5  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy h}^{-1}$  respectivement, n'ont pas pu être liés à une catégorie KOG.....100

Figure 43. Survie (%) de *D. magna* sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la génération F0 est exposée aux radiations gamma à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy.h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy.h}^{-1}$  sur la totalité de son cycle de vie et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire. ....102

Figure 44. Croissance (taille du corps en mm) de *D. magna* sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la génération F0 est exposée aux radiations gamma à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy.h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy.h}^{-1}$  sur la totalité de son cycle de vie et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire. Les données expérimentales et les courbes de croissance de von Bertalanffy sont respectivement représentées par des points et des lignes.....102

Figure 45. Production de néonates par daphnie sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la F0 est exposée aux radiations gamma sur la totalité de son cycle de vie à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy.h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy.h}^{-1}$  et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire. Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticaux: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n = 10$ .....103

Figure 46 : Diagram acyclique orienté (Directed Acyclic Graph, DAG en anglais) représentant la structure du modèle DEBtox utilisé. Les données sont représentées par des rectangles et les autres variables (paramètres, variables latentes) par des ellipses. Les flèches pleines indiquent des liens déterministes et les flèches en pointillés des liens stochastiques. Ces liens sont décrits dans le Tableau 17. ....118

Figure 47. Ajustements du modèle coût-croissance aux données de croissance (A) et de reproduction (B) des daphnies témoins, provenant de l'expérience multigénérationnelle d'irradiation gamma externe (Étude I) (Parisot et al., 2015). Points (+) : données observées, lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, lignes en pointillés : intervalle de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.....126

Figure 48. Ajustements du modèle DEBtox « Coût-Croissance » aux données observées de

croissance (taille du corps) et de reproduction (nombre d'œufs cumulés par daphnie) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites. ....128

Figure 49. Distributions *a priori* (ligne pointillée) et *a posteriori* (en rouge pour le modèle coût-croissance et en vert pour le modèle mortalité-croissance) de chaque paramètre physiologique du modèle DEBtox estimés à partir des données observées des individus témoins dans le cadre de l'étude I.....129

Figure 50. Distributions *a priori* (ligne pointillée) et *a posteriori* (en rouge pour le modèle coût-croissance et en vert pour le modèle mortalité-croissance) de chaque paramètre toxicologique du modèle DEBtox. Dans le cas où la distribution *a priori* s'applique au logarithme népérien du paramètre (kr1\_F0, kr1\_F1, kr2, NEDR1, NEDR2), la distribution *a posteriori* du logarithme népérien de ce paramètre a été représentée.....132

Figure 51. Niveaux de dommages normalisés *D1* \*et *D2* \* simulés pour une irradiation gamma externe (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle chez *D. magna*. *D1* \*et *D2* \* sont associés aux modes d'actions « coûts de production des œufs » et « coûts de de croissance et de maturation » respectivement.....134

Figure 52. Distributions conjointes des paramètres toxicologiques estimés à partir du modèle coût-croissance (projection des échantillons MCMC). r correspond au coefficient de corrélation de Kendall.....136

Figure 53. Niveaux de stress toxique  $\sigma1$  et  $\sigma2$  simulés d'une irradiation gamma externe (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle chez *D. magna*.  $\sigma1$  et  $\sigma2$  sont associés aux modes d'actions « coûts de production des œufs » et « coûts de de croissance et de maturation » respectivement.....137

Figure 54. Prédictions de croissance et de reproduction de daphnies sur trois générations (F0, F1, F2) exposées aux radiations gamma en génération F0 (0,0065 et 41,3 mGy.h<sup>-1</sup>) puis en l'absence d'irradiation en générations F1 et F2 dans le cadre de l'étude II. Les prédictions ont été obtenues en calibrant le modèle DEBtox à partir d'un échantillonnage de la distribution *a posteriori*

estimée pour chaque paramètre avec des données de l'étude I pour les paramètres toxicologiques et avec des données l'expérience II pour les paramètres physiologiques. Points (+) : données observées (Étude II), lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, lignes en pointillés : intervalle de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites. ....139

Figure 55. Comparaison des effets sur le taux de reproduction maximum  $R_m$  (fixé à 1 en l'absence de stress toxique) entre les deux modes d'actions « coûts de l'œuf » et « mortalité à l'ovogenèse » en fonction de l'intensité du stress toxique. ....145

Figure 56. Structure d'un AOP (Adverse Outcome Pathway). MIE : Molecular Initiating Event, KE : Key Event. ....156

Figure 57. Représentation schématique d'un AOP lors d'une contamination chimique chez le poisson et son intégration dans le modèle DEB. Le réseau d'évènements biologiques clefs (KE, Key Events en anglais) affecté par le contaminant dans différents organes et à différentes échelles d'organisation biologique (M : moléculaire, C : cellulaire, O : organe) est représenté. Ce réseau de KE se traduit en dommage venant directement affecter certains processus énergétiques du modèle DEBtox (flèches vertes). Schéma issu de (Garcia-Reyero and Murphy, 2017).....157

Figure 58. Ajustements du modèle DEBtox « mortalité-croissance » aux données observées de croissance (taille du corps) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites. ....225

Figure 59. Ajustements du modèle DEBtox « Mortalité-Croissance » aux données observées de reproduction (nombre d'œufs cumulés par daphnie) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.....226





---

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Composition et activité des rejets radioactifs totaux émis lors des accidents des centrales nucléaires de Tchernobyl (1986) et Fukushima (2011).....	14
Tableau 2. Valeurs de référence (débit de dose) proposées par différents organismes pour la protection des populations terrestres et aquatiques (IAEA, UNSCEAR, ICRP) ou des écosystèmes dans leur globalité (ERICA), contre les radiations ionisantes.....	19
Tableau 3. Caractéristique de la méthylation de l'ADN pour différents invertébrés et chez l'Homme (Wang et al., 2014).....	43
Tableau 4. Paramètres et variables du modèle DEBtox simplifié avec leur symbole, leur interprétation et leur unité (# pour les nombres, l pour la taille, t pour le temps, c pour la concentration et [-] pour un paramètre dans unité). .....	64
Tableau 5. Description des études DEBtox appliquées à l'exposition aux radiations ionisantes. ....	65
Tableau 6. Débits de dose reçus par les daphnies au centre des unités expérimentales, estimés avec les calculs du code Monte-Carlo N-Particle (MCNP) et mesurés avec des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL), selon la source de césium-137 utilisée et son activité en Bq. Les valeurs de débits de dose sont des moyennes $\pm$ plage de variation calculée entre les parois avant et arrière des unités expérimentales. L'erreur relative entre les débits de dose nominaux et mesurés a également été calculée. ....	79
Tableau 7 : Équations utilisées pour modéliser la croissance en taille et en masse des daphnies en accord avec le modèle DEB (Kooijman, 2010).....	81
Tableau 8 : Échantillons d'ADN sélectionnés pour l'analyse de la méthylation, avec le nombre de daphnies et la quantité d'ADN les constituant. ....	82
Tableau 9. Liste des catégories KOG (euKariotic Orthologous Genes) (Tatusov et al., 2003) et des fonctions biologiques associées .....	88
Tableau 10. Liste de tous les DMR détectés pour les générations F0, F2 et F3, et les débits de dose 6,5 $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> et 41,3 mGy h <sup>-1</sup> avec l'identifiant du gène et l'annotation si la DMR est située dans une région génique. ....	93

Tableau 11 : DMC (Cytosines Différentiellement Méthylées) détectées entre les échantillons témoin des générations F0, F2 et F3, qui sont également présentes parmi les DMC des générations F0, F2 et F3 (témoins vs exposés), parmi les DMCs communes aux générations et parmi les DMC communes aux débits de doses.....	96
Tableau 12. Jeux de données et utilisation de ces données dans le cadre de l'analyse DEBtox pour une irradiation gamma.....	109
Tableau 13 : Les six modèles DEBtox testés présentant 6 différentes combinaisons de modes d'action toxiques pour les radiations gamma. Le mode d'action 1 tient compte d'effets directs sur la reproduction. Le mode d'action 2 tient compte d'effets sur la croissance et la reproduction. ....	113
Tableau 14. Équations de croissance et de reproduction du modèle DEBtox pour chaque combinaison de mode d'action toxique testée (les fonctions de stress $\sigma_1(D_1^*)$ et $\sigma_2(D_2^*)$ , dépendantes des dommages normalisés $D_1^*$ et $D_2^*$ , sont simplifiées en $\sigma_1$ en $\sigma_2$ dans les équations).....	114
Tableau 15. Paramètres et variables utilisés dans les équations .....	115
Tableau 16. Paramètres estimés pour le calcul de la masse sèche d'un œuf en fonction de la taille de la mère chez la daphnie. ....	116
Tableau 17 : Description des liens déterministes ou stochastiques entre les nœuds du modèle, présentés dans le DAG (Figure 46). $N(m, sd)$ correspond à une loi normale de moyenne m et d'écart-type sd, $NegBin(n, p)$ correspond à une binomiale négative avec n le nombre de succès et p la probabilité de succès. T(a,b) se rapporte à la troncature de la distribution de probabilité entre les bornes a et b.....	117
Tableau 18. Distributions <i>a priori</i> utilisées dans l'estimation bayésienne des paramètres DEBtox pour <i>D. magna</i> dans le cas d'une irradiation gamma. N(m ; sd) correspond à une distribution normale de moyenne m et d'écart-type sd. T(a ; b) fait référence à une troncature de la distribution entre les bornes a et b. logUnif(inf ; sup) correspond à une distribution log-uniforme, c'est-à-dire que le logarithme népérien de la variable aléatoire est distribué de façon uniforme entre les bornes inf et sup. ....	119
Tableau 19. Valeurs de DIC (Deviance Information Criterion) calculées pour les différents modèles testés.....	125

Tableau 20. Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées chez les individus témoins issus de l'étude I, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox « coût-croissance » ou « mortalité-croissance ».	126
Tableau 21. Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées issues de l'étude I, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox Coût-croissance ou Mortalité-croissance.	127
Tableau 22. Paramètres physiologiques estimés et les caractéristiques (médiane, 2,5 <sup>e</sup> et 97,5 <sup>e</sup> centiles) de leur distribution <i>a posteriori</i> empirique.	131
Tableau 23. Paramètres toxicologiques estimés. Pour chaque paramètre, les caractéristiques (médiane, 2,5 <sup>e</sup> et 97,5 <sup>e</sup> centiles) de leur distribution <i>a posteriori</i> empirique sont précisées.	133
Tableau 24. Paramètres physiologiques estimés à partir des individus témoins de l'étude II et les caractéristiques (médiane, 2,5 <sup>e</sup> et 97,5 <sup>e</sup> centiles) de leur distribution <i>a posteriori</i> empirique.	138
Tableau 25 . Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées issues de l'étude II, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox coût-croissance ou mortalité-croissance calibrés à partir des données issues de l'étude I.	140
Tableau 26. Valeurs des paramètres toxicologiques estimés par une approche fréquentiste pour décrire les données issues de l'étude I (Parisot, 2015).	143
Tableau 27. Composition de la solution M4 à pH8.	193
Tableau 28. Composition de la solution mère I.	194
Tableau 29. Composition de la solution mère de vitamines.	194
Tableau 30. Composition des solutions stock utilisées pour la préparation du milieu HSM.	195
Tableau 31. Caractéristiques des lectures «en paire » (paired-end reads) de 100 paires de base de longueur générées par le séquençage bisulfite. Le nombre total de séquences est indiqué pour les reads 1 (R1) et les reads 2 (R2). Le pourcentage de lecture avec un score Phred (Q) supérieur à 30 est précisé.	199
Tableau 32. Liste de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la génération F0.	205
Tableau 33. Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la	

génération F2, mis à part pour les DMC en commun entre les générations F2 et F3.....	208
Tableau 34. Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la génération F3, mis à part pour les DMC en commun entre les générations F2 et F3.....	212
Tableau 35. Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC en commun entre les générations F2 et F3.....	216
Tableau 36. Nombre d'itérations nécessaires à chaque modèle testé pour atteindre la convergence des chaines MCMC, calculé grâce à la méthode de Raftery et Lewis (Ratery, Lewis, 1992). Le nombre de « thin » indique à quelle fréquence les itérations sont enregistrées, le reste des itérations sont éliminées.....	223

---

## LISTE DES ANNEXES

---

Annexe 1.	Préparation du milieu d'élevage M4.....	193
Annexe 2.	Préparation du milieu de culture des algues.....	195
Annexe 3.	Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit DNeasy blood & tissue de QIAGEN 197	
Annexe 4.	Caractéristiques et qualité des lectures (reads) générées par le séquençage bisulfite. 199	
Annexe 5.	Modification de la fonction call_DMR.....	201
Annexe 6.	Liste des gènes comportant des DMC .....	205
Annexe 7.	Convergence des chaînes MCMC : critère de Gelman .....	219
Annexe 8.	Nombre d'itérations pour atteindre la convergence des chaînes MCMC .....	223
Annexe 9.	Ajustements du modèle « mortalité-croissance » aux données de croissance et de reproduction issues de Parisot et al. 2015 .....	225
Annexe 10.	Article scientifique.....	227



---

# GLOSSAIRE

---

**ADN** : Acide Desoxyribonucléique, molécule du support de l'information génétique héréditaire, en principe similaire dans toutes les cellules somatiques d'un organisme.

**Apoptose** : Mort cellulaire programmée, processus par lequel les cellules déclenchent leur mort en réponse à un signal.

**Cellules somatiques** : Les cellules constituant la majorité des cellules d'un organisme et n'appartenant pas à la lignée germinale (gamètes, cellules germinales...)

**Cellules germinales** : Cellules reproductrices à l'origine des gamètes.

**Gène** : Séquence d'ADN codant pour un caractère particulier.

**Néonate** : Nouveau-né (anglicisme). Dans notre étude, les néonates désignent les daphnies qui viennent d'être expulsées de la poche incubatrice de leur mère (<24h).

**Parthénogenèse** : Mode de reproduction asexuée, permettant le développement d'un individu à partir d'un ovule non fécondé.

**Génome** : L'ensemble du matériel génétique d'une espèce codé dans son ADN.

**Génotoxicité** : Capacité d'une substance à produire des modifications physiques ou fonctionnelles dans un génome. De l'ADN.

**Mutation** : Altération du matériel génétique d'une cellule pouvant être héréditaire si elle concerne les cellules germinales.

**Diploïdie** : Concerne les cellules qui comportent deux exemplaires de chaque chromosome (2n chromosomes)

**Haploïdie** : Concerne les cellules qui comportent qu'un seul exemplaire de chaque chromosome (n chromosomes)

**Histones** : Principaux constituants protéiques des chromosomes permettant la compaction de l'ADN.

**Phénotype** : L'ensemble des traits observables d'un organisme.

**Site CpG** : Segment d'ADN de deux nucléotides dont la séquence de bases nucléiques est CG. La notation « CpG » est une abréviation de cytosine-phosphate-guanine.



---

## LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS

---

**DEBtox** : Modèle mécaniste basé sur l'application de la théorie du budget énergétique dynamique (Dynamic Energy budget) à la toxicologie

**DIC** : Deviance Information Criterion

**DLx** : Dose létale pour x % des individus

**DMC** : Cytosine différenciellement méthylée (Differentially Methylated Cytosines)

**DMR** : Région différenciellement méthylée (Differentially Methylated Cytosines)

**DNMT** : ADN Méthyltransférases

**DSB** : Cassures double-brin de l'ADN (Double Strand Break)

**ERICA** : Projet européen en radioprotection environnementale qui s'est déroulé de 2004 à 2007 (Environmental Risk for Ionising Contaminants : Assessment and Management)

**IAEA** : Agence internationale pour l'énergie atomique (International Atomic Energy Agency)

**ICRP** : Commission internationale de protection radiologique (International Commission on Radiological Protection)

**IRSN** : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire

**KOG** : (EuKaryotic *Orthologous* Groups)

**MCMC** : Méthodes de Monte-Carlo par Chaîne de Markov

**OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OECD en anglais)

**SSB** : Cassures double-brin de l'ADN (Simple Strand Break)

**TKTD** (modèle) : Toxicocinétique-toxicodynamique

**UNSCEAR** : Comité scientifique des Nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation)



---

# INTRODUCTION

---



De nombreuses activités humaines, parmi lesquelles la production d'énergie, l'armement ou la médecine font usage de radionucléides et sont à l'origine de leur rejet intentionnel ou accidentel dans l'environnement (Hu et al., 2010). Les accidents des centrales de Tchernobyl en 1986 et de Fukushima en 2011 sont à l'origine du rejet de radionucléides artificiels persistants tels que  $^{137}\text{C}$  ou  $^{90}\text{Sr}$  qui ont entraîné l'exposition chronique d'écosystèmes terrestres et aquatiques aux radiations ionisantes (IRSN, 2014). Par le passé, les conséquences de l'exposition aux radiations ionisantes étaient principalement évaluées afin de protéger l'Homme (ICRP, 1977). Considéré alors comme l'une des espèces les plus radiosensibles, les normes de protection humaines étaient jugées adéquates à la protection des écosystèmes (ICRP, 1991). Toutefois une telle conception de la radioprotection de l'environnement ne tenait pas compte des connaissances existantes sur les effets des radiations ionisantes sur la faune et la flore naturelles (Thompson, 1988). De même, les différences de radiosensibilité entre les espèces et stades de développement étaient niées (Panter, 1986 ; Rose, 1991 ; Sparrow et al., 1968), ainsi que la présence d'habitats naturels, généralement inaccessibles à l'Homme, dans lesquels certains organismes pouvaient être exposés à des limites supérieures à celles admises pour l'Homme (IAEA, 1988). C'est ainsi qu'à partir des années 1990, l'environnement n'est plus considéré comme un simple vecteur de contamination radioactive de la chaîne alimentaire humaine et sa protection contre les radiations ionisantes devient un objectif en soi (IAEA, 1999 ; IRSN, 2016 ; UNSCEAR, 1996). En développant une méthodologie d'évaluation des risques environnementaux pour les radiations ionisantes en cohérence avec celle utilisée pour les substances chimiques (IRSN, 2006), les objectifs des autorités publiques sont alors centrés autour de la protection durable des écosystèmes et de leur fonctionnement (EFSA, 2016).

L'analyse des effets biologiques des radiations ionisantes est une étape essentielle de la caractérisation du risque environnemental qui leur est associé. Les effets des radiations ionisantes interviennent à différents niveaux d'organisation biologique, de la molécule à l'écosystème (Adam-Guillermin et al., 2012 ; Dallas et al., 2012 ; Won et al., 2015). Les altérations moléculaires et cellulaires constituent les effets les plus précoces et sont à l'origine de perturbations physiologiques pouvant affecter la survie, la croissance ou la reproduction des organismes. Sur le long terme, ces effets à l'échelle individuelle peuvent avoir des conséquences sur la dynamique de population, pouvant ensuite se répercuter sur le fonctionnement et la

structure des communautés et des écosystèmes.

En pratique, les effets sur les écosystèmes n'étant pas mesurables directement du fait de la complexité des processus en jeu, la toxicité des radiations est mesurée à l'échelle individuelle ou sub-individuelle par une approche expérimentale au laboratoire (Rohr et al., 2016). L'évaluation de ces effets doit être suffisamment pertinente d'un point de vue écologique pour permettre leur extrapolation aux échelles de la population et aux échelles supérieures. Or la plupart des études mesurant l'effet des radiations ionisantes ont opté pour des scénarios d'exposition peu représentatifs d'une exposition environnementale (Coppystone et al., 2008). D'une part, les débits de dose sont généralement bien plus élevés que ceux mesurés dans les zones contaminées. D'autre part, les durées d'exposition sont souvent limitées à un stade de vie ou une seule génération, alors que dans le milieu naturel, les populations sont exposées sur des durées bien plus longues, sur plusieurs générations.

C'est dans ce contexte que plusieurs études ont récemment réalisé des expositions multigénérationnelles aux radiations ionisantes, en prenant en compte des débits de dose représentatifs des conditions environnementales (Plaire et al., 2013 ; Alonzo et al., 2008 ; Buisset-Goussen et al., 2014 ; Hiyama et al., 2012 ; Parisot et al., 2015). Ces études ont mis en évidence des différences de sensibilité aux radiations ionisantes entre les générations et dans les cas d'une exposition à l'uranium appauvri, aux radiations alpha et aux radiations gamma, une aggravation des effets sur la reproduction et la croissance au fil des générations (Plaire et al., 2013 ; Alonzo et al., 2008 ; Parisot et al., 2015). Une analyse mécaniste, basée sur la théorie du budget énergétique appliquée à la toxicologie (modèle DEBtox) a permis d'analyser les effets mesurés sur les traits d'histoire de vie et d'identifier un mode d'action métabolique permettant d'expliquer cette aggravation (Plaire, 2013).

Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets multigénérationnels restent encore mal identifiés et une meilleure connaissance de leur nature permettrait d'améliorer les prédictions sur le long terme. Lorsque ces effets persistent au fil de générations même en l'absence d'exposition, on parle d'effets transgénérationnels (Péry, Garric, 2017). Ces effets transgénérationnels peuvent être d'origine génétique, c'est-à-dire liés à une modification directe de l'ADN des gamètes, ou bien épigénétiques, c'est-à-dire liés à une modification au sein des

gamètes des marqueurs moléculaires intervenant dans l'expression des gènes sans que l'ADN ne soit modifié (Youngson, Whitelaw, 2008). Les effets transgénérationnels pourraient avoir des conséquences durables sur les populations et interférer dans les processus biologiques évolutifs.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de doctorat est d'améliorer la caractérisation et la prédiction des effets transgénérationnels lors d'une exposition aux radiations gamma. Pour répondre à cet objectif, deux approches ont été développées.

La première approche consiste à examiner l'hypothèse de modifications épigénétiques transgénérationnelles lors d'une exposition chronique aux radiations gamma externes. Les objectifs de cette étude sont les suivants : (i) Préciser le rôle de la méthylation de l'ADN, un mécanisme épigénétique, dans la réponse aux radiations en fonction du débit de dose, (ii) Tester la transmission de modifications de la méthylation de l'ADN vers la descendance non exposée, (iii) Examiner si ces modifications sont associées à des effets sur la survie, la croissance ou la reproduction. Cette démarche s'appuie sur la daphnie (*Daphnia magna*) comme organisme modèle. Micro-crustacé d'eau douce couramment utilisé en écotoxicologie, la daphnie présente les avantages d'avoir un cycle de vie court, une manipulation aisée en laboratoire et une reproduction clonale, permettant de conduire des études sur plusieurs générations en limitant les variations génétiques interindividuelles.

La seconde approche concerne la modélisation mécaniste des effets transgénérationnels avec le modèle DEBtox. Elle a pour objectif d'évaluer la pertinence d'un compartiment de dommage transgénérationnel corrélé au débit de dose pour prédire la dynamique des effets au fil des générations. Cette démarche se base sur des données multigénérationnelles d'exposition aux radiations gamma issues d'une thèse menée précédemment dans notre laboratoire (Parisot et al., 2015) et sur les données acquises lors de l'expérience annoncée ci-dessus. Des méthodes d'inférence bayésienne sont utilisées, car elles permettent d'estimer de façon plus pertinente les incertitudes associées aux paramètres et aux prédictions du modèle, et de prendre en compte des connaissances *a priori* sur les paramètres afin de faciliter leur estimation.

Ce manuscrit de doctorat comporte 3 parties :

- La partie A correspond à une synthèse bibliographique des différentes thématiques traitées dans la thèse. Le chapitre I présente les radiations ionisantes en général, leur distribution dans l'environnement et les principaux objectifs de la radioprotection environnementale. Le chapitre II détaille les connaissances actuelles sur les mécanismes de toxicité et les effets biologiques des radiations gamma en particulier. Le chapitre III présente les caractéristiques de l'organisme modèle *D. magna* et son utilisation en écotoxicologie, et plus particulièrement dans des études multigénérationnelles. Le chapitre IV présente les mécanismes épigénétiques et le concept de mémoire épigénétique en se concentrant sur les modifications de la méthylation de l'ADN. Enfin, le chapitre V s'intéresse à la modélisation mécaniste des effets et présente le modèle DEBtox.
- La partie B concerne l'étude des modifications transgénérationnelles de la méthylation de l'ADN chez *D. magna*. Le premier chapitre comprend les matériels et méthodes précisant l'approche expérimentale suivie et les méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN. Le second chapitre est consacré aux résultats et la discussion.
- La partie C correspond l'analyse mécaniste de données multigénérationnelles par un modèle DEBtox transgénérationnel. Le premier chapitre décrit la structure du modèle DEBtox utilisé, les hypothèses avancées et la méthode d'inférence bayésienne. Le second chapitre présente les résultats obtenus à partir de l'analyse DEBtox et le troisième chapitre discute ces résultats.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives découlant de ce travail de recherche.



---

**PARTIE A.**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## Chapitre I. Les radiations ionisantes dans l'environnement

### 1. Généralités sur les radiations ionisantes

#### 1.1. La découverte de la radioactivité

En 1865, alors qu'il étudiait le passage du courant électrique à travers un gaz à basse pression, le physicien allemand Wilhelm Röntgen a identifié des rayons, qu'il nomma « rayons X » du fait de leur nature inconnue. Il se rendit compte qu'en plaçant un objet entre la source des rayonnements et une plaque photographique, on obtenait un cliché de l'objet avec une transparence variable. C'est ainsi qu'en plaçant la main de sa femme sur le parcours des rayons, il obtint le premier « Röntgenogram » (Figure 1) sur lequel on peut distinguer les os de sa main et ses bagues. Il en déduisit donc que la perméabilité aux rayons dépendait de la composition de la matière.



**Figure 1: Hand mit Ringen (Main avec des bagues): premier cliché radiographique réalisé par Wilhelm Röntgen en 1895 (ENS 2007).**

Très peu de temps après, en 1896, le physicien français Henri Becquerel découvrit, alors qu'il étudiait le phénomène de phosphorescence, que les sels d'uranium émettaient des rayonnements similaires aux rayons X. L'étude de ces rayons uraniques, tels qu'on les appelait à l'époque, devint en 1897 le sujet de thèse de doctorat de la physicienne et chimiste d'origine polonaise Marie Skłodowska-Curie. Durant ses travaux de recherche, elle identifia le caractère ionisant de ces radiations. C'est elle qui est à l'origine du terme « radioactivité ». Elle découvrit également par la suite les éléments polonium et radium, qui sont plusieurs centaines de fois plus radioactifs que

l'uranium (IRSN 2013).

### 1.2. Les différents types de radiations ionisantes issues de la radioactivité

Un rayonnement ionisant est une onde électromagnétique ou corpusculaire, transportant assez d'énergie pour ioniser de façon directe ou indirecte la matière qu'il traverse, c'est-à-dire pour arracher des électrons aux atomes du milieu traversé, les transformant ainsi en ions.

Les radiations ionisantes sont principalement émises par les noyaux instables des éléments radioactifs, dits radionucléides, lors de la désintégration radioactive. L'instabilité d'un noyau est liée à son nombre de nucléons ou à sa composition relative en protons et neutrons. La désintégration radioactive peut se poursuivre jusqu'à l'obtention d'un élément stable. La Figure 2 illustre un exemple de chaîne de désintégration, depuis l'uranium 238, un radioisotope, jusqu'au plomb 206, un élément stable.

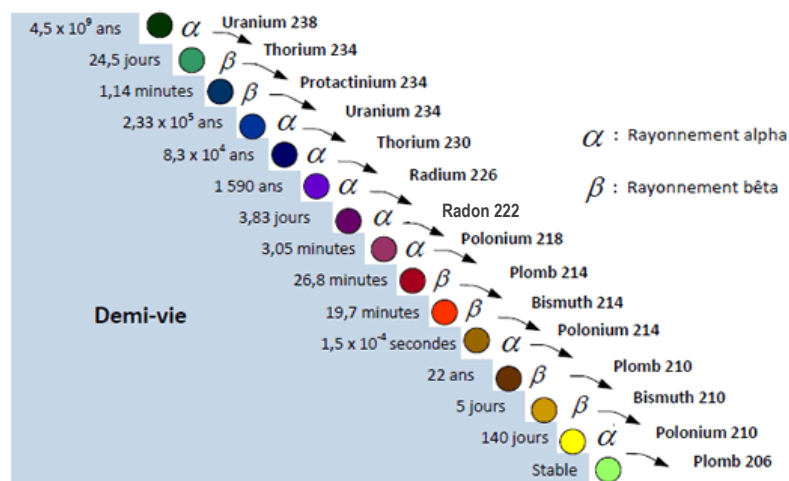


Figure 2 : Chaîne de désintégration de l'uranium 238 (CCSN 2012)

Les différents types de rayonnements ionisants émis lors d'une désintégration nucléaire diffèrent principalement dans leur nature et leur pouvoir de pénétration dans la matière, ils sont détaillés ci-dessous :

- Le rayonnement particulaire alpha ( $\alpha$ ) correspond à un faisceau de noyaux d'hélium composés de deux protons et deux neutrons, appelés particules alpha (Figure 3). Les particules alpha, lourdes et chargées électriquement ont un fort pouvoir d'ionisation, et de fait, un faible pouvoir de pénétration de la matière, une simple feuille de papier suffit à les arrêter (Figure 6).



Figure 3 : Particule alpha

Elles sont émises par des radionucléides de grande masse atomique, tels que l'uranium 238, le thorium 234 ou l'américium 241. L'énergie des particules  $\alpha$ , généralement supérieure à 4MeV, est une caractéristique du noyau émetteur.

- Le rayonnement particulaire beta ( $\beta$ ) correspond à un faisceau d'électrons (rayonnement  $\beta^-$ ), ou de positrons (rayonnement  $\beta^+$ ), émis par le noyau lors d'un excès de neutrons ou de protons, respectivement (Figure 4). Leur pouvoir de pénétration des particules beta est plus important que celui des particules alpha, mais une feuille d'aluminium peut les arrêter (Figure 6). Elles ont également un fort pouvoir d'ionisation. Elles sont émises par certains radionucléides, tels que le potassium 40 ou le tritium ( $H^3$ ). L'énergie des particules  $\beta$  peut varier pour un même noyau émetteur, mais l'énergie moyenne se situe généralement en dessous de 1 MeV.

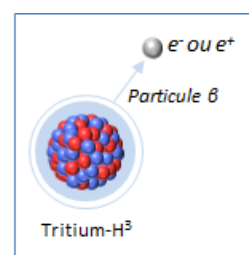


Figure 4 : Particule beta

- Le rayonnement électromagnétique gamma ( $\gamma$ ) correspond à un faisceau de photons. Il est généralement émis lors d'une désintégration nucléaire à la suite de l'émission de rayonnement beta ou alpha. Le rayonnement gamma a un pouvoir d'ionisation si faible qu'il peut pénétrer profondément la matière avant d'avoir perdu toute son énergie. Au moins 10 cm de plomb seront nécessaires à les arrêter (Figure 6). L'énergie des photons gamma émise est spécifique de la nature du noyau émetteur. Le Césium 137, l'Iode 131 et le Cobalt 60 sont des exemples d'émetteurs gamma.

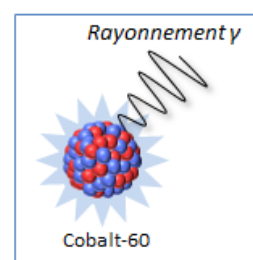


Figure 5 : Rayonnement gamma

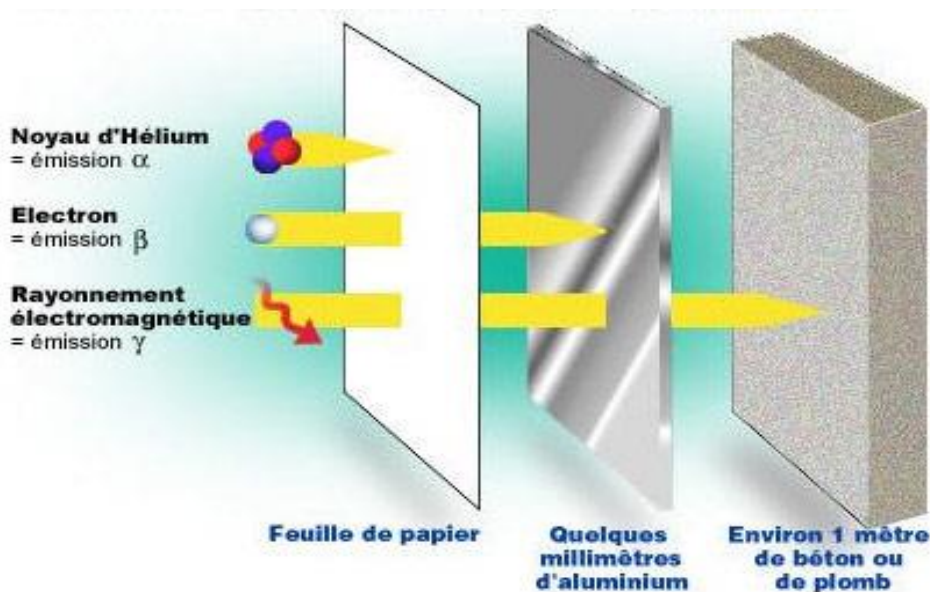


Figure 6 : Le pouvoir de pénétration des différents rayonnements (IRSN, 2016)

### 1.3. Les unités de mesure de la radioactivité

L'activité d'une matière radioactive se mesure en becquerel (Bq). Cette unité correspond au nombre de désintégrations radioactives par seconde se produisant dans la matière étudiée. Cette unité ne prend toutefois pas en compte la nature et l'énergie des rayonnements émis.

La dose absorbée est mesurée en Gray (Gy). Elle correspond à la quantité d'énergie, déposée sous forme de radiation par kilogramme de matière (en  $\text{J.kg}^{-1}$ ). Le débit de dose correspond à la dose absorbée par unité de temps (en Gy par h, Gy par j ou Gy par an).

En radioprotection humaine, la dose absorbée est corrigée par des facteurs de pondération, permettant d'évaluer l'impact des radiations ionisantes sur la santé selon la nature du rayonnement absorbé et la sensibilité du tissu biologique exposé. On parle alors de dose efficace et son unité est le Sievert (Sv).

## 2. Les sources de radiations ionisantes dans l'environnement

### 2.1. Les sources naturelles

Sur Terre, les radiations ionisantes d'origine naturelle proviennent des rayonnements cosmiques, atmosphériques et telluriques (National Research Council, 1999). Les rayonnements cosmiques provenant de l'espace sont constitués en majorité de particules telles que des protons et de noyaux d'hélium. Alors que les particules de plus faible énergie sont stoppées par le champ magnétique

terrestre, l'autre partie interagit avec les particules de l'atmosphère et la composition des rayonnements cosmiques se modifie peu à peu lors de sa propagation dans l'atmosphère. Au niveau du sol, les rayonnements cosmiques sont à 75% composés de muons, des particules au faible pouvoir ionisant. L'intensité des rayonnements cosmiques dépend largement de la latitude, de l'altitude et du cycle solaire. L'interaction des rayonnements cosmiques avec les molécules et les atomes présents en haute atmosphère, produisent un certain nombre de radionucléides, dits cosmogéniques parmi lesquels le tritium ( $^3\text{H}$ ), le carbone-14 ( $^{14}\text{C}$ ), le béryllium-7 ( $^7\text{Be}$ ) et le sodium-22 ( $^{22}\text{Na}$ ) contribuent le plus à l'irradiation de l'environnement.

Le rayonnement tellurique est issu de chaînes de désintégration des radionucléides qui sont présents dans la croûte terrestre depuis la formation de la terre, principalement celles de l'Uranium-238 ( $^{238}\text{U}$ ), de l'Uranium-235 ( $^{235}\text{U}$ ) et du Thorium-232 ( $^{232}\text{Th}$ ) (National Research Council, 1999). Ces radionucléides sont transférés dans les sols, l'air et l'eau (océan, rivière, eaux souterraines...), en quantités variables, dépendant principalement de la géologie locale et des caractéristiques physico-chimiques du radionucléide concerné (solubilité, volatilité...) (UNSCEAR, 2000).

## **2.2. Les sources artificielles**

L'utilisation des radionucléides à des fins industrielles, militaires ou médicales, est à l'origine de rejets radioactifs dans l'environnement. En France, la majeure partie des rejets est liée à la production d'énergie par fission nucléaire. Plus précisément, on compte, par ordre grandeur de rejets annuels, le retraitement du combustible nucléaire (quelques centaines de TBq), les centrales nucléaires de production d'électricité (CNPE) (quelques dizaines de TBq) et l'exploitation minière (quelques GBq) (Ménager et al., 2009).

Dans leur fonctionnement normal, les CNPE sont amenées à rejeter principalement et de manière régulière, sous formes liquide et gazeuse, du  $^3\text{H}$  (entre 25 et 55 TBq en 2017), des gaz rares (entre 1 et 9 GBq), et d'autres radionucléides (entre 5 et 50 GBq) parmi lesquels de l' $^{131}\text{I}$  ou du  $^{14}\text{C}$ , en partie déjà présents à l'état naturel dans l'environnement (ASN, 2017, 2000).

Des sources plus ponctuelles, comme les essais nucléaires atmosphériques (entre 1945 et 1980) et les accidents de l'industrie nucléaire civile ont introduit dans l'environnement des radionucléides

issus de la fission de l'uranium-235 ou du plutonium-239 et absents de l'environnement à l'état naturel. Les accidents nucléaires les plus importants sont ceux des centrales de Tchernobyl en 1986 et de Fukushima en 2011. Pour ces deux accidents, les rejets radioactifs dans l'atmosphère ont consisté en un ensemble de gaz rares et de divers radionucléides, parmi lesquels l'iode-131, le césium-137 et le césium-134 sont les principaux radionucléides présents dans les retombées radioactives dans l'environnement. Une des grandes différences entre ces trois radionucléides est leur demi-vie (Tableau 1). La radioactivité de L'iode-131 décroît rapidement, elle est divisée par 1000 tous les 80 jours. Les césiums seront plus persistants dans l'environnement ; ils seront présents pendant plusieurs années, voire dizaines d'années pour le césium-137 (IRSN, 2011a).

Les rejets atmosphériques totaux survenus à Fukushima représentent environ 10% de ceux estimés lors de l'accident de Tchernobyl (IRSN, 2011a) (Tableau 1). L'ampleur de la contamination radioactive dépend fortement de la quantité de Bq rejetés, ainsi que des conditions météorologiques, régionales et locales qui influencent la dispersion et le dépôt des radionucléides, lors de la période des rejets. Dans le cas de Tchernobyl, les dépôts de césium s'étendent sur des milliers de kilomètres, sur une grande partie de l'Europe, avec 13000 km<sup>2</sup> ayant reçu des niveaux de contaminations supérieurs à 600 kBq.m<sup>2</sup>. Dans le cas de Fukushima, ces niveaux de contamination concernent 600 km<sup>2</sup> ans un rayon de 250 km (Figure 7).

**Tableau 1 : Composition et activité des rejets radioactifs totaux émis lors des accidents des centrales nucléaires de Tchernobyl (1986) et Fukushima (2011).**

Radionucléide artificiel	Demi-vie	Type de rayonnement	Activité des rejets radioactifs (10 <sup>15</sup> Bq)	
			Accident de Tchernobyl (IAEA, 1996)	Accident de Fukushima (IRSN, 2011a)
Iode-131	8,02 jours	Beta, gamma	1300	90
Césium-137	30,15 ans	Beta, gamma	90	10
Césium-134	2 ans	Beta, gamma	50	10



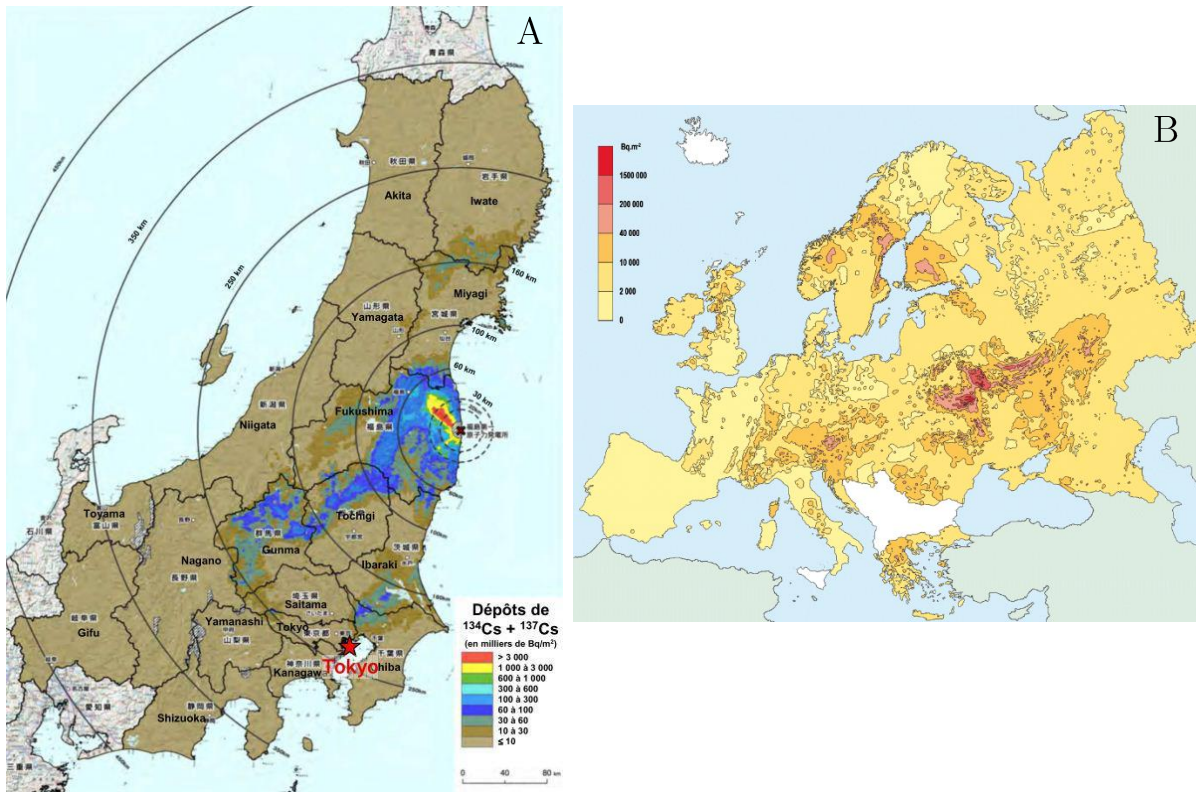


Figure 7: Carte des dépôts rémanents du césium-137 et césium-134 suite à l'accident de la centrale de Fukushima en 2011 (A) et de la centrale de Tchernobyl en 1986 (B) (IRSN, 2014).

Si la contamination radioactive est restée majoritairement continentale pour l'accident de Tchernobyl, une grande partie des rejets atmosphériques provenant de la centrale de Fukushima s'est dispersée puis déposée sur l'océan Pacifique. À ceux-ci s'ajoutent les rejets d'eau contaminée directement vers l'océan, qui s'élèvent à  $27 \cdot 10^{15}$  Bq (IRSN, 2011b). Toutefois, les courants océaniques ont permis une rapide dispersion et la dilution de ces eaux contaminées, si bien que les quantités en Césium-137 dans les zones littorales près de la centrale ont été divisées par 1000 en quatre mois.

### 3. L'exposition des organismes aux radiations ionisantes

#### 3.1. Voies d'exposition

On distingue deux voies d'exposition aux radiations ionisantes :

- L'exposition externe : la source de radiations ionisantes est située à l'extérieur de l'organisme. Ce sont les rayons gamma qui sont essentiellement concernés, et beaucoup moins les particules alpha et beta qui sont facilement arrêtées par l'air et les barrières

biologiques comme la peau.

- L'exposition interne : elle résulte de l'ingestion, l'inhalation ou l'absorption de radionucléides. Ces radionucléides peuvent provenir du milieu physique environnant (air, sol, eau...) ou être présents dans la nourriture. Ici, les particules alpha et beta émises par les radionucléides pourront, selon leur trajet dans l'organisme, déposer leur énergie de manière localisée, au sein d'un organe ou d'un tissu spécifique.

### **3.2. Doses d'irradiation dans l'environnement**

#### **3.2.1 Doses d'irradiation naturelles**

Les doses de radiations ionisantes d'origine naturelle reçues par la faune et la flore dépendent largement de leur habitat et des conditions géochimiques locales. Dans la majorité des cas, on estime que les plantes reçoivent entre 0,02 et 0,7  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , les animaux terrestres entre 0,01 et 0,44  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , et les animaux aquatiques en eau douce entre 0,022 et 0,18  $\mu\text{Gy}/\text{h}$ , les organismes vivant à proximité du fond des lacs et des cours d'eau (benthos) recevant généralement des doses plus élevées que ceux vivant dans la colonne d'eau (pelagos) (Garnier-Laplace et al., 2008). Ces doses peuvent être multipliées par 1000 dans certaines conditions géochimiques particulières (UNSCEAR, 1996).

#### **3.2.2 Doses d'irradiation artificielles**

Dans le contexte des rejets planifiés de radionucléides des centrales nucléaires dans l'air et dans l'eau, il a été estimé que les environnements concernés n'étaient jamais exposés à plus de 0,1  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  et très exceptionnellement à des débits de dose dépassant 1  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  (UNSCEAR, 1996). Il faut cependant tenir compte que ces rejets sont ponctuels et se dispersent rapidement dans l'environnement, aboutissant à des débits de dose moyens reçus par la faune et la flore probablement bien inférieurs à ceux indiqués ci-dessus.

À la suite immédiate des accidents de Tchernobyl et de Fukushima, une exposition aigüe aux radiations ionisantes a eu lieu à proximité des centrales avec des doses totales estimées à 100 Gy à Tchernobyl en l'espace de quelques jours (UNSCEAR, 1996). Les débits de dose ont rapidement diminué, suite à la dispersion et à la désintégration des radionucléides de demi-vie très courte comme l'iode-131. Quelques mois après l'accident de Tchernobyl, les débits de dose estimés étaient supérieurs à 5  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  dans une zone de 4  $\text{km}^2$  autour de la centrale, entre 2 et 5  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ .

<sup>1</sup> dans une zone de 38 km<sup>2</sup> et de 0,5 à 2 mGy.h<sup>-1</sup> dans une zone de 120 km<sup>2</sup> (Coppelstone et al., 2001). À Fukushima, les débits de dose reçus par les écosystèmes terrestres à plus d'une vingtaine de kilomètres de la centrale de Fukushima ont été estimés entre 2 et 6 mGy.h<sup>-1</sup> sur les 30 premiers jours (Garnier-Laplace et al., 2008). Quelques mois après l'accident, ces débits de dose reçus ont été mesurés à des valeurs allant de 0,1 à 47 µGy.h<sup>-1</sup> dans la zone d'exclusion (Fuma et al., 2017).

#### **4. Radioprotection de l'environnement**

Par le passé, l'Humain était la principale cible à protéger contre les radiations ionisantes (ICRP, 1977). On considérait qu'il était l'une des espèces les plus radiosensibles et qu'en protégeant l'Homme, on protégeait également les écosystèmes naturels (ICRP, 1991). (ICRP, 1991). Toutefois cette conception de la radioprotection de l'environnement fut mise à mal par le manque de connaissances sur les effets des radiations ionisantes sur la faune et la flore naturelles (Thompson, 1988), les différences de radiosensibilité entre les espèces et stades de développement (Panter, 1986 ; Rose, 1991 ; Sparrow et al., 1968) et la présence d'habitats naturels, généralement inaccessibles, dans lesquels certains organismes pouvaient être exposés à des limites supérieures à celles admises pour l'Humain (IAEA, 1988). À partir des années 1990, en lien avec la déclaration de Rio (United Nations, 1992b) et la convention sur la diversité biologique (United Nations, 1992a), l'Environnement n'est plus seulement considéré comme un vecteur de contamination radioactive vers l'Humain et sa protection contre les radiations ionisantes est alors considérée comme un objectif à part entière.

La première convention internationale (OSPAR) stipulant la prise en compte des radionucléides dans la protection de l'environnement est ratifiée en 1992 par 15 pays européens, dont la France, et mise en vigueur en 1998. Par la suite plusieurs projets de recherche à l'échelle européenne, les projets FASSET (2000-2003), ERICA (2004-2007), PROTECT (2007-2008) puis le réseau d'excellence STAR (2011-2015) ont pour objectifs de mettre en place une méthodologie pour l'évaluation, la gestion et la communication du risque environnemental associé aux radionucléides (IRSN, 2006). Ces projets de recherches ont notamment permis de définir une liste d'organismes de références (31 au total) afin d'assurer la représentativité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes, mais aussi de définir des valeurs de référence correspondant à des débits de dose seuil pour la protection environnementale. En particulier, la méthode développée dans le cadre

du projet ERICA a permis de dériver une valeur de référence pour la protection générique des écosystèmes lors d'une exposition chronique aux radiations gamma externes, égale à  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , soit  $240 \mu\text{Gy}\cdot\text{jour}^{-1}$  (Garnier-Laplace et al., 2010). Dans cette méthode, une SSD (pour Species Sensitivity Distribution), c'est-à-dire une distribution de la sensibilité des espèces provenant de différents groupes taxonomiques, a été construite à partir des valeurs d'EDR10 les plus faibles pour chaque espèce (Débit de dose à l'origine d'un effet de 10% sur le critère le plus sensible) et a permis d'obtenir, comme valeur de référence, le débit de dose pour lequel 95 % des espèces ne devraient pas subir plus de 10 % d'effet.

Parallèlement à ces projets européens, un certain nombre d'institutions internationales liées à la radioprotection, dont l'IAEA<sup>1</sup>, l'UNSCEAR<sup>2</sup> et l'ICRP<sup>3</sup>, ont proposé d'autres valeurs de références qui diffèrent en matière de méthodologie utilisée pour leur calcul et du niveau de protection considéré (Tableau 2). En effet, contrairement au projet ERICA qui a pour cible la protection générique des écosystèmes, les autres organisations visent la protection des populations. Toutefois, ces valeurs de références sont dérivées pour la plupart de données mesurées à l'échelle de l'individu sans qu'une méthode d'extrapolation vers la population soit explicitement spécifiée, ce qui limite leur application dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental (Howard et al., 2010).

La plus faible valeur de référence pour la protection environnementale reste celle déterminée dans le cadre du projet ERICA, soit  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ . Toutefois, le manque de données sur les effets des faibles doses de radiations sur le long terme (Garnier-Laplace et al., 2008) et la sous-représentation de certains groupes taxonomiques, comme les amphibiens, les reptiles ou les crustacées dans les études utilisées (Copplestone et al., 2001), ne permettent pas de conclure sur la robustesse de cette valeur à protéger les écosystèmes dans leur globalité.

---

<sup>1</sup> IAEA : International Atomic Energy Agency

<sup>2</sup> UNSCEAR : United Nations Scientific Committee on the Effect of Atomic Radiation

<sup>3</sup> ICRP : International Commission on Radiological Protection

**Tableau 2. Valeurs de référence (débit de dose) proposées par différents organismes pour la protection des populations terrestres et aquatiques (IAEA, UNSCEAR, ICRP) ou des écosystèmes dans leur globalité (ERICA), contre les radiations ionisantes.**

	IAEA (1992)	UNSCEAR (1996)	ICRP (2008)	ERICA (Garnier-Laplace et al., 2008)
	$\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$			
<b>TERRESTRE</b>				
<i>Plantes</i>	400	400		10
Arbres			4-40	
Herbes			40-400	
<i>Animaux</i>	40	40-100		10
Invertébrés terrestres			400- 4000	
Mammifères			4-40	
Oiseaux			4-40	
<b>AQUATIQUE</b>				
<i>Organismes d'eau douce</i>	400	400		10
Amphibiens			40-400	
Poissons			40-400	
<i>Organismes marins</i>		400		10
Crustacés			400- 4000	
Poissons plats			40-400	
Algues brunes			400- 4000	
<i>Organismes des fonds marins</i>	1000			10



## Chapitre II. La toxicité des radiations gamma

### 1. Mécanismes de toxicité

#### 1.1. Les lésions moléculaires

En traversant les tissus vivants, les radiations gamma vont déposer leur énergie et ioniser directement ou indirectement les molécules biologiques (ADN, lipides, protéines...). L'ionisation indirecte est liée à l'augmentation du stress oxydant à proximité de ces molécules biologiques via la création de radicaux libres par la radiolyse des molécules d'eau (Hutchinson, 1985). Les cellules étant constitués à 70% d'eau, la majorité des lésions moléculaires seraient liées à l'action des produits finaux de la radiolyse l'eau (OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sub>2</sub><sup>·</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais, pour *Reactive Oxygen Species*) (Desouky et al., 2015).

##### 1.1.1 Les dommages radio-induits à l'ADN

L'ADN peut subir différents types de lésions lors d'une irradiation gamma (Figure 8). Il existe des cassures simple brin (SSB), correspondant à la rupture d'une seule chaîne de l'ADN. Les cassures double brin (DSB) correspondent à la rupture des deux chaînes de l'ADN à moins de 3 nucléotides de distance. Ces cassures sont plus ou moins bien réparables selon leur localisation et leur nombre.

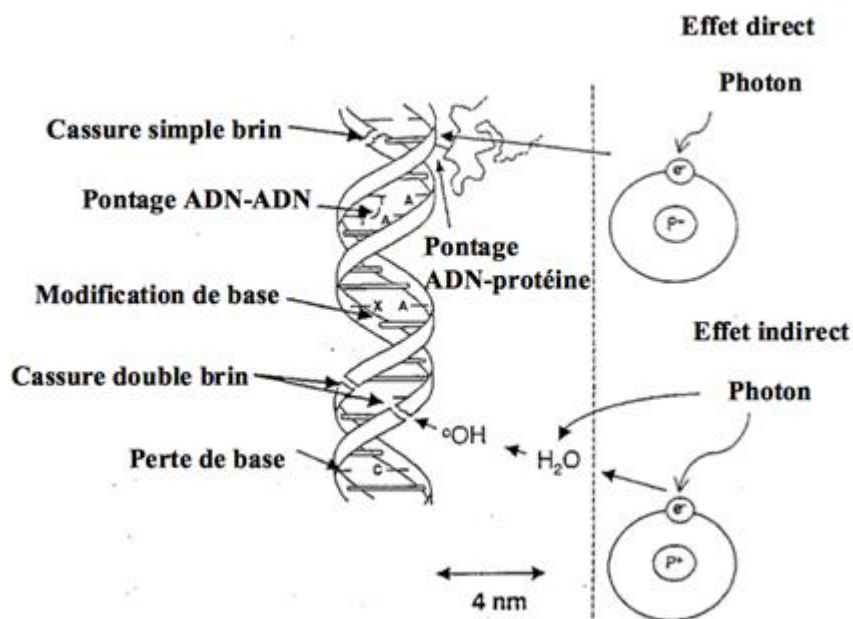


Figure 8. Lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des radiations gamma

Les autres types de dommages radio-induits correspondent à des modifications ou des pertes de base, des pontages, c'est-à-dire l'addition de liaisons covalentes avec les histones ou d'autres protéines environnantes.

Il a été estimé que 1 Gy d'irradiation gamma peut causer 1000 SSB, 500 modifications de bases, 150 pontages et 40 DSB dans une cellule (Graupner et al., 2016).

### 1.1.2 Effets sur les autres biomolécules

L'exposition des protéines aux espèces réactives de l'oxygène produites lors d'une irradiation gamma peut modifier leur structure et altérer leur fonction. Les dommages aux protéines sont, pour la plupart, irréversibles et entraînent généralement leur dégradation. Toutefois, si le nombre de protéines endommagées est trop important, les mécanismes de dégradation deviennent inefficaces (Reisz et al., 2014).

Les lipides constituant les membranes des cellules sont également impactés par l'augmentation du stress oxydant radio-induit. La peroxydation lipidique entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane et des perturbations des gradients d'ions et de divers processus transmembranaires pouvant mener jusqu'à la mort cellulaire (Reisz et al., 2014).

## 1.2. Les réponses cellulaires et tissulaires

Au niveau cellulaire, on distingue trois mécanismes cellulaires principaux en réponse aux radiations ionisantes (Tubiana et al., 2007) :

- La protection contre les espèces réactives de l'oxygène grâce à des antioxydants : Parmi ces antioxydants, on trouve systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxidase, catalase...) ainsi que des molécules non-enzymatiques (vitamines A, C et E, flavonoïdes ...). Ce mécanisme est efficace aux faibles doses, mais perd de son efficacité aux fortes doses.
- La réparation de l'ADN : Les cassures simple brin sont généralement réparées par un mécanisme qui se conforme au brin d'ADN complémentaire pour réparer celui qui est endommagé. Ce mécanisme intervient rapidement et efficacement. La réparation des cassures double-brin nécessite l'intervention de plusieurs mécanismes enzymatiques et du



fait de sa complexité est plus susceptible d'engendrer des erreurs. Plus le nombre et la complexité des cassures sont élevés et moins les mécanismes de réparation seront efficaces et fidèles. Les réparations erronées des cassures double brin sont à l'origine d'aberrations chromosomiques et de mutations, entraînant souvent la mort cellulaire, ou l'apparition de dysfonctionnements sur le long terme en cas de survie de la cellule, comme les cancers chez les mammifères. Lorsque les mutations radio-induites surviennent dans les cellules germinales et qu'elles ne sont pas létales, elles peuvent être transmises à la descendance et être à l'origine de différentes maladies héréditaires et de malformations (Hall, Giaccia, 2006).

- La mort cellulaire : Lorsque les lésions de l'ADN sont trop nombreuses et que les mécanismes de réparation sont dépassés, deux types de morts cellulaires peuvent avoir lieu. La mort cellulaire par nécrose intervient de façon passive lors d'une irradiation à fortes doses. Quant à la mort cellulaire programmée, appelée apoptose, elle permet d'éliminer les cellules endommagées et d'éviter leur prolifération. Toutefois, la mort d'un grand nombre de cellules en même temps, accompagnée d'un faible renouvellement cellulaire peut être à l'origine d'importants dysfonctionnements tissulaires. La sensibilité des cellules dépend du tissu auquel elles appartiennent : les cellules qui se divisent régulièrement, comme les cellules de l'intestin, de l'épiderme ou les spermatogonies, rentreront en mort cellulaire beaucoup plus rapidement que les cellules qui se divisent peu (Hall, Giaccia, 2006). Cette différence de sensibilité entre les tissus est à l'origine d'effets précoces d'une part, et d'effets tardifs d'autre part.

### ***1.3. Synthèse des mécanismes de toxicité***

La Figure 9 est une synthèse de l'ensemble des effets des radiations ionisantes de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire au cours du temps.

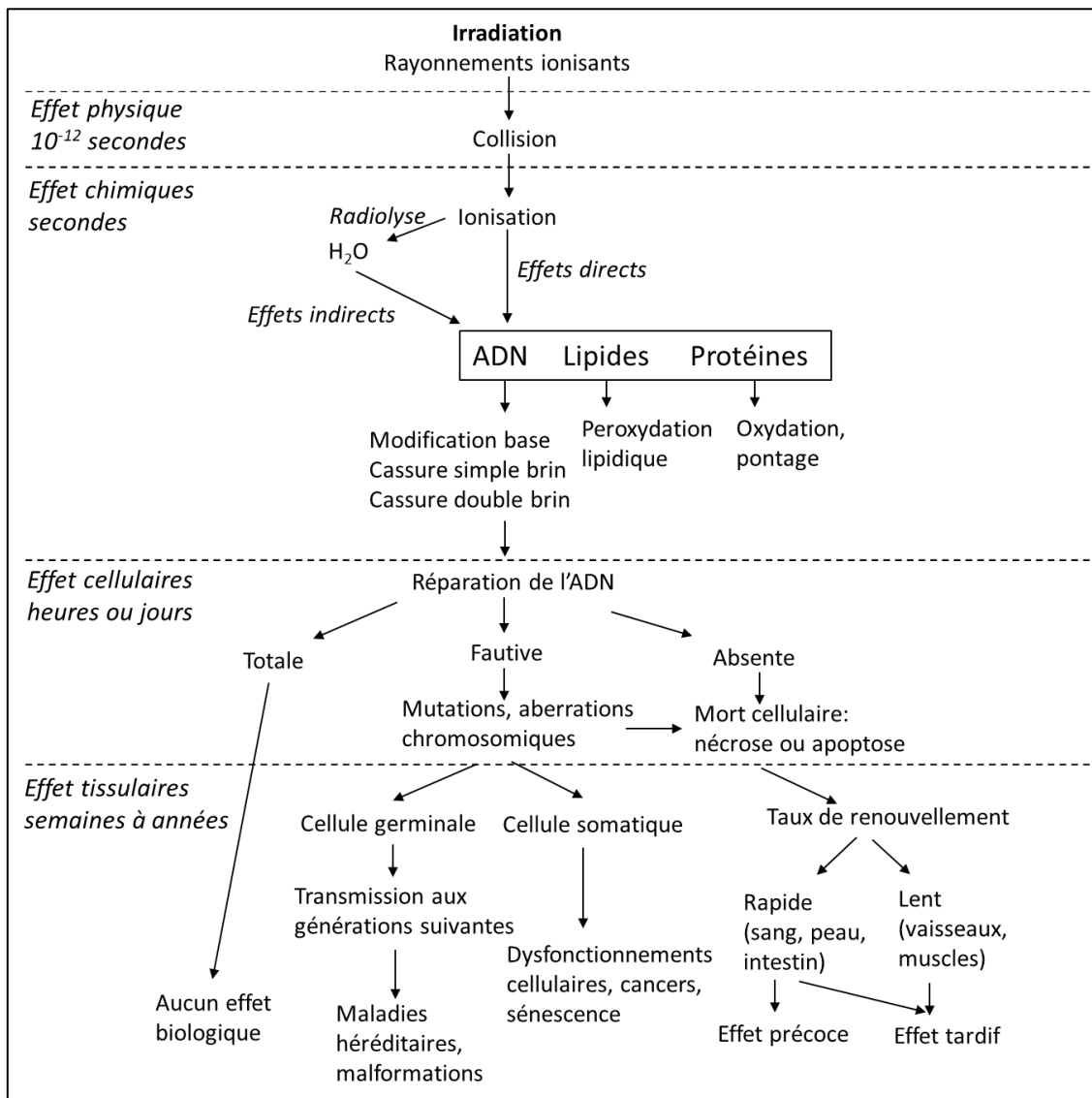


Figure 9. Effets biologiques des radiations ionisantes de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire, en fonction du temps (modifiée d'après(Haton, 2005))

#### 1.4. Caractéristiques cellulaires et physiologiques déterminant la radiosensibilité des espèces

La sensibilité des espèces aux radiations ionisantes est déterminée par diverses caractéristiques cellulaires et physiologiques (Adam-Guillermin et al., 2018), parmi lesquelles :

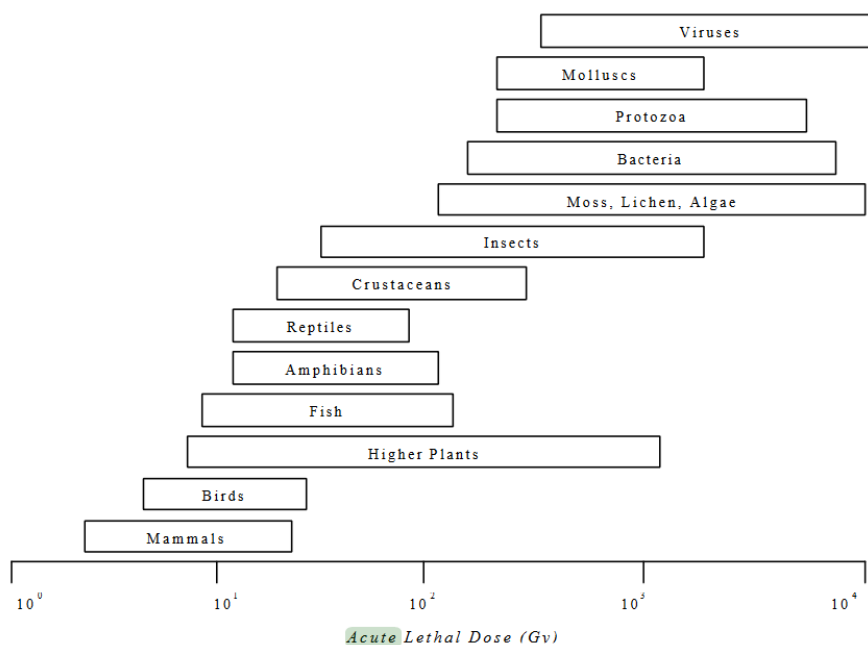
- L'efficacité de la protection contre les espèces réactives de l'oxygène
- La taille du génome : Plus le génome est grand, et plus le nombre de lésions risque d'être élevé.
- La condensation de l'ADN : plus l'ADN est compacté dans le noyau et moins il sera exposé.
- L'efficacité des mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN
- La capacité des cellules à se renouveler pour remplacer les cellules tuées ou endommagées

par les radiations.

## 2. Les effets biologiques des radiations gamma

### 2.1. Toxicité aigüe

La toxicité aigüe fait référence aux effets qui suivent une exposition aux radiations ionisantes sur un temps court. Les expositions aigües concernent la majorité des travaux sur les effets des radiations ionisantes et les doses utilisées dépassent généralement 0,1 Gy sur des durées de quelques minutes à quelques heures. Le principal critère mesuré est la dose entraînant 50% de mortalité chez les organismes étudiés (DL50). Il existe une grande variabilité de DL50 entre les organismes, mettant en évidence de grandes différences de radiosensibilité (Figure 10).



**Figure 10. Gamme de doses létales entraînant 50 % de mortalité (DL50) pour différents groupes taxonomiques (Copplestone et al., 2001).**

Les mammifères sont les plus radiosensibles avec des DL50 variant de 2 à 15 Gy, ensuite viennent l'ensemble des vertébrés et les plantes supérieures, puis pour finir l'ensemble des invertébrés et des organismes unicellulaires. Les organismes sont généralement plus sensibles dans leurs stades de vie précoces. Par exemple, la DL50 d'une souris est de 6,5 Gy au stade adulte et de 1 Gy seulement au stade embryonnaire (Copplestone et al., 2001).

Dans la nature, les expositions aigües aux radiations ionisantes sont plutôt rares. Elles sont notamment intervenues dans les premiers temps des accidents nucléaires. Juste après l'accident

de Tchernobyl, on a observé une très grande mortalité des pins dans une zone 600 ha autour de la centrale où la dose reçue en 2 mois était de 60 à 100 Gy. De plus, la densité des invertébrés du sol a été divisée par 30 suite à la mortalité des œufs et des stades juvéniles, celle des rongeurs par 2 à 10 dans un rayon de quelques kilomètres de la centrale (Geras'kin et al., 2008).

## **2.2. Toxicité chronique**

La toxicité chronique des radiations ionisantes fait référence à leurs effets sur le long terme. La majorité des études concernant une exposition chronique ont mesuré des effets sublétaux, tels que les effets sur la reproduction, la morbidité, c'est-à-dire la performance générale de l'organisme (croissance, comportement...) et l'apparition de mutations ou de modifications chromosomiques. Ici, sera fait référence uniquement aux études qui se sont déroulées sur des durées ne dépassant pas la longévité de l'organisme, c'est le cas de la plupart des études en écotoxicologie.

### *Reproduction*

La reproduction est généralement le critère le plus sensible aux radiations ionisantes, que ce soit en matière de capacité à produire des descendants (fertilité) ou de viabilité des descendants produits (fécondité). On estime que la dose minimum affectant la fécondité représente, dans beaucoup de cas, moins de 10 % de la dose nécessaire à une mortalité directe (UNSCEAR, 1996). Cette sensibilité est vraisemblablement la conséquence de la division et différenciation rapides des cellules à l'origine de la production des gamètes.

Chez le rat, une réduction significative du nombre de spermatogonies a été observée dès 0,44 mGy.h<sup>-1</sup> sur une durée de 1 mois, se stabilisant sur les 4 mois suivants (Erickson, 1978). Chez la souris femelle, une réduction significative du nombre d'oocytes a été constatée dès 0,94 mGy.h<sup>-1</sup> dans le cas d'une exposition du stade embryonnaire sur 4 jours et dès 2,1 mGy.h<sup>-1</sup> dans le cas d'une exposition au stade adulte sur 4 jours (Rönnbäck, 1983). De plus, une irradiation chronique des femelles au stade juvénile a entraîné une réduction significative de la fertilité dès 1,3 mGy.h<sup>-1</sup> et une stérilité à partir de 5,22 mGy.h<sup>-1</sup> (Rönnbäck, 1967). Chez le chien (beagle), la stérilité du mâle a été rapportée après une exposition de plusieurs mois à 0,8 mGy.h<sup>-1</sup> au stade adulte (UNSCEAR, 1996).

Chez les poissons, plusieurs études ont montré une diminution des performances reproductives

significatives pour des débits de dose entre 1,67 et 14,58 mGy.h<sup>-1</sup> et des durées allant de 28 jours à 30 semaines (Adam-Guillermin et al., 2012). Les poissons exposés à des débits de dose allant de 52 à 97 mGy.h<sup>-1</sup> pendant la totalité de leur stade embryonnaire se sont développés normalement au stade adulte, mais leurs cellules germinales étaient totalement détruites. La régénération des cellules ne semble possible qu'en dessous de 21 mGy.h<sup>-1</sup> (Adam-Guillermin et al., 2012).

Chez le ver polychète, *Neanthes arenaceodentata*, l'exposition durant la totalité du cycle de vie (~130 jours) a entraîné une diminution du nombre d'embryons produits à 17 mGy.h<sup>-1</sup>, et une diminution de la viabilité des embryons à partir de 0,19 mGy.h<sup>-1</sup> (Harrison, Anderson, 1989). Chez l'annélide *Eisenia fetida*, une exposition à 17 mGy.h<sup>-1</sup> pendant 10 semaines a réduit l'éclosion des cocons à partir de la 6<sup>e</sup> semaine, mais pas le nombre de cocons produits. Toutefois, après l'arrêt de l'irradiation, les vers retrouvent un taux d'éclosion normal (Hertel-Aas et al., 2011). Pour le crustacé *D. magna*, le nombre de larves produites est réduit à partir d'une exposition à 31 mGy.h<sup>-1</sup> pendant tout leur cycle de vie depuis le stade néonate (23 jours au total) (Gilbin et al., 2008).

### *Morbidité*

Il existe globalement peu d'études rapportant les effets d'une irradiation gamma chronique sur le développement et la croissance des organismes. Chez le rat, une diminution de la masse du cerveau a été observée à des débits de dose entre 5 et 10 mGy.h<sup>-1</sup> (Real et al., 2004). Chez le crustacé *Daphnia magna*, un faible effet sur la croissance en taille a été mesuré à partir de 23 jours à 35,4 mGy.h<sup>-1</sup> en première génération (Parisot et al., 2015), mais aucun effet sur leur croissance en masse n'a été détecté aux débits de dose testés, entre 0,41 et 31 mGy.h<sup>-1</sup> (Gilbin et al., 2008).

### *Mutations et génotoxicité*

Dans les spermatogonies de souris, la fréquence de mutation sur 7 loci spécifiques a été multipliée par 5 pour des débits de dose entre 1 et 5 mGy.h<sup>-1</sup> (Real et al., 2004). De plus, une étude sur des lignées cellulaires de poisson-zèbre a montré que les cellules germinales étaient très sensibles aux altérations de l'ADN radio-induites, apparaissant dès 24 heures à 41,7 µGy.h<sup>-1</sup> contre 31,25

mGy.h<sup>-1</sup> pour les cellules du foie (Adam-Guillermin et al., 2012). Des études *in vivo* chez le poisson-zèbre ont montré l'apparition d'altération à l'ADN dès 0,42 mGy.h<sup>-1</sup> sur les deux premiers jours post-fertilisation (Bourrachot, 2009) et dès 1,2 mGy.h<sup>-1</sup> pour une irradiation sur 24 heures à partir du 5<sup>e</sup> jour post-fertilisation (Jarvis, Knowles, 2003). Par comparaison avec les vertébrés, il existe très peu d'études sur les effets génotoxiques d'une irradiation gamma chronique. Une étude conduite avec le ver polychète, *Neanthes arenaceodentata*, a montré que le nombre d'aberrations chromosomiques était doublé par rapport au témoin, pour une exposition à 0,4 mGy.h<sup>-1</sup> pendant 24 heures. À des débits de dose plus élevés, 70 et 130 mGy.h<sup>-1</sup>, le nombre d'aberrations chromosomiques était inférieur à celui des témoins, suggérant une élimination des altérations par apoptose (Adam-Guillermin et al., 2012). De plus, Parisot et al. (2015) ont mis en évidence l'apparition d'altérations de l'ADN chez *D. magna* à partir de 23 jours à 7 µGy.h<sup>-1</sup>.

Les effets génotoxiques apparaissent généralement à des débits de dose plus faibles que les effets macroscopiques ou démographiques, à l'échelle de l'individu ou la population. Ils sont de bons candidats pour servir comme des indicateurs précoces de conséquences défavorables sur le long terme (Dallas et al., 2012). En outre, l'induction de mutations dans les cellules germinales introduit la possibilité d'une transmission aux générations suivantes.

### **2.3. Effets multigénérationnels**

Dans les zones contaminées, les populations sont généralement exposées aux radiations ionisantes pendant de longues périodes, pouvant dépasser la longévité des organismes et impliquer plusieurs générations. De plus, les contaminants génotoxiques peuvent entraîner des effets sur des générations non exposées, par la transmission de dommages via les gamètes, appelés effets transgénérationnels (Depledge, 1998).

Malgré ce constat, peu d'études traitent de l'exposition multigénérationnelle et des effets transgénérationnels des radiations ionisantes.

#### **2.3.1 À l'échelle moléculaire**

Plusieurs études conduites avec des souris ou des rats ont montré que l'irradiation des gamètes précédant la fertilisation entraînait une augmentation dans la descendance des taux de mutation, nommée instabilité génomique (Barber et al., 2006 ; Dubrova et al., 2000 ; UNSCEAR, 2006) (UNSCEAR, 2006). Toutefois, l'héritabilité de ces mutations ne suivant pas les lois de Mendel,

il a été suggéré que cette instabilité génétique ne serait pas liée à la transmission directe de mutations du parent irradié à sa descendance, mais à des modifications héréditaires de facteurs contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Barber, Dubrova, 2006). Ce type de modifications est qualifié d'épigénétique. Le Chapitre IV est consacré à l'épigénétique et le concept de modifications épigénétiques transgénérationnelles y sera approfondi.

Parmi les quelques études concernant des espèces non-mammifères, Shimada et Shima (2004) ont montré que l'irradiation aigüe du sperme du poisson medaka, *Oryzias latipes*, à 4,75 Gy multipliait par trois la fréquence des mutations apparaissant lors du développement des embryons. Toutefois, cette instabilité génomique n'a pas été détectée à la génération suivante. Une autre étude sur le même poisson a montré que les dommages à l'ADN (cassures double brin et guanines oxydées) augmentaient de façon non-linéaire au cours des quatre générations exposées à 0,1 ou 0,87 mGy.h<sup>-1</sup> (Grygoryev et al., 2013). La quantité plus importante de dommages à l'ADN à 0,1 mGy.h<sup>-1</sup> par rapport à 0,87 mGy.h<sup>-1</sup> dans les quatre générations, suggèrerait un seuil de dommage minimum pour l'activation des mécanismes de réparation, ce qui entrainerait l'accumulation de dommages non réparés aux faibles débits de dose.

### 2.3.2 À l'échelle macroscopique

Quelques études se sont penchées sur les changements de sensibilité aux radiations gamma au fil des générations. Knowles et Greenwood (1994) ont testé les effets d'une exposition chronique (de 1,7 à 13,7 mGy.h<sup>-1</sup>) chez le polychète marin, *Ophryotrocha diadema*, sur 7 générations. Dans la première génération, un effet sur le nombre d'œufs et de larves produites a été observé uniquement au débit de dose le plus élevé. En deuxième et troisième générations, l'effet sur la reproduction a été observé dès 3,2 mGy.h<sup>-1</sup> et en septième génération, seulement à partir de 7,7 mGy.h<sup>-1</sup>. Ces résultats suggèreraient la sélection d'organismes plus résistants aux radiations au fil des générations. Une autre étude sur l'annélide *Eisenia fetida*, a rapporté une réduction significative du nombre de larves produites dès 4,2 mGy.h<sup>-1</sup> en première génération et seulement à partir de 11 mGy.h<sup>-1</sup> en seconde génération, associée à une atténuation des effets au fil des semaines (Hertel-Aas et al., 2007). Cette diminution de sensibilité dès la deuxième génération suggère la mise en place de mécanismes d'adaptation en réponse à l'exposition aux radiations gamma. Chez le nématode, *C. elegans*, une aggravation des effets sur la reproduction a été

détectée entre la génération F0 et F2 au plus fort débit de dose, soit 42,7 mGy.h<sup>-1</sup> (Buisset-Goussen et al., 2014). Chez *D. magna*, Parisot et al. (2015) ont observé une diminution significative de la croissance et la fécondité à 35,4 mGy.h<sup>-1</sup> en première génération (F0), puis une atténuation de ces effets en génération F1 et finalement un retard de croissance et de ponte significatif dès 0,07 mGy.h<sup>-1</sup> en génération F2. Ces effets à l'échelle de l'organisme se sont accompagnés de l'observation d'altérations de l'ADN suivant les mêmes tendances, mais à des débits de dose plus faibles. Ainsi, des altérations de l'ADN ont été mesurées dans la génération F0 à partir de 4,7 mGy.h<sup>-1</sup> au stade néonate et dès 0,007 mGy.h<sup>-1</sup> après 26 jours d'exposition. Elles sont restées principalement observables à 35,4 mGy.h<sup>-1</sup> dans la génération F1, et ont été observées dès 0,007 mGy.h<sup>-1</sup> tout au long de la génération F2. L'accumulation et la transmission de ces altérations à l'ADN entre les générations est l'un des mécanismes moléculaires possibles, avancés pour expliquer la dynamique des effets au fil des générations.

#### **2.4. Confrontation des études en laboratoire avec les données de terrain**

La comparaison des effets des radiations ionisantes entre les tests expérimentaux et le terrain a montré que les organismes vivant dans des zones contaminées, près de la centrale de Tchernobyl, semblaient plus sensibles que ceux exposés au laboratoire (Garnier-Laplace et al., 2013) (Figure 11).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence. L'une d'elles est l'influence de nombreux facteurs confondants qui sont difficiles à prendre en compte dans les résultats sur le terrain. En effet, un grand nombre de facteurs abiotiques (température, composition physico-chimique...) et biotiques (disponibilité de la nourriture, compétition intra et interspécifique, prédation...), ainsi que la présence d'autres polluants, peuvent influencer la sensibilité des organismes aux radiations ionisantes (Garnier-Laplace et al., 2013 ; Møller, Mousseau, 2011). De plus, la modification de la sensibilité des organismes sur le long terme est rarement prise en compte dans les études au laboratoire.



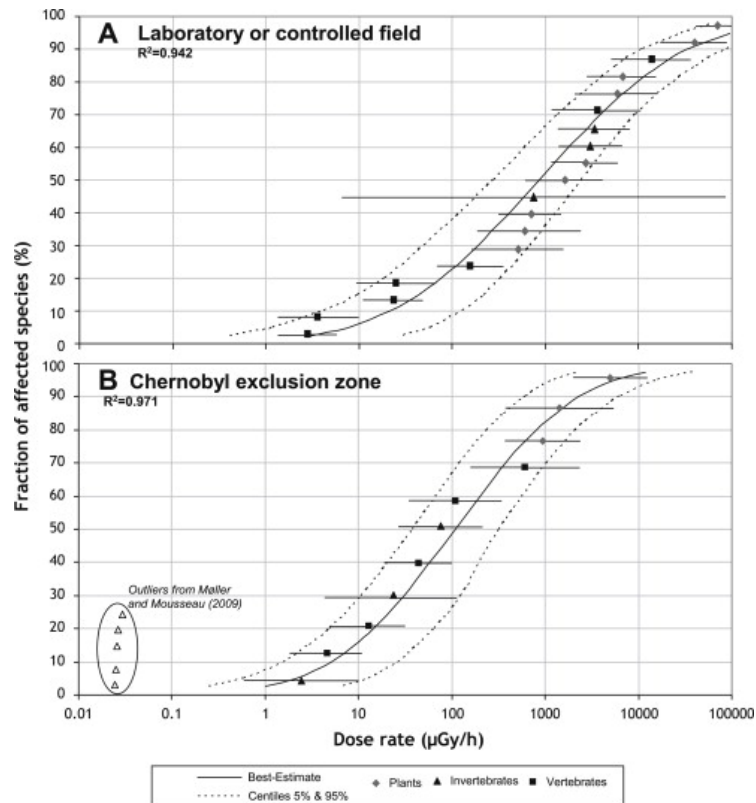


Figure 11. Comparaison de la radiosensibilité des espèces, avec en A, la distribution de sensibilité des espèces (SSD) ajustée aux valeurs minimales de EDR<sub>10</sub> (débits de dose à l'origine entraînant 10% d'effets) pour des espèces exposées aux radiations ionisantes en conditions contrôlées au laboratoire, et en B, la SSD ajustée aux valeurs minimales de EDR<sub>10</sub> acquises sur le terrain dans la zone d'exclusion de Tchernobyl (Garnier-Laplace et al., 2013). L'erreur-standard de chaque EDR<sub>10</sub> estimé est représenté par une barre horizontale.



## Chapitre III. *Daphnia magna*, comme modèle biologique

Dans le cadre de l'étude d'effets transgénérationnels, l'espèce *D. magna* constitue un candidat idéal. Elle présente en effet une facilité de manipulation en laboratoire, un cycle court et des pontes abondantes qui permettent d'étudier plusieurs générations sur une durée limitée. De plus, sa reproduction clonale assure une homogénéité génétique qui facilite l'étude des modifications épigénétiques et de leur transmission au fil des générations.

### 1. Caractéristiques biologiques et écologiques

*D. magna* est un microcrustacé d'eau douce de l'ordre des Cladocères. Le genre *Daphnia* comprend une trentaine d'espèces, mais *D. magna* et *D. pulex* sont les espèces les plus étudiées dans les domaines de l'écologie, de la génomique comparative et de l'écotoxicologie.

Organismes communs des lacs et des étangs, elles constituent notamment un maillon important de la chaîne trophique des écosystèmes aquatiques, en tant que consommatrices de phytoplancton et elles-mêmes sources de nourriture pour de nombreuses espèces.

Les caractéristiques biologiques de *D. magna* sont essentiellement détaillées à partir de l'ouvrage de référence *Introduction to Daphnia biology* (Ebert, 2005).

#### 1.1. Habitat

Les daphnies sont présentes sur tous les continents, toutefois *D. magna* est restreinte à certaines parties de l'hémisphère nord. L'espèce vit dans des étendues d'eau douce de tailles variées, allant de petites mares éphémères aux grands lacs. Le pH optimal de l'eau pour *D. magna* se situe entre 7,2 et 8,5 et sa tolérance de salinité peut aller jusqu'à 20%, une valeur plus élevée que la plupart des espèces du genre *Daphnia*.

#### 1.2. Morphologie

Les femelles *D. magna* mesurent entre 1,5 à 5 mm à la taille adulte. Elles possèdent une carapace de chitine transparente comprenant une ouverture ventrale (Figure 12).

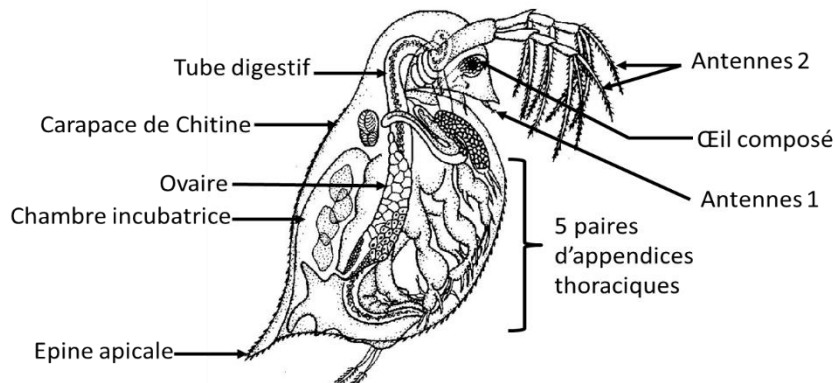


Figure 12. Morphologie d'une femelle *Daphnia magna*.

Cinq paires d'appendices thoraciques génèrent un courant à l'intérieur de l'ouverture thoracique de la carapace et permettent la filtration des particules en suspension, telles que les micro-algues, et leur acheminement jusqu'à la bouche. Leur première paire d'antennes constitue un organe sensoriel et leur seconde paire d'antennes leur permet de se déplacer dans la colonne d'eau. Elles possèdent un œil unique, fusionné, composé d'une vingtaine de facettes, qui leur sert à s'orienter. Les mâles se caractérisent par une taille inférieure et une première paire d'antennes plus développée intervenant dans l'accouplement.

### 1.3. Cycle de vie et reproduction

Les daphnies ont deux modes de reproduction : la reproduction asexuée (parthénogenèse) et la reproduction sexuée (Figure 13).

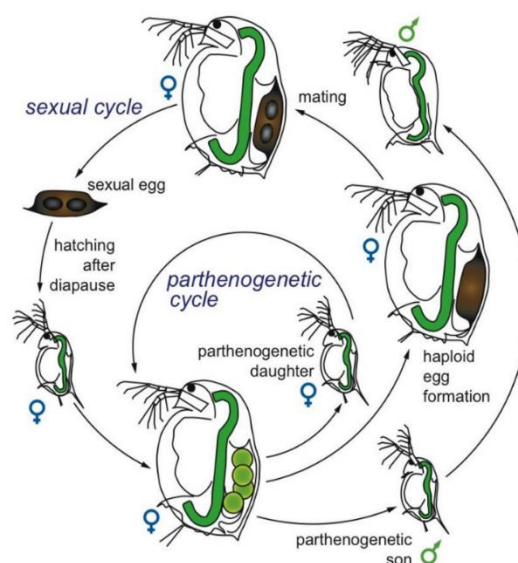


Figure 13 : Cycle de vie de *Daphnia magna*. On distingue un mode de reproduction sexué et un mode parthénogénétique (Ebert, 2005).

### 1.3.1 Reproduction parthénogénétique

En conditions environnementales favorables, les femelles *D. magna* vont principalement se reproduire de manière asexuée, via la production d'œufs parthénogénétiques diploïdes qui donneront des femelles (Figure 14).



**Figure 14. *Daphnia magna* femelles au stade adulte, avec une portée d'œufs parthénogénétiques (A), et avec deux œufs de conservation enveloppés dans une poche protectrice, l'éphippie (B) (photos par Dieter Ebert, Bâle, Suisse, CC BY-SA 4.0).**

En conditions trophiques optimales, les femelles produisent leur première ponte le 6<sup>e</sup> jour puis tous les 3 à 4 jours jusqu'à leur mort. Chaque ponte est suivie immédiatement par une mue. La taille des pontes, comportant plusieurs dizaines d'œufs, augmente généralement jusqu'à la 5<sup>e</sup> ponte, puis se stabilise ou tend à diminuer dans les pontes suivantes suivant le clone étudié (Anderson, Jenkins, 1942). Les œufs sont déposés dans la poche incubatrice dorsale et les embryons s'y développent pendant 3 jours, avant d'éclore et d'être libérés dans le milieu. Les daphnies fraîchement écloses sont appelées « néonates ». Elles entrent dans une phase de croissance maximale, où se succèdent de 4 à 6 mues, jusqu'à leur première ponte. Au stade adulte, la croissance ralentit et finit par se stabiliser autour de la 5<sup>e</sup> ponte.

### 1.3.2 Reproduction sexuée

En conditions environnementales moins favorables, notamment en cas de fortes densités de daphnies et de faibles disponibilités en nourriture, on observe l'émergence de mâles au sein de la génération parthénogénétique. Les mâles peuvent s'accoupler avec les femelles, ce qui donnera lieu à une fertilisation interne des gamètes femelles haploïdes. Cette reproduction sexuée est à l'origine de la production d'œufs latents (Figure 14). Entourés d'une poche protectrice appelée éphippie, les œufs latents, généralement au nombre de deux, sont expulsés dans le milieu au moment de la mue et rentrent en phase de diapause pendant plusieurs mois voire plusieurs

années, jusqu'à ce que des conditions plus favorables (température, photopériode, humidité ...) permettent leur éclosion.

## **2. *Daphnia magna* en écotoxicologie**

### **2.1. Utilisation et atouts**

*D. magna* a été utilisée depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle dans les tests toxicologiques. Ernest Warren l'utilisa en 1900 pour tester la toxicité du chlorure de sodium et fut le premier à établir un lien entre la concentration, la durée d'exposition et la réponse de l'organisme. Avec l'essor de l'industrie pharmaceutique dans la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle et l'évolution rapide de la toxicologie moderne, *D. magna* a été beaucoup utilisée pour définir les modes d'action et l'efficacité de toutes sortes de médicaments (Shaw et al., 2008). *D. magna* fut également la première espèce utilisée pour tester la qualité de l'eau potable (Naumann, 1929), puis servit à l'estimation de la toxicité aiguë de différents contaminants chez les espèces aquatiques, en mesurant des critères comme la mortalité et l'immobilisation (Anderson, 1945, 1944 ; Breukelman, 1932). Plus tard, des tests de toxicité chronique, basés sur la reproduction et la survie sur le long terme ont été développés (Adema, 1978 ; Biesinger, Christensen, 1972 ; Maki, 1979 ; Winner, Farrell, 1976). Face au constat que des facteurs expérimentaux abiotiques (température, luminosité, pH, composition de l'eau...) et biotiques (nourriture, souche des daphnies, compétition entre les individus...) (Buikema et al., 1980 ; Cairns et al., 1975 ; Davis, 1977) pouvaient largement influencer les résultats des tests de toxicité, une standardisation des conditions expérimentales de différents tests de toxicité, dont les tests d'immobilisation et de reproduction avec *Daphnia sp.*, a été mise en place à travers la production de lignes directrices OCDE en Europe (OECD, 1982) et EPA aux Etats-Unis (EPA, 1982). Ces lignes directrices ont ensuite été révisées de nombreuses fois (OECD, 2012, 2004). En 2007, les daphnies représentaient 8% des données de tests de toxicité dans les bases de données toxicologiques (Denslow et al., 2007). *D. magna* a été identifiée comme une espèce aquatique particulièrement sensible à toute une gamme de contaminants chimiques (pesticides, métaux lourds, polluants organiques, composés azotés...), s'agissant aussi bien de toxicité chronique qu'aiguë (Mark, Solbé, 1998 ; Martins et al., 2007 ; May, Hahn, 2015).

L'utilisation très commune de *D. magna* dans les tests de toxicité est liée à plusieurs de ses

caractéristiques, notamment à sa facilité d'élevage en laboratoire, grâce à une petite taille, son cycle de vie court ainsi qu'un milieu de culture et une nourriture faciles à préparer (Shaw et al., 2008). De plus, son mode de reproduction parthénogénétique permet, par la production de clones, d'analyser la réponse de l'organisme à différents contaminants tout en limitant la variabilité génétique entre les individus. Cette dernière caractéristique, à laquelle s'ajoute le séquençage (en cours) du génome (Orsini et al., 2017), en fait une espèce particulièrement pertinente dans le domaine de l'écotoxicologie moléculaire (Kim et al., 2015 ; Shaw et al., 2008).

### **2.2. Utilisation dans des études multigénérationnelles et transgénérationnelles**

*D. magna* a été utilisée dans plusieurs études traitant des effets de divers contaminants environnementaux au fil des générations, par exemple ceux des métaux lourds, des antibiotiques, des perturbateurs endocriniens, et des radionucléides. Certaines études concernent une exposition sur plusieurs générations, dite multigénérationnelle, et d'autres études se concentrent sur la transmission d'effets d'une génération exposée à leur descendance, appelés effets transgénérationnels.

Les résultats des expositions multigénérationnelles montrent, au fil des générations, soit une augmentation de la résistance des daphnies aux contaminants, soit une augmentation de leur sensibilité :

Plusieurs études ont, ainsi, mis en évidence une diminution de la sensibilité des daphnies exposées aux métaux lourds. Ward et Robinson (2009) ont montré que la DL50 de cadmium passait de 26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  à 120  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de la première à la huitième génération et Muysen et Janssen (2001) que la tolérance au zinc augmentait avec les générations. Une autre étude concernant l'antibiotique tétracycline a montré une meilleure résistance des daphnies au fil des générations (Kim et al., 2014). Un mécanisme génétique a parfois été suggéré pour expliquer l'apparition d'une plus grande résistance au fil des générations (Ward, Robinson, 2009), mais d'autres études penchent plutôt pour un mécanisme d'acclimatation résultant de la plasticité phénotypique des daphnies (Kim et al., 2014 ; Muysen, Janssen, 2001).

À l'inverse, d'autres études ont mis en évidence une augmentation de la sensibilité des daphnies au fil des générations. Ainsi, Brausch et Salice (2011) montrent une diminution progressive de la

taille de génération en génération lors d'une exposition à un pesticide et Chen et al. (2014) montrent des effets de plus en plus prononcés sur la survie, la taille et le nombre de descendants lors d'une exposition à un herbicide. En ce qui concerne les effets des radionucléides, plusieurs études multigénérationnelles ont également mis en évidence une augmentation de la sensibilité des daphnies au fil des générations. Massarin et al. (2010) ont montré, lors de l'exposition de trois générations à l'uranium appauvri, une aggravation des effets sur la croissance en taille, la reproduction et le taux d'assimilation du carbone entre les générations F0 et F2. Une analyse DEBtox de ces résultats suggère que le mode d'action toxique le plus vraisemblable pour l'uranium appauvri est une réduction de l'assimilation. Ce mode d'action ne permettant pas à lui seul d'expliquer l'aggravation des effets au fil des générations, Plaire et al. (2013) a étudié le rôle des dommages à l'ADN lors d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium appauvri. Cette étude a montré que ces dommages s'accumulent et se transmettent parallèlement à l'augmentation de la sensibilité des organismes à l'uranium appauvri. C'est une approche similaire à celle employée pour étudier l'exposition multigénérationnelle aux radiations gamma du Cs-137 (Parisot et al., (2015), déjà présentée dans le Chapitre II (paragraphe 2.3.2). En outre, Alonzo et al. (2008) ont également montré que l'exposition multigénérationnelle aux radiations alpha ( $^{241}\text{Am}$ ) entraînait une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies sur trois générations.

Chez la daphnie, d'autres études se sont penchées sur la persistance ou l'atténuation des effets au fil des générations, après l'arrêt de l'exposition au stressor environnemental (Andrewartha, Burggren, 2012 ; Martins, Guilhermino, 2018). Récemment, Castro et al. (2018) a évalué les effets de quatre contaminants chez des daphnies issues de parents exposés pendant tout leur cycle de vie. Des retards de reproduction ont été observés sur ces daphnies dans les cas du paracétamol et du sulfate de cuivre. Dans ce type de protocole expérimental, la seconde génération a été exposée pendant son stade embryonnaire. Ainsi, l'effet de l'exposition directe n'est pas à exclure et la mise en évidence des effets transgénérationnels durables, c'est-à-dire transmis via les gamètes, nécessiterait l'observation d'un plus grand nombre de générations non-exposées.



## Chapitre IV. L'épigénétique en écotoxicologie

L'étude des mécanismes épigénétiques revêt un intérêt tout particulier en écotoxicologie et radioécologie, car ils constituent un chaînon essentiel dans la réponse des organismes à l'exposition à un stress environnemental, à l'échelle d'un cycle de vie et sur plusieurs générations. En particulier, plusieurs études réalisées avec des organismes prélevés dans les zones contaminées de Tchernobyl et Fukushima ou issus d'expérimentation *in vivo* et *in vitro* ont montré que les radiations ionisantes entraînent des modifications de la méthylation de l'ADN, un mécanisme épigénétique très étudié intervenant dans divers processus cellulaires clés et pouvant potentiellement être transmis aux générations suivantes.

### 1. Petit historique de l'épigénétique

Le terme « Epigenetics » est employé pour la première fois en 1942 par Conrad H. Waddington (Waddington 2012). Il fait écho au concept d'épigénèse, une théorie, déjà énoncée par Aristote au IV<sup>e</sup> siècle av. J.-C., qui stipule que les embryons se développent de façon progressive en devenant de plus en plus complexes. Conrad H. Waddington, en tant que biologiste du développement, s'est particulièrement intéressé aux liens entre les gènes et le phénotype au cours du développement de l'organisme. Il est notamment à l'origine du concept de « paysage épigénétique » (Figure 15).

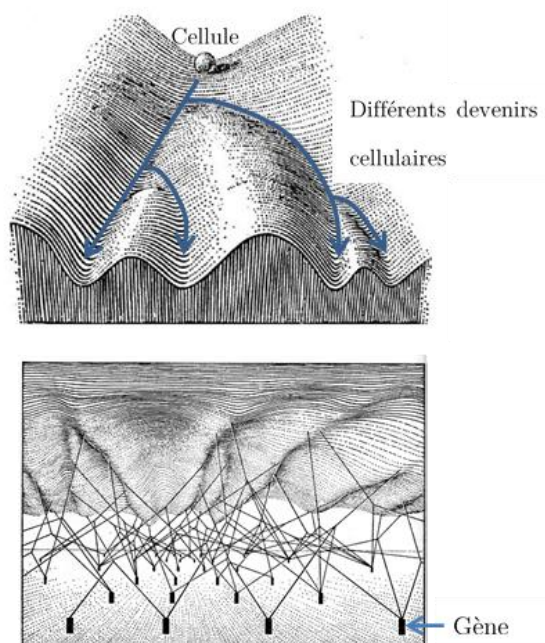


Figure 15 : le paysage épigénétique de Waddington et les interactions sous-jacentes, d'après (Waddington 1947).

Cette métaphore illustre la différenciation cellulaire lors de l'embryogenèse, les vallées représentant les différents devenir cellulaires que la boule, symbolisant la cellule au départ indifférenciée, peut emprunter, en fonction de la tension exercée par les ficelles creusant plus ou moins les vallées du paysage. Ces ficelles représentent l'interaction complexe des gènes qui canalise la différenciation cellulaire (Waddington, 1947, 2014). Par la suite, il développe, à partir de ses propres observations sur la larve de drosophile soumise à un choc thermique, l'idée que l'environnement extérieur peut venir se rajouter à l'interaction des gènes pour canaliser le développement (Waddington, 1956).

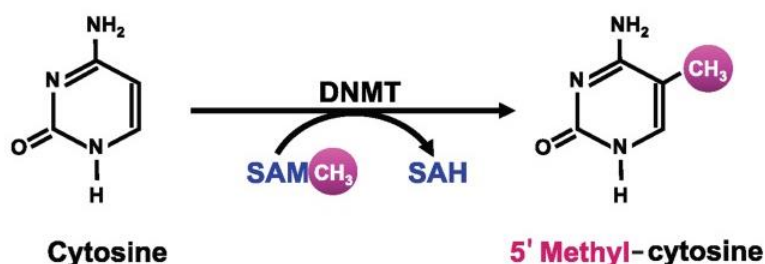
Néanmoins, compte tenu des connaissances de l'époque, Waddington n'était pas en mesure de proposer un mécanisme moléculaire précis correspondant à ses théories. Avec l'avènement de la culture cellulaire dans les années 60-70, les biologistes ont réalisé que certaines particularités du développement avaient besoin d'être éclaircies. Parmi ces particularités, on retrouve le fait que le phénotype de cellules de culture différenciées soit associé à des gènes spécialisés qui sont toujours activés, alors que d'autres sont toujours réprimés, et que ce phénotype soit maintenu au cours des divisions cellulaires. De plus, le mécanisme d'inactivation permanente d'un des chromosomes X chez les femelles des mammifères restait inexpliqué. En 1975, différentes études (Holliday, Pugh, 1975 ; Riggs, 1975) ont proposé, de manière indépendante, un mécanisme permettant d'expliquer l'activation et l'inactivation de gènes lors du développement ainsi que l'héritabilité de ces caractéristiques lors de la division cellulaire : il s'agit de la méthylation de l'ADN. Dans les décennies suivantes, d'autres mécanismes épigénétiques, comme la modification des histones ou les micro-ARN, pouvant également avoir un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, ont été découverts (Lorch et al., 1987 ; Kayne et al., 1988 ; Lee et al., 1993).

Peu à peu la définition de l'épigénétique proposée originellement par Waddington se transforme, ce n'est plus seulement l'étude de la relation entre les gènes et le développement du phénotype, mais cela devient principalement, dès les années 1990, l'étude de la transmission des mécanismes contrôlant l'expression des gènes au fil des divisions cellulaires et des générations (Jablonka, Lamb, 2002). Ainsi l'épigénétique est définie dans le livre intitulé « Epigenetic Mechanisms of Gene regulation » (Russo et al., 1996) comme l'étude des changements dans l'activité d'un gène,

pouvant être transmis lors de la mitose ou de la méiose, mais ne pouvant pas être expliqués par des changements dans la séquence d'ADN.

## 2. Un mécanisme épigénétique : la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le premier mécanisme épigénétique découvert et reste encore aujourd'hui le plus étudié. Il s'agit de l'addition d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) sur un nucléotide, le plus souvent la cytosine, et parfois l'adénosine chez certaines espèces, grâce à l'action d'enzymes appelées les «DNA methyl-transférases» (DNMTs) (Figure 16).



**Figure 16. Représentation schématique de la méthylation de l'ADN, qui convertit une cytosine en 5' méthyl-cytosine, grâce à l'action méthyl-transférase (DNMT). SAM = S-adenosylméthionine; SAH = S-adenosylhomocystéine (Zakhari, 2013)**

Les profils et le rôle de la méthylation de l'ADN pouvant présenter de fortes différences entre les groupes taxonomiques (Head 2014), deux cas seront détaillés ci-dessous : les mammifères, car ils sont représentés dans la majorité des études qui ont été conduites jusqu'à présent en épigénétique et les invertébrés, car le modèle d'étude utilisé dans cette thèse en fait partie.

### 2.1. La méthylation de l'ADN chez les mammifères

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN concerne essentiellement les sites CpG, c'est-à-dire les cytosines directement suivies d'une guanine. Environ 60 à 90% de ces sites CpG sont méthylés (Glastad, Hunt et al. 2011).

Les profils de méthylation de l'ADN sont principalement mis en place au début de l'embryogenèse, à travers un processus qu'on appelle reprogrammation (Figure 17). Peu de temps après la fertilisation, le génome du zygote jusqu'au stage blastocyte connaît une importante déméthylation. Les gènes soumis à empreinte parentale, spécificité des mammifères, et certains éléments répétitifs peuvent toutefois échapper à cette déméthylation. Ensuite, approximativement au moment de la nidation, l'embryon subit une méthylation *de novo* grâce à l'action des enzymes DNMT3A et DNMT3B. Ensuite, le maintien de la méthylation au cours des

divisions cellulaires est assuré par l'enzyme DNMT1 (Morgan, Santos et al. 2005; Messerschmidt, Knowles et al. 2014).

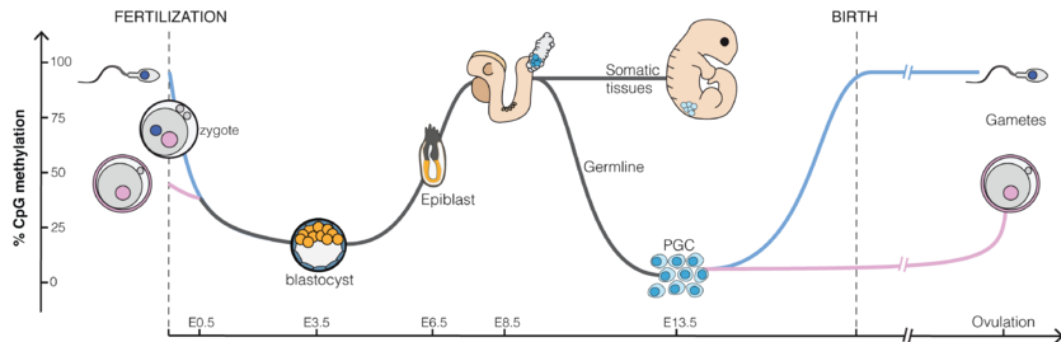


Figure 17. Reprogrammation d'un embryon de mammifère, par Marius Walter CC BY-SA 4.0

Chez les vertébrés, la présence de régions de forte densité en sites CpG, que l'on nomme les îlots CpG, a été relevée. Plus de la moitié des gènes possèdent des îlots CpG dans leur région promotrice chez l'humain (Antequera and Bird 1993) et il a été montré qu'une forte méthylation de ces îlots peut entraîner la fixation de protéines spécifiques pouvant bloquer l'initiation de la transcription (Nan, Ng et al. 1998; Jones 2012).

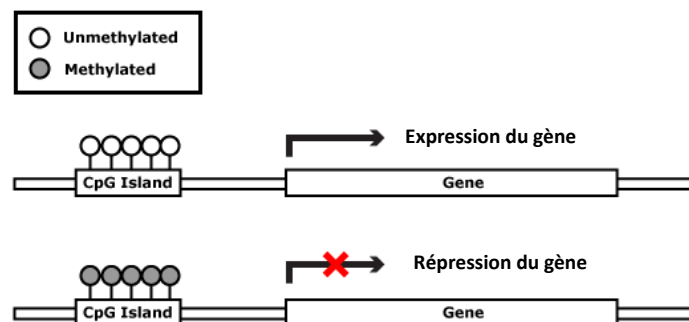


Figure 18. Rôle de la méthylation des îlots CpG sur la transcription des gènes (UCSF School of Medicine, 2007).

En revanche, la méthylation des sites CpG dans les régions géniques semblerait, quant à elle, corrélée positivement à l'expression des gènes, mais son rôle reste encore à préciser (Jjingo, Conley et al. 2012).

La méthylation de l'ADN tiendrait également un rôle important dans la stabilité génomique, notamment au niveau des séquences microsatellite (séquences répétitives d'ADN non-codant). Des anomalies dans la méthylation de ces séquences microsatellites pourraient être à l'origine de

plusieurs maladies et cancers chez l'humain (Putiri and Robertson 2011).

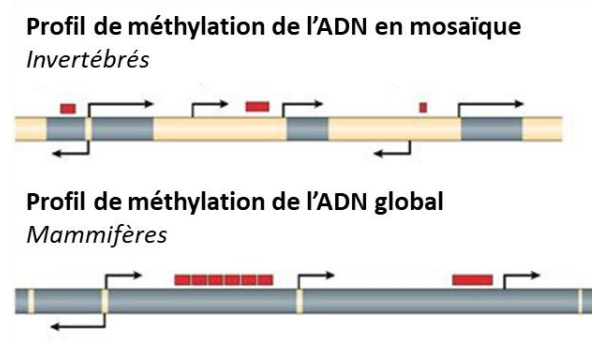
### 2.2. La méthylation de l'ADN chez les invertébrés

Les profils de méthylation de l'ADN présentent une grande diversité chez les invertébrés et généralement de grandes différences avec celui des vertébrés et des mammifères en particulier (Tableau 3).

**Tableau 3. Caractéristique de la méthylation de l'ADN pour différents invertébrés et chez l'Homme (Wang et al., 2014)**

	Espèces	% de cytosines génomiques méthylées	% de sites CpG méthylés	% de gènes méthylés
<b>Invertébrés</b>	Huitre	1,95	15,96	54
	Ver à soie	0,11	0,56	47
	Abeille	0,11	0,36	61
	Fourmi	0,15	0,54	31
	Anémone de mer	1,44	10,89	51
<b>Mammifères</b>	Tunicier	4,07	28,95	71
	Humain	3,93	82,08	97

En comparaison aux mammifères, la méthylation de l'ADN chez les invertébrés sont caractérisés le plus souvent par des taux moyens relativement bas, voire presque nuls et par un profil en mosaïque, c'est-à-dire des génomes présentant des successions de séquences fortement méthylées et de séquences non-méthylées (Miho M. Suzuki, Bird, 2008) (Figure 19). Contrairement aux observations réalisées chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN chez invertébrés ne semble pas jouer de rôle particulier dans la répression de la prolifération des éléments répétitifs (Feng, Cokus et al. 2010; Zemach, McDaniel et al. 2010).



**Figure 19. Profils de méthylation de l'ADN chez les invertébrés et les mammifères. Les zones grises représentent des séquences de méthylation stable, les zones jaunes des séquences non-méthylées et les rectangles rouges, les éléments transposables (Miho M. Suzuki, Bird, 2008).**

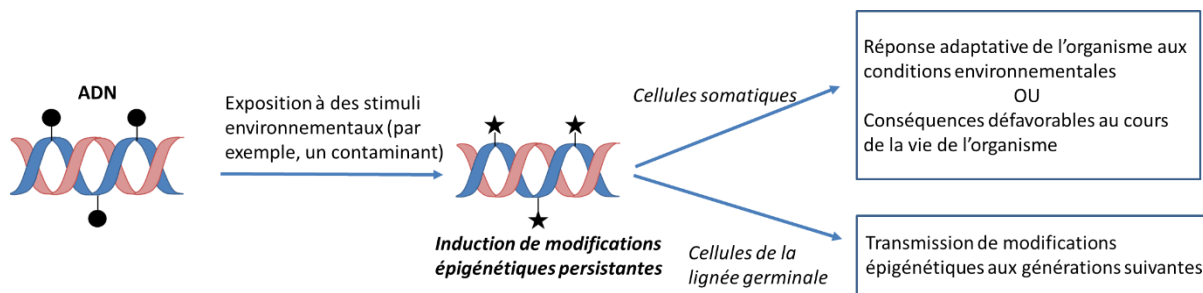
La méthylation semble se concentrer principalement dans les zones géniques, délaissant les régions intergéniques (Suzuki, Kerr et al. 2007; Feng, Cokus et al. 2010; Zemach, McDaniel et al. 2010). La méthylation des gènes a été corrélée positivement avec l'expression des gènes chez différents invertébrés (Keller, Han et al. 2015). Plusieurs études ont montré que de nombreux gènes domestiques avaient tendance à être fortement méthylés chez l'abeille et l'huitre du pacifique (Elango, Hunt et al. 2009; Gavery and Roberts 2010; Hunt, Brisson et al. 2010). Il a été également suggéré que la méthylation dans les régions géniques pouvait avoir un rôle dans l'épissage alternatif, correspondant à la capacité d'exprimer différentes protéines à partir du même gène, chez les insectes et les crustacés comme *D. magna* (Asselman et al., 2017 ; Bonasio et al., 2012 ; Flores et al., 2012)

### 3. La mémoire épigénétique

La mise en place des marques épigénétiques au cours du développement confère aux cellules de chacun des tissus de l'organisme un profil d'expression de gènes et des fonctions biologiques qui leur sont propres et qui sont maintenus au fil des divisions cellulaires (Leeb, Wutz, 2012). Malgré leur apparente stabilité, ces marques épigénétiques peuvent être modifiées par différents stimuli tels que des conditions physiologiques particulières de l'organisme ou des conditions environnementales externes, et certaines de ces modifications pourront perdurer en l'absence du stimulus (Aguilera et al., 2010). Certaines modifications épigénétiques pourront être bénéfiques aux organismes et leur permettront de mieux s'adapter aux changements de leur environnement, d'autres seront au contraire défavorables et pourront être à l'origine de dysfonctionnements tels que le cancer, largement étudié chez les mammifères.

La mémoire épigénétique peut être alors définie comme la propagation de changements stables dans l'activité des gènes induits par un stimulus environnemental interne ou externe, perdurant en l'absence même de ce stimulus (D'Urso and Brickner 2014). La mémoire épigénétique intervient suivant les échelles de temps différentes, d'une part à l'échelle de l'individu au sein de ses cellules somatiques et d'autre part à l'échelle multigénérationnelle via les cellules germinales (Figure 20). Dans les paragraphes suivants, nous nous intéresserons principalement aux changements épigénétiques induits par des conditions environnementales externes. La méthylation de l'ADN, ainsi que la modification des histones ou les micro-ARN font partie des

mécanismes moléculaires impliqués dans cette mémoire épigénétique.



**Figure 20. Conséquences des modifications épigénétiques induites par des stimuli environnementaux dans les cellules somatiques ou dans les cellules de la lignée germinale, modifiée d'après Mirbahai and Chipman (2014).**

### 3.1. Mémoire épigénétique à l'échelle de l'individu

Même si les modifications épigénétiques peuvent intervenir tout au long de la vie de l'organisme, certaines périodes du développement, notamment le stade embryonnaire, sont particulièrement sensibles et peuvent induire des changements de l'expression des gènes qui perdureront tout au long de leur cycle de vie (Faulk, Dolinoy, 2011 ; Mirbahai, Chipman, 2014).

Certaines modifications épigénétiques participent à la régulation du développement de l'organisme. Un des exemples les plus connus, la vernalisation, décrit la nécessité pour certaines plantes d'une exposition prolongée au froid pour permettre leur floraison (D'Urso, Brickner, 2014). Ce phénomène est permis par la levée, sous l'action du froid, de l'inhibition de l'expression d'un gène empêchant la floraison. Ce mécanisme implique des modifications de la méthylation des séquences régulatrices de ce gène.

D'autres modifications épigénétiques vont participer à la plasticité phénotypique des organismes, c'est-à-dire la possibilité à partir d'un même génome de produire différents phénotypes selon les conditions environnementales (Duncan et al., 2014). Ce type de modification épigénétique intervient notamment dans la détermination des castes (reine ou ouvrière) chez les abeilles et les fourmis en fonction du type de nourriture apportée à la larve (Bonasio et al., 2012 ; Kucharski et al., 2008). Les modifications épigénétiques peuvent aussi intervenir dans l'expression d'un phénotype améliorant l'adaptation des organismes à de nouvelles conditions environnementales en augmentant leurs chances de survivre et de se reproduire. Ainsi, chez les campagnols, la photopériode et les niveaux de mélatonine des femelles, lors de leur gestation, influencent

l'épaisseur du pelage chez la progéniture au moment de leur naissance : un campagnol né en automne aura un pelage plus épais qu'un campagnol né en au printemps (Lee, Zucker, 1988). Un autre exemple concerne certaines espèces du genre *Daphnia*, qui, pendant les premiers stades de leur vie, lorsqu'elles sont en contact de kairomones produites par des prédateurs, voient leur carapace développer une extension en forme de casque, augmentant leurs chances de survie face à la prédation (Harris et al., 2012). La méthylation de l'ADN pourrait avoir un rôle important dans la régulation des gènes intervenant dans ce type de réponse adaptative (Flores et al., 2012).

Enfin, certaines modifications épigénétiques pourront avoir des conséquences défavorables sur les organismes sur le long terme. De nombreux facteurs environnementaux, comme la disponibilité de la nourriture ou la présence de certains polluants dans l'environnement, sont à l'origine de divers dysfonctionnements et maladies. Les polluants environnementaux peuvent interférer directement, ou via le stress oxydant, sur les méthyltransférases pouvant mener à l'altération des profils de méthylation de l'ADN. La disponibilité de la nourriture peut également être à l'origine d'aberrations épigénétiques, lorsque certains nutriments essentiels à la méthylation de l'ADN viennent à manquer (Mirbahai, Chipman, 2014).

Chez les mammifères, un lien entre les conditions environnementales et le développement de différents cancers a été établi. Les cellules cancéreuses sont associées à des profils épigénétiques particuliers, faisant du rôle des mécanismes épigénétiques dans l'apparition du cancer un domaine de recherche très actif (Herceg, Vaissière, 2011 ; Perera, Herbstman, 2011). Quelques études seulement, se sont intéressées aux modifications épigénétiques liées à l'exposition à divers polluants dans d'autres groupes taxonomiques que les mammifères (Vandegheuchte, Janssen, 2014). Une étude a mis en évidence des modifications de la méthylation de l'ADN et l'apparition de tumeurs chez le poisson, suite à l'exposition à plusieurs polluants des milieux aquatiques (Mirbahai et al., 2011). L'exposition des embryons de grenouilles à certains perturbateurs endocriniens a entraîné des perturbations de leur système hormonal plus tard dans leur cycle de vie (Andres et al., 1984). Plus récemment, Asselman et al. (2015) ont observé des modifications de la méthylation totale de l'ADN chez le crustacé *D. magna* à la suite d'une exposition à une nourriture de faible qualité, au chlorure de sodium et à des signaux chimiques du prédateur *Triops*. Une nette différence entre les niveaux de méthylation des deux clones, *linb1* et *Xinb3*,

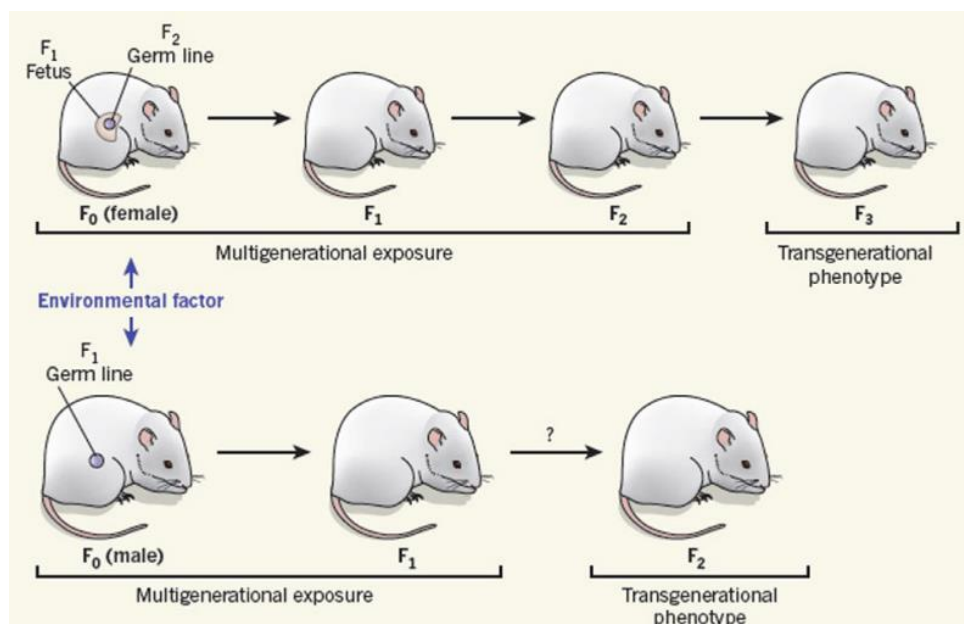


en réponse à l'exposition aux stressseurs évoqués ci-dessus a également été mise en évidence alors que ces clones avaient le même taux de méthylation totale en condition témoin.

### 3.2. Mémoire épigénétique transgénérationnelle

L'hérédité épigénétique transgénérationnelle est définie comme la transmission de modifications épigénétiques par les gamètes à la descendance, jusqu'aux générations non exposées aux conditions environnementales à l'origine de ces modifications (Skinner, 2011). Ce phénomène a suscité un intérêt croissant depuis une vingtaine d'années dans les domaines de la biologie de l'évolution, mais aussi de l'écotoxicologie (Jablonka, Raz, 2009 ; Vandegehuchte, Janssen, 2014 ; Youngson, Whitelaw, 2008).

Afin de mettre en évidence un phénomène d'hérédité épigénétique transgénérationnelle, il faut donc évaluer les modifications épigénétiques dans la descendance n'ayant jamais été exposée au contaminant (Figure 21).



**Figure 21. Mise en évidence de modifications épigénétiques transgénérationnelles chez la souris, dans les cas de l'exposition en génération F<sub>0</sub> d'une femelle (en haut) et d'un mâle (en bas) (Nilsson and Skinner, 2014)**

Dans le cas de l'exposition de femelles dont les embryons se développent à l'intérieur de leur organisme, comme chez les mammifères ou les cladocères (par exemple, les daphnies), certaines précautions doivent être prises. En effet, en plus de la mère (génération F<sub>0</sub>), ce sont non seulement les embryons (génération F<sub>1</sub>), mais aussi les cellules germinales (génération F<sub>2</sub>) contenues dans ces embryons qui sont exposées simultanément (Skinner, 2008). La génération F<sub>3</sub>

est donc la première génération non-exposée, dans laquelle la transmission des modifications épigénétiques pourra être évaluée. En revanche, chez les espèces ovipares ou en cas d'exposition des mâles seulement (génération F0), la transmission de modifications épigénétiques transgénérationnelles pourra être évaluée dès la deuxième génération (génération F2) (Figure 21).

Une étude très reconnue de Anway et al. (2005) a montré que l'exposition d'embryons de rat au perturbateur endocrinien vinclozolin entraînait une diminution de la fertilité corrélée à une modification du profil de méthylation de l'ADN de la lignée germinale chez les trois générations suivantes. Cette étude est très controversée, car aucun autre laboratoire n'a réussi à confirmer ces résultats (Vandeghechuchte, Janssen, 2014). Des modifications épigénétiques transgénérationnelles de la lignée germinale chez le rat ont également été décrites après l'exposition *in utero* à d'autres substances, telles que les dioxines, le bisphénol A, un insecticide et un répulsif à insectes (Manikkam et al., 2013, 2012b, 2012a). Chez les mammifères, les modifications concernant la méthylation de l'ADN ne peuvent être transmises que lorsqu'elles échappent la reprogrammation ayant lieu juste après la fécondation. Chez d'autres groupes taxonomiques, la reprogrammation globale de la méthylation de l'ADN n'a pas été étudiée extensivement, mais certaines études ont montré qu'elle était absente chez le poisson-zèbre et la grenouille (Macleod et al., 1999 ; Stancheva, Meehan, 2000).

Les effets épigénétiques transgénérationnels de divers contaminants environnementaux ont également été étudiés chez le crustacé *D. magna*. L'utilisation de ce type d'organisme à la reproduction clonale permet ainsi de mieux discriminer les effets épigénétiques des effets génétiques. Vandeghechuchte et al. (2010) ont étudié les modifications épigénétiques induites chez *D. magna* par différentes substances connues pour leurs effets chez les mammifères sur la méthylation de l'ADN. Aucun effet épigénétique transgénérationnel n'a été détecté pour le perturbateur endocrinien génistéine et pour le vinclozolin. Quant au composé 5-azacytidine, une substance connue pour l'inhibition des DNMT, l'exposition de la génération F0, a entraîné une diminution significative de méthylation globale de l'ADN en génération F0, F1, F2. Toutefois, en l'absence de mesure sur la méthylation de l'ADN en génération F3, les effets observés pourraient résulter de l'exposition directe à la substance et rien ne permet de déterminer s'il s'agit d'un cas d'hérédité épigénétique transgénérationnelle.

#### 4. Radiations ionisantes et modifications épigénétiques

Les effets des radiations ionisantes sur les marques épigénétiques ont majoritairement concerné la méthylation de l'ADN et ont été testés au laboratoire sur des lignées cellulaires ou sur des espèces modèles mammifères, tels que la souris ou le rat.

Plusieurs études ont montré que les radiations ionisantes en exposition aiguë de 2,5 à 7 Gy pouvaient induire des modifications de la méthylation de l'ADN de certaines cellules de l'organisme comme celles du thymus ou du foie, alors que la méthylation de l'ADN des cellules du cerveau ou de la rate ne semblait pas affectée (Koturbash et al., 2006 ; Tawa et al., 1998). Kovalchuk et al. (2004) ont montré une hypométhylation globale de l'ADN des cellules de muscle chez la souris à suite d'une exposition chronique à une faible dose de rayon X (50 cGy), alors qu'aucun effet sur la méthylation n'a pu être détecté en exposition aiguë. En revanche, aucun effet n'a pu être détecté dans les cellules de foie en exposition chronique ou aiguë. L'exposition de cellules de la peau humaines aux radiations ionisantes a entraîné une modification dans l'expression de micro-ARN qui auraient un rôle dans l'apparition de cancers, mais ici encore la réponse s'est révélée différente entre une exposition chronique et une exposition aiguë (Chaudhry, Omaruddin, Kreger, de Toledo, & Azzam, 2012).

Des modifications radio-induites de la méthylation de l'ADN ont également été étudiées sur plusieurs types d'organismes, comme le pin sylvestre ou la grenouille, directement prélevés dans les zones contaminées autour des centrales de Tchernobyl et de Fukushima. Les études ont montré une hypométhylation globale de l'ADN chez les deux espèces (Gombeau, 2015 ; Igor Kovalchuk et al., 2004 ; Kovalchuk et al., 2003).

De plus, Dubrova et al. (2000) ont suggéré que la transmission de l'instabilité génomique observée chez les descendants de parents irradiés chez plusieurs espèces serait liée à des mécanismes épigénétiques (Barber et al., 2006 ; Dubrova et al., 1993 ; Kubota et al., 1995 ; Luke et al., 1997 ; Shimada, Shima, 2004). Toutefois, il n'existe pas encore d'étude, à notre connaissance, mettant clairement en évidence des mécanismes d'hérédité épigénétique transgénérationnels.



## Chapitre V. La modélisation mécaniste des effets en écotoxicologie

### 1. Méthode classique d'évaluation des effets en écotoxicologie

La méthode classique pour l'évaluation des effets des polluants sur les écosystèmes utilise des tests de toxicité, dans lesquels des espèces standards sont exposées, en conditions contrôlées, à une gamme de concentrations pendant une durée standard définie afin de déterminer les niveaux d'expositions à partir desquels le contaminant étudié produit des effets défavorables. Ces tests permettent de construire des courbes dose-réponse et d'obtenir les ECx (*x% Effective Concentration*, Concentration efficace à x%) ou les NOEC (*No Observed Effect Concentration*, concentration testée la plus forte sans effet observé) qui sont à la base du calcul de la concentration prédite sans effet (PNEC pour *Predicted No Effect Concentration*,). Toutefois, ces valeurs de NOEC et ECx ont l'inconvénient de dépendre de la durée d'exposition, de l'espèce utilisée et du critère observé. Ainsi, comparer à partir des valeurs NOEC et ECx les différences de sensibilité à un contaminant entre plusieurs espèces ou les différences de toxicité entre des contaminants a peu de sens, car elles pourraient être seulement le reflet des choix arbitraires en matière de critère et de durée sélectionnés pour les tests de toxicité. De plus, les NOEC et ECx sont purement descriptifs, et n'apportent aucune information sur les mécanismes de toxicité du contaminant considéré.

Une approche alternative est celle des modèles d'effets à fondement biologique. Ces modèles mécanistes visent à expliquer les effets toxiques en fonction du temps et de la concentration d'exposition, en se basant sur un ensemble cohérent de mécanismes biologiques. En prenant en compte, de façon intégrée, l'ensemble des effets des contaminants sur différents traits d'histoire de vie (survie, croissance, reproduction...) sur la totalité du cycle de vie, ces modèles permettent de mieux comprendre le mode d'action toxique d'un contaminant. De plus, la prise en compte des mécanismes de toxicité constitue une base solide pour réaliser une grande variété d'extrapolation des effets, par exemple vers des conditions non-testées, telles que des concentrations variables dans le temps, des températures ou des niveaux de nourriture différents, ou bien vers d'autres contaminants ou d'autres espèces (Jager, Kooijman, 2007).

## 2. Les modèles TKTD

Les modèles TKTD (*ToxicoKinetics and Toxicodynamics*, Toxicocinétiques et Toxicodynamiques) sont utilisés en écotoxicologie pour modéliser les variations de concentration d'un contaminant environnemental dans l'organisme (modèles toxicocinétiques, TK) et l'apparition des effets à l'échelle de l'organisme au cours du temps en fonction de la concentration interne du contaminant (modèles toxicodynamiques) (Figure 22) (Jager et al., 2006).

Plusieurs modèles TKTD ont été développés pour décrire les effets létaux, puis unifiés sous le modèle GUTS (General Unified Threshold model of Survival) (Jager et al., 2011). Les effets sublétaux (sur la croissance, la reproduction, le développement...) sont analysés à l'aide de modèles TKTD basés sur les perturbations du budget énergétique des organismes, comme le DEBtox (Dynamic Energy Budget model for toxicology). La partie toxicocinétique des modèles TKTD, commune aux modèles traitant des mécanismes de toxicité létale ou sublétale, est présentée ci-dessous.

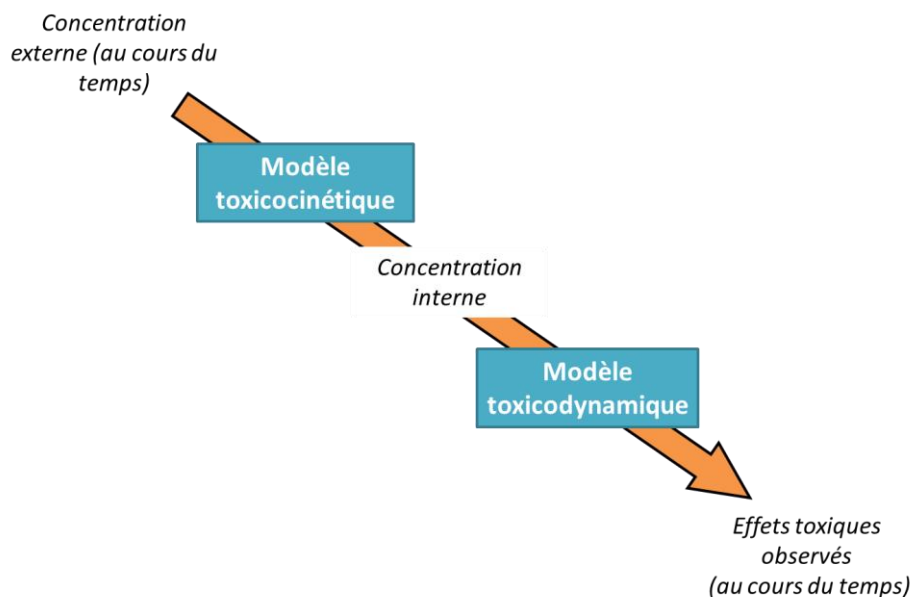


Figure 22: L'approche mécaniste de l'effet des contaminants par les modèles toxicocinétique et toxicodynamique (TKTD), utilisés pour passer de la concentration externe d'exposition à l'apparition des effets au cours du temps (Jager, 2012).

### 2.1. Les modèles toxicocinétiques

Les processus toxicocinétiques regroupent les processus biologiques d'absorption, de distribution, de transformation métabolique et d'élimination du contaminant. Ces processus ont été extensivement étudiés en pharmacologie ou en écotoxicologie, menant au développement de

différents modèles toxicocinétiques permettant d'estimer la concentration interne du contaminant à partir de sa concentration dans le milieu (Barber, 2003 ; Dixit et al., 2003 ; Mackay, Fraser, 2000). Plusieurs niveaux de complexité caractérisent ces modèles toxicocinétiques. Les modèles PBTK (Physiologically-Based Toxicokinetic models) utilisés en pharmacologie estiment les concentrations internes au niveau de plusieurs compartiments, comme le sang et divers organes (muscles, foie, rein...). Le niveau de détail dépend alors de la connaissance acquise sur la physiologie de l'animal considéré. Si ces connaissances sont bien développées pour des organismes de grande taille tels que des mammifères comme la souris ou certains poissons, ce n'est pas le cas pour la plupart des organismes utilisés en écotoxicologie, comme les daphnies (Krishnan, Peyret, 2009). L'approche la plus simple reste alors de considérer l'organisme comme un seul compartiment homogène et d'utiliser une cinétique du premier ordre rassemblant plusieurs processus d'accumulation et d'élimination :

$$\frac{dC_i}{dt} = k_a C_e - k_e C_i \quad (1)$$

Avec  $C_i$  la concentration interne du contaminant,  $C_e$  la concentration externe, c'est-à-dire la concentration du contaminant dans le milieu,  $k_a$  le taux d'accumulation du contaminant et  $k_e$  le taux d'élimination du contaminant.

## **2.2. Les modèles toxicodynamiques**

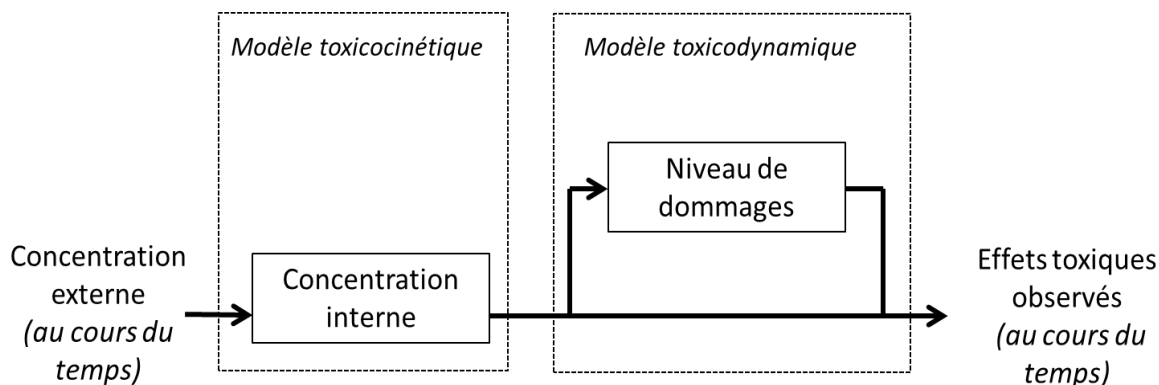
Les modèles toxicodynamiques permettent de relier l'apparition et l'intensité des effets sur l'organisme au cours du temps à une métrique de dose, généralement la concentration interne du contaminant.

### **2.2.1 Métrique de dose**

Pour pouvoir modéliser l'apparition des effets, il faut tout d'abord définir la métrique qui va agir comme force motrice dans les processus toxicodynamiques. C'est généralement la concentration interne du contaminant aux sites cibles de la toxicité qui est choisie comme métrique de dose (Ashauer et al., 2011 ; Escher, Hermens, 2002).

Dans certains modèles TKTD, l'apparition des effets au cours du temps n'est pas reliée directement à la cinétique de concentration interne, mais à un compartiment de dommage (Jager et al., 2011) (Figure 23). Le concept de dommage est relativement abstrait et regroupe toutes

sortes de processus biochimiques et physiologiques impliqués dans la toxicité.



**Figure 23 : Structure schématique d'un modèle toxicocinétique-toxicodynamique (TKTD) avec la possibilité d'intégrer un compartiment de dommages pour expliquer la dynamique des effets , d'après (Jager et al., 2011).**

Le dommage s'accumule proportionnellement à la concentration interne et se répare proportionnellement au niveau de dommage lui-même (équation 2). Cela permet notamment d'obtenir une métrique de dose dont la cinétique ne suit pas celle de la concentration interne. De façon similaire à l'équation de la concentration interne :

$$\frac{dD}{dt} = k_a C_i - k_r D \quad (2)$$

Avec  $D$  le niveau de dommage,  $C_i$  la concentration interne du contaminant,  $k_a$  le taux d'accumulation des dommages et  $k_r$  le taux de réparation des dommages.

### 2.2.2 Modèles TKTD pour la survie

Le modèle de survie de GUTS réunit deux approches différentes qui sont celle de tolérance individuelle (IT : Individual Tolerance) et celle de mort stochastique (SD : Stochastic Death).

L'approche IT suit le principe selon lequel l'organisme meurt lorsque la métrique de dose choisie dépasse un certain seuil. Comme tous les organismes d'une population n'auraient pas la même valeur pour ce seuil, ils ne meurent pas tous au même moment. L'approche SD suppose que tous les organismes ont le même seuil de toxicité et qu'ils ont tous une probabilité égale de mourir à un moment  $t$ . La mort d'un individu résulte alors seulement d'un processus stochastique. Cette méthode est similaire à celle utilisée en biologie (analyse de survie), en ingénierie (analyse de la fiabilité) et en économie (analyse de la durée) pour traiter de la probabilité d'occurrence d'événements au cours du temps.

Dans le modèle GUTS, la réunion de ces deux approches aboutit à un modèle de risque qui



confère à l'organisme exposé une probabilité accrue de mourir (par rapport aux organismes témoins) lorsque la métrique de dose choisie dépasse un certain seuil. Cette probabilité de mourir augmente de façon linéaire avec la métrique de dose au-dessus du seuil. Ce seuil suit une distribution donnée (le plus souvent log-normale) dans la population.

### 2.2.3 Modèles TKTD pour les effets sublétaux

On distingue deux grandes classes d'effets sublétaux dont la modélisation nécessite des modèles TKTD différents. Certains effets font référence à un état binaire de l'individu. Leur observation est nécessairement rapportée à une fraction d'individus sur la population totale testée. On peut citer par exemple l'immobilité, le sex-ratio, la présence d'individus intersexués... (Ashauer et al., 2011). Certains de ces effets peuvent être considérés comme des processus stochastiques et ainsi modélisés d'une manière similaire à la survie dans le modèle GUTS. Le modèle peut être modifié pour permettre, dans certains cas, la réversibilité des effets. Les effets quantifiables sur les traits d'histoire de vie, comme la croissance, la reproduction ont été largement modélisés dans le cadre de la théorie DEB (Dynamic Energy Budget) (Kooijman, 2010). Le modèle DEBtox est un modèle TKTD qui considère que les effets sur la reproduction, la croissance et la maturation sont liés à des perturbations du budget énergétique des organismes. Dans ce contexte, ils sont étudiés de façon intégrée. La section suivante est dédiée à la description du modèle DEBtox.

## 3. Le modèle DEBtox

### 3.1. La théorie DEB

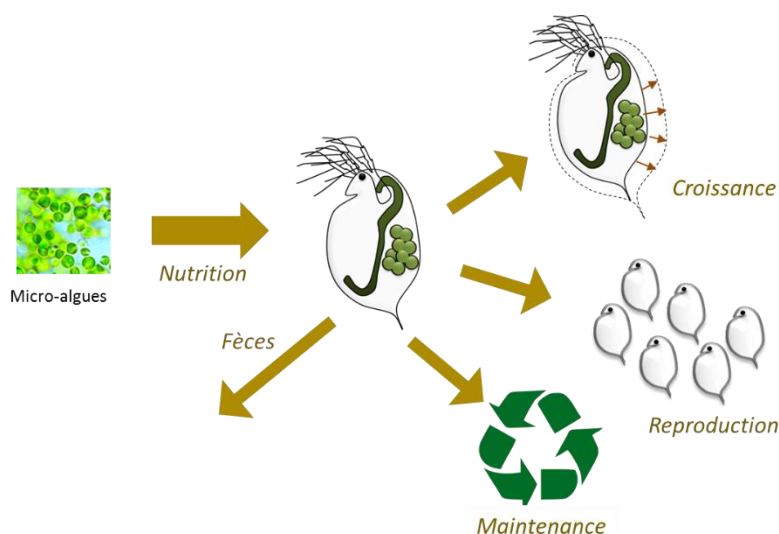


Figure 24 : Concept de la théorie du Budget Énergétique Dynamique (DEB) avec l'entrée de ressources dans l'organisme et leur distribution entre les principaux processus métaboliques (Kooijman, 2010).

Tous les êtres vivants prélèvent des ressources (énergie et éléments de base) dans leur environnement et utilisent ces ressources dans des processus biologiques majeurs tels que la croissance, la reproduction, la maturation et la maintenance de leur organisme (Figure 24). Les ressources prélevées sont en quantité finie et leur répartition entre les différents processus biologiques cités ci-dessus doit obéir aux lois de conservation de l'énergie et de la masse. C'est à partir de ces principes que la théorie et le modèle du budget énergétique dynamique (DEB) ont été développés par S.A.L.M. Kooijman à partir de 1979 (Kooijman, 2010). Même si le modèle DEB s'applique plus particulièrement aux animaux ectothermes, se reproduisant via la production d'œufs, il peut être adapté à tous les organismes vivants.

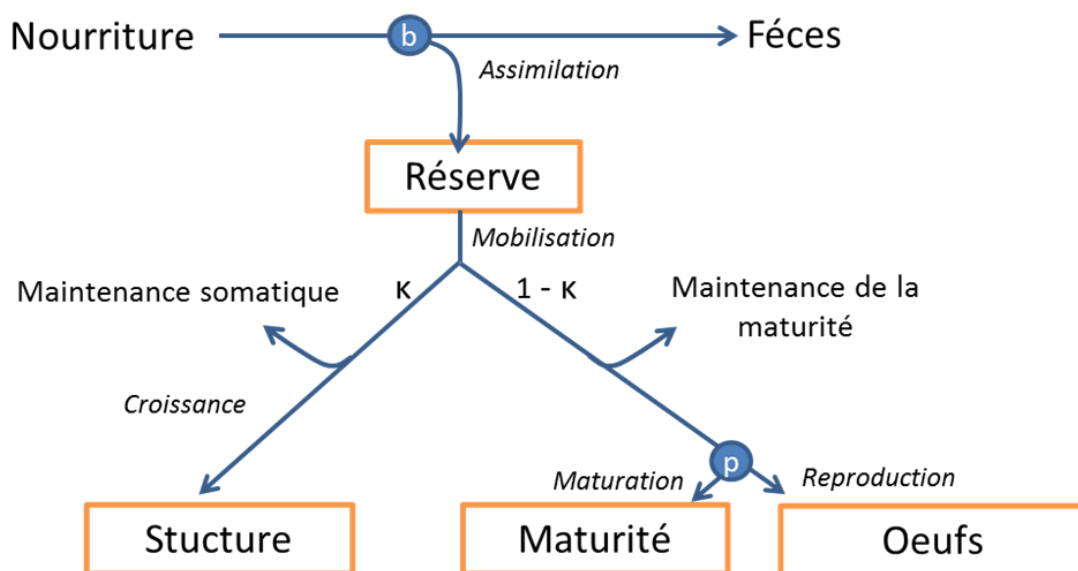


Figure 25. Représentation schématique du modèle DEB standard.

Le modèle DEB décrit la façon dont l'énergie issue de la nourriture est utilisée par l'organisme (Figure 25). Il est constitué d'un ensemble de principes et de règles, basés sur des données empiriques, qui sont résumés ci-dessous.

### *Nutrition et allocation de l'énergie*

Le modèle DEB considère qu'il existe deux types de biomasses dans un organisme : la réserve qui alimente le métabolisme et la structure qui requiert de la maintenance. Dans le modèle standard, un organisme est constitué d'une seule structure et d'une seule réserve.

Chez les animaux, la totalité de l'énergie apportée à l'organisme provient de la nourriture.

L'ingestion de nourriture est considérée comme proportionnelle à la surface du tube digestif, elle-même approximativement proportionnelle à celle de la structure de l'organisme. La nourriture est ensuite digérée, avec une efficacité constante, indépendante de la taille de l'organisme et de concentration de nourriture. Les éléments et l'énergie assimilés sont ajoutés au compartiment de réserve. Le rythme avec lequel la réserve est mobilisée dépend du stade de vie et la taille de l'organisme. Cette énergie mobilisée est ensuite répartie entre les grandes fonctions biologiques, en suivant la loi dite « kappa ». Une fraction fixe  $\kappa$  est toujours allouée à la maintenance de l'organisme et à la croissance, alors que le reste ( $1 - \kappa$ ) est alloué à la maintenance de la maturité, à la maturation et à la reproduction. En général, on considère que,  $\kappa$  reste constant tout le long du cycle de vie. Il existe toutefois des situations particulières pour lesquelles la loi  $\kappa$  est enfreinte, par exemple en cas de famine extrême où les organismes risquent d'utiliser toute l'énergie destinée à la reproduction pour alimenter leur métabolisme.

### ***Les stades de vie et la maturation***

La théorie DEB prend en compte trois stades de vie : l'embryon, le juvénile et l'adulte. La transition d'un stade à un autre s'opère toujours par un changement dans l'activité métabolique. La transition du stade embryon au stade juvénile correspond au début de la nutrition. Les embryons ne se nourrissent pas, mais utilisent les réserves énergétiques déposées dans l'œuf par la mère. La transition du stade juvénile au stade adulte correspond à la puberté, c'est-à-dire au moment où l'organisme devient apte à la reproduction.

Afin de suivre la variation de la complexité de l'organisme et de déclencher le passage d'un stade à l'autre, une variable d'état appelée maturité a été introduite au modèle DEB. Dans les stades embryon et juvénile, l'organisme investit de l'énergie pour augmenter le niveau de maturité. Le niveau de maturité a davantage trait à un statut informatif, plutôt qu'à une quantité de masse ou d'énergie. Le passage d'un stade à un autre se fait instantanément à un niveau de maturité fixe. Lorsque l'organisme a atteint le stade adulte, le niveau de maturité ne varie plus.

### ***La maintenance***

La maintenance somatique est un ensemble de processus qui garantissent l'intégrité de l'organisme. On peut citer par exemple le turnover des protéines de la structure ou l'activité

musculaire. La maintenance somatique est prioritaire sur la croissance et les coûts énergétiques qui lui sont liés sont généralement proportionnels au volume de la structure.

Il existe également une maintenance de la maturité dont les coûts sont proportionnels au niveau de maturité. La maintenance de la maturité est également prioritaire sur la maturation et la reproduction.

### ***La reproduction***

Les organismes adultes n'investissent plus dans la maturité, mais dans la reproduction. Le flux continu d'énergie alloué à la reproduction doit être d'abord stocké pour être ensuite converti en œufs, lorsque la quantité requise d'énergie a été accumulée. En pratique, on considère que l'énergie investie dans la reproduction est transformée en œufs de façon continue et un taux de reproduction continu peut être utilisé.

### **3.2. Application à l'écotoxicologie**

Conçu à l'origine par Kooijman et Bedaux (1996), le modèle DEBtox utilise la théorie DEB pour analyser des données de tests de toxicité. Il part du principe que les contaminants, une fois internalisés, vont influencer l'acquisition et/ou l'utilisation de l'énergie dans l'organisme.

#### **3.2.1 Toxicocinétique**

Le modèle toxicocinétique utilisé dans le DEBtox est un modèle à un seul compartiment avec une cinétique du premier degré, déjà décrite dans sa forme basique par l'équation 1 modifiée pour tenir compte du phénomène de dilution par la croissance (Jager, 2012 ; Kooijman, Bedaux, 1996). En effet, si l'organisme grandit, la quantité interne du contaminant est rapportée à un plus grand volume. De plus, la croissance va augmenter les surfaces d'échange avec l'environnement, ce qui affectera les cinétiques d'échange. Ainsi pour une même espèce, des individus de petite taille atteindront plus rapidement l'équilibre avec la concentration externe par rapport à des individus plus grands. La cinétique d'accumulation et d'élimination du contaminant tenant compte de la dilution par la croissance peut s'écrire selon l'équation suivante :

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

Avec  $C_i$  la concentration interne du contaminant,  $C_e$  la concentration du contaminant dans le milieu,  $k_a$  le taux d'accumulation du contaminant,  $k_e$  le taux d'élimination du contaminant et  $l$  la taille normalisée par la taille maximale de l'organisme telle que  $l = \frac{L}{L_m}$ .

Le plus souvent, la concentration interne du contaminant ( $C_i$ ) n'est pas mesurée expérimentalement. En l'absence de mesures de  $C_i$ , il n'est pas possible d'estimer les paramètres toxicocinétiques. Par contre, la dynamique d'apparition des effets au cours du temps peut renseigner sur la cinétique d'accumulation du contaminant et plus particulièrement sur la constante d'élimination. En effet, la constante d'élimination détermine le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre entre la concentration externe et la concentration interne (Jager et al., 2011). On utilise alors une concentration interne normalisée  $C_i^*$ , correspondant à la concentration interne  $C_i$  divisée par le facteur de bioconcentration (BCF) égal à  $\frac{k_a}{k_e}$  et on obtient alors l'équation suivante :

$$\frac{dC_i}{dt} = C_e \frac{k_e}{l} - C_i^* \left( \frac{k_e}{l} + \frac{d}{dt} l^3 \right) \quad (4)$$

Avec la concentration interne normalisée  $C_i^* = \frac{k_e}{k_a} C_i$

$C_i^*$  est proportionnelle à la concentration interne réelle et est égale, à l'état d'équilibre, à la concentration externe  $C_e$ .  $k_e$  est donc le seul paramètre toxicocinétique à estimer à partir des données de toxicité.

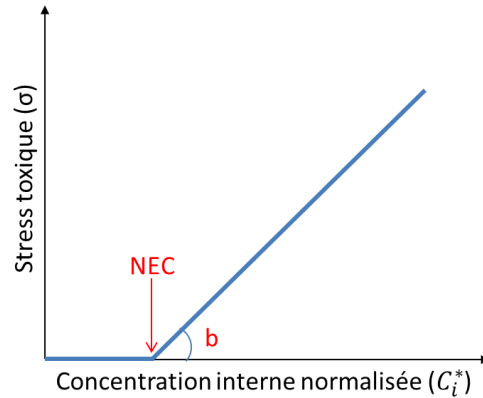
### 3.2.2 Toxicodynamique

Dans le modèle toxicodynamique, la métrique de dose choisie, généralement la concentration interne normalisée ou le niveau de dommages normalisé, est reliée à un ou plusieurs paramètres DEB.

Le modèle toxicodynamique postule l'existence d'un seuil de toxicité, appelé NEC (No Effect Concentration), correspondant à la concentration interne normalisée (ou le niveau de dommage) en dessous de laquelle aucun effet toxique n'est observé. Lorsque la NEC est dépassée, un ou plusieurs paramètres DEB sont affectés au sein des équations de croissance et/ou de reproduction via une fonction de stress  $\sigma$  :

$$\begin{cases} \sigma(C_i^*) = 0 & \text{si } C_i^* < NEC \\ \sigma(C_i^*) = b \times (C_i^* - NEC) & \text{si } C_i^* > NEC \end{cases} \quad (5)$$

Ce stress toxique augmente de façon linéaire par rapport à la concentration interne à partir de la NEC (voir Figure 26).



**Figure 26 : Relation linéaire entre la concentration interne normalisée et le stress toxique dans le modèle toxicodynamique du DEBtox. NEC : No Effect Concentration, b : pente d'intensité de stress**

Différentes hypothèses ont été formulées quant aux modes d'action métaboliques (MoA) des contaminants (Kooijman, Bedaux, 1996). La ou les fonction(s) biologique(s) affectée(s) dépend(ent) de la nature du contaminant.

Certains modes d'actions entraînent une réduction de la taille et de la reproduction, ils sont listés ci-dessous et représentés dans la Figure 27:

1. Diminution de l'énergie assimilée à partir de la nourriture – modèle Assimilation
2. Augmentation des coûts énergétiques de maintenance somatique et de maturité – modèle Maintenance
3. Augmentation des coûts énergétiques de croissance et de maturation – modèle Croissance

D'autres modes d'action entraînent des effets directs sur la reproduction, sans réduction de la taille :

4. Augmentation des coûts de production des œufs – modèle Coûts
5. Augmentation de la mortalité lors de l'oogenèse – modèle Oogenèse

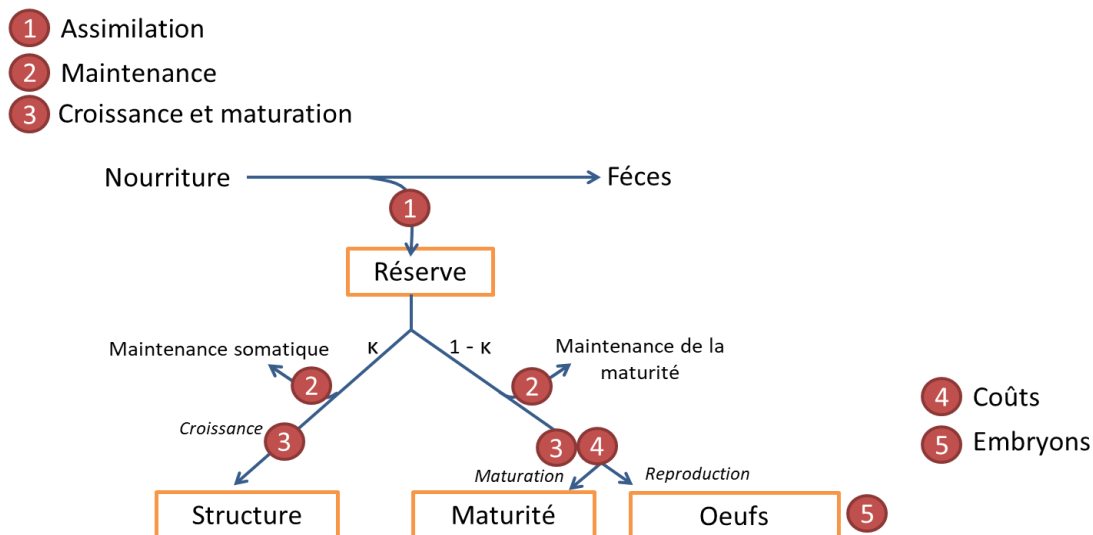


Figure 27 : Modes d'action métaboliques du modèle DEBtox perturbant les flux d'énergie au sein de l'organisme (Jager and Zimmer, 2012). Il existe 5 modes d'action : 1) Réduction de l'assimilation, 2) augmentation des coûts énergétiques de maintenance somatique et de maturité, 3) augmentation des coûts de croissance et de maturation, 4) augmentation du coût de production des œufs et 5) mortalité lors de l'oogenèse

### 3.2.3 DEBtox simplifié et équations des modèles d'effets

Le modèle DEBtox tel qu'il est décrit à l'origine par Kooijman et Metz (1984) a été simplifié plusieurs fois afin de réduire le nombre de paramètres et faciliter leur estimation (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008 ; Jager, Zimmer, 2012).

Voici les plus importantes simplifications :

- Un ratio fixe entre l'énergie allouée à la structure et celle allouée à la maturité dans les stades embryon et juvénile, ce qui implique une puberté à une taille structurelle fixe. Il devient donc inutile de suivre la maturité comme variable d'état.
- Le coût énergétique d'un œuf reste constant, sauf en cas d'effet direct du contaminant.
- Si on considère que les organismes sont nourris *ad libitum*, on fait alors l'hypothèse que les réserves sont à l'état d'équilibre et la dynamique des réserves n'est plus représentée de façon explicite dans le modèle

Ces simplifications réduisent à 7 le nombre de paramètres à estimer :  $L_m$ ,  $L_p$ ,  $r_B$ ,  $R_m$ ,  $k_e$ ,  $NEC$ ,  $b$  (l'ensemble des paramètres et variables sont détaillés dans le Tableau 4). Lorsque les organismes sont nourris *ad libitum*, la réponse nutritive fonctionnelle  $f$  est égale à 1 et on considère que la taille à la naissance  $L_b$  et le ratio de l'investissement d'énergie  $g$  sont fixés à des valeurs de la littérature :  $g = 1$  pour *D. magna* à 20 C (Kooijman, Bedaux, 1996). L'ensemble de ces

paramètres est basé sur des hypothèses mécanistes et a une interprétation biologique.

Dans ce modèle simplifié, la croissance et la reproduction des organismes en l'absence d'exposition à un contaminant sont calculées selon les équations suivantes :

Croissance en taille :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l) \quad (6)$$

Avec  $l(0) = l_b$

Reproduction :

$$R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (7)$$

Avec  $R(0) = 0$

En cas d'exposition à un contaminant, les équations de croissance et de reproduction sont modifiées en fonction du mode d'action en jeu :

*Modèle Assimilation :*

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f(1-\sigma(C_i^*)) + g} (f(1 - \sigma(C_i^*)) - l) \quad (8)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ f(1 - \sigma(C_i^*)) l^2 \left( \frac{g+l}{g+f(1-\sigma(C_i^*))} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (9)$$

*Modèle Maintenance :*

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B (f - l(1 + \sigma(C_i^*))) \quad (10)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1 - l_p^3} (1 + \sigma(C_i^*)) \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma(C_i^*))^{-1} + l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (11)$$



*Modèle Croissance :*

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f+g(1+\sigma(C_i^*))} (f-l) \quad (12)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma(C_i^*)) + l}{g(1+\sigma(C_i^*)) + f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (13)$$

*Modèle Coûts :*

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (14)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma(C_i^*))^{-1} & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (15)$$

*Modèle Oogenèse :*

$$\text{Croissance} \quad \frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (16)$$

$$\text{Reproduction} \quad R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < lp \\ \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma(C_i^*)} & \text{si } l > lp \end{cases} \quad (17)$$

**Tableau 4. Paramètres et variables du modèle DEBtox simplifié avec leur symbole, leur interprétation et leur unité (# pour les nombres, l pour la taille, t pour le temps, c pour la concentration et [-] pour un paramètre dans unité).**

Symbole	Unité	Interprétation
$L_m$	l	Taille maximale
$L_b$	l	Taille à la naissance
$L_p$	l	Taille à la puberté
$l$	[-]	Taille normalisée par la taille maximale
$l_b$	[-]	Taille à la naissance normalisée par la taille maximale
$l_p$	[-]	Taille à la puberté normalisée par la taille maximale
$r_B$	$t^{-1}$	Taux de croissance de von Bertalanffy
$R$	$\#.t^{-1}$	Taux de reproduction journalier
$R_m$	$\#.t^{-1}$	Taux de reproduction maximum
$C_e$	c	Concentration externe
$C_i$	c	Concentration interne
$C_i^*$	c	Concentration interne normalisée par le facteur de bioconcentration
$k_e$	$t^{-1}$	Taux d'élimination du contaminant
$\sigma$	[-]	Niveau de stress
$NEC$	c	Concentration sans effet (No Effect Concentration)
$b$	$c^{-1}$	Pente de la fonction de stress

### 3.3. Application du modèle DEBtox

Depuis ses premiers développements (Kooijman, Bedaux, 1996), le modèle DEBtox a été utilisé à de nombreuses reprises en écotoxicologie pour analyser les effets de divers stressés environnementaux et pour mieux comprendre les modes d'action métaboliques à l'origine de l'apparition des effets à l'échelle de l'organisme. Le modèle DEBtox a notamment été utilisé dans l'analyse des effets de métaux lourds, de pesticides, de nanoparticules ou de radionucléides (Arzul et al., 2006 ; Billoir et al., 2011 ; Goussen et al., 2015 ; Holden et al., 2013 ; Jager et al., 2007 ; Massarin et al., 2011 ; Miller et al., 2017)paragraphe 3.3.1) avec des espèces issues de divers groupes taxonomiques, principalement des invertébrés comme des crustacés des annélides, des mollusques ou des nématodes, mais aussi des poissons et du phytoplancton (Augustine et al., 2012 ; Barsi Alpar et al., 2014 ; Klok et al., 1997 ; Kooijman et al., 1996 ; Miller et al., 2010 ;

Péry et al., 2008 ; Pieters et al., 2006). Il a également été appliqué à l'analyse des effets sous différents scénarios de contamination, notamment des expositions pulsées (Pieters et al., 2006) et des mélanges de contaminants (Baas et al., 2010 ; Jager et al., 2010), ou bien en interaction avec différentes conditions environnementales (Bontje et al., 2009 ; Cedergreen et al., 2016 ; Goussen et al., 2016 ; Klok et al., 1997). Les prédictions du modèle à l'échelle de l'organisme ont aussi été utilisées pour prédire les effets à l'échelle de la population en utilisant des matrices de Leslie ou des IBM (Individual based Model) (Billoir et al., 2007 ; Martin et al., 2013).

### 3.3.1 Le DEBtox et les radiations ionisantes

Les études DEBtox appliquées aux radiations ionisantes sont résumées dans le Tableau 5. L'étude de Lecomte-Pradines et al. (2017) est la première à introduire le débit de dose des radiations gamma comme métrique de dose, à la place de la concentration interne. On ne parle plus alors de concentration sans effet (NEC), mais de débit de dose sans effet (NEDR). Parisot (2015) a analysé les résultats de deux études multigénérationnelles concernant l'effet d'une irradiation gamma externe et d'une contamination alpha interne sur *D. magna*. (Alonzo et al., 2008 ; Parisot et al., 2015). Pour expliquer la dynamique des effets observée sur la croissance et la reproduction des daphnies au fil des générations (Parisot, 2015), deux compartiments de dommages, utilisés comme métrique de dose et impliqués dans deux modes d'actions différents, ont été nécessaires (voir section 3.3.2).

**Tableau 5. Description des études DEBtox appliquées à l'exposition aux radiations ionisantes.**

Exposition aux radiations ionisantes	Espèce	Mode d'action (MoA)	Référence
Irradiation gamma externe ( $^{137}\text{Cs}$ )	<i>C. elegans</i>	MoA1 : Coûts de croissance et de maturation MoA2 : Réduction du stock de gamètes	(Lecomte-Pradines et al., 2017)
Irradiation gamma externe multigénérationnelle ( $^{137}\text{Cs}$ )	<i>Daphnia magna</i>	MoA1 : Coûts de l'œuf MoA2 : Coûts de croissance et de maturation	(Parisot, 2015)
Contamination alpha interne multigénérationnelle ( $^{241}\text{Am}$ )	<i>Daphnia magna</i>	MoA1 : Coûts de l'œuf MoA2 : Coûts de maintenance de la structure et de la maturité	(Parisot, 2015)

### 3.3.2 Modélisation DEBtox dans un contexte multigénérationnel

Pour certains contaminants et certaines espèces, l'exposition sur plusieurs générations peut

entraîner des réponses différentes selon la génération. Pour pouvoir alors analyser ces effets avec le modèle DEBtox, l'évolution de la sensibilité des organismes au fil des générations doit être prise en compte.

Par exemple, dans le cas de l'uranium appauvri, l'analyse DEBtox des données de croissance et de reproduction Massarin et al. (2011) a permis d'identifier une réduction de l'assimilation comme mode d'action le plus probable et ce résultat a été appuyé par la détection en microscopie d'importants dommages histologiques au niveau de l'épithélium du tube digestif des daphnies et par l'observation d'une réduction de l'assimilation du carbone (Massarin et al., 2010). Puisqu'aucune augmentation de la bioconcentration de l'uranium n'a été observée au fil des générations (Massarin et al., 2010), l'aggravation des effets a été modélisée à l'aide de fonctions de stress différentes pour chaque génération, avec des valeurs décroissantes de *NEC* et croissantes de *b* (Massarin et al., 2011) (Figure 28). Toutefois, Le mécanisme causant l'augmentation du stress toxique sur l'assimilation au fil des générations n'a pas été expliqué.

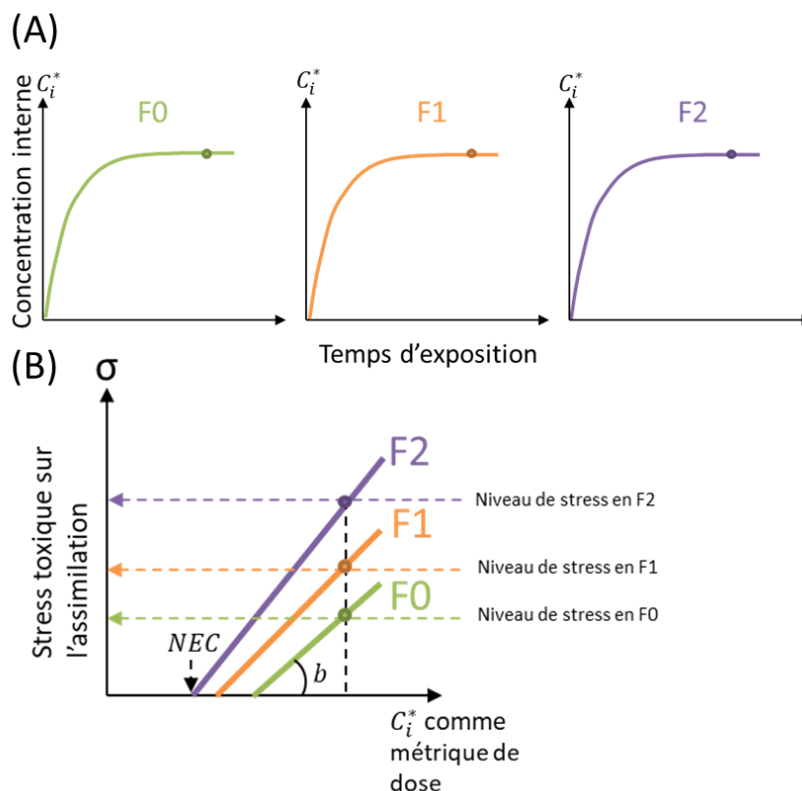


Figure 28 : Représentation schématique de l'internalisation de l'uranium appauvri de façon similaire sur trois générations exposées (A), et du stress toxique sur l'assimilation dépendant de la génération afin de décrire l'aggravation des effets selon les hypothèses (Massarin et al., 2011) à partir des données de (Massarin et al., 2010).

Par la suite, le dommage transmis d'une génération à une autre a été considéré comme le mécanisme sous-jacent causant l'aggravation des effets toxiques. Dans le modèle DEBtox, un niveau de dommage, identique à celui décrit par Jager et al. (2011), a été introduit avec comme propriété d'être héritable (Alonzo et al., 2014 ; Plaire, 2013). Comme expliqué dans le paragraphe 2.2.1, ce niveau de dommage  $D$ , est normalisé par son taux de bioconcentration, donnant l'équation suivante :

$$\frac{D^*}{dt} = k_r(C_i - D^*) \quad (18)$$

Avec  $D^*$  le niveau de dommage normalisé tel que  $D^* = \frac{k_r}{k_d}D$ ,  $k_r$  le taux de réparation du dommage,  $k_d$  le taux d'accumulation du dommage et  $C_i$  la concentration interne du contaminant (en pratique on utilisera plutôt la concentration externe  $C_e$  pour éviter la difficulté liée à l'autocorrélation des paramètres  $k_e$  et  $k_d$ ).

Les analyses DEBtox ont suggéré deux modes d'action de l'uranium à savoir une réduction de l'assimilation (*modèle Assimilation*), induite par l'internalisation de l'uranium appauvri, et une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*modèle Croissance*), induite par l'accumulation et la transmission d'un dommage héritable (Alonzo et al., 2014) (Figure 29).

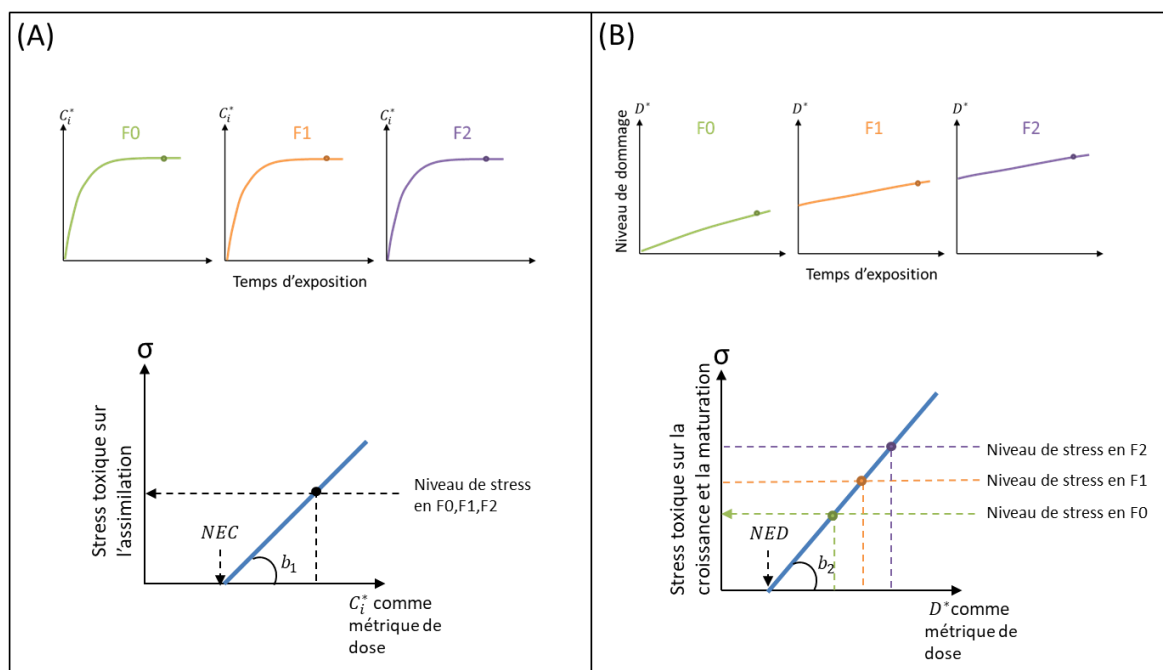


Figure 29. Représentation schématique des deux stress toxiques impliqués lors de l'exposition de *D. magna* à l'uranium appauvri et de leur métrique de dose avec : (A) le stress toxique sur l'assimilation, (B) le stress toxique sur la croissance et la maturation (Alonzo et al., 2014).

#### 4. L'estimation des paramètres du modèle DEBtox

##### 4.1. L'approche fréquentiste classique

Les paramètres du modèle DEBtox sont estimés à partir des données expérimentales au cours d'une démarche statistique appelée inférence. L'inférence consiste à estimer les valeurs des paramètres tout en réduisant la différence entre les données observées ( $Y_{\text{obs}}$ ) et les données simulées par le modèle ( $Y_{\text{sim}}$ ). Pour ce faire, un grand nombre d'études DEBtox ont utilisé des méthodes basées sur le maximum de vraisemblance et les moindres carrés (Kooijman, Bedaux, 1996 ; Péry et al., 2003 ; Jager et al., 2004 ; Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008 ; Jager, Zimmer, 2012 ; Plaire, 2013 ; Parisot, 2015). Ces méthodes se rapportent à une approche dite fréquentiste, qui considère que chaque paramètre  $\theta$  a une valeur inconnue, mais fixe, alors que les données observées sont aléatoires. Aucune distribution de probabilité n'est associée aux paramètres mêmes, les seules probabilités considérées sont les probabilités d'échantillonnage des données observées  $P(Y|\theta)$ , conditionnelles au paramètre. Quant à l'intervalle de confiance du paramètre  $\theta$ , ses bornes sont des grandeurs aléatoires. Un intervalle de confiance à 0,95 signifie que 95% des intervalles calculés sur l'ensemble des échantillons possibles contiennent la vraie valeur de  $\theta$  (Lecoutre, 2005).

Toutefois, dans le cadre de l'estimation des paramètres du modèle DEBtox, ces méthodes rencontrent certaines difficultés et limitations liées à la complexité et à la non-linéarité du modèle (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008). Les estimations de paramètres à des valeurs aberrantes et les difficultés à interpréter les intervalles confiances calculés pour des paramètres fortement corrélés sont les principaux problèmes statistiques formulés envers ces méthodes (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008). C'est dans ce cadre qu'une alternative à cette approche fréquentiste, l'inférence bayésienne, a été proposée pour l'estimation des paramètres du DEBtox (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008 ; Billoir, Delignette-Muller, Péry, Charles, 2008). Contrairement à l'inférence fréquentiste qui n'utilise que les données expérimentales, l'inférence bayésienne utilise également des connaissances *a priori* sur les paramètres, sous forme de distribution *a priori* des paramètres ( $P(\theta)$ ), facilitant l'estimation des paramètres en particulier lorsque les données expérimentales sont peu nombreuses. Dans le cas du DEBtox, Ces connaissances *a priori* peuvent provenir de données

acquises lors de précédentes expérimentations ou bien de raisonnements biologiques.

#### 4.2. L'inférence bayésienne

L'inférence bayésienne considère que la valeur de chaque paramètre ( $\theta$ ) est aléatoire et suit une distribution de probabilité conditionnelle aux données observées,  $P(\theta|Y)$ , aussi appelée distribution *a posteriori* du paramètre. En se basant sur le théorème de Bayes présenté en 1763, cette approche part du principe que tout expérimentateur possède des connaissances *a priori* sur le système étudié, sous la forme de distributions de probabilité *a priori* des paramètres du modèle, et que ces connaissances vont être révisées sur la base des données acquises par l'expérimentation, aboutissant à une distribution de probabilité *a posteriori* des paramètres reflétant à la fois l'information *a priori* et les données expérimentales.

Les distributions *a posteriori* sont formulés selon le théorème de Bayes :

$$P(\theta|Y) = \frac{P(Y|\theta)P(\theta)}{P(Y)} \quad (19)$$

Avec :

- $P(Y|\theta)$ , la distribution de probabilité des données  $Y$  conditionnelle aux paramètres, on l'appelle la vraisemblance des données.
- $P(\theta)$ , la distribution de probabilité des paramètres, non conditionnelle aux données, on l'appelle la distribution *a priori* des paramètres.
- $P(Y)$ , la distribution de probabilité des données, non conditionnelle aux paramètres.

Etant donné que  $P(Y)$  est indépendant de  $\theta$ , le théorème de Bayes peut être simplifié par la formule suivante, à un coefficient constant près :

$$P(\theta|Y) \propto P(Y|\theta)P(\theta) \quad (20)$$

La distribution *a posteriori* des paramètres est proportionnelle au produit de la vraisemblance des données et de la distribution *a priori* des paramètres.

De nombreuses études ont mis en avant les avantages de l'approche bayésienne pour estimer des paramètres dans les domaines de l'écologie et l'écotoxicologie (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Charles, 2008 ; Ellison, 2004 ; Johnson et al., 2013 ; Link, Barker, 2009 ; Ludwig, 1996), dont :

- La prise en compte d'une expertise antérieure (données expérimentales antérieures, connaissances générales liées au paramètre...), évitant ainsi de fixer la valeur de certains paramètres.
- La possibilité d'intégrer simultanément différents types de données (par exemple, des données de croissance et de reproduction), sans avoir besoin de leur attribuer des poids différents.
- La disponibilité immédiate d'un intervalle de crédibilité pour chaque paramètre à partir de leur distribution *a posteriori*. Un intervalle de crédibilité à 95 % signifie que la probabilité que la valeur du paramètre se trouve dans cet intervalle est de 95%. Cette interprétation est souvent réalisée à tort pour l'intervalle de confiance dans une approche fréquentiste.



---

**PARTIE B. ÉTUDE DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES  
TRANSGENERATIONNELLES LORS D'UNE IRRADIATION GAMMA  
EXTERNE CHEZ *DAPHNIA MAGNA***

---



Cette partie est consacrée à l'étude des modifications épigénétiques, leur transmission au fil des générations et leur lien avec les effets sur les traits d'histoire de vie suite à une irradiation gamma chez *D. magna*. Pour rappel, les objectifs de cette partie sont de : (i) Préciser le rôle de la méthylation de l'ADN, un mécanisme épigénétique, dans la réponse aux radiations en fonction du débit de dose, (ii) Tester la transmission de modification de la méthylation de l'ADN vers la descendance non exposée, (iii) Examiner si les modifications de la méthylation sont associées à des effets sur la survie, la croissance ou la reproduction.

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique publié dans Environmental Science and Technology (Annexe 10):

Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna* Exposed to Chronic  $\gamma$  Irradiation par Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K. A., & Alonzo, F. (2018)



## Chapitre VI. : Matériels et Méthodes

### 1. Élevage des daphnies au laboratoire

Les daphnies utilisées appartiennent à l'espèce *Daphnia magna* (clone A, INERIS, Verneuil-sur-Halatte, France). Elles sont élevées dans des conditions optimales de reproduction parthénogénétiques conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE pendant de nombreuses générations (>50) au laboratoire avant d'être utilisées dans les expérimentations (OECD, 2012).

Dans l'élevage, les daphnies sont maintenues à la densité d'un individu pour 50 mL dans le milieu de culture M4 à pH8 (voir composition dans l'Annexe 1), renouvelé à 50% une fois par semaine par un milieu frais saturé en oxygène. Les unités d'élevage contenant 2 L de milieu environ sont placées dans des chambres thermostatées à une température de 20 °C ( $\pm 1$  °C) et une intensité lumineuse de 20  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (~1500 lux) avec une photopériode lumière:obscurité de 16:8 h. (Figure 30).



**Figure 30. Élevage des daphnies dans des pichets contenant 40 daphnies dans 2 L de milieu M4 , au sein d'une chambre thermostatée (A) et élevage des micro-algues *Chlamydomonas reinhardtii* (B)**

Les élevages sont contrôlés quotidiennement. En cas d'éclosion d'une ponte, le milieu de culture est tamisé afin de maintenir une densité optimale d'individus à travers 2 tamis de taille de maille différente, de 1 mm pour récupérer les adultes et de 180  $\mu\text{m}$  pour retenir les néonates. Les néonates sont ensuite éliminés ou utilisés pour commencer une nouvelle génération. Les élevages

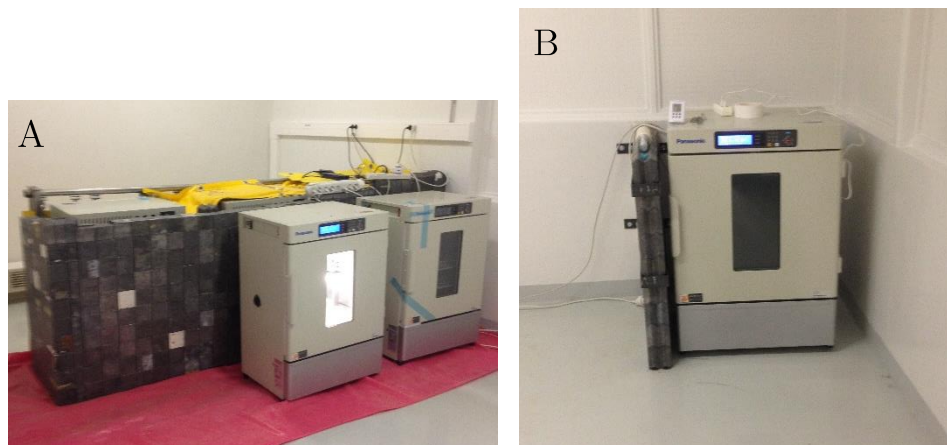
sont renouvelés tous les 25 jours avec des néonates, âgés de 24 h ou moins, issus de la 5<sup>e</sup> ponte.

Après le tri des néonates, les daphnies sont nourries quotidiennement (5 jours sur 7) avec des algues vertes phytoplanctoniques unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* (souche 11/32B, CCAP, Oban, RU). La ration journalière est de 100 µg de carbone par daphnies, ce qui correspond à environ 4 millions de cellules phytoplanctoniques par daphnie. Les algues sont cultivées en conditions axéniques, dans 1 ou 2 L de milieu HSM aéré (High Salt Medium, voir composition dans l'Annexe 2). Les algues sont collectées en phase exponentielle de croissance et leur concentration est mesurée à l'aide du compteur de particule Z2 (Beckman-Coulter, Brea, Etats-Unis). Elles sont centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture M4 avant d'être distribuées aux daphnies.

## 2. Dispositif d'irradiation gamma

### 2.1. L'irradiateur gamma externe MIRE

L'irradiation gamma externe a été réalisée dans l'irradiateur MIRE (Mini-Irradiator for Radio-Ecology) à l'IRSN à Cadarache. Cet Irradiateur est composé de 5 sources scellées, liquides ou solides, de Césium 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ) provenant du CERCA-LEA (Areva, Pierrelatte, France), placées chacune dans une chambre thermostatique ventilée. Seules 3 des 5 sources ont été utilisées lors des expérimentations menées dans le cadre de cette thèse : la source de plus faible activité (1,64 Mbq) et les deux sources d'activité identique la plus forte (1,93 GBq chacune). Des murs en briques de plomb sont présents autour des irradiateurs afin d'éviter les irradiations croisées entre les différents traitements et de protéger de toute irradiation provenant des sources gamma la chambre thermostatée témoin, placée à l'écart dans la même pièce. (Figure 31). Lors d'une irradiation, les unités expérimentales sont disposées dans chaque chambre thermostatique autour de la source. Chaque source possède un chapeau de plomb mobile qui peut être abaissé lors de la manipulation des unités expérimentale et relevé lors des phases d'irradiation des daphnies.



**Figure 31. Installation MIRE. A) les cinq chambres thermostatées contenant les sources radioactives (deux seulement sont visibles, les trois autres sont derrière le mur en briques de plomb), B) Chambre thermostatée témoin, ne contenant pas de source radioactive, placée dans la même pièce et protégée par un mur en briques de plomb.**

### ***2.2. Un dispositif expérimental d'irradiation pour les daphnies***

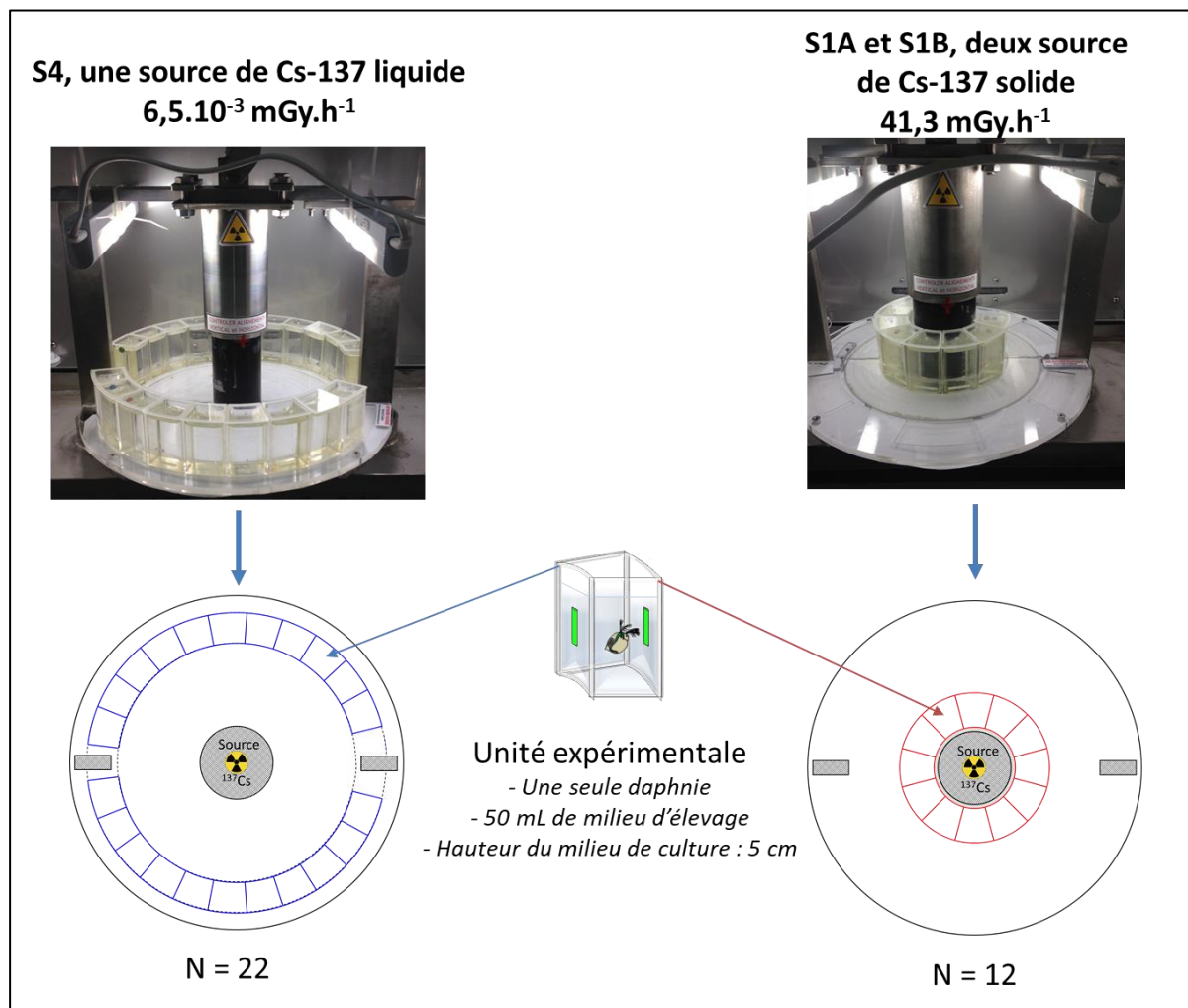
Le dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation des daphnies dans l'irradiateur MIRE a été spécialement conçu lors de thèse de Florian Parisot (Parisot, 2015). La conception de ce dispositif a suivi un certain nombre de critères respectant les lignes directrices de l'OCDE (OECD 2012) :

- (1) permettre une irradiation des daphnies dans des unités expérimentales individuelles de 50 mL et de la hauteur du faisceau d'irradiation (5 cm), disposées de manière équidistante à la source ;
- (2) optimiser le nombre de réplicats pour permettre le suivi de la survie et de la reproduction sur 10 individus et la réalisation de 12 à 14 échantillons pour les analyses biométriques et/ou moléculaires ;
- (3) minimiser, autant que possible, la variabilité du débit de dose absorbé par les daphnies entre les faces avant et arrière des unités.

L'irradiation a été associée à une étude dosimétrique, réalisée par Nicolas Dubourg (responsable technique du GARM, IRSN), visant à estimer les débits de dose, en Gy par unité de temps, auxquels les organismes étaient soumis. Ces débits de dose, estimés numériquement à l'aide du code MCNP (Monte Carlo N-Particle code) permettant de calculer en 3D l'atténuation des radiations ionisantes avec la distance parcourue dans l'air et dans le milieu (Briesmeister, 2000), ont été vérifiés pendant l'expérience grâce à des mesures réalisées à l'aide de dosimètres Radio Photo Luminescents (RPL, type GD-301, Chiyoda Technol Corporation, Japon) placés à l'avant et à l'arrière des unités expérimentales. Le débit de dose moyen reçu par chaque daphnie a été estimé au centre des unités expérimentales en supposant un déplacement aléatoire des daphnies

dans le milieu.

Les unités expérimentales individuelles permettent de suivre les variables de reproduction et de croissance de chaque daphnie, et de contrôler le niveau de nutrition en évitant toute compétition entre les daphnies.



**Figure 32.** Dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation gamma externe des daphnies lors de l'expérience. Vingt-deux unités expérimentales disposées autour de la source scellée de Césium-137, S4, ont reçu un débit de dose égal à  $6,5 \mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$  et 24 (2x12) unités expérimentales disposées autour de chacune des sources S1A ou S1B ont reçu  $41,3 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$ . Le rectangle vert sur les faces avant et arrière de l'unité expérimentale représente l'emplacement des dosimètres Radio Photo Luminescents utilisés pour valider la valeur des débits de dose.

Les trois sources de  $^{137}\text{Cs}$  utilisées sont représentées dans la Figure 32. Les débits de dose, estimés et mesurés, reçus par les daphnies sont reportés dans le Tableau 6. Le dispositif expérimental a permis l'irradiation de 22 daphnies à  $41,3 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$  et 24 daphnies (12 x 2) à  $6,5 \mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ . Le choix de ces débits de dose est basé sur des résultats antérieurs obtenus avec *D. magna* (Parisot et al., 2015):  $41,3 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$  est un débit de dose élevé pour lequel des effets significatifs au niveau de la reproduction et des dommages à l'ADN ont été observés tôt dans la génération F0, et  $6,5 \mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$



<sup>1</sup> est un débit de dose faible, plus représentatif d'une exposition en zone contaminée tel qu'à Tchernobyl (Garnier-Laplace et al., 2013), pour lequel des dommages à l'ADN ont été détectés en fin de génération F0 et dès le début de la génération F2, sans effet sur la reproduction.

**Tableau 6. Débits de dose reçus par les daphnies au centre des unités expérimentales, estimés avec les calculs du code Monte-Carlo N-Particle (MCNP) et mesurés avec des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL), selon la source de césium-137 utilisée et son activité en Bq. Les valeurs de débits de dose sont des moyennes  $\pm$  plage de variation calculée entre les parois avant et arrière des unités expérimentales. L'erreur relative entre les débits de dose nominaux et mesurés a également été calculée.**

Source	Activité (Bq)	Débit de dose (mGy.h-1)		Erreur relative (%)
		Nominal (MCNP)	Mesuré (RPL)	
S1 (A and B)	1,93. 10 <sup>9</sup>	44,25 $\pm$ 26,52	41,29 $\pm$ 25,18	7%
S4	1,64. 10 <sup>6</sup>	0,0063 $\pm$ 0,0019	0,0065 $\pm$ 0,0022	4%

### 3. Design expérimental

#### **3.1. La mise en évidence d'un effet transgénérationnel lié à l'exposition des daphnies aux radiations gamma**

Une transmission transgénérationnelle des modifications épigénétiques à la descendance a été testée en examinant si d'éventuelles modifications épigénétiques, transmises par les gamètes, sont présentes dans les générations qui n'ont subi strictement aucune exposition aux radiations (Youngson, Whitelaw, 2008).

Les femelles *D. magna*, comme chez tous les cladocères, portent leur progéniture dans leur poche incubatrice dorsale, pendant toute la durée de leur développement embryonnaire. C'est lors de ce stade embryonnaire que la lignée germinale à l'origine de la génération suivante se met en place (Sagawa et al., 2005). Ainsi, l'exposition de la génération F0 est indissociable de celles des générations F1 (stade embryonnaire) et F2 (sous forme de cellules de la lignée germinale à l'intérieur des embryons F1).

Ainsi, une première génération de daphnies (génération F0) a été exposée aux radiations gamma, l'exposition a été stoppée chez la descendance, à partir de l'éclosion de la génération F1. La génération F3 est alors la première génération complètement exempte d'exposition aux radiations.

Plus en détail, l'exposition de la génération F0 (maintenue en condition contrôle ou exposée à 6,5  $\mu$ Gy.h<sup>-1</sup> et 41,3 mGy.h<sup>-1</sup>) a été débutée au stade œuf (5<sup>e</sup> ponte) portée par une génération

parentale P (Figure 33). Cette génération P a été produite par des daphnies issues d'une même ponte. L'exposition de la génération F0 a été poursuivie sur le cycle de vie entier (26 jours) jusqu'à l'éclosion de la 5<sup>e</sup> ponte. Les néonates qui en sont issus (génération F1) ont été transférés dans les 24h suivant leur éclosion vers une nouvelle chambre thermostatée, où les générations en récupération (F1, F2 et F3) étaient maintenues hors du local d'irradiation. Pour des raisons pratiques, ce sont les néonates issus de la 4<sup>e</sup> ponte des générations F1 et F2 qui ont été utilisés pour constituer respectivement, les générations F2 et F3.

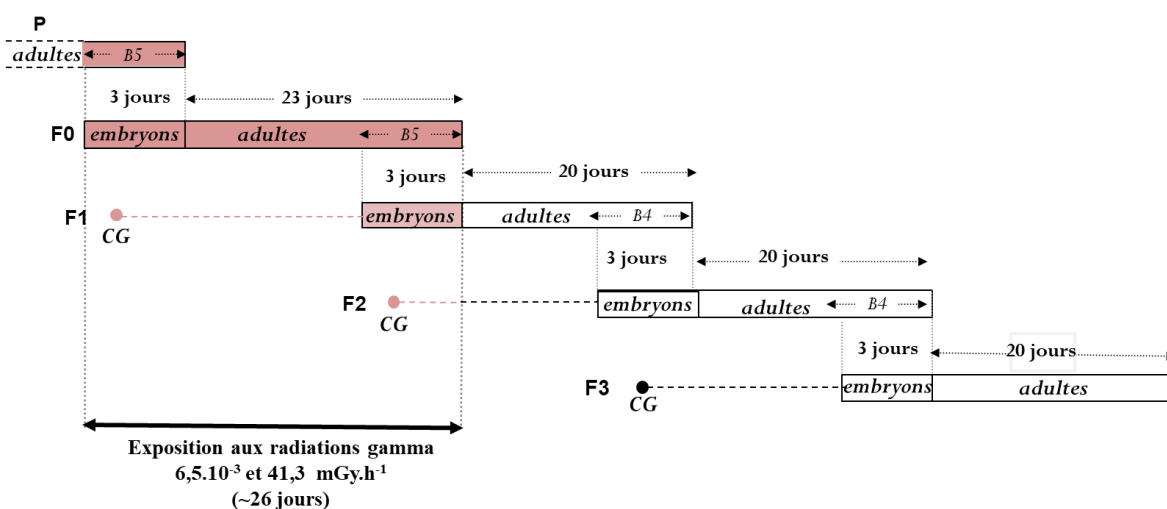


Figure 33. Design expérimental utilisé pour mettre en évidence des modifications épigénétiques transgénérationnelles lors d'une irradiation gamma de *Daphnia magna*. CG : Cellules Germinales, B4 et B5 : 4<sup>e</sup> ou 5<sup>e</sup> ponte, utilisée pour la génération suivante.

Les apports de nourriture étaient identiques à ceux de l'élevage, à une fréquence de six jours sur sept. Le milieu d'élevage de chaque unité expérimentale a été renouvelé à la même fréquence.

### 3.2. Suivi de la survie et de la fécondité

La survie et l'âge des daphnies au moment de chaque ponte ont été suivis sur dix unités expérimentales par traitement, choisies au hasard au début de chaque génération. Au moment de l'éclosion de la ponte, les néonates ont été prélevés des unités expérimentales, comptés et éliminés.

### 3.3. Mesure de la taille et de la masse

La taille et la masse ont été mesurées au stade néonate (< 24h après éclosion) et au moment des pontes 1, 3 et 6 (générations F0 et F1) ou 1, 3 et 5 (générations F2 et F3), sur 5 réplicats par

traitement. La taille des daphnies a été mesurée depuis le sommet de la capsule céphalique jusqu'à la base de l'épine caudale, à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'une règle micrométrique. Les œufs ont ensuite été retirés en pressant délicatement sur la poche incubatrice à l'aide d'une pince. Chaque daphnie prélevée et chaque ponte (œufs intacts seulement) ont été transférées dans des micro-coupelles pré-pesées. Les échantillons ont été séchés pendant 48 h dans une étuve à 60 °C, puis mis à refroidir dans un dessiccateur et pesés immédiatement sur une microbalance (SE2, Sartorius, Aubagne, France) avec une précision de 0,1 µg.

#### 4. Analyses statistiques sur les données de croissance et de fécondité

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.3.2).

Deux équations, formulées dans le modèle DEB (Kooijman, 2010), permettent de modéliser la croissance, la masse sèche des daphnies au cours du temps (Tableau 7). Ces équations ont été ajustées aux données de taille et de masse en utilisant le critère des moindres carrés pour modèles non linéaires (fonction *gnls*). La normalité des résidus a été testée avec des tests de Shapiro-Wilk et l'homoscédasticité des résidus a été testée avec le test de Levene. Les courbes ajustées du traitement témoin et des traitements exposés ont été comparées grâce à une analyse de covariance en appliquant la procédure séquentielle de Holm pour la comparaison multiple (Holm, 1979).

La fécondité a été comparée entre les traitements témoins et exposés, indépendamment pour chaque ponte, en utilisant une ANOVA à un facteur contrôlé suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunnett. Une transformation Box-Cox a été appliquée en cas de rejet des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité. Les différences d'âge à la libération des néonates entre les traitements témoins et exposés ont été analysées avec un test de Kruskal-Wallis.

**Tableau 7 : Équations utilisées pour modéliser la croissance en taille et en masse des daphnies en accord avec le modèle DEB (Kooijman, 2010)**

Critère mesuré	Equations	Paramètres
Taille du corps (mm)	$L(t) = L_m - (L_m - L_b)e^{(-r_B \cdot t)}$	$L_m$ : Taille maximale (mm) $L_b$ : Taille à la naissance (mm) $r_B$ : taux de croissance de von Bertalanffy ( $j^{-1}$ )
Masse sèche du corps (µg)	$W(t) = \delta \cdot L(t)^3$	$\delta$ : Coefficient de forme ( $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ )

## 5. Analyse de la méthylation de l'ADN

### 5.1. Choix et préparation des échantillons d'ADN

Chaque échantillon d'ADN a été extrait à partir de plusieurs daphnies adultes, afin d'obtenir la quantité minimum de 1 µg d'ADN, requise par le laboratoire d'analyse (Tableau 8). Les daphnies ont été collectées le jour de leur 5<sup>e</sup> ponte (génération F0) ou 4<sup>e</sup> ponte (génération F2 et F3), individuellement congelées à l'azote liquide et conservées à -80 °C. À la fin de l'expérience, les daphnies ont été décongelées, débarrassées des œufs contenus dans leur poche incubatrice et réunies par échantillon dans des tubes eppendorf. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen), dont le protocole modifié est décrit dans l'Annexe 3. Les échantillons ont ensuite été stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse de la méthylation.

Un échantillon d'ADN a été préparé pour chaque traitement, soit 3 conditions (témoin, 6,5 µGy.h<sup>-1</sup> et 41,3 mGy.h<sup>-1</sup>) et trois générations (F0, F2 et F3), pour un total de 9 échantillons.

La méthylation de l'ADN a été analysée dans la génération F0 afin d'examiner les modifications induites lors d'une exposition aux radiations gamma sur tout le cycle de vie, et dans les générations F2 et F3 afin de déterminer si certaines des modifications induites lors de l'exposition au stade de cellule de la lignée germinale (F2) auraient pu être transmises à la génération F3 non exposée.

**Tableau 8 : Échantillons d'ADN sélectionnés pour l'analyse de la méthylation, avec le nombre de daphnies et la quantité d'ADN les constituant.**

Génération	Traitement (mGy.h <sup>-1</sup> )	Nombre de daphnies	Quantité d'ADN (µg)
F0	T	4	3,6
	6,5.10 <sup>-3</sup>	4	4,7
	43.1	4	4
F2	T	3	2
	6,5.10 <sup>-3</sup>	4	1,8
	43.1	2	4,9
F3	T	6	4,5
	6,5.10 <sup>-3</sup>	8	3,9
	43.1	4	5,8

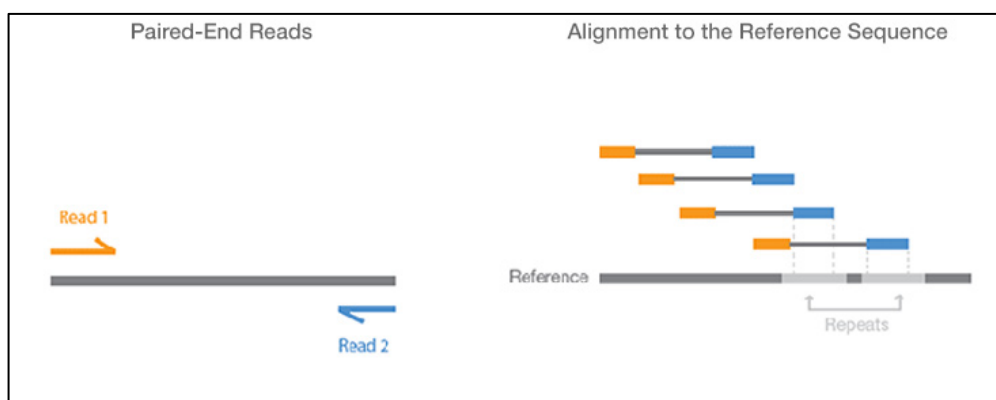
### 5.2. Le séquençage bisulfite

Les échantillons d'ADN ont été expédiés à la société BGI (Beijing Genomics Institute, Hong-Kong, Chine) qui a réalisé des contrôles qualité, le traitement au bisulfite, la préparation des

librairies et le séquençage.

La qualité des échantillons a été évaluée en utilisant un Bioanalyser (Agilent technologies). Le traitement au bisulfite, subi par les échantillons d'ADN, a été réalisé à l'aide du kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, Costa Mesa, Etats-Unis). Ce traitement convertit les cytosines non-méthylées en uracile. Au préalable, un brin d'ADN témoin entièrement non-méthylé, celui du phage *Lambda*, a été ajouté à chaque échantillon afin d'estimer l'efficacité de la conversion bisulfite (Bonasio et al., 2012).

Les échantillons d'ADN ont ensuite été fragmentés par sonication (taille moyenne ~300 pb) puis les librairies d'ADN ont été préparées pour le séquençage avec le kit TruSeq DNA Methylation (Illumina, San Diego, Etats-Unis). Les échantillons ont été séquencés avec un séquenceur Illumina HiSeq-2000 (Illumina, San Diego, Etats-Unis). Plus de 80 millions de lectures « en paire » (paired-end reads en anglais) de haute qualité (98% des lectures avec un score Phred supérieur à 30) ont été générées pour chaque échantillon (Annexe 4). Le séquençage en paire signifie que chaque fragment d'ADN est séquencé à partir de chacune de ses deux extrémités sur un nombre de paires de bases définies, ici 100 pb. Contrairement au séquençage de première génération qui réalisait des lectures uniques (single reads en anglais), les lectures en paires facilitent l'alignement des séquences, en particulier sur des régions répétitives du génome. (Figure 34).



**Figure 34. Principe du séquençage en paire (paired-end sequencing)**

Les données brutes de ce séquençage ont ensuite été obtenues et rendues accessibles dans la base de données GEO (Gene Expression Omnibus) sous le numéro de dépôt GSE108426. La totalité de l'analyse bio-informatique des données a été réalisée au LECO.

### **5.3. Contrôle de la qualité des échantillons séquencés et alignement**

La qualité des lectures a été contrôlée avec le logiciel FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). Les séquences correspondant aux adaptateurs utilisés pour le séquençage et les séquences de faible qualité de lecture (score Phred <30) ont été supprimées des données à l'aide du logiciel Trim Galore ! (Version 0.4.2, Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). Les lectures ont été alignées au génome de référence de *D. magna* (v2.4, Bioproject PRJNA298946 dans NCBI) avec les logiciels Bismark (version 0.16.3, Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK) et Bowtie2 (version 2.2.9) en utilisant le paramétrage de la fonction de score suivant : --score\_min L,0,-0.6 (Krueger, Andrews, 2011). Afin de pouvoir aligner les lectures issues d'ADN converti au bisulfite, le génome de référence a préalablement subi une conversion de ses cytosines en thymines, ce qui équivaut à une conversion *in silico* au bisulfite.

### **5.4. Détection du polymorphisme nucléotidique**

Le génome de référence de *D. magna* (v2.4, Bioproject PRJNA298946 dans NCBI) étant séquencé à partir d'un clone Xbin3, différent du clone A utilisé dans notre expérience, une détection préalable du polymorphisme nucléotidique (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism, en anglais) a été conduite pour éviter de confondre les variations de certaines paires de bases entre clones avec des conversions liées au traitement bisulfite. Pour ce faire, le génome d'une daphnie du clone A, séquencé sans traitement au bisulfite, a été comparé au génome de référence à l'aide de la fonction mpileup du logiciel SAMtools (Li, 2011) et les cytosines du génome de référence qui n'étaient pas des cytosines dans le génome du clone A ont été identifiées et retirées de l'analyse des échantillons, afin de ne pas être interprétées à tort comme des cytosines méthylées.

### **5.5. Calcul du niveau de méthylation des CpGs**

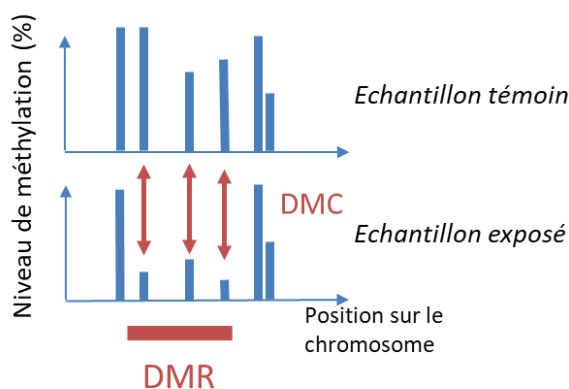
Les cytosines suivies d'une guanine, communément appelées sites CpG, sont la cible principale de la méthylation de l'ADN chez la plupart des invertébrés (Bird, 2002), y compris les daphnies (Asselman et al., 2017). Seules les cytosines appartenant à un site CpG, couverts par au moins 5 lectures et présents dans tous les échantillons analysés, ont été incluses dans notre analyse, pour un total d'environ 5,4 millions de sites CpG.

Pour chaque lecture, l'état de méthylation de chaque site CpG (méthylé ou non méthylé) a été extrait avec le logiciel Bismark (Krueger, Andrews, 2011). Les faux positifs ont été détectés grâce

à un test binomial réalisé pour chaque site CpG. Ce test binomial a été basé sur l'efficacité de la conversion bisulfite (de 99,4 à 99,6 %) calculée à partir de l'ADN non méthylé du phage *Lambda*. Pour chaque cytosine reconnue comme méthylée, un niveau de méthylation, égal au nombre de lectures de l'état méthylé divisé par le nombre total de lectures du site CpG, est calculé.

### 5.6. L'analyse différentielle de la méthylation

L'analyse différentielle a pour but de détecter, dans chaque traitement exposé, les cytosines et les groupes de cytosines (DMC et DMR pour Differentially Methylated Cytosine et Differentially Methylated Region) dont le niveau de méthylation est significativement différent du traitement témoin (Figure 35). Pour ce faire, le traitement exposé a été comparé au traitement témoin de la même génération. Au total, 6 analyses différentielles ont été réalisées (2 traitements x 3 générations).



**Figure 35 : Principe général de l'analyse différentielle de la méthylation de l'ADN permettant la détection des DMC (Differentially Methylated Cytosines) et des DMR (Differentially Methylated Regions) en comparant les niveaux de méthylation des échantillon ADN témoin et exposé grâce au package DSS sur R (Feng, Conneely, and Wu 2014; Wu et al. 2015)**

#### 5.6.1 Analyse différentielle sous DSS

L'analyse a été réalisée sur un ensemble de 74020 CpG sélectionnées d'après les recommandations de (Huh et al., 2017), soit environ 1,4% du total de 5,4 millions. Cette sélection visait à éliminer toutes les cytosines qui ne présentaient aucune variation de leur niveau de méthylation dans l'ensemble des échantillons. Les DMC et les DMR ont été détectés sous R grâce au package DSS (Dispersion Shrinkage for Sequencing Data, version 2.14.0) (Feng et al., 2014). En l'absence de réplicats (Wu et al., 2015), le package DSS permet de modéliser la variabilité du niveau de méthylation de chaque cytosine à l'aide d'une distribution bêta-binomiale, paramétrée par la

moyenne  $\mu_i$  et la dispersion  $\varphi_i$ . L'estimation de  $\mu_i$  et  $\varphi_i$  se base sur la corrélation spatiale entre les niveaux de méthylation des sites CpG voisins, utilisés comme pseudo-réplicats (Wu et al., 2015). Les valeurs de  $\mu_i$  et  $\varphi_i$  ont été estimés grâce à une fonction de lissage à moyenne mobile centrée (centered moving average smoothing en anglais) sur une fenêtre de 80 paires de bases. La définition de la taille de la fenêtre est détaillée ci-après. Pour chaque CpG, les niveaux de méthylation entre l'échantillon témoin et l'échantillon exposé ont été comparés grâce à un test de Wald utilisant les estimations de  $\mu_i$  et  $\varphi_i$ , l'hypothèse nulle correspondant à l'absence de différence entre les niveaux moyens de méthylation de l'échantillon témoin et l'échantillon exposé ( $H_0: \mu_{témoin} = \mu_{exposé}$ ). Les valeurs-p obtenues ont ensuite été corrigées grâce à la procédure de contrôle du taux de fausses découvertes (FDR : False Discovery Rate, en anglais) telle qu'elle est définie par Benjamini et Hochberg (Benjamini, Hochberg 1995). La FDR correspond au taux de vraies hypothèses nulles rejetées à tort parmi toutes les hypothèses rejetées. Lorsque la valeur-p corrigée est en dessous de 5 %, les taux de méthylation sont considérés significativement différents entre l'échantillon témoin et l'échantillon exposé au site CpG considéré, que l'on qualifie alors de DMC. Cette procédure, depuis l'étape de lissage jusqu'au test de Wald, a été réalisée grâce à la fonction *DMLtest*. Les DMR ont été définies comme des régions d'au moins 50 paires de bases, comprenant au moins 5 sites CpG et 50 % de DMC significatives parmi les sites CpG. Une version modifiée de la fonction callDMR a été utilisée pour détecter les DMR (Annexe 5).

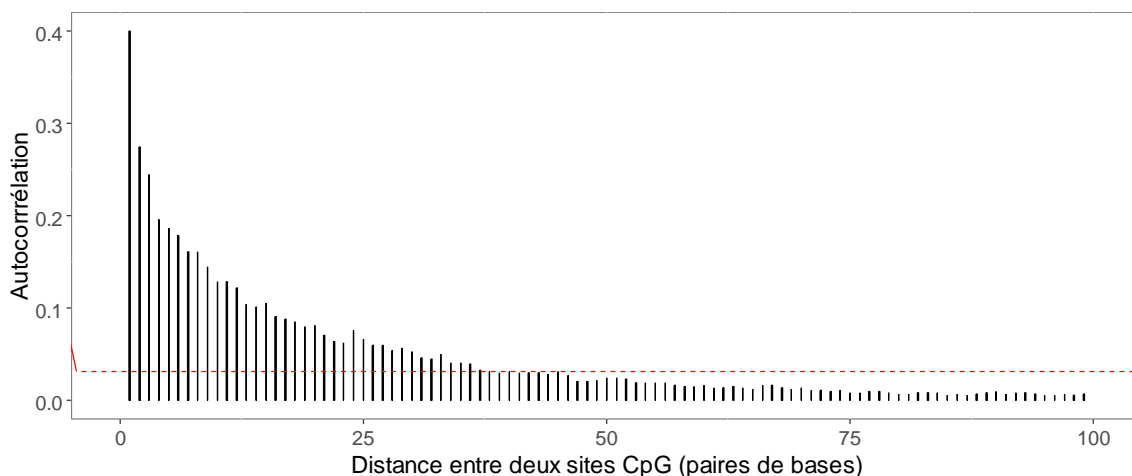
### 5.6.2 Taille de la fenêtre de lissage

La daphnie, comme la plupart des invertébrés, présente une méthylation de l'ADN en mosaïque, concentrée sur de petites régions, principalement dans les séquences activement transcrites (Schübeler, 2015 ; Asselman et al., 2017). Le lissage sur une fenêtre trop grande pourrait donc entraîner une estimation incorrecte des niveaux moyens de méthylation  $\mu_i$  dans des zones où la corrélation spatiale de la méthylation diminue fortement. La taille de la fenêtre de lissage nécessite d'être optimisée afin ne pas fausser l'estimation des niveaux de méthylation  $\mu_i$  (Huh et al., 2017).

La taille adéquate pour la fenêtre de lissage est déterminée à l'aide de l'échantillon témoin de la génération F0, en calculant la corrélation des niveaux de méthylation entre deux sites CpG en fonction de leur distance. Ce calcul a été réalisé pour chaque chromosome en utilisant la fonction



acf sous R, puis les valeurs des coefficients de corrélation en fonction de la distance ont été moyennées sur l'ensemble des chromosomes (Figure 36).



**Figure 36. Autocorrélation des niveaux de méthylation entre des sites CpG séparés d'une distance. Le seuil de significativité, fixé à 0.03, est représenté en pointillés rouge.**

On a considéré que l'autocorrélation n'était plus significative lorsqu'elle tombait en dessous de 0.03. Comme l'autocorrélation atteint la valeur de 0,03 autour d'une distance de 40 paires de bases et que le lissage à moyenne mobile est centré, on a choisi une largeur de fenêtre de lissage de 80 paires de bases.

### 5.6.3 Comparaison des échantillons témoins

Des analyses différentielles complémentaires ont été réalisées entre les échantillons témoin des générations F0, F2 et F3 pris deux à deux. L'identité des DMC issues de ces analyses a été comparée à celle des DMC issues de l'analyse entre échantillons témoin et exposés, afin de déterminer quelles DMC risquaient d'être liées à une variation entre les générations chez le témoin plutôt qu'à une réelle réponse aux radiations ionisantes.

### **5.7. Identification des régions géniques et des gènes concernés par les modifications de la méthylation**

Les annotations du génome de *D. magna* (daphnmagna\_2011pubfc8.gff3) disponibles sur WFleabase.org (Orsini et al., 2017) ont permis de déterminer si les DMC appartenaient à une région génique (intron ou exon) ou à une région intergénique. Afin de déterminer si les DMC étaient surreprésentées dans une de ces régions, une analyse d'enrichissement a été réalisée pour chaque traitement : la distribution des DMC entre les trois différents types de régions génomiques (introns, exons, régions intergéniques) a été comparée à la distribution de la totalité des sites

CpG entre ces trois mêmes types de régions génomiques. Cette analyse d'enrichissement a été réalisée avec un test de Fisher, l'hypothèse nulle correspondant à ce que la distribution des DMC entre les régions génomiques soit identique à celle des sites CpG. Les valeurs-p ont ensuite été corrigées en utilisant la méthode FDR Benjamini-Hochberg (Benjamini, Hochberg, 1995).

Peu d'informations sont disponibles chez *D. magna* pour identifier la fonction des gènes concernés par des modifications de la méthylation. Dans ce contexte, l'analyse a été limitée à une identification de la fonction des gènes basée sur la classification KOG (euKariotic Orthologous Genes) de *Daphnia pulex* disponible sur le site internet du Joint Genomic Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/kogBrowser?db=Dappu1>). Chaque gène d'intérêt a ainsi été regroupé dans une catégorie KOG, déterminée à partir du gène orthologue de *D. pulex*, c'est-à-dire à partir du gène identifié comme ayant des origines et des fonctions communes chez les deux espèces, lorsqu'il était renseigné (Tatusov et al., 2003) (Tableau 9)

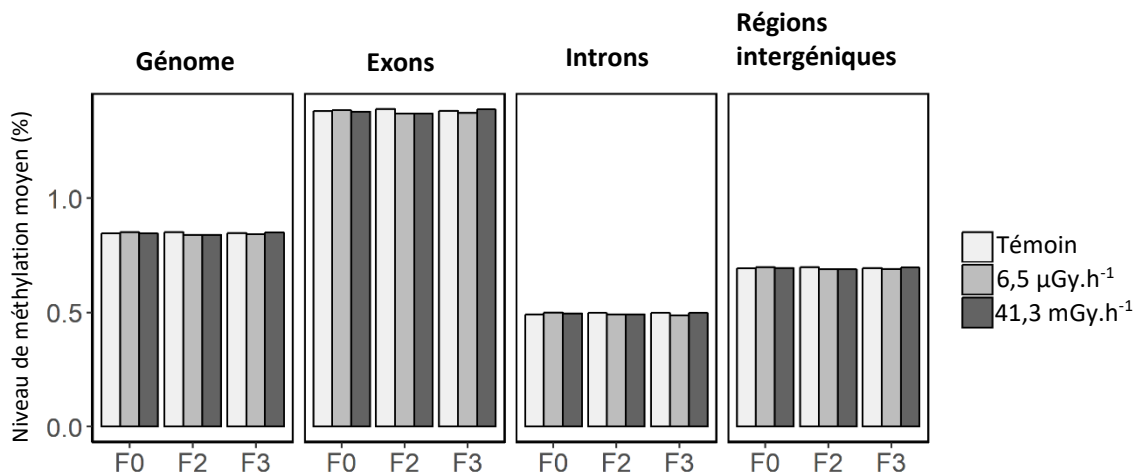
**Tableau 9. Liste des catégories KOG (euKariotic Orthologous Genes) (Tatusov et al., 2003) et des fonctions biologiques associées**

KOG	Fonction biologique
A	Traitement et modification des ARN
B	Structure et dynamique de la chromatine
C	Production et conversion énergétiques
D	Contrôle du cycle cellulaire et mitose
E	Métabolisme et transport des acides aminés
F	Métabolisme et transport des nucléotides
G	Métabolisme et transport des glucides
H	Métabolisme des Coenzymes
I	Métabolisme des lipides
J	Traduction
K	Transcription
L	Réplication et réparation
M	Biogenèse des parois cellulaires/membranes/enveloppes
N	Motilité cellulaire
O	Modifications post-traductionnelles, turn-over des protéines, fonctions de chaperon
P	Transport et métabolisme des ions inorganiques
Q	Structure secondaire
T	Transduction du signal
U	Trafic et sécrétion intracellulaire
Y	Structure du noyau
Z	Cytosquelette
R	Prédiction d'une fonction générale seulement
S	Fonction inconnue

## Chapitre VII. Résultats et Discussion

### 1. Les modifications de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome

L'effet des radiations gamma sur la méthylation de l'ADN a été évalué à l'échelle du génome et à l'échelle de différentes régions génomiques (exons, introns, régions intergéniques) (Figure 37).



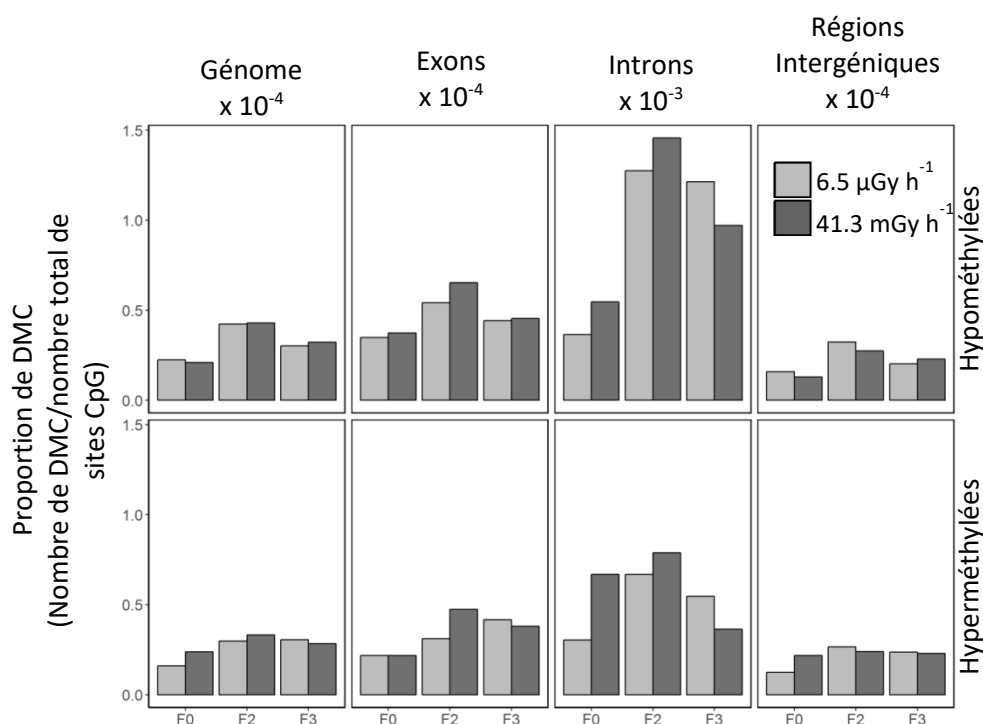
**Figure 37. Niveau de méthylation moyen (%) calculé sur l'ensemble des sites CpG du génome et dans différentes régions génomiques (exons, introns, régions intergéniques) pour les traitements témoin, 6,5 µGy.h<sup>-1</sup> et 41,3 mGy.h<sup>-1</sup> aux générations F0, F2 et F3.**

Le niveau de méthylation moyen des sites CpG au niveau du génome entier est d'environ 0.85% pour les échantillons témoins. Cette valeur est légèrement plus élevée, mais dans le même ordre de grandeur que celles rapportées précédemment pour *D. magna*, allant de 0,25 à 0,52 % (Asselman et al., 2015, 2016 ; Vandegheuchte et al., 2009). La variabilité du niveau moyen de méthylation de l'ADN entre les différents clones de daphnies pourrait expliquer cette différence (Asselman et al., 2015). Ce niveau de méthylation moyen reste toutefois cohérent avec les faibles niveaux de méthylation moyens relevés chez les invertébrés dans différentes études, contrastant avec ceux des vertébrés, en particulier les mammifères dont la valeur se situe plutôt entre 60 et 90 % (Glastad et al., 2011). Une importante variation du niveau de méthylation moyen a été observée entre les différentes régions génomiques : les exons sont les plus méthylés (1,38%) suivis des régions intergéniques (0,69%) puis des introns (0,49%). Cette observation est en accord avec l'étude d'Asselman et al. (2017) qui a rapporté un profil de méthylation similaire entre les régions génomiques, appuyant l'hypothèse selon laquelle les gènes sont la cible principale de la méthylation de l'ADN chez les invertébrés (Zemach et al., 2010 ; Suzuki et al., 2007).

Aucune différence significative de niveau de méthylation moyen n'a été détectée entre traitements exposés et témoins, aussi bien au niveau du génome que des différentes régions génomiques. Ce résultat contraste avec ceux de différentes études qui ont observé un effet significatif des radiations ionisantes sur le niveau moyen de méthylation, notamment une hyperméthylation de certains tissus chez des plantes et des grenouilles provenant des zones contaminées de Tchernobyl et Fukushima (Kovalchuk et al., 2003 ; Igor Kovalchuk et al., 2004 ; Gombeau, 2015), et une hypométhylation du foie et du thymus, chez des rongeurs exposés de façon aiguë ou chronique aux radiations ionisantes (Tawa et al., 1998 ; Koturbash et al., 2006 ; Pogribny et al., 2004). Il faut toutefois rester prudents dans nos comparaisons. En effet, notre étude diffère de celles citées ci-dessus par les techniques employées pour mesurer la méthylation globale de l'ADN et par l'échelle d'organisation biologique étudiée. Notre étude examine la méthylation de l'ADN à l'échelle de daphnies entières, ce qui a conduit à moyenniser le niveau de méthylation et a potentiellement empêché la distinction de changements spécifiques à certains types cellulaires ou certains tissus.

## 2. Les modifications de la méthylation de l'ADN à l'échelle des CpG

Des modifications significatives de la méthylation de l'ADN à l'échelle des CpG ont été détectées à tous les débits de dose et toutes les générations (Figure 38). En génération F0, 209 et 243 DMC sur  $5,4 \cdot 10^6$  CpG au total ont été détectés à  $6,5 \mu\text{Gy h}^{-1}$  et  $41,3 \text{ mGy h}^{-1}$  respectivement. En génération F2, ces proportions sont plus élevées, avec 392 et 413 DMC détectées et en génération F3, 330 et 329 DMC à  $6,5 \mu\text{Gy h}^{-1}$  et  $41,3 \text{ mGy h}^{-1}$ . Pour résumer, ce sont entre 4 et 7 DMC pour 100 000 CpG qui ont été détectées, selon les générations.



**Figure 38. Proportions de DMC hypométhylées et hyperméthylées (nombre de DMC/nombre total de sites CpG) dans le génome entier et dans différentes régions génomiques (Exons, introns, régions intergéniques) pour les générations F0, F2 et F3 exposées ou descendant de générations exposées à des débits de dose de  $6.5 \mu\text{Gy h}^{-1}$  et  $41.3 \text{ mGy h}^{-1}$ .**

La distribution des DMC entre les différentes régions génomiques a été comparée à celle des sites CpG sur l'ensemble du génome (Figure 38). Dans tous les traitements, le nombre de DMC dans les régions intergéniques était significativement plus petit ( $p < 0,001$ ) qu'attendu d'une distribution aléatoire des DMC sur l'ensemble des CpG. La proportion de DMC dans les introns et les exons était significativement plus élevée ( $p < 0,01$ ) que celle des CpG. Dans tous les traitements et toutes les régions génomiques, des DMC hypométhylées et hyperméthylées (c'est-à-dire présentant des niveaux de méthylation significativement inférieurs ou supérieurs à ceux de

l'échantillon témoin) ont été observées. Ces observations suggèrent que les modifications de la méthylation dans les introns et les exons pourraient avoir un important rôle fonctionnel dans la réponse des daphnies aux radiations ionisantes. Une étude concernant l'exposition de *D. magna* à des cyanobactéries avait également suggéré que les modifications de la méthylation au niveau des exons pourraient intervenir dans une réponse adaptative au stress environnemental, grâce à l'expression de différentes protéines isoformes (Asselman et al., 2017). Bien que son rôle ne soit pas encore totalement élucidé chez les invertébrés, il est probable que la méthylation de l'ADN participe à la régulation de l'épissage alternatif des gènes (Flores et al., 2012 ; Song et al., 2017 ; Park et al., 2011). Par exemple, chez les abeilles, le taux de méthylation semble plus élevé dans les exons transcrits en ARN par rapport aux exons qui ne le sont pas (Flores et al., 2012).

Enfin, le nombre total de DMR détectées allait de 4 à 9 selon le traitement et la génération et chaque DMR contenait de 2 à 6 DMC (Tableau 10). Ce faible nombre de DMR par rapport au nombre total de DMC semble refléter une faible agglomération des DMC dans les échantillons analysés. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation. Premièrement, les échantillons d'ADN étant extraits à partir d'organismes entiers, cela a entraîné un lissage des différences de niveau de méthylation limitant la possibilité de détecter des DMC spécifiques à certains types cellulaires ou tissus. Deuxièmement, la rareté des DMR pourrait être une spécificité des daphnies en particulier ou des invertébrés en général. En effet, la méthylation de l'ADN chez les invertébrés est généralement très faible et suit un profil de méthylation en mosaïque, avec des exons plus méthylés que les introns et les régions intergéniques (Zemach et al., 2010). Ce profil de méthylation et la faible proportion de sites CpG méthylés amoindrit les chances d'observer des DMR, comparativement à la situation observée chez les mammifères (Rakyan et al., 2011), chez lesquels on observe des modifications homogènes de la méthylation des CpG sur des séquences relativement longues, appelées îlots CpG (>500 pb) (Miho Suzuki, Bird, 2008).

**Tableau 10.** Liste de tous les DMR détectés pour les générations F0, F2 et F3, et les débits de dose 6,5  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy h}^{-1}$  avec l'identifiant du gène et l'annotation si la DMR est située dans une région génique.

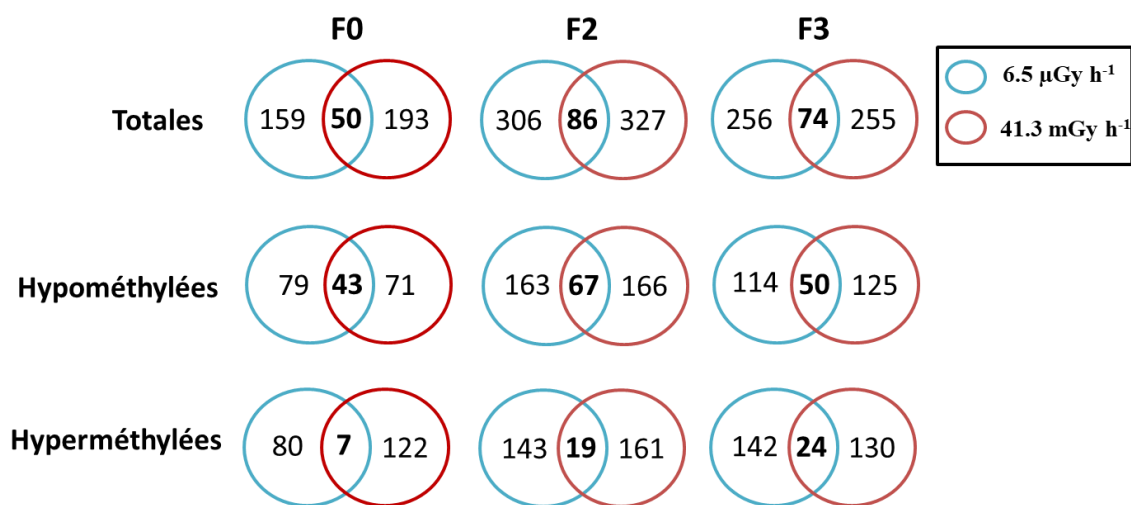
Débit de dose ( $\text{Gy h}^{-1}$ )	Génération	Chromosome	Position		Longueur (# de nucléotides)	nombre de sites CpG	nombre de DMC	Gene ID	Annotation	KOG
			Début	Fin						
0.0065	F0	scaffold03102	84505	84557	53	5	2	Dapma7bEVm003101t1	ATP-dependent RNA Helicase DHX35, putative	A
		scaffold00512	3095106	3095170	65	4		/	/	/
		scaffold00642	1529319	1529402	84	5	3	Dapma7bEVm010687t1	Lysosomal alpha-glucosidase	G
		scaffold00512	3479406	3479458	53	5		/	/	/
	F2	scaffold00687	20389	20449	61	5		/	/	/
		scaffold00725	362247	362322	76	4		/	/	/
		scaffold00890	220	272	53	4		/	/	/
		scaffold01361	1188765	1188832	68	4	2	Dapma7bEVm010587t1	Uncharacterized protein	NA
		scaffold02665	40955	41022	68	4		/	/	/
	F3	scaffold01361	1188878	1188934	57	5	3	Dapma7bEVm010587t1	Uncharacterized protein	NA
		scaffold02902	90375	90425	51	4	2	Dapma7bEVm005882t1	FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein	G
		scaffold00944	989454	989508	55	6	2	Dapma7bEVm011866t1	Translation factor SUI1 protein	J
		scaffold01363	8548	8720	173	4	2	Dapma7bEVm015303t1	Protein MAGE, putative	S
		scaffold00944	696909	696965	57	4		/	/	/
scaffold00469		95916	95966	51	4		/	/	/	
41.3	F0	scaffold01005	1633443	1633498	56	6		/	/	/
		scaffold00781	590054	590107	54	5		/	/	/
		scaffold02545	47269	47346	78	4	2	Dapma7bEVm030722t1	UPF0595 protein	S
		scaffold01936	2231	2315	85	8		/	/	/
		scaffold00512	3479406	3479458	53	5		/	/	/
		scaffold00642	1529347	1529402	56	4	2	Dapma7bEVm010687t1	Lysosomal alpha-glucosidase	G
		scaffold02581	56258	56327	70	4		/	/	/
	F2	scaffold01024	734	835	102	8	6	Dapma7bEVm003534t1	UPF0614 protein	S

Débit de dose(Gy .h <sup>-1</sup> )	Génération	Chromosome	Position		Longueur (# de nucléotides)	nombre de sites CpG	nombre de DMC	Gene ID	Annotation	KOG
			Début	Fin						
		scaffold01764	346174	346240	67	4		/	/	/
		scaffold00115	524563	524717	155	5	3	Dapma7bEVm005785t1	Uncharacterized protein	Z
		scaffold03125	3924	4494	571	4		/	/	/
		scaffold02861	430293	430351	59	6		/	/	/
		scaffold00781	544957	545022	66	5	3	Dapma7bEVm015403t1	at-rich interactive domain-containing protein	K,B
		scaffold01005	1452078	1452160	83	5	3	Dapma7bEVm001409t1	RNA-binding protein 10	R
		scaffold01005	833071	833131	61	4		/	/	/
		scaffold02581	915609	915665	57	4		/	/	/
	F3	scaffold01361	2176963	2177015	53	6	3	Dapma7bEVm002890t1	Proteasome subunit alpha type	O
		scaffold00781	590055	590108	54	6	4	Dapma7bEVm002018t1	Prohibitin-2	O
		scaffold00944	696884	696965	82	6	4	Dapma7bEVm011866t1	Translation factor SU11 protein	J
		scaffold01361	1374014	1374072	59	4	2	Dapma7bEVm006161t1	Uncharacterized protein	B,K



### 3. Les modifications de la méthylation de l'ADN en fonction du débit de dose

Le lien entre les modifications de la méthylation et le débit de dose a été étudié. La comparaison entre les traitements montre que des proportions similaires de DMC (nombre de DMC détectées/74020 sites CpG inclus dans l'analyse) ont été observées aux deux débits de dose, avec des valeurs de 0,3%, 0,5% et 0,4% dans les générations F0, F2 et F3 respectivement (Figure 39). Les DMC communes aux deux débits de dose étaient pour une grande majorité (>75%) hypométhylées.



**Figure 39 : Diagrammes de Venn présentant les DMC communes aux débits de dose 6,5 µGy h<sup>-1</sup> (en bleu) et 41,3 mGy.h<sup>-1</sup> (en rouge) dans les générations F0, F2 et F3.**

Le nombre de DMC communes (50, 86 et 74 dans les générations F0, F2 et F3 respectivement) excédait largement ce qu'on pouvait espérer d'une distribution aléatoire des DMC parmi les CpG considérées dans l'analyse. En effet, la proportion de DMC par rapport au total de 74020 sites CpG étant seulement de 0,5% au maximum, la probabilité d'observer des DMC communes aux deux débits de dose était très faible (0,0025% au maximum), avec un nombre de DMC communes variant de 0 à 2.

Il faut toutefois être prudent dans l'interprétation des DMC communes entre les débits de dose. En effet, parmi ces DMC, 45 à 70 % sont également des DMC détectées entre les générations dans les traitements témoins (Tableau 11). Une partie significative de ces DMC communes entre les débits de dose pourrait être liée à la variation des témoins entre générations. D'autres DMC communes aux débits de dose sont cependant observées et restent surreprésentées dans nos traitements. Cela suggérerait que les modifications de la méthylation ne sont pas survenues de

façon aléatoire, mais ont touché des CpG spécifiques, reflétant vraisemblablement une réponse aux radiations gamma via des mécanismes moléculaires au sein des cellules somatiques de la génération F0 et des cellules germinales de la génération F1.

**Tableau 11 : DMC (Cytosines Différentiellement Méthylées) détectées entre les échantillons témoin des générations F0, F2 et F3, qui sont également présentes parmi les DMC des générations F0, F2 et F3 (témoins vs exposés), parmi les DMC communes aux générations et parmi les DMC communes aux débits de doses.**

		DMC témoin vs exposé														
		F0		F2		F3		F0-F2		F0-F3		F2-F3		0,0065-41,3		
		0,0065	41,3	0,0065	41,3	0,0065	41,3	0,0065	41,3	0,0065	41,3	0,0065	41,3	F0	F2	F3
DMC témoin vs témoin	F0-F2	48	45	76	82	26	26	0	0	0	0	13	12	25	41	13
	F0-F3	46	45	15	23	50	63	1	0	0	0	12	11	31	8	30
	F2-F3	5	2	42	33	22	24	1	0	0	0	0	0	0	17	6
	<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>69</b>	<b>103</b>	<b>99</b>	<b>67</b>	<b>88</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>36</b>	<b>46</b>	<b>33</b>

Nos résultats contrastent avec ceux obtenus précédemment lors d'études *in vivo* et *in vitro* qui suggéraient que le nombre de modifications de la méthylation induites par des radiations ionisantes dépendait de la dose reçue dans les organes de souris (Pogribny et al., 2004 ; Nzabarushimana et al., 2014) et dans les cellules humaines et murines (Kalinich et al., 1989). La comparaison stricte de ces résultats reste encore une fois difficile, du fait des différences d'exposition, entre expositions chroniques et aiguës, ou encore entre fortes et faibles doses. Les tissus analysés, le sexe et l'espèce biologique considérés sembleraient également avoir une forte influence sur le niveau de méthylation de l'ADN (Tawa et al., 1998 ; Pogribny et al., 2004 ; Olga Kovalchuk et al., 2004).

#### 4. Les modifications de la méthylation de l'ADN au fil des générations

L'hypothèse d'une transmission des modifications de la méthylation de l'ADN au fil des générations a été testée en comparant l'identité et le niveau de méthylation des DMC communes à deux générations au moins.

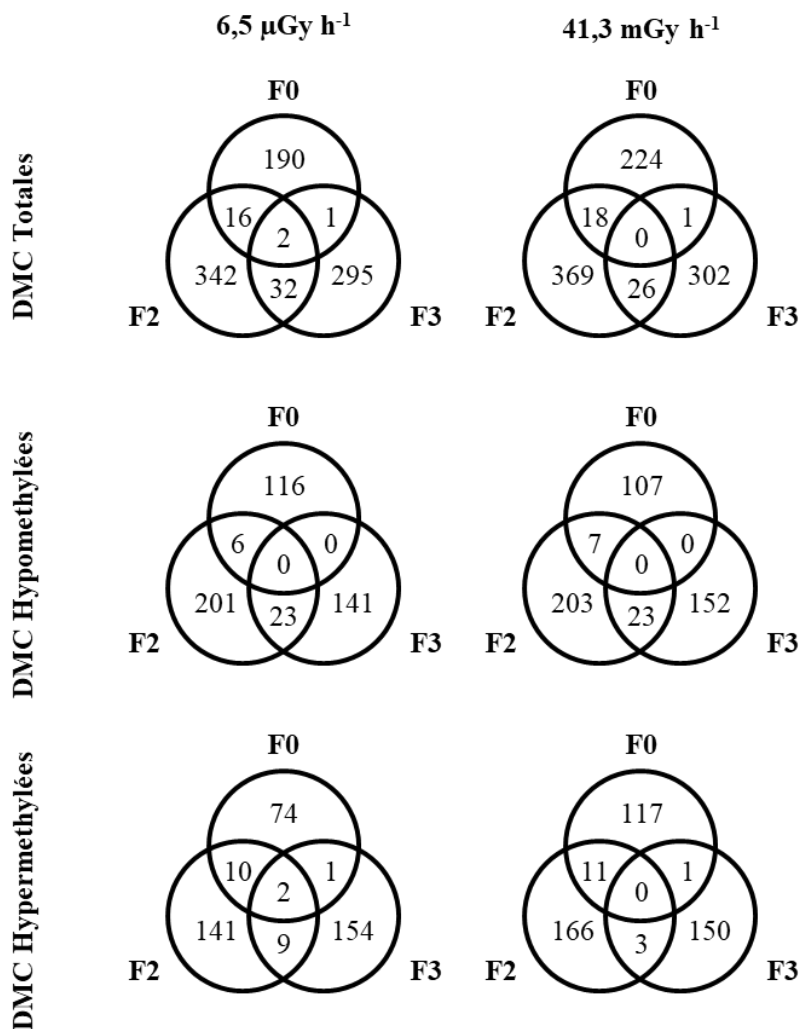


Figure 40 : Diagrammes de Venn montrant, pour les DMCs totales, hypométhylées et hyperméthylées, le nombre de DMC communes aux générations F0, F2 et F3 pour les traitements 6,5 µGy h<sup>-1</sup> et 41,3 mGy h<sup>-1</sup>.

La comparaison des DMC entre les générations (Figure 40) a montré que le nombre total de DMC communes était le plus faible (3 DMC pour 6,5 µGy.h<sup>-1</sup> et 1 DMC pour 41,3 mGy.h<sup>-1</sup>) entre les générations F0 et F3. Ce nombre était plus important entre les générations F0 et F2 avec 18 DMC communes quel que soit le traitement. Les modifications de la méthylation induites par les radiations gamma dans la génération F0 concernaient, en grande majorité, des cellules somatiques. Le faible nombre de DMC en commun entre les générations F0 et F2 pourrait donc

être imputable au fait que ces modifications ne pouvaient pas être transmises à la descendance, seules les modifications qui ont eu lieu dans les cellules germinales étant potentiellement transmissibles (Jablonka, Raz, 2009). La présence de deux DMC hyperméthylées communes aux trois générations montre que certaines modifications de la méthylation de l'ADN ont pu avoir lieu à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales de génération F0 et être transmises aux générations F2 et F3.

Le nombre total de DMC communes était le plus important entre la génération F2 et F3, avec 34 DMC à 6,5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  et 26 DMC à 41,3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Figure 40). La majeure partie de ces DMC communes aux générations F2 et F3 (23 sur 26 ou 34 DMC) étaient hypométhylées. Une majorité de ces DMC hypométhylées (16 sur 23 DMC) étaient également communes entre les traitements. Enfin, la comparaison des DMC communes aux générations F2 et F3 et situées dans des régions géniques (Figure 41) montre le plus souvent un niveau de méthylation similaire entre les générations F2 et F3. De nouveau il faut être prudent dans l'interprétation de ces résultats. En effet, 14 DMC communes entre F2 et F3 pour chaque débit de dose font partie des DMC détectées entre les générations dans le traitement témoin (Tableau 11).

Néanmoins, ces observations suggèrent fortement que des modifications de la méthylation, probablement induites dans les cellules germinales de la génération F1 lors de l'irradiation, pourraient être transmises entre les générations F2 et F3, en particulier dans cas d'une hypométhylation. On pourrait alors faire l'hypothèse que l'hypométhylation des sites CpG contribue à l'instabilité génomique observée sur plusieurs générations chez *D. magna* lors dans une étude antérieure (Parisot et al., 2015). L'hypométhylation a souvent été associée à l'instabilité génomique (Putiri, Robertson, 2011), bien qu'un mécanisme similaire reste à mettre en évidence chez les invertébrés (Zemach et al., 2010 ; Feng et al., 2010). On peut aussi se demander si l'observation de modifications radio-induites transmises au fil des générations n'est pas une spécificité du mode de reproduction parthénogénétique des daphnies et si cette transmission serait également observée dans le cas de la reproduction sexuée. La généralisation de ce phénomène à d'autres espèces est une question qui nécessite des études complémentaires. On peut supposer que l'héritabilité des modifications de la méthylation de l'ADN devrait être fortement limitée chez les espèces, comme les mammifères, qui subissent une étape d'effacement

et reprogrammation de la méthylation du génome dans les gamètes ou au stade zygote (Seisenberger et al., 2013). Au contraire, elle pourrait être bien plus importante chez d'autres espèces d'invertébrés ou de vertébrés, comme le poisson-zèbre, qui ne subissent aucun effacement de la méthylation de l'ADN lors de leur développement (Hackett, Surani, 2013 ; Potok et al., 2013).

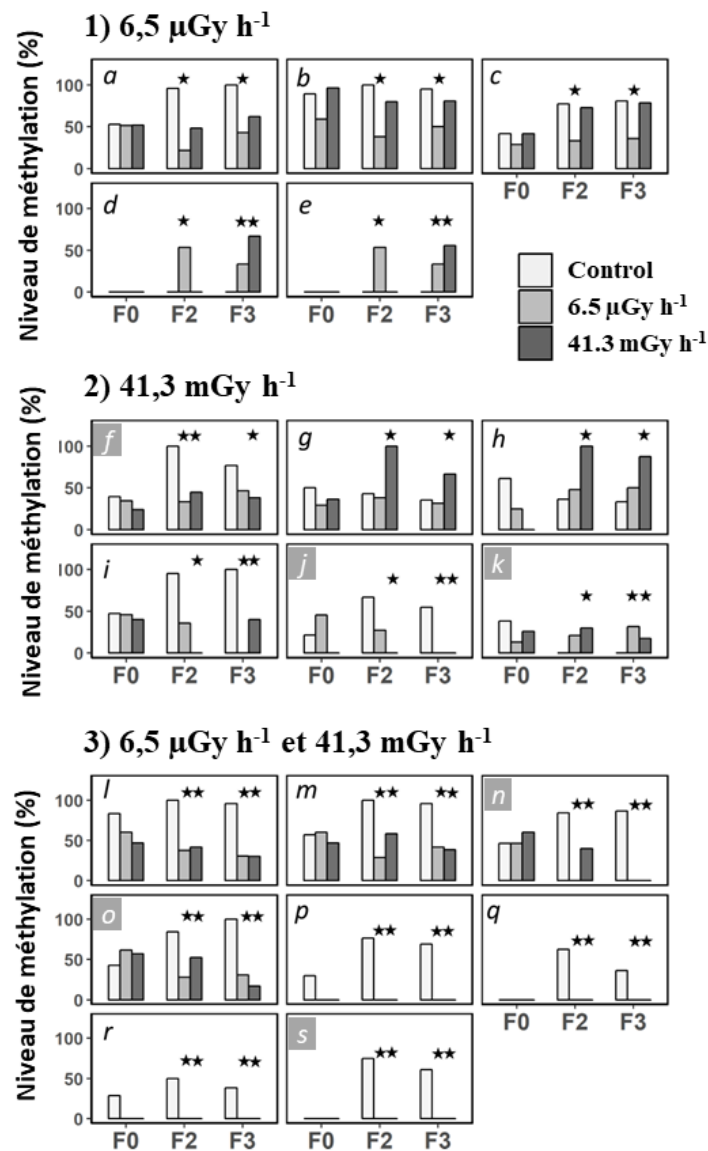
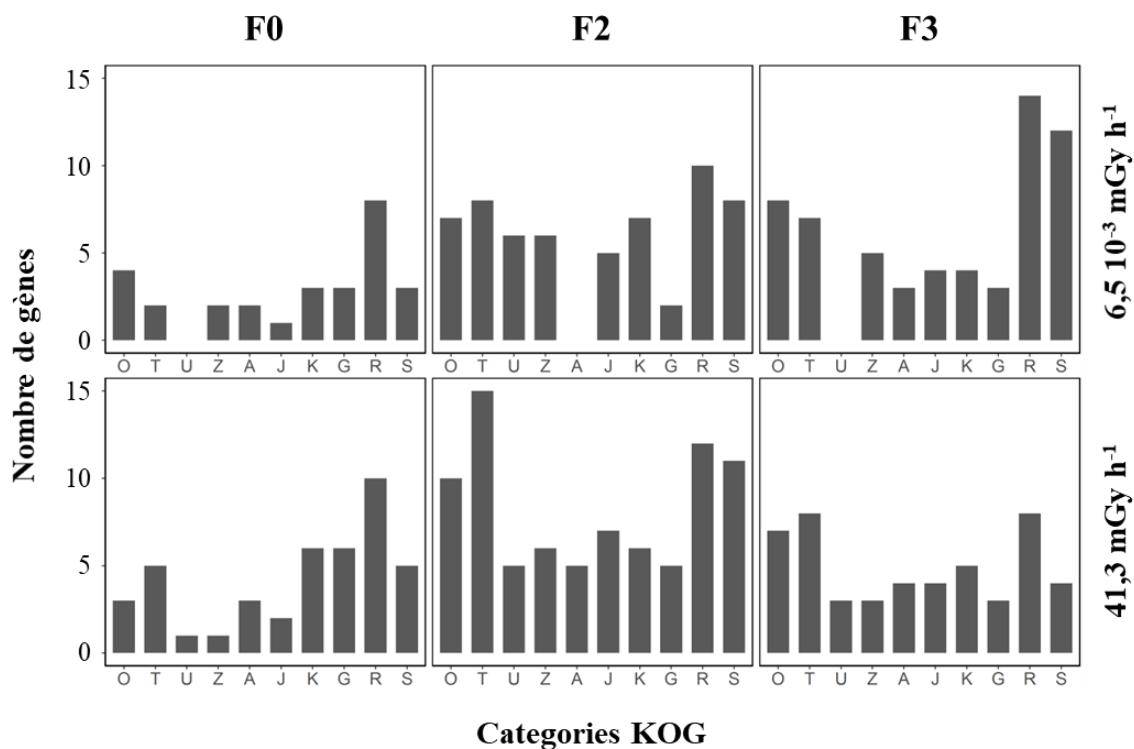


Figure 41. Niveau de méthylation (%) dans les générations F0, F2 et F3 pour des sites CpG localisés dans des régions géniques et correspondant tous à des DMC communes entre les générations F2 et F3, à 6,5  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  (de a à e), 41,3  $\text{mGy h}^{-1}$  (de f à k) ou pour les deux débits de dose à la fois (de l à s). Les DMC sont signalées par une étoile. Les Lettres comportant un fond gris correspondent à des sites CpG qui ont été également été détecté comme DMC entre les échantillons témoin des génération F0, F2 et F3. Identification des gènes: a) Dapma7bEVm643574t1; b) Dapma7bEVm006642t1; c) Dapma7bEVm005020t1; d,e) Dapma7bEVm000594t1; f) Dapma7bEVm007421t1; g,h) Dapma7bEVm008419t1; i) Dapma7bEVm004647t1; j) Dapma7bEVm637841t1; k) Dapma7bEVm005882t1; l,m) Dapma7bEVm636207t1; n,o) Dapma7bEVm001664t1; p) Dapma7bEVm004770t1; q,r) Dapma7bEVm004226t1; s) . Dapma7bEVm001898t1

### 5. Fonctions biologiques des gènes comportant des DMC

Des études antérieures ont montré que la méthylation des régions géniques pouvait avoir un rôle majeur dans l'expression des gènes chez l'abeille (Elango et al., 2009 ; Foret et al., 2009). Cette hypothèse a été explorée chez *D. magna* en identifiant les gènes et les familles de gènes comportant des DMC, ainsi que leurs fonctions biologiques associées (catégorie KOG) quand cela était possible (Figure 42, Annexe 6).



**Figure 42.** Nombre de gènes contenant au moins un DMC dans les générations F0, F2 ou F3, exposées ou en récupération après des expositions à 6,5  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  et 41,3 mGy  $\text{h}^{-1}$ , dans chaque catégorie KOG. Seules les 10 catégories KOG les plus représentées (en incluant les ex aequo) ont été considérées. Certains gènes, représentant des proportions de 38 et 12% en génération F0, 26 et 23 % en génération F2 et 28 et 27% en génération F3 à 6,5  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  et 41,3 mGy  $\text{h}^{-1}$  respectivement, n'ont pas pu être liés à une catégorie KOG.

Les fonctions biologiques les plus représentées dans tous les traitements sont associées à la transduction du signal (catégorie KOG T), à la modification et au turnover des protéines (catégorie KOG O), à la transcription (catégorie KOG K), traitement et modification des ARN (catégorie KOG A), cytosquelette (catégorie KOG Z) et à la traduction (catégorie KOG J). Ces fonctions biologiques ont déjà été mises en avant par des études antérieures rapportant les familles de gènes impliquées dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes (Sakamoto-Hojo et al., 2003). Toutefois, des fonctions biologiques ne sont pas les plus représentées parmi les catégories observées, comme « réplication et réparation » (catégorie KOG L) et « contrôle du

cycle cellulaire » (catégorie KOG D), bien qu'elles jouent un rôle prépondérant dans la réponse aux radiations ionisantes (Li et al., 2001 ; Maier et al., 2016).

Les fonctions de quelques gènes contenant des DMC identifiées en génération F0 (irradiée pendant tout le cycle de vie) ont déjà été liées au stress radiologique lors d'études *in vitro* et *in vivo* chez les humains et les rongeurs. Deux de ces gènes, comportant des DMC communes aux deux débits de dose, codent pour les protéines suivantes : une « X-box-binding protein » (Dapma7bEVM007629t1) qui a été associée au stress du réticulum endoplasmique et à la mort cellulaire à la suite d'une irradiation (Zhang et al., 2010 ; Çetinkaya, Gül Dursun, 2016), et une « Anaphase-promoting complex subunit » (Dapma7bEVM003591t1), sous-exprimée suite à une irradiation afin de retarder la mitose des cellules endommagées (Zhou, Rigaud, 2001). Un des gènes comportant des DMC détectées à  $6,5 \mu\text{Gy h}^{-1}$  code pour la protéine « Clip-domain serine protease » (Dapma7bEVM005724t1). Les protéases à sérine ont été impliquées dans l'apoptose radio-induite des cellules humaines (Gong et al., 1999), mais les « Clip-domain serine protease » pourraient avoir une fonction différente chez arthropodes, en lien avec la réponse immunitaire (Kanost, Jiang, 2015).

Parmi les gènes comportant des DMC communes aux générations F2 et F3, certaines codaient pour des protéines qui ont également été associées avec l'exposition aux radiations ionisantes. Une protéine « 60S ribosomal protein L28 » (Dapma7bEVM004770t1, Figure 41.p), impliquée dans la régulation de la traduction, a été liée à une dérégulation radio-induite de l'expression des gènes dans le développement du cœur chez des rongeurs (Bakshi et al., 2013). Une protéine « 70 kDa HEAT shock protein » (Hsp70) (Dapma7bEVM636207t1, Figure 41.l et Figure 41.m), impliquée dans la réponse cellulaire à différents stress, à la stabilité des protéines et à la prévention de la mort cellulaire (Lee et al., 2001), était sur-exprimée après une exposition aux radiations ionisantes (Landis et al., 2012) et a également été associée à une réponse adaptative (Park et al., 2000). L'association de ce gène avec des DMC communes aux générations F2 et F3 suggérerait que *D. magna* puisse développer une résistance aux radiations. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une fécondité plus forte dans la génération F1 lors d'une irradiation continue aux radiations gamma (Parisot et al., 2015).

## 6. Effets à l'échelle de l'organisme

### 6.1. Effets sur la survie

Au cours de l'expérience, la mortalité des daphnies n'a jamais dépassé 10% à la fin de chaque génération et aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements exposés et témoins, quelle que soit la génération (Figure 43).

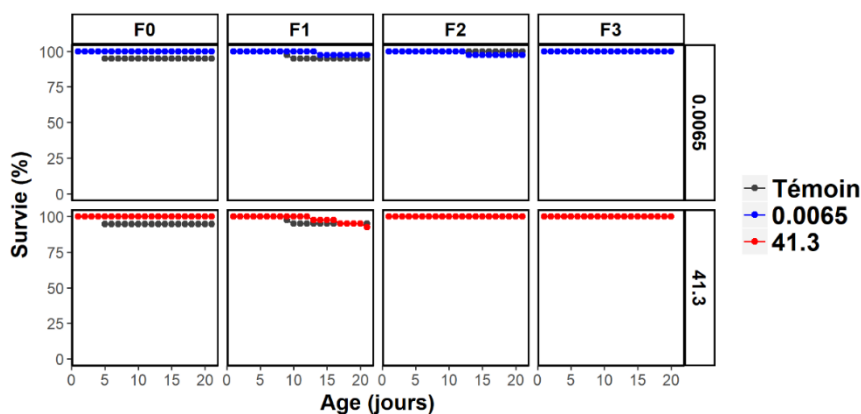


Figure 43. Survie (%) de *D. magna* sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la génération F0 est exposée aux radiations gamma à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  sur la totalité de son cycle de vie et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire.

### 6.2. Effets sur la croissance

Aucun effet significatif des radiations gamma n'a été détecté sur la croissance en taille dans la génération F0 exposée pendant tout son cycle de vie, ainsi que dans les générations suivantes (Figure 44). Un léger effet sur la croissance avait été reporté dans la génération F0 à 35,4  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Parisot et al., 2015), mais il n'a pas été observé dans notre étude, en raison peut-être d'une plus grande variabilité entre les individus.

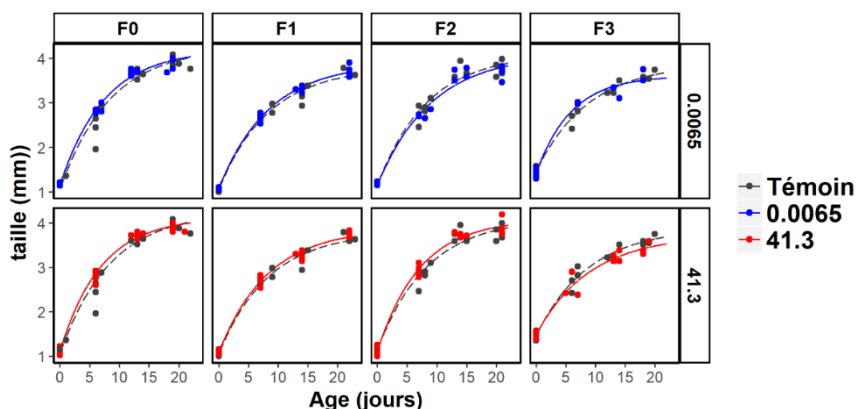


Figure 44. Croissance (taille du corps en mm) de *D. magna* sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la génération F0 est exposée aux radiations gamma à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  sur la totalité de son cycle de vie et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire. Les données expérimentales et les courbes de croissance de von Bertalanffy sont respectivement représentées par des points et des lignes.



### 6.3. Effets sur la reproduction

En génération F0, une diminution significative de la fécondité a été observée au débit de dose le plus élevé (41,3 mGy h<sup>-1</sup>) (Figure 45). Cette diminution est intervenue à partir de la 2<sup>e</sup> ponte et a atteint 17% sur les 4 dernières pontes ( $p \leq 0,05$ ). Ce résultat est en accord avec de précédentes études concernant *D. magna* (Parisot et al., 2015 ; Gilbin et al., 2008) et d'autres espèces d'invertébrés, comme le polychète marin *Ophryotrocha diadema* et l'oligochète terrestre *Eisenia fetida*. Chez ces annélides, les radiations gamma avaient un effet reprotoxique à des débits de dose de 0,19 à 43 mGy h<sup>-1</sup> dans la première génération exposée (Knowles, Greenwood, 1994 ; Hertel-Aas et al., 2007, 2011).

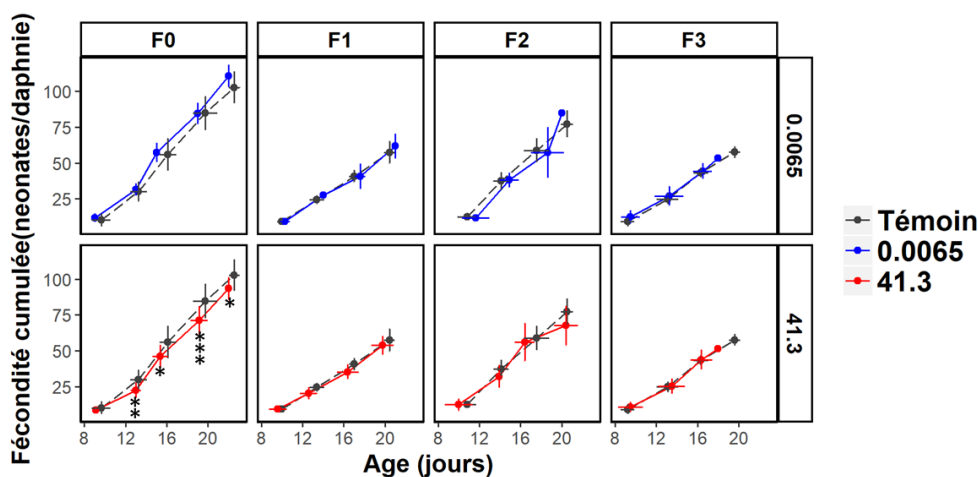


Figure 45. Production de néonates par daphnie sur quatre générations F0, F1, F2 et F3. Seule la F0 est exposée aux radiations gamma sur la totalité de son cycle de vie à des débits de dose de 6,5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  et 41,3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  et la génération F1 seulement lors de son stade embryonnaire. Les barres d'erreur verticales et horizontales indiquent respectivement les écarts-types du nombre de néonates par ponte et de l'âge au moment de la libération des pontes. Les différences significatives de reproduction cumulée par rapport au témoin (ANOVA; tests de Dunnett) sont indiquées par des astérisques verticaux: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ;  $n = 10$ .

Par la suite, aucun effet significatif sur la reproduction n'a été observé dans les générations F1, F2 et F3. Ces résultats rejoignent ceux obtenus chez *C. elegans* montrant que la fécondité d'une génération F1, après exposition de la génération parentale F0, ne présentait pas de différence avec le témoin jusqu'à un débit de dose de 42,7  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ .

### 6.4. Relier les modifications de la méthylation aux effets macroscopiques

Les modifications de la méthylation observées dans notre étude, et en particulier celles qui étaient transmises de la génération F2 à la génération F3, n'ont pas pu être directement liées à un phénotype particulier à l'échelle de l'organisme. Malgré l'absence d'effets macroscopiques dans la descendance en récupération, les modifications de la méthylation pourraient servir de

biomarqueur d'une exposition parentale aux radiations gamma (Ladd-Acosta, 2015).

On pourrait supposer que l'irradiation gamma réalisée dans notre expérience n'était pas suffisante, en débit de dose ou en dose totale absorbée, pour induire une accumulation de modification de la méthylation suffisante pour causer des effets macroscopiques détectables dans les générations suivantes. Un tel mécanisme cumulatif des marques épigénétiques a déjà été décrit (Jablonka, Raz, 2009) et suggéré dans différentes études présentant une augmentation de l'intensité des effets des radiations à l'échelle de l'organisme au fil des générations exposées (Parisot et al., 2015 ; Knowles, Greenwood, 1994 ; Hertel-Aas et al., 2007 ; Buisset-Goussen et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étendre l'irradiation sur un nombre  $N$  plus important de générations (2 ou plus) et d'étudier ensuite les changements épigénétiques, leur transmission et les potentiels effets macroscopiques dans les générations  $N+2$  non-exposées (Mirbahai, Chipman, 2014).

---

**PARTIE C. MODELISATION MECANISTE DES EFFETS  
TRANSGENERATIONNELS D'UNE IRRADIATION GAMMA AVEC LE  
MODELE DEBTOX**

---



Dans cette partie, un modèle DEBtox transgénérationnel à deux compartiments de dommage est utilisé pour analyser les données d'exposition multigénérationnelle aux radiations gamma acquises dans le cadre de la thèse de Parisot (2015). Une méthode d'inférence bayésienne permet de faciliter l'estimation des paramètres du modèle et d'obtenir une mesure pertinente de l'incertitude qui leur est associée. Les données acquises sur les effets à l'échelle de l'organisme dans le cadre de cette thèse (Partie B) sont également utilisées afin de valider les prédictions du modèle.



## Chapitre VIII. : Méthodes - modèle DEBtox

### 1. Données

Une partie des données utilisées dans cette analyse DEBtox a servi à l'estimation des paramètres du modèle (phase d'apprentissage) (Parisot, 2015) et les données présentées dans le Chapitre VII de cette thèse ont servi à la validation des prédictions du modèle (Tableau 12).

**Tableau 12. Jeux de données et utilisation de ces données dans le cadre de l'analyse DEBtox pour une irradiation gamma**

Dénomination	Données utilisées	Utilisation	Source
Étude I	Exposition continue F0 – F2	Apprentissage	(Parisot, 2015)
Étude II	Exposition continue F0 Récupération F1 – F2	Validation	(Chapitre VII)

Les résultats de l'étude de Parisot (2015) (Etude I) ont montré qu'une exposition multigénérationnelle des daphnies aux radiations gamma cause une aggravation des effets sur la croissance et la reproduction observée entre les générations F0 et F2, accompagnée d'une diminution transitoire des effets entre les générations F0 et F1. A l'échelle moléculaire, les altérations de l'ADN ont suivi des tendances comparables à celles des effets à l'échelle de l'organisme, suggérant leur accumulation et transmission au fil des générations, ainsi que l'intervention de mécanismes adaptatifs qui pourraient permettre une meilleure réparation des altérations en génération F1.

### 2. Hypothèses et formulation du modèle

#### 2.1. Choix de la métrique de dose

Dans les expériences considérées, l'irradiation gamma des daphnies était externe, elle a été réalisée grâce à des sources de Césium-137 scellées, placées au centre d'un cercle formé par les unités expérimentales contenant les daphnies (cf. matériels et méthodes, Chapitre VI). En l'absence de contamination du milieu, il n'est pas nécessaire d'inclure une modélisation de la cinétique d'internalisation du contaminant, telle qu'elle est classiquement décrite dans les modèles DEBtox (Jager, Zimmer, 2012). Cette cinétique vise à décrire les variations de la concentration interne du contaminant. A la place de la concentration interne, la première analyse DEBtox réalisée dans le contexte d'une irradiation gamma externe (Lecomte-Pradines et al., 2017) a proposé d'employer le débit de dose des radiations comme métrique de dose. En présence d'un débit de

dose constant, l'intensité du stress était considérée constante tout au long de l'exposition. Dans l'étude de Parisot et al. (2015), les débits de dose sont également constants au cours de l'exposition, mais ne peuvent pas convenir comme métrique de dose, au vu de la cinétique observée des effets, variables dans le temps. Dans cette situation, comme proposé par Jager et al (2011), un compartiment de dommage, représentant la synthèse de tous les dommages, aux échelles moléculaires et cellulaires, a été utilisé comme métrique de dose. Ce niveau de dommage est normalisé par le niveau d'exposition et s'exprime donc dans la même unité que le débit de dose ( $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Ce niveau de dommage peut également être transmis d'une génération à l'autre, pour permettre de modéliser un effet transgénérationnel (Parisot, 2015 ; Plaire, 2013).

## **2.2. Un modèle à deux compartiments de dommage**

Dans notre cas, deux compartiments de dommage ( $D_1$  et  $D_2$ ) ont été introduits dans le modèle DEBtox afin de prendre en compte deux modes d'action métaboliques distincts : le premier ( $D_1$ ) induit des effets sur la reproduction en génération F0, qui sont ensuite atténués en F1, et le deuxième ( $D_2$ ) induit des effets sur la croissance et la reproduction qui s'aggravent au fil des générations (Parisot, 2015).

### **2.2.1 Cinétiques des niveaux de dommage**

La disparition de l'effet sur la reproduction en génération F1 est expliquée par une réduction du niveau de dommage  $D_1$  entre les générations F0 et F1 (Parisot et al., 2015). Dans le modèle, cette différence est expliquée par une plus grande capacité de réparation du dommage  $D_1$ , déterminée par des taux de réparation du dommage distincts entre la génération F0 ( $k_{r1F0}$ ) et les générations F1 et F2 ( $k_{r1F1-F2}$ ).

La cinétique du dommage  $D_1$  est définie par les deux équations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_1}{dt} = kd_1DR - k_{r1F0}D_1 \quad \text{en génération F0} \\ \frac{dD_1}{dt} = kd_1DR - k_{r1F1}D_1 \quad \text{en générations F1 et F2} \end{array} \right. \quad (21)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dD_1}{dt} = kd_1DR - k_{r1F0}D_1 \quad \text{en génération F0} \\ \frac{dD_1}{dt} = kd_1DR - k_{r1F1}D_1 \quad \text{en générations F1 et F2} \end{array} \right. \quad (22)$$

Avec  $DR$  le débit de dose gamma,  $kd_1$  le taux d'accumulation du dommage  $D_1$  dans l'organisme.

Comme le niveau de dommage, ainsi que son taux d'accumulation et de réparation ne sont pas directement mesurables, un niveau de dommage normalisé  $D_1^*$  est utilisé, de la même manière



qu'une concentration interne normalisée  $C_i^*$  est employée dans les équations d'internalisation d'un contaminant (cf. partie bibliographique) (Jager et al., 2011). Le niveau de dommage normalisé  $D_1^*$  est égal au niveau de dommage divisé par le facteur de concentration du dommage  $\frac{kd_1}{kr}$ . En utilisant  $kr_{1F_0}$  pour la normalisation de  $D_1$ , on obtient :

$$D_1^* = D_1 \times \frac{kr_{1F_0}}{kd_1} . \quad (23)$$

La cinétique du dommage  $D_1^*$  ainsi normalisée se simplifie donc comme suit :

$$\frac{dD_1^*}{dt} = kr_{1F_0}(DR - D_1^*) \quad \text{en génération F0} \quad (24)$$

$$\frac{dD_1^*}{dt} = kr_{1F_0}DR - kr_{1F_1}D_1^* \quad \text{en générations F1 et F2} \quad (25)$$

L'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction entre les générations F0 à F2 est, quant à elle, prise en compte par le deuxième compartiment de dommages ( $D_2$ ), avec un seul taux de réparation ( $kr_2$ ) commun aux 3 générations :

$$\frac{dD_2}{dt} = kd_2DR - kr_2D_2 \quad (26)$$

En prenant soin de normaliser  $D_2$  par le facteur d'accumulation  $\frac{kd_2}{kr_2}$ , la cinétique du dommage normalisé  $D_2^*$  est définie par l'équation suivante :

$$\frac{dD_2^*}{dt} = kr_2(DR - D_2^*) \quad (27)$$

### 2.2.2 Transmission des niveaux de dommage des parents aux descendants

Les niveaux de dommage pendant la période embryonnaire sont représentés par les variables  $Degg_1$  et  $Degg_2$ . On fait l'hypothèse que les niveaux de dommage  $D_1$  et  $D_2$  accumulés par les daphnies au moment de la ponte sont transmis à la génération suivante et constituent donc les valeurs initiales de  $Degg_1$  et  $Degg_2$ . La cinétique des niveaux de dommage  $Degg_1^*$  et  $Degg_2^*$  pendant les trois jours de la période embryonnaire, normalisés par le facteur de bioconcentration de la même manière que  $D_1^*$  et  $D_2^*$ , s'exprime selon les équations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dDegg_1^*}{dt} = k_{r1F0} (DR - Degg_1^*) \quad \text{en génération F0} \\ \frac{dDegg_1^*}{dt} = k_{r1F0} DR - k_{r1F1} Degg_1^* \quad \text{en générations F1 et F2} \end{array} \right. \quad (28)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dDegg_1^*}{dt} = k_{r1F0} DR - k_{r1F1} Degg_1^* \quad \text{en générations F1 et F2} \end{array} \right. \quad (29)$$

$$\frac{dDegg_2^*}{dt} = k_{r2} (DR - Degg_2^*) \quad (30)$$

A l'éclosion, les niveaux de dommage  $Degg_1^*$  et  $Degg_2^*$  atteints deviennent les niveaux de dommage initiaux de  $D_1^*$  et  $D_2^*$ .

### 2.3. Fonctions de stress

Selon la formulation classique du DEBtox (Kooijman, Bedaux, 1996), le contaminant est supposé affecter un des processus du budget énergétiques daphnies lorsque la concentration interne dépasse un seuil appelé NEC, pour *No Effect Concentration*. Dans le cas des radiations gamma, les niveaux de dommages ( $D_1^*$  et  $D_2^*$ ) utilisés dans les fonctions de stress sont normalisés par le débit de dose et on parle de débits de dose sans effet (NEDR, pour *No Effect Dose Rate*). Les fonctions de stress ( $\sigma_1$  et  $\sigma_2$ ) sont exprimées ainsi :

$$\left\{ \begin{array}{l} \sigma_1 = 0 \quad \text{si } D_1^* \leq NEDR_1 \\ \sigma_1 = b_1(D_1^* - NEDR_1) \quad \text{si } D_1^* > NEDR_1 \end{array} \right. \quad (31)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \sigma_2 = 0 \quad \text{si } D_2^* \leq NEDR_2 \\ \sigma_2 = b_2(D_2^* - NEDR_2) \quad \text{si } D_2^* > NEDR_2 \end{array} \right. \quad (32)$$

Avec  $b_1$  et  $b_2$  les pentes d'intensité des stress toxiques  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$ .

### 2.4. Modes d'action testés

À partir des 5 modes d'action des contaminants définis pour le modèle DEBtox (Jager, Zimmer, 2012 ; Kooijman, Bedaux, 1996), nous avons testé 6 paires de modes d'action, l'un affectant la reproduction seulement (mode d'action 1) et l'autre affectant à la fois la croissance et la reproduction (mode d'action 2). Chaque paire correspond à un modèle distinct (Tableau 13).

Le mode d'action 1 (MoA 1) peut correspondre soit à une augmentation des coûts énergétiques investis pour la production de chaque œuf (coût de l'œuf), soit à une augmentation de la mortalité pendant l'oogenèse.

Pour le mode d'action 2 (MoA 2), il existe trois possibilités. Premièrement il peut s'agir d'une réduction de l'assimilation de la nourriture, qui entraîne une réduction de l'énergie utilisable par l'organisme. Deuxièmement, il peut s'agir augmentation des coûts énergétiques de maintenance somatique et de maturité. Ces deux modes d'action entraînent des effets très similaires, avec une taille maximale réduite et un retard de reproduction. Troisièmement, il peut s'agir d'une augmentation des coûts de croissance et de maturation, qui retarde la croissance sans pour autant avoir d'influence sur la taille maximale et a comme conséquence un retard de reproduction.

**Tableau 13 : Les six modèles DEBtox testés présentant 6 différentes combinaisons de modes d'action toxiques pour les radiations gamma. Le mode d'action 1 tient compte d'effets directs sur la reproduction. Le mode d'action 2 tient compte d'effets sur la croissance et la reproduction.**

Modèle	Mode d'action 1	Mode d'action 2
Coût-Assimilation	Coût de l'œuf	Assimilation
Coût-Croissance	Coût de l'œuf	Croissance
Coût-Maintenance	Coût de l'œuf	Maintenance
Mortalité-Assimilation	Mortalité pendant l'oogenèse	Assimilation
Mortalité-Croissance	Mortalité pendant l'oogenèse	Croissance
Mortalité-Maintenance	Mortalité pendant l'oogenèse	Maintenance

### 2.5. Équations de croissance et de reproduction

Les équations de croissance et de reproduction ont été adaptées à partir des équations du modèle DEBtox révisées par Billoir et al. (2008). L'ensemble des variables et paramètres utilisés dans ces équations sont décrits dans le Tableau 15.

#### 2.5.1 Individus témoins

Croissance en taille (mm):

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l) \quad (33)$$

Avec  $l(0) = l_p$

Reproduction ( $\mu\text{g d'œufs.j}^{-1}$ ):

$$R(l) = \begin{cases} 0 & \text{si } l < l_p \\ \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l > l_p \end{cases} \quad (34)$$

Avec  $R(0) = 0$

### 2.5.2 Individus exposés

Pour chaque combinaison de modes d'action, les équations de croissance et de reproduction prennent en compte l'action du stress  $\sigma_1$  correspondant au mode d'action 1 et du stress  $\sigma_2$  correspondant au mode d'action 2 (Tableau 14).

**Tableau 14.** Équations de croissance et de reproduction du modèle DEBtox pour chaque combinaison de mode d'action toxique testée (les fonctions de stress  $\sigma_1(D_1^*)$  et  $\sigma_2(D_2^*)$ , dépendantes des dommages normalisés  $D_1^*$  et  $D_2^*$ , sont simplifiées en  $\sigma_1$  en  $\sigma_2$  dans les équations).

Modèle	Equations	
	$\begin{cases} l(0) = l_b \\ R(l) = 0 \text{ si } l < l_p \end{cases}$	
Coût-Assimilation	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f(1-\sigma_2)+g} (f(1-\sigma_2)-l) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ f(1-\sigma_2)l^2 \left( \frac{g+l}{g+f(1-\sigma_2)} \right) - l_p^3 \right] (1+\sigma_1)^{-1} \end{cases}$	<p>(35)</p> <p>(36)</p>
Coût-Croissance	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f+g(1+\sigma_2)} (f-l) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma_2)+l}{g(1+\sigma_2)+f} \right) - l_p^3 \right] (1+\sigma_1)^{-1} \end{cases}$	<p>(37)</p> <p>(38)</p>
Coût-Maintenance	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B (f-l(1+\sigma_2)) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} (1+\sigma_2) \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma_2)^{-1}+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] (1+\sigma_1)^{-1} \end{cases}$	<p>(39)</p> <p>(40)</p>
Mortalité-Assimilation	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f(1-\sigma_2)+g} (f(1-\sigma_2)-l) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ f(1-\sigma_2)l^2 \left( \frac{g+l}{g+f(1-\sigma_2)} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma_1} \end{cases}$	<p>(41)</p> <p>(42)</p>
Mortalité-Croissance	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f+g(1+\sigma_2)} (f-l) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma_2)+l}{g(1+\sigma_2)+f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma_1} \end{cases}$	<p>(43)</p> <p>(44)</p>
Mortalité-Maintenance	$\begin{cases} \frac{dl}{dt} = r_B (f-l(1+\sigma_2)) \\ R(l) = \frac{R_M}{1-l_p^3} (1+\sigma_2) \left[ fl^2 \left( \frac{g(1+\sigma_2)^{-1}+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma_1} \end{cases}$	<p>(45)</p> <p>(46)</p>

**Tableau 15. Paramètres et variables utilisés dans les équations**

Symbole	Unité	Interprétation
<i>Paramètres et variables physiologiques</i>		
$L_m$	mm	Taille maximale
$l$	[-]	Taille normalisée par la taille maximale $L_m$
$l_b$	[-]	Taille à la naissance normalisée par la taille maximale
$l_p$	[-]	Taille à la puberté normalisée par la taille maximale
$r_B$	$j^{-1}$	Taux de croissance de von Bertalanfy
$R$	$\mu\text{g oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction journalier
$R_m$	$\mu\text{g oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction maximum
<i>Paramètres et variables toxicologiques</i>		
$\sigma_1, \sigma_2$	[-]	Niveaux de stress 1 et 2
$D_1^*, D_2^*$	$\text{mGy.h}^{-1}$	Niveaux de dommage normalisés 1 et 2
$NEDR_1, NEDR_2$	$\text{mGy.h}^{-1}$	Débits de dose sans effet 1 et 2
$b_1, b_2$	$\text{mGy}^{-1}.\text{h}$	Pentes des fonctions de stress 1 et 2
$k_{r1}, k_{r2}$	$j^{-1}$	Taux de réparation des dommages 1 et 2
<i>Paramètres génériques</i>		
$g$	[-]	Ratio de l'investissement énergétique
$f$	[-]	Réponse nutritive fonctionnelle

Le ratio de l'investissement énergétique  $g$  est un paramètre propre à chaque espèce, qui a été estimé à 1 pour *D. magna* (Kooijman, Bedaux, 1996). Les daphnies étant nourries quotidiennement *ad libitum* durant toute la durée de l'expérience dans l'étude I, la réponse nutritive fonctionnelle  $f$  est fixée à 1. Par contre, elles n'ont été nourries que 6 jours sur 7 dans l'étude II,  $f$  a alors été fixée à 6/7.

### 2.6. Changement d'unité – reproduction

Dans le modèle DEBtox utilisé, la fécondité ( $R$ ) est définie comme une masse d'œufs produite par unité de temps. En effet, étant donné que la masse d'un œuf est corrélée à la taille de la daphnie, il a semblé plus judicieux d'exprimer l'investissement énergétique dans la reproduction en masse d'œufs produits plutôt qu'en nombre d'œufs. Toutefois les données collectées pendant

nos expériences sont exprimées en nombre d'œufs par unité de temps. Il est donc nécessaire de convertir  $R$  en nombre d'œufs par jour afin d'obtenir des valeurs de même unité que les données expérimentales. Pour obtenir la fécondité en nombre d'œufs  $R_{Nb}$ , il suffit de diviser  $R$  par la masse d'un œuf au temps  $t$ ,  $W_t$ , tel que :

$$R_{Nb} = \frac{R}{W_t} \quad (47)$$

Il a été montré qu'en conditions optimales de culture, notamment de nourriture ad libitum, la masse sèche d'un œuf  $W_t$  est corrélée à la taille de la mère (Alonzo et al., 2008), selon une relation linéaire :

$$W_t = \beta \times L + \omega \quad (48)$$

Avec  $\beta$  la pente de la régression linéaire et  $\omega$  l'ordonnée à l'origine.

Les paramètres  $\beta$  et  $\omega$  ont été estimés par régression linéaire pour chaque génération à partir des données de taille des mères et de masse des œufs mesurées sur quatre à cinq réplicats aux pontes 1, 3 et 6, puis ces paramètres ont été utilisés directement comme données dans le modèle (Tableau 16).

**Tableau 16. Paramètres estimés pour le calcul de la masse sèche d'un œuf en fonction de la taille de la mère chez la daphnie.**

Génération	Masse sèche des œufs	
	$\beta$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	$\omega$ ( $\mu\text{g}$ )
F0	1,66	0,43
F2	2,15	-1,22
F3	2,65	-2,79

### 3. Inférence bayésienne et estimation des paramètres

#### 3.1. Structure du modèle bayésien

La structure du modèle bayésien est représentée graphiquement par un diagramme acyclique orienté (Directed Acyclic Graph, DAG en anglais), également appelé réseau bayésien, décrivant, de manière hiérarchique, l'ensemble des relations de dépendance entre les variables et les paramètres (Figure 46). Dans le diagramme, chaque grandeur du modèle (paramètres, données, covariables...) est représentée par un nœud (ellipse) et les liens entre les nœuds représentent la dépendance directe et unidirectionnelle entre ces grandeurs pouvant être déterministe (une fonction) ou stochastique (une distribution de probabilité) (Tableau 17). Tous les paramètres de

valeur inconnue sont des variables aléatoires et une distribution *a priori* leur est associée (Lunn et al., 2000).

Afin de relier le modèle de croissance aux données mesurées de taille, une loi normale a été choisie comme modèle d'erreur. La taille du corps (ML) suit une distribution normale avec une moyenne  $m$  égale à la taille du corps théorique et un écart-type  $sd$  égal à la racine carrée de l'inverse de la précision  $\tau_G$ , représentant la variabilité individuelle des données de taille. Afin de relier le modèle de reproduction aux données mesurées de fécondité, de la même manière que (Billoir et al., 2011), une loi binomiale négative a été choisie comme modèle d'erreur. La fécondité cumulée (MR) suit une distribution binomiale négative, avec une probabilité  $p = pR$  et un paramètre de dispersion  $n = \frac{pR \times Rcum}{1-pR}$ , en faisant en sorte que la moyenne de cette distribution soit égale à la fécondité cumulée  $Rcum$ . La loi binomiale négative permet de prendre en compte l'augmentation généralement observée dans les données de fécondité, de la variance avec la moyenne, ce qui est en partie imputable à leur cumul (Delignette-Muller et al., 2014).

**Tableau 17 : Description des liens déterministes ou stochastiques entre les nœuds du modèle, présentés dans le DAG (Figure 46).  $N(m, sd)$  correspond à une loi normale de moyenne  $m$  et d'écart-type  $sd$ ,  $NegBin(n, p)$  correspond à une binomiale négative avec  $n$  le nombre de succès et  $p$  la probabilité de succès.  $T(a, b)$  se rapporte à la troncature de la distribution de probabilité entre les bornes  $a$  et  $b$ .**

Nœuds	Type	Définition
$Degg_{1h,i,j}, Degg_{2h,i,j}$	Déterministe	Equations 21, 22,
$D_{1h,i,j}, D_{2h,i,j}$	Déterministe	Equations 21, 22,
$\sigma_{1h,i,j}, \sigma_{2h,i,j}$	Déterministe	Equations 31, 32
$l_{h,i,j}$	Déterministe	Equations 6, 35, 37, 39, 41, (43, 45
$L_{h,i,j}$	Déterministe	$L_{h,i,j} = l_{h,i,j} \times L_m$
$R_{h,i,j}$	Déterministe	Equations 7, 36, 38, 40, 42, 44, 46
$Rcum_{h,i,j}$	Déterministe	$Rcum_{h,i,j} = Rcum_{h,i,j-1} + R_{h,i,j}$
$ML_{h,i,j,k}$	Stochastique	$N(L_m \times lsim, \sqrt{\frac{1}{\tau_G}}) T(0,)$
$MRcum_{h,i,j,k}$	Stochastique	$NegBin(Rcum \times \frac{pR}{1-pR}, pR)$

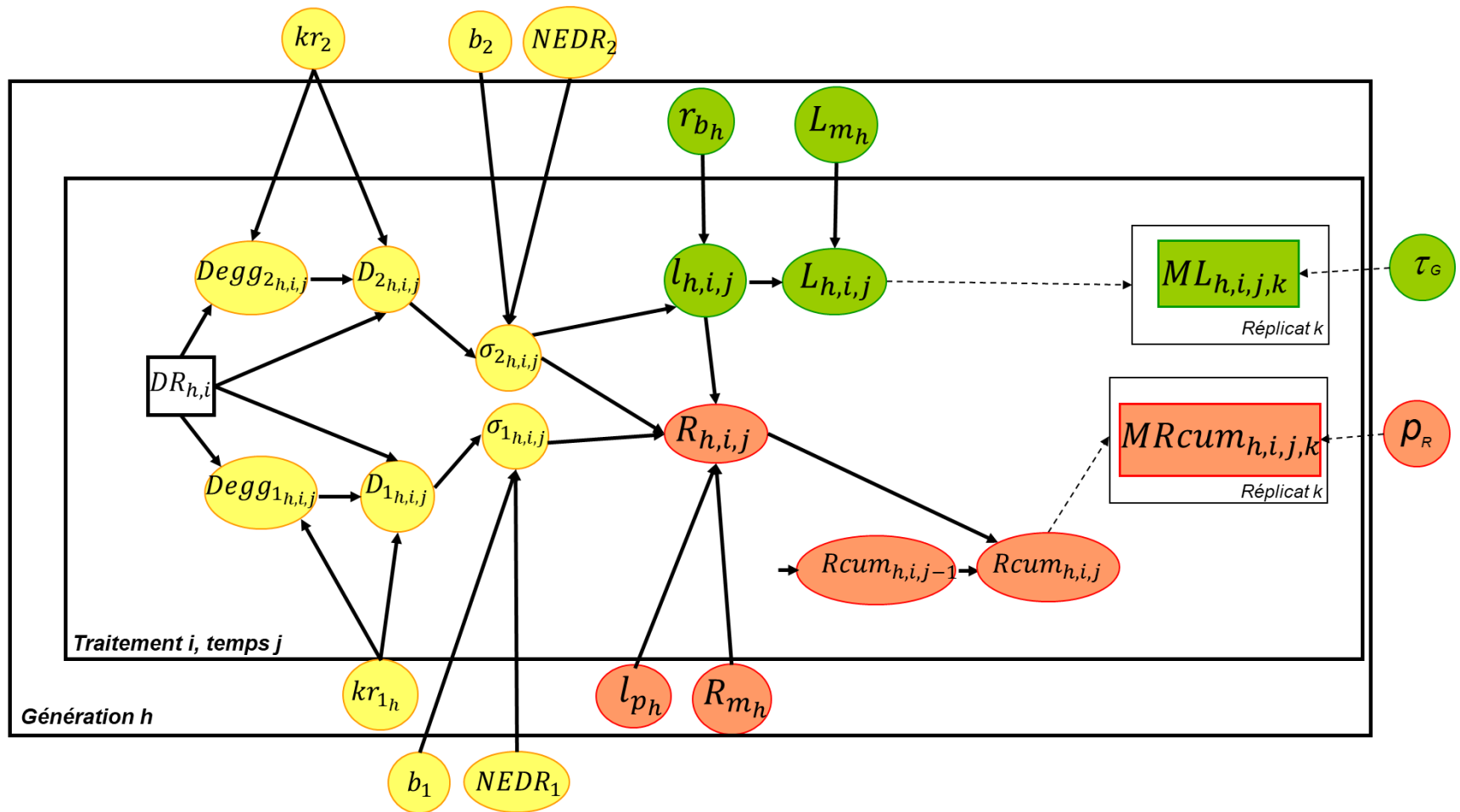


Figure 46 : Diagram acyclique orienté (Directed Acyclic Graph, DAG en anglais) représentant la structure du modèle DEBtox utilisé. Les données sont représentées par des rectangles et les autres variables (paramètres, variables latentes) par des ellipses. Les flèches pleines indiquent des liens déterministes et les flèches en pointillés des liens stochastiques. Ces liens sont décrits dans le Tableau 17.



### 3.2. Distributions a priori des paramètres

Les distributions *a priori* des paramètres reflètent notre connaissance des paramètres à estimer, sans prendre compte le jeu de données utilisé lors de l'estimation (Tableau 18).

**Tableau 18. Distributions *a priori* utilisées dans l'estimation bayésienne des paramètres DEBtox pour *D. magna* dans le cas d'une irradiation gamma. N(m ; sd) correspond à une distribution normale de moyenne m et d'écart-type sd. T(a ; b) fait référence à une troncature de la distribution entre les bornes a et b. logUnif(inf ; sup) correspond à une distribution log-uniforme, c'est-à-dire que le logarithme népérien de la variable aléatoire est distribué de façon uniforme entre les bornes inf et sup.**

Paramètre	Unité	Interprétation	Distribution a priori	Source
$L_m$	mm	Taille maximale	N(4,6 ; 0,59) T(4,1 ; 4,8)	Connaissance d'expert
$r_B$	$j^{-1}$	Taux de croissance de Von Bertalanffy	N(0,14 ; 0,03) T(0,11 ; 0,17)	(Billoir, Delignette-Muller, Péry, Charles, 2008)
$l_p$	[-]	Taille à la puberté normalisée	N(0,49 ; 0,07) T(0,4 ; 0,6)	(Billoir, Delignette-Muller, Péry, Charles, 2008)
$R_m$	$\mu\text{g oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction maximum	N(100 ; 20) T(80 ; 140)	(Gilbin et al., 2008),
$kr_{1F_0}$ , $kr_{1F_1-F_2}$	$j^{-1}$	Taux de réparation du dommage 1	logUnif(-5,1 ; 1)	Cinétique rapide
$kr_2$	$j^{-1}$	Taux de réparation du dommage 2	logUnif(-5,1 ; -1)	Cinétique lente
$NEDR_1$ , $NEDR_2$	$\text{mGy.h}^{-1}$	Débit de dose sans effet	logUnif (-6,9 ; 3,9)	Non informatif
$b_1$ , $b_2$	$\text{mGy}^{-1}.\text{h}$	Pentes des fonctions de stress	logUnif(-10 ; 10)	Non informatif
$p_R$	[-]	Paramètre de dispersion des données de reproduction	Beta(1 ; 1)	Non informatif
$sdG = \sqrt{\frac{1}{\tau_G}}$	mm	Variabilité individuelle des données de taille	Unif (0 ; 5)	Non informatif

Une distribution normale a été choisie pour les paramètres physiologiques  $L_m$ ,  $r_B$ ,  $l_p$  et  $R_m$ . Ces

paramètres peuvent varier légèrement d'une expérience à l'autre en fonction des conditions expérimentales. Les valeurs de troncatures de la loi normale ont été définies par expertise quant aux valeurs possibles dans les conditions de l'expérimentation (pH, etc.). Pour les paramètres toxicologiques, aucune information n'est disponible étant donné que le modèle DEBtox n'a jamais été utilisé encore pour analyser le cas d'une exposition aux radiations gamma chez la daphnie. Afin de satisfaire l'hypothèse d'une cinétique du dommage plus lente pour le mode d'action 2 que pour le mode d'action 1, la distribution *a priori* de  $k_{r2}$  est contrainte à des valeurs plus faibles que celles de  $kr_{1-F0}$  et  $kr_{1-F1}$ . Pour le NEDR, une distribution uniforme avec des bornes du même ordre de grandeur que le débit de dose le plus faible ( $0,001 \text{ mGy.h}^{-1}$ ) et le débit de dose le plus fort ( $50 \text{ mGy.h}^{-1}$ ). Pour les pentes des fonctions de stress, des distributions uniformes non informatives ont été choisies. En ce qui concerne la précision  $\tau_G$ , représentant la variabilité des données de taille, une distribution *a priori* uniforme a été appliquée à l'écart-type des données de croissance,  $sdG$ , égal à  $\sqrt{\frac{1}{\tau_G}}$ . Pour le paramètre de dispersion  $p_R$  de la distribution binomiale négative du modèle d'erreur des données de reproduction, une distribution beta non informative a été choisie, en contraignant  $p_R$  entre 0 et 1, intervalle le plus large pour une probabilité.

### 3.3. Estimation des paramètres

L'estimation des distributions *a posteriori* des paramètres a été réalisée avec le logiciel JAGS (Just Another Gibbs Sampler) (version 4.2.0) (Plummer, 2003) et le package rjags (version 4.6) dans le logiciel R, utilisant une méthode d'échantillonnage MCMC (Markov Chain Monte Carlo) et un algorithme de Gibbs. L'algorithme de Gibbs réalise des tirages aléatoires successifs des valeurs de chaque paramètre, selon une distribution de probabilité définie à partir de la structure hiérarchique du modèle bayésien et conditionnellement aux valeurs courantes des autres paramètres (Billoir, 2008 ; Ravenzwaaij et al., 2018). Ces tirages successifs constituent une chaîne de Markov, où chaque tirage ne dépend que du précédent. La chaîne de Markov converge vers son état stable qui est la distribution *a posteriori* des paramètres. Les caractéristiques de cette distribution *a posteriori* (médiane, variance, percentiles...) peuvent ensuite être calculées empiriquement pour chaque paramètre à partir de l'échantillon de tirages.

Le nombre d'itérations nécessaires pour atteindre la convergence a été déterminé pour chaque modèle grâce à la méthode de Raftery et Lewis (Raftery, Lewis, 1992) après une phase

d'initialisation du modèle de 5000 itérations. Trois chaînes de Markov ont été calculées en parallèle. La convergence a été contrôlée graphiquement en vérifiant que les 3 chaînes convergent vers une distribution commune (fonction *plot.chains*) et par le calcul d'un critère de convergence (Gelman, Rubin, 1992) qui compare la variance entre chaînes MCMC à la variance au sein de chaque chaîne. Lorsque les chaînes ont convergé, ces deux variances devraient être identiques.

Les distributions des paramètres physiologiques ( $L_m, l_p, r_B, R_m, p_R, \tau_G$ ) ont été estimés deux fois : à partir des données témoin seules et à partir du jeu de données complet (données témoin et données exposées), afin de pouvoir évaluer quel impact l'inclusion des données exposées a dans l'estimation de ces paramètres.

Les distributions conjointes des paramètres ont été tracées à partir des échantillons MCMC afin de vérifier si les valeurs prises par les paramètres à chaque itération étaient corrélées entre elles. La fonction *cor* dans R a permis le calcul du coefficient de corrélation de Kendall.

#### 4. Evaluation de la qualité d'ajustement du modèle

##### 4.1. Evaluation graphique et vérification prédictive postérieure

L'ajustement du modèle aux données a été évalué de façon graphique dans un premier temps, grâce à une vérification prédictive postérieure (posterior predictive checking en anglais) (Gelman 2003), c'est-à-dire une comparaison graphique des données observées de taille et de croissance avec les données de taille et de reproduction simulées. Ces données simulées sont enregistrées au moyen d'une chaîne MCMC avec le logiciel JAGS, en échantillonnant les valeurs des paramètres dans leur distribution *a posteriori* jointe et en considérant un modèle d'erreur similaire à celui utilisé pour les données observées. Sur les graphiques des ajustements, les 2,5<sup>e</sup>, 50<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles des simulations ont été tracés.

Afin d'évaluer de façon quantitative l'ajustement du modèle, les pourcentages de données observées situées dans les intervalles de crédibilité à 50%, 80%, 95% et 99% (entre, respectivement, les 25<sup>e</sup> et 75<sup>e</sup> centiles, les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> centiles, les 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles et les 0,5<sup>e</sup> et 99,5<sup>e</sup> centiles des données simulées) ont été calculés. En cas de bon ajustement du modèle, ces pourcentages devront être proches des pourcentages nominaux (50%, 80%, 95% et 99%).

#### 4.2. Evaluation des modes d'action

Afin de sélectionner les modes d'action les plus vraisemblables, l'ajustement des 6 modèles testés a été comparé. Pour cela, le DIC (Deviance Information Criterion) de chaque modèle a été calculé et le modèle comportant le plus bas DIC a été retenu. Le DIC a été calculé uniquement pour les modèles dont les chaînes MCMC ont convergé (critère de Gelman  $<1,1$  pour chaque paramètre estimé).

Le DIC proposé par Spiegelhalter et al. (2002) est une adaptation de l'AIC (Akaike Information Criterion) au bayésien. L'AIC utilise le maximum de la fonction de vraisemblance ( $L$ ) du modèle et le nombre de paramètre ( $k$ ) dans son calcul :

$$AIC = 2k - 2 \ln L$$

Lors de la comparaison de différents modèles, celui comportant la plus faible valeur d'AIC sera choisi, en tenant compte de la qualité de l'ajustement du modèle et en pénalisant la vraisemblance par le nombre de paramètres afin de limiter le sur-ajustement des modèles.

Le DIC est construit en analogie à l'AIC, mais évite le calcul du maximum de la fonction de vraisemblance. A la place, le DIC utilise, pour mesurer l'ajustement aux données, une estimation de la déviance ( $D$ ) de la moyenne *a posteriori* des paramètres ( $\bar{\theta}$ ), calculée à partir des distributions postérieures du modèle obtenues par une simulation MCMC. Un second terme,  $p_D$ , représente le nombre effectif de paramètres et évalue la complexité du modèle.

$$DIC = D(\bar{\theta}) + 2p_D$$

Dans notre cas, le nombre de paramètres étant constant, la comparaison des modèles se fait en pratique à partir de la seule mesure de l'ajustement aux données.

Comme pour l'AIC, le plus faible DIC pointe le modèle avec les meilleurs ajustements aux données et il est admis qu'une différence de DIC inférieure à 5 entre deux modèles signifie qu'ils produisent des ajustements similaires (Spiegelhalter et al., 2003).

#### 5. Validation du modèle sélectionné

Afin de valider le modèle sélectionné et les paramètres estimés, des prédictions ont été réalisées et comparées aux données expérimentales présentées dans le Chapitre VII (Étude II). Ce jeu de

données n'a pas servi à l'estimation des paramètres toxicologiques.

Les prédictions de reproduction et de taille sont calculées à partir de tirages aléatoires réalisés dans la distribution *a posteriori* jointe des paramètres, obtenue sur un total de 10 000 itérations. Seuls les paramètres toxicologiques ont été estimés à partir de l'étude I. Par ce qu'ils sont très dépendants des conditions expérimentales, les paramètres physiologiques ont été estimés à partir des données des individus témoins issues de l'Etude II.

La capacité de prédiction du modèle est évaluée de façon quantitative en calculant les pourcentages de données observées (reproduction et taille confondues) contenues dans l'intervalle simulé pour les niveaux de crédibilité de 50%, 80%, 95% et 99%. Les prédictions du modèle sont validées si ces pourcentages sont proches de leur valeur nominale correspondante (50%, 80%, 95% et 99%).



## Chapitre IX. Résultats

### 1. Comparaison des modèles : Identification des modes d'action toxique des radiations gamma

La convergence des chaînes MCMC a été atteinte pour tous les modèles testés (critère de Gelman <1,1, Annexe 7). Le nombre d'itérations nécessaire à la convergence des chaînes MCMC se situe entre 82 000 et 191 000 en fonction du modèle (détail dans Annexe 8).

Les modèles « coûts-croissance » et « mortalité-croissance » ayant obtenu les plus faibles valeurs de DIC (ex aequo) et une différence de DIC avec les autres modèles supérieure à 5, ce sont les modèles produisant les meilleurs ajustements aux données (Tableau 19). Les modes d'action toxiques des radiations gamma les plus vraisemblables correspondent donc à une augmentation des coûts de production des œufs ou à une mortalité accrue lors de l'ovogenèse (mode d'action 1), associées à une augmentation des coûts de croissance et de maturation (mode d'action 2).

**Tableau 19. Valeurs de DIC (Deviance Information Criterion) calculées pour les différents modèles testés.**

Modèle	Modes d'actions (MoA 1/ MoA 2)	DIC
Coût-Assimilation	Coût de l'œuf/ Assimilation	6488
Coût-Croissance	Coût de l'œuf/ Croissance	<b>6461</b>
Coût-Maintenance	Coût de l'œuf/ Maintenance	6492
Mortalité-Assimilation	Mortalité embryon/ Assimilation	6488
Mortalité-Croissance	Mortalité embryon / Croissance	<b>6461</b>
Mortalité-Maintenance	Mortalité embryon / Maintenance	6491

### 2. Ajustement des modèles sélectionnés

#### 2.1. Individus témoins

De manière générale, les données de croissance et de reproduction des individus témoins sont bien décrites par les deux modèles sélectionnés (Figure 47). Cela est confirmé par des proportions très satisfaisantes de données observées incluses dans les intervalles de crédibilité prédits par les deux modèles (Tableau 20).

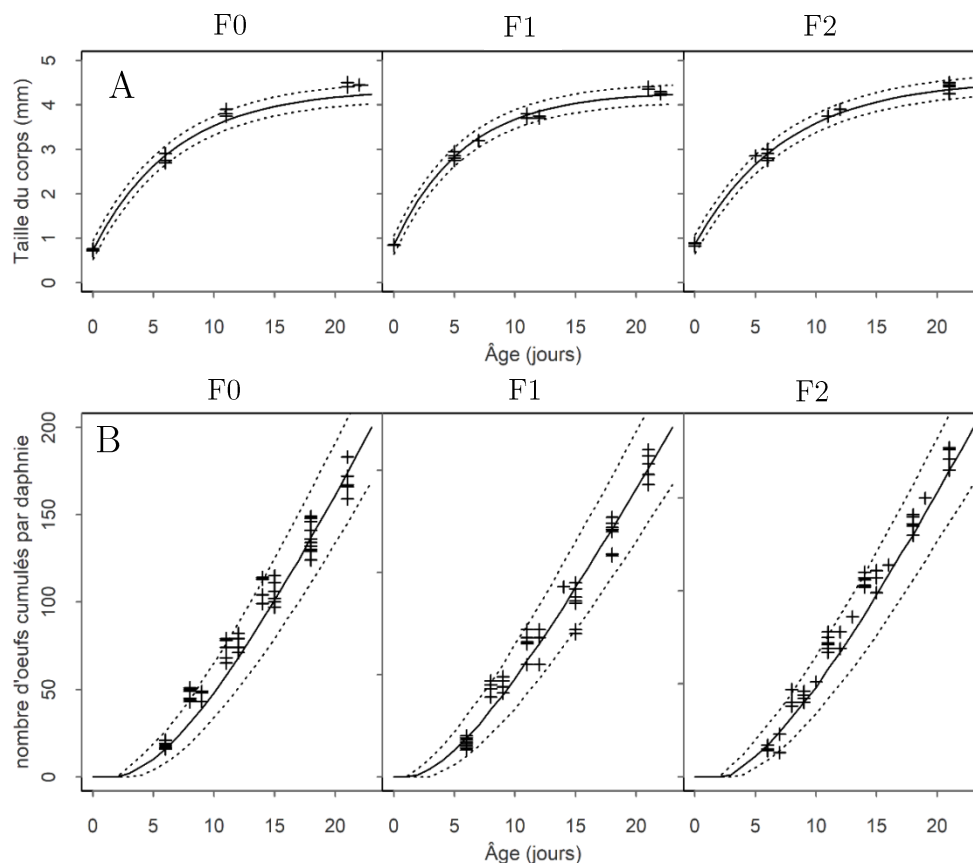


Figure 47. Ajustements du modèle coût-croissance aux données de croissance (A) et de reproduction (B) des daphnies témoins, provenant de l'expérience multigénérationnelle d'irradiation gamma externe (Étude I) (Parisot et al., 2015). Points (+) : données observées, lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, lignes en pointillés : intervalle de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.

Tableau 20. Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées chez les individus témoins issus de l'étude I, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox « coût-croissance » ou « mortalité-croissance ».

Niveau de crédibilité du modèle	Pourcentage des données incluses (%)			
	Modèle coût-croissance		Modèle mortalité-croissance	
	Croissance	Reproduction	Croissance	Reproduction
50%	49,1	47,8	49,1	43,9
80%	83,5	74,8	83,5	70,2
95%	93	88,7	93	87,7
99%	97,2	98,1	97,2	96,5

## 2.2. Individus exposés

L'ajustement des modèles « Coût-Croissance » et « Mortalité-Croissance » aux données de croissance et de reproduction des individus exposés aux radiations gamma est graphiquement



très satisfaisant (Figure 48 et Annexe 9), excepté à  $7 \mu\text{Gy.h}^{-1}$  en génération F0 où les effets sur la reproduction semblent légèrement sous-estimés. Les proportions de données observées incluses dans les intervalles de crédibilité prédits par les deux modèles sont très proches des niveaux de crédibilité nominaux (Tableau 21).

Les effets sur la croissance sont principalement visibles pour le débit de dose le plus élevé ( $35,4 \text{ mGy.h}^{-1}$ ) (Figure 48 et Annexe 9). Leur intensité est plus forte en générations F1 et F2 qu'en génération F0. Ils prennent la forme d'un retard de croissance, sans pour autant affecter la taille maximale atteinte. Pour les autres débits de dose, il n'est pas possible de distinguer de différences entre la courbe de croissance médiane des individus témoins et celle des individus exposés. Quant aux effets sur la reproduction, ils sont visibles à  $35,4 \text{ mGy.h}^{-1}$  et dans une moindre mesure à  $4,7 \text{ mGy.h}^{-1}$  (Figure 48 et Annexe 9). Leur intensité est plus forte en génération F0, qu'en génération F1 et F2 pour lesquelles elle semble équivalente. Aucun effet sur la reproduction n'est visible pour les débits de dose plus faibles.

**Tableau 21. Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées issues de l'étude I, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox Coût-croissance ou Mortalité-croissance.**

Niveau de crédibilité du modèle	Pourcentage des données incluses (%)			
	Modèle Coût-croissance		Modèle Mortalité-croissance	
	Croissance	Reproduction	Croissance	Reproduction
50%	57	50,3	57	50,2
80%	83,5	80,3	82	80
95%	93	93,9	92,6	93,9
99%	97,2	98,6	97,2	98,6

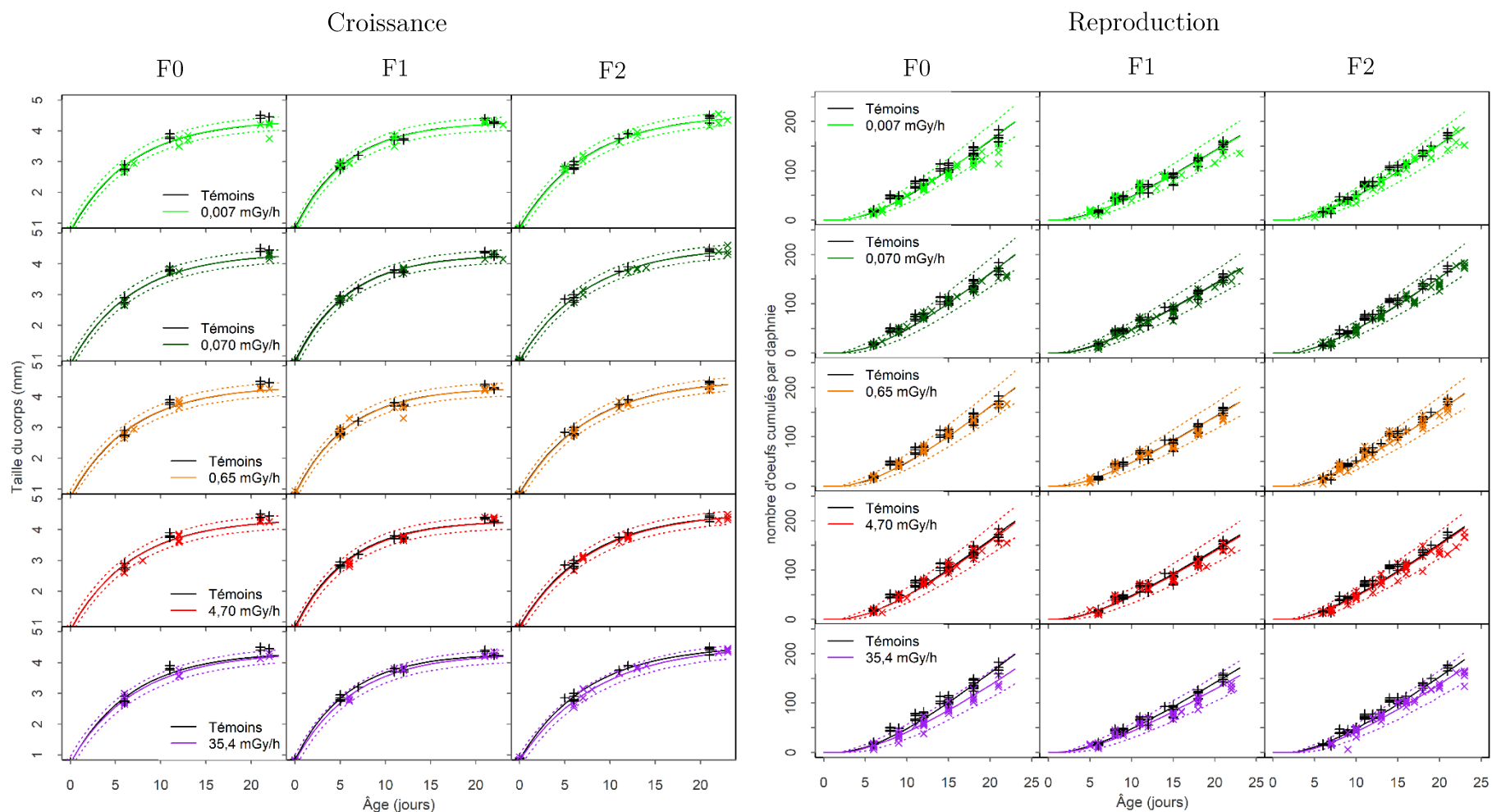
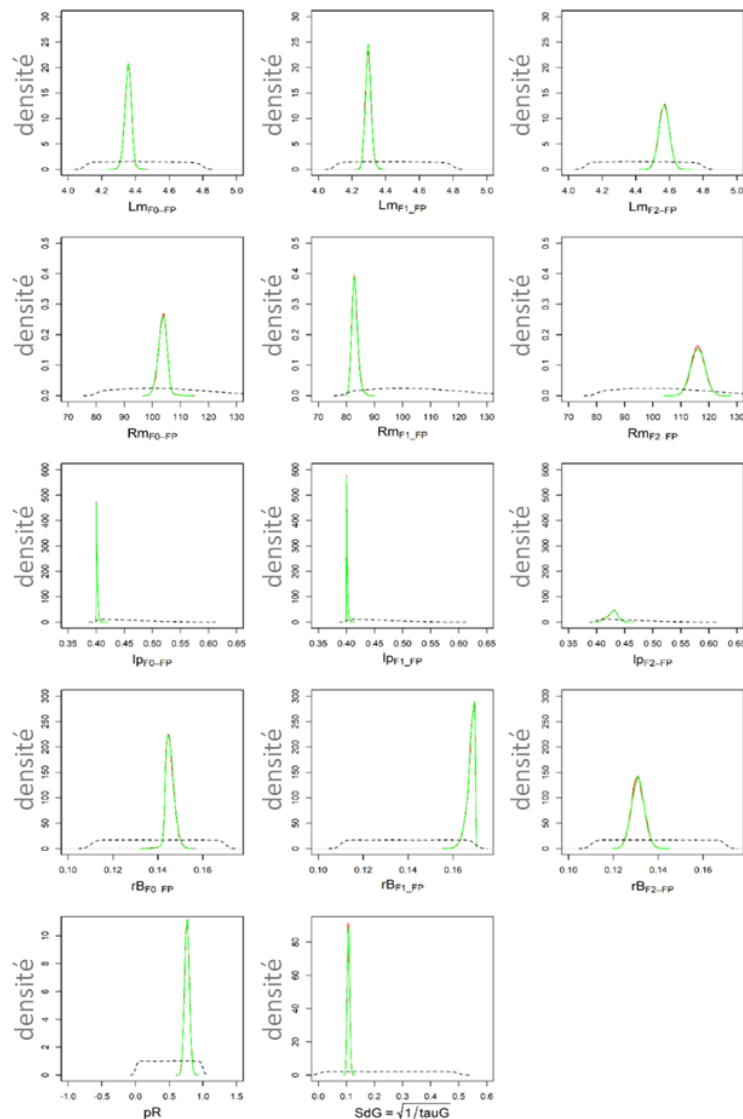


Figure 48. Ajustements du modèle DEBtox « Coût-Croissance » aux données observées de croissance (taille du corps) et de reproduction (nombre d'œufs cumulés par daphnie) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.

### 3. Paramètres du DEBtox estimés

#### 3.1. Paramètres physiologiques

Toutes les distributions a posteriori des paramètres physiologiques pour l'étude I ont été estimées avec précision : elles sont unimodales et plus étroites que les distributions *a priori* utilisées pour chacun de ces paramètres, ce qui signifie que les données observées ont permis de réduire leurs incertitudes (Figure 49).



**Figure 49. Distributions *a priori* (ligne pointillée) et *a posteriori* (en rouge pour le modèle coût-croissance et en vert pour le modèle mortalité-croissance) de chaque paramètre physiologique du modèle DEBtox estimé à partir des données observées des individus témoins dans le cadre de l'étude I.**

Ces paramètres présentent des différences plus ou moins importantes entre les trois générations, ce qui est imputable à la variabilité des conditions expérimentales, par exemple celle de la qualité de la nourriture. Ces conditions restent toutefois toujours largement au-dessus des critères de

validité des tests OCDE (OECD, 2012) (mortalité  $< 20\%$  et fécondité totale cumulée par daphnie à 21 jours  $\geq 60$ ).

Les paramètres estimés à partir des données témoins seules ont des distributions *a posteriori* proches des distributions estimées à partir du jeu de données entier (témoins + exposés), quel que soit le modèle sélectionné (Tableau 22. Paramètres physiologiques estimés et les caractéristiques (médiane, 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles) de leur distribution *a posteriori* empirique.). En effet, leurs intervalles de crédibilité se recoupent, à part pour le paramètre  $R_{m_{F_0}}$  qui présente des valeurs supérieures lorsqu'il est estimé à partir des données témoins seules.

**Tableau 22. Paramètres physiologiques estimés et les caractéristiques (médiane, 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles) de leur distribution *a posteriori* empirique.**

Paramètre	Unité	Caractéristiques des distributions <i>a posteriori</i>		
		Modèle coût-croissance	Modèle mortalité-croissance	Modèle témoin
$L_{m_{F0}}$	mm	4,36 (4,32-4,39)	4,36 (4,31-4,39)	4,48 (4.35-4.61)
$L_{m_{F1}}$	mm	4,30 (4,26-4,33)	4,30 (4,26-4,33)	4,37 (4.28-4.47)
$L_{m_{F2}}$	mm	4,57 (4,50-4,63)	4,57 (4,50-4,63)	4,61 (4.47-4.73)
$l_{p_{F0}}$	(-)	0,401 (0,400-0,406)	0,401 (0,400-0,406)	0.403 (0.400-0.418)
$l_{p_{F1}}$	(-)	0,401 (0,400-0,405)	0,401 (0,400-0,405)	0.410 (0.400-0.439)
$l_{p_{F2}}$	(-)	0,429 (0,408-0,445)	0,429 (0,408-0,445)	0.428 (0.402-0.468)
$r_{B_{F0}}$	j <sup>-1</sup>	0,145 (0,142-0,150)	0,145 (0,142-0,150)	0,147 (0.134-0,162)
$r_{B_{F1}}$	j <sup>-1</sup>	0,168 (0,163-0,170)	0,168 (0,163-0,170)	0,160 (0.148-0,169)
$r_{B_{F2}}$	j <sup>-1</sup>	0,131 (0,125-0,137)	0,131 (0,125-0,137)	0,133 (0,123-0,146)
$R_{m_{F0}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	102,6 (100,4-106,6)	103,7 (100,4-106,5)	115,1 (103,8-126,9)
$R_{m_{F1}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	82,27 (81,1-85,6)	82,96 (81,1-85,5)	89,3 (83,6-96,8)
$R_{m_{F2}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	116,1 (111,2-121)	116,0 (111,2-121)	127,4 (116,0-137,9)
$p_R$	(-)	0,764 (0,695-0,835)	0,764 (0,696-0,834)	0.825 (0.645-0.979)
$\tau_G$	mm <sup>2</sup>	87,12 (73,90-101,59)	86,91 (74,20-101,59)	95,99 (55,81-156,12)

### 3.2. Paramètres toxicologiques

A part pour les paramètres  $b_1$  et  $b_2$ , les paramètres toxicologiques présentent globalement de larges incertitudes (Figure 50). Les différences entre les deux modèles sont un peu plus importantes que pour les paramètres physiologiques, mais elles restent encore minimales (Figure 50 et Tableau 23). La présence de certaines distributions *a posteriori* presque aussi larges que les distributions *a priori* qui leur sont associées ( $kr_{1F_0}$ ,  $NEDR_1$ ,  $NEDR_2$ ) et d'une limitation de certaines distributions *a posteriori* par les bornes des distributions *a priori* ( $kr_{1F_1-F_2}$ ,  $kr_2$ ,  $NEDR_1$ ,  $NEDR_2$ ) montrent l'influence des distributions *a priori* dans l'estimation de ces paramètres. Cela signifie qu'il a été difficile pour l'inférence bayésienne de préciser les distributions *a posteriori* de ces paramètres à partir des données observées.

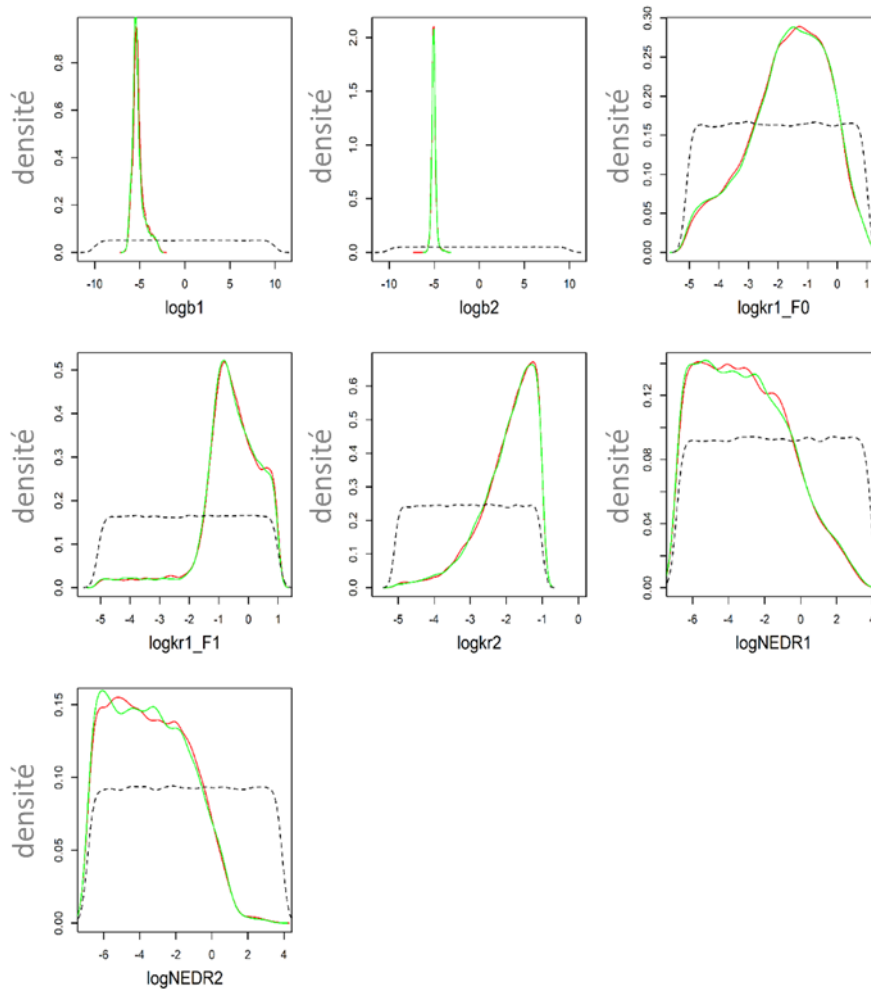


Figure 50. Distributions *a priori* (ligne pointillée) et *a posteriori* (en rouge pour le modèle coût-croissance et en vert pour le modèle mortalité-croissance) de chaque paramètre toxicologique du modèle DEBtox. Dans le cas où la distribution *a priori* s'applique au logarithme népérien du paramètre ( $kr_{1F_0}$ ,  $kr_{1F_1}$ ,  $kr_2$ ,  $NEDR_1$ ,  $NEDR_2$ ), la distribution *a posteriori* du logarithme népérien de ce paramètre a été représentée.

**Tableau 23. Paramètres toxicologiques estimés. Pour chaque paramètre, les caractéristiques (médiane, 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles) de leur distribution *a posteriori* empirique sont précisées.**

Paramètre	Unité	Distribution <i>a posteriori</i>	
		Modèle coût-croissance	Modèle mortalité-croissance
$b_1$	mGy <sup>-1</sup> .h	0,005 (0,002-0,035)	0,005 (0,002 - 0,035)
$b_2$	mGy <sup>-1</sup> .h	0,006 (0,004-0,011)	0,006 (0,004-0,011)
$kr_{1F0}$	j <sup>-1</sup>	0,217 (0,010-1,686)	0,220 (0,009-1,699)
$kr_{1F1-F2}$	j <sup>-1</sup>	0,575 (0,024-2,464)	0,568 (0,021-2,456)
$kr_2$	j <sup>-1</sup>	0,169 (0,021-0,355)	0,169 (0,020-0,355)
$NEDR_1$	mGy.h <sup>-1</sup>	0,038 (0,002-6,68)	0,036 (0,002-6,68)
$NEDR_2$	mGy.h <sup>-1</sup>	0,028 (0,002-1,82)	0,028 (0,001-1,81)

Concernant le mode d'action 1 (augmentation des coûts de production des œufs ou mortalité de l'embryon), la cinétique du dommage  $D_1^*$  est contrôlée par les taux de réparation  $kr_{1F0}$  en F0 et  $kr_{1F1-F2}$  en générations F1 et F2. La valeur médiane du niveau de dommage  $D_1^*$  atteint son maximum autour du 15<sup>e</sup> jour en génération F0 et décroît rapidement en génération F1 à 30% de la valeur maximale prédite en génération F0 (Figure 51). L'intervalle de crédibilité de  $D_1^*$  reste toutefois très large au cours des trois générations et particulièrement en génération F1 et F2.

Concernant le mode d'action 2 (coûts de croissance et de maturation), la cinétique du dommage  $D_1^*$  est contrôlée par le taux de réparation  $kr_2$  pour les trois générations. La valeur médiane du niveau de dommage  $D_2^*$  atteint son maximum autour du 20<sup>e</sup> jour en génération F0 et se maintient à cette valeur maximale en générations F1 et F2 (Figure 51). L'intervalle de crédibilité du niveau de dommage  $D_2^*$  montre que les valeurs de  $kr_2$  prédisent également des cinétiques du dommage plus lentes. Cet intervalle de crédibilité se réduit peu à peu entre les générations F0 et F2, indiquant une plus grande crédibilité des niveaux de dommage  $D_2^*$  élevés en génération F2.

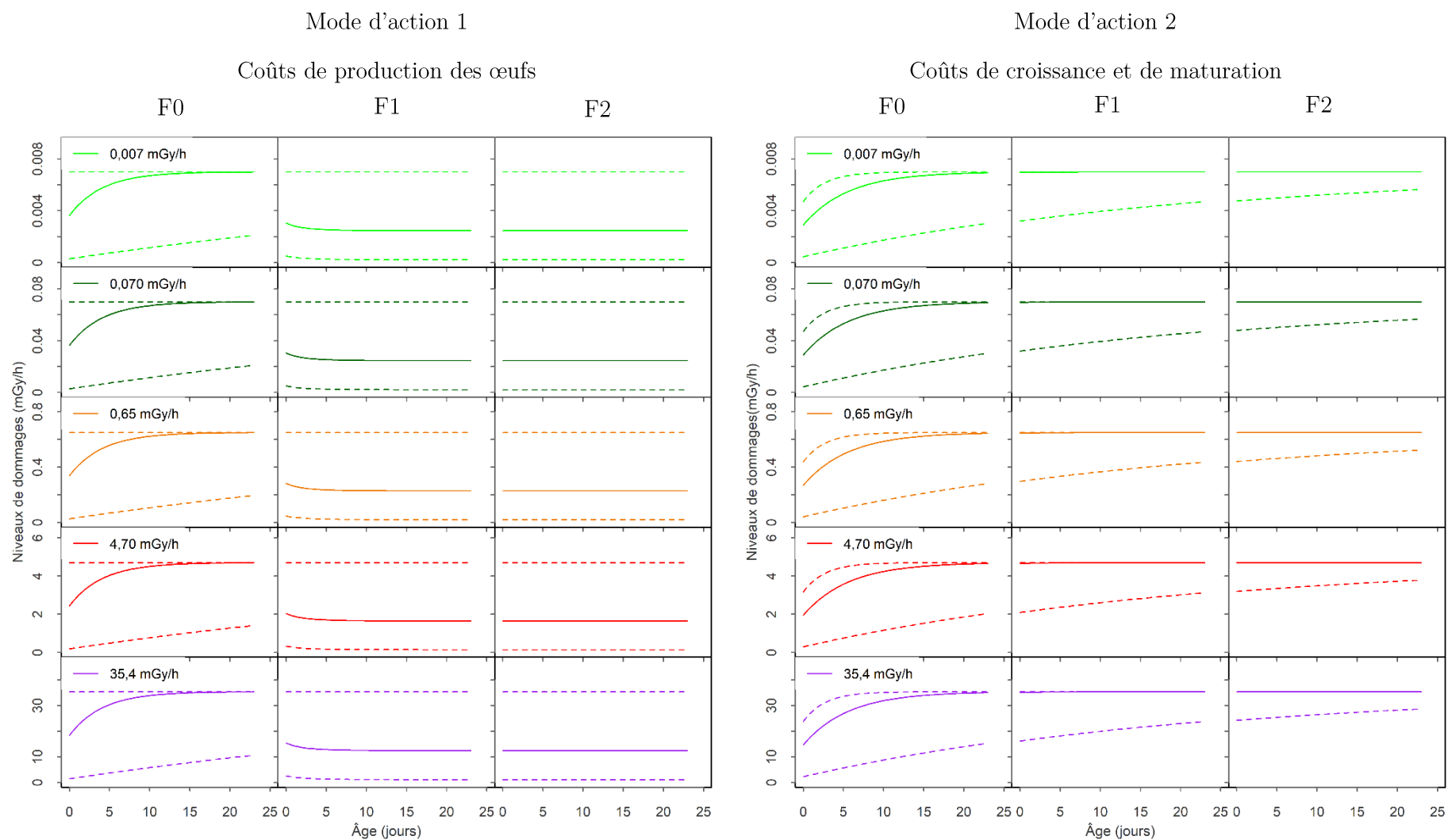


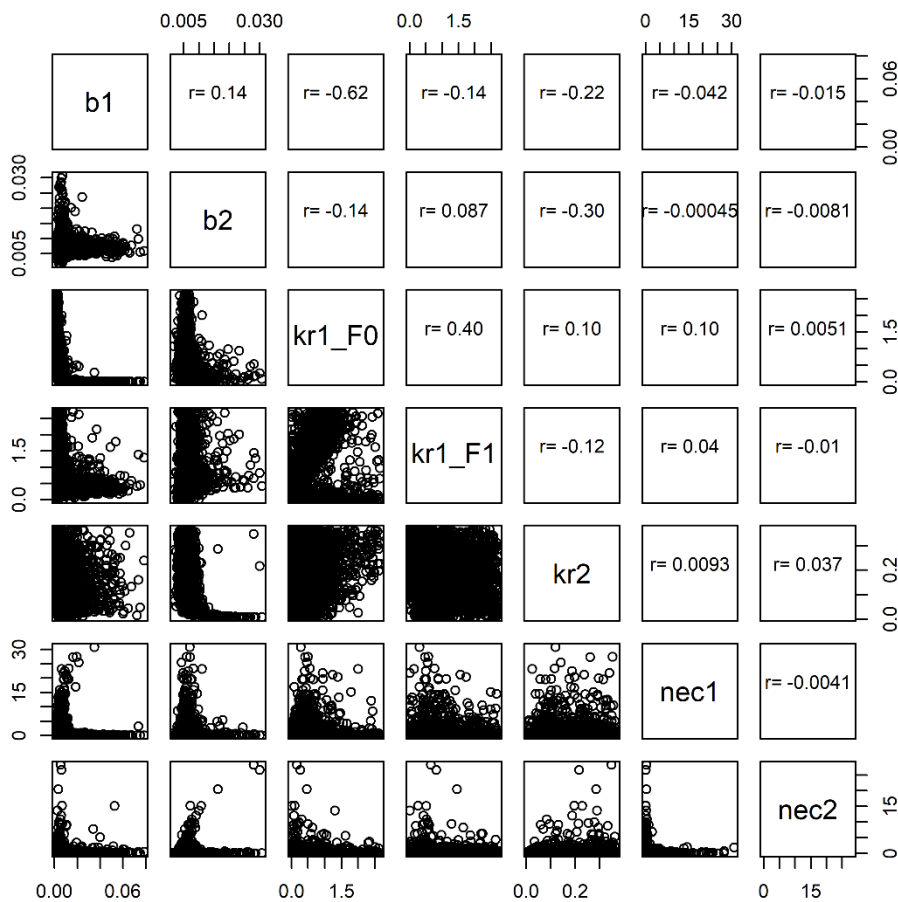
Figure 51. Niveaux de dommages normalisés  $D_1^*$  et  $D_2^*$  simulés pour une irradiation gamma externe (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle chez *D. magna*.  $D_1^*$  et  $D_2^*$  sont associés aux modes d'actions « coûts de production des œufs » et « coûts de de croissance et de maturation » respectivement.



Les valeurs des débits de dose sans effet ( $NEDR_1$ , et  $NEDR_2$ ) prédisent les niveaux de dommage minimaux pour l'apparition d'effets sur l'organisme. Leurs distributions *a posteriori* étant fortement limitées par les bornes inférieures de leur distribution *a priori*, on peut interpréter leurs intervalles de crédibilité à 95% ainsi : [ $<6,7$ ] mGy.h<sup>-1</sup> pour  $NEDR_1$  et [ $<1,8$ ] mGy.h<sup>-1</sup> pour  $NEDR_2$ . Malgré de grandes incertitudes sur les valeurs de  $NEDR_1$ , et  $NEDR_2$ , le modèle semble prédire ainsi une plus grande sensibilité aux radiations gamma pour le mode d'action 2 que le mode d'action 1.

Par ailleurs, les distributions conjointes des paramètres toxicologiques nous révèlent plusieurs corrélations significatives entre ces paramètres, parmi lesquelles les plus importantes sont d'une part entre les taux de réparation du mode d'action 1,  $kr_{1F_0}$  et  $kr_{1F_1-F_2}$  ( $r=0,40$ ) et d'autre part entre le taux de réparation et la pente de fonction de stress de chaque mode d'action,  $kr_{1F_0}$  et  $b_1$  ( $r=-0,62$ ) et  $kr_2$  et  $b_2$  ( $r=-0,30$ ) (Figure 52). Il est important de prendre en compte ces corrélations dans l'interprétation des intervalles de crédibilité des paramètres. En effet, même si on choisit l'ensemble des valeurs de paramètres à l'intérieur de leurs intervalles de crédibilité, il n'est pas assuré que toutes valeurs se situent à l'intérieur des distributions conjointes des différents paramètres.

Les distributions conjointes  $kr_{1F_0}$  et  $kr_{1F_1-F_2}$  montrent que dans 90 % des itérations le taux de réparation du dommage  $D_1^*$  est plus élevé en génération F1 qu'en génération F0, conduisant à un niveau de dommages à l'équilibre plus faible en F1 qu'en F0. Cette observation va dans le sens de l'hypothèse formulée pour expliquer l'atténuation des effets sur la reproduction observée en F1. En revanche, dans 10 % des cas, les valeurs  $kr_{1F_0}$  sont plus élevées que celles de  $kr_{1F_1-F_2}$  conduisant à un niveau de dommages à l'équilibre aussi élevé en F1 qu'en F0. Ces incertitudes sur les taux de réparation du dommage  $D_1^*$  sont bien retranscrites par les larges intervalles de crédibilité du niveau dommage  $D_1^*$  (Figure 51). La corrélation négative entre les taux de réparation et les pentes des fonctions de stress observée pour chaque mode d'action ( $kr_{1F_0}$  et  $b_1$ , et  $kr_2$  et  $b_2$ ), mettent en avant deux cas de figure possibles pour expliquer la cinétique d'apparition des effets : soit une accumulation du dommage rapide et des intensités de stress faible, soit une accumulation du dommage plus lente et des intensités de stress plus élevées.



**Figure 52. Distributions conjointes des paramètres toxicologiques estimés à partir du modèle coût-croissance (projection des échantillons MCMC).  $r$  correspond au coefficient de corrélation de Kendall.**

L'ensemble des paramètres toxicologiques estimés permettent de prédire, pour chaque mode d'action, les cinétiques du stress toxique  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  (Figure 53). Si le stress toxique est principalement visible à 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>, il reste très faible, mais non nul aux débits de dose inférieurs, étant donné que l'intervalle de crédibilité des *NEDR* allant jusqu'à 2  $\mu$ Gy.h<sup>-1</sup>. A 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>, le modèle prédit en génération F0 une augmentation progressive de  $\sigma_1$  à des valeurs pouvant aller jusqu'à 0,3, suivie d'une diminution de ce niveau de stress toxique à des valeurs en dessous 0,1 en générations F1 et F2. Pour  $\sigma_2$ , le modèle prédit également en génération F0 une augmentation à des valeurs pouvant aller jusqu'à 0,3, suivie d'une stabilisation du niveau de stress toxique au-dessus de 0,1 en génération F1 et F2, mais accompagnée d'une légère croissance de la limite supérieure de son intervalle de crédibilité au cours de ces deux générations.

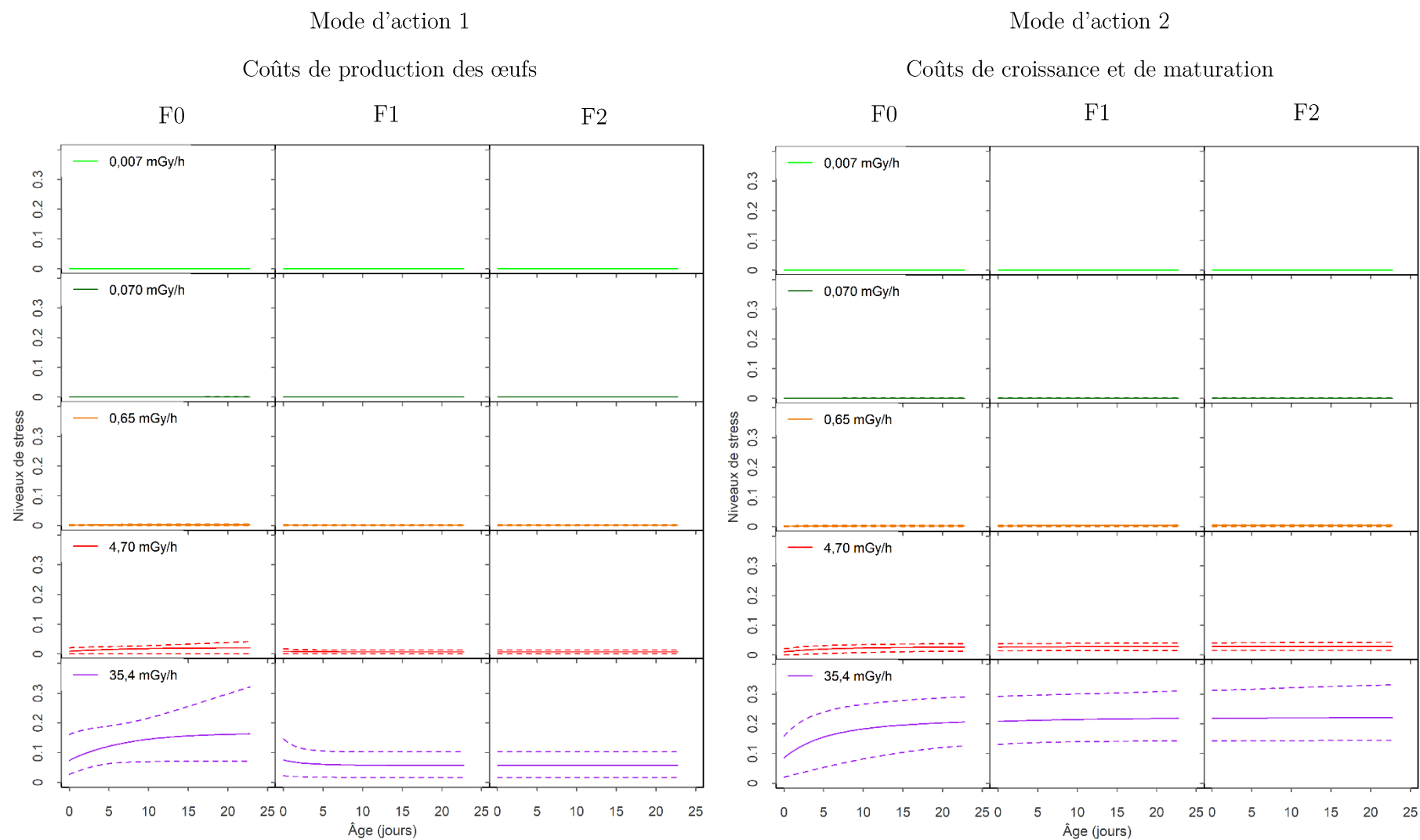


Figure 53. Niveaux de stress toxique  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  simulés d'une irradiation gamma externe (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle chez *D. magna*.  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  sont associés aux modes d'actions « coûts de production des œufs » et « coûts de de croissance et de maturation » respectivement.

## 4. Validation du modèle

### 4.1. Paramètres physiologiques estimés à partir de l'étude II

Les distributions *a posteriori* des paramètres physiologiques estimés à partir des données témoin de l'étude II sont présentées dans le Tableau 24.

**Tableau 24. Paramètres physiologiques estimés à partir des individus témoins de l'étude II et les caractéristiques (médiane, 2,5<sup>e</sup> et 97,5<sup>e</sup> centiles) de leur distribution *a posteriori* empirique.**

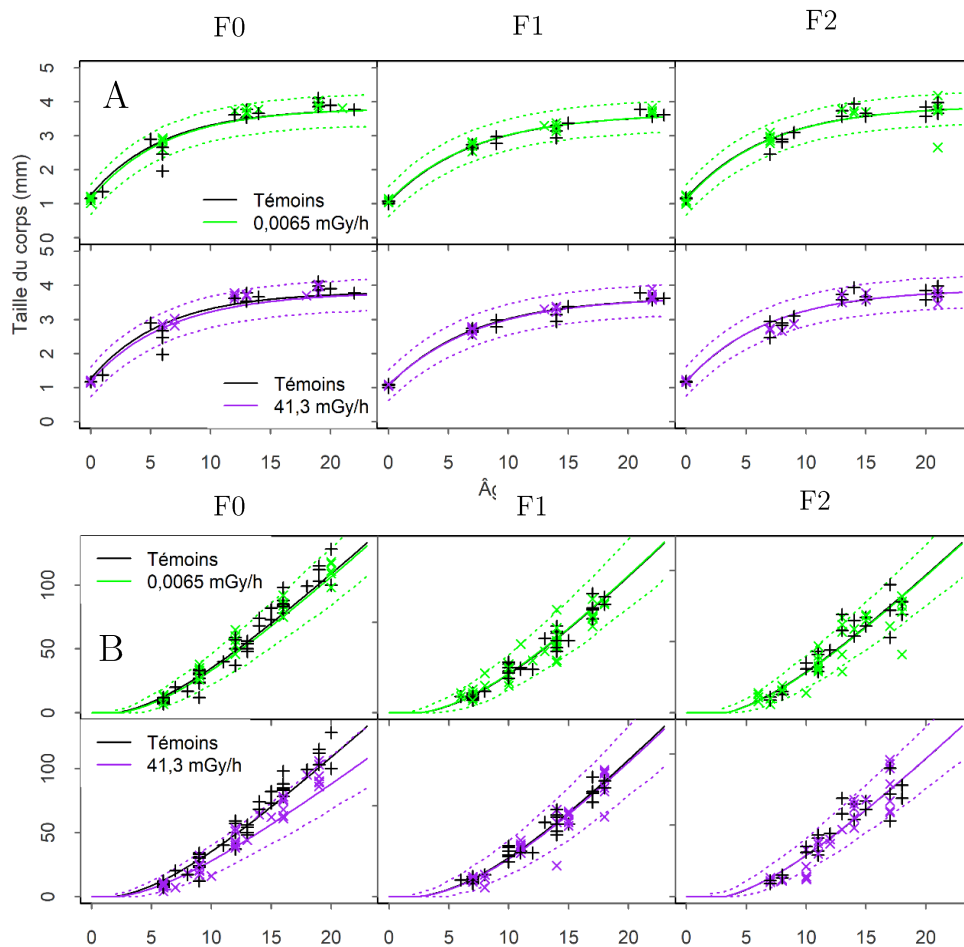
Paramètre	Unité	Distribution <i>a posteriori</i>
$L_{m_{F0}}$	mm	4,45 (4,28-4,60)
$L_{m_{F1}}$	mm	4,27 (4,12-4,49)
$L_{m_{F2}}$	mm	4,54 (4,34-4,74)
$l_{p_{F0}}$	(-)	0,449 (0,407-0,485)
$l_{p_{F1}}$	(-)	0,436(0,402-0,490)
$l_{p_{F2}}$	(-)	0,484 (0,426-0,538)
$r_{B_{F0}}$	j <sup>-1</sup>	0,162 (0,146-0,170)
$r_{B_{F1}}$	j <sup>-1</sup>	0,138 (0,117-0,164)
$r_{B_{F2}}$	j <sup>-1</sup>	0,144 (0,121-0,167)
$R_{m_{F0}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	138,4 (132,5-139,9)
$R_{m_{F1}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	104,3 (89,2-122,9)
$R_{m_{F2}}$	µg œufs.j <sup>-1</sup>	129,2 (111,3-139,3)
$p_R$	(-)	0,886 (0,694-0,994)
$\tau_G$	mm <sup>-2</sup>	20,54 (13,58-30,34)

### 4.2. Prédictions de croissance et de reproduction pour les daphnies de l'étude II

Les prédictions de croissance et de reproduction simulées à partir des distributions *a posteriori* des paramètres physiologiques (étude II) et des paramètres toxicologiques (étude I) décrivent bien les données exposées de l'étude II (Figure 54). Le pouvoir prédictif du modèle est confirmé par des pourcentages des données de croissance et reproduction incluses dans les intervalles de crédibilité des prédictions proches des pourcentages nominaux (Tableau 25). On observe que les pourcentages des données de reproduction sont légèrement inférieurs à ceux obtenus lors de la prédiction de données issues de l'étude I. Cela pourrait être expliqué par une sous-estimation de la variabilité des données de reproduction en conditions d'exposition, liée à l'estimation du

paramètre  $p_R$  à partir des données témoin seules.

Ces prédictions sur la croissance et la reproduction des daphnies permettent de valider le modèle dans le cas d'une exposition aux radiations gamma sur une génération, suivie d'une phase de récupération (absence d'irradiation) pendant deux générations. En effet, ces prédictions prennent bien en compte de l'absence d'effet sur la reproduction et la croissance à  $6,5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , ainsi que la réduction de fécondité à  $41 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  en génération F0, suivie d'une absence d'effet chez les générations F1 et F2 en phase de récupération.



**Figure 54.** Prédiction de croissance et de reproduction de daphnies sur trois générations (F0, F1, F2) exposées aux radiations gamma en génération F0 ( $0,0065$  et  $41,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) puis en l'absence d'irradiation en générations F1 et F2 dans le cadre de l'étude II. Les prédictions ont été obtenues en calibrant le modèle DEBtox à partir d'un échantillonnage de la distribution a posteriori estimée pour chaque paramètre avec des données de l'étude I pour les paramètres toxicologiques et avec des données l'expérience II pour les paramètres physiologiques. Points (+) : données observées (Étude II), lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, lignes en pointillés : intervalle de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.

**Tableau 25 . Pourcentage des données de croissance et de reproduction observées issues de l'étude II, incluses dans les intervalles de crédibilité à 50, 80, 95 et 99% des données prédites par les modèles DEBtox coût-croissance ou mortalité-croissance calibrés à partir des données issues de l'étude I.**

Intervalle de crédibilité des données simulées	Pourcentage des données observées incluses (%)			
	Modèle coût-croissance		Modèle mortalité-croissance	
	Croissance	Reproduction	Croissance	Reproduction
50%	60,9	45,2	60,9	44,8
80%	86,1	73,8	86,1	73,3
95%	98,3	87,6	98,3	88,1
99%	99,1	96,7	99,1	96,2

## Chapitre X. Discussion

### 1. Inférence mécaniste de la dynamique transgénérationnelle des effets sur l'organisme

L'intégration des effets transgénérationnels dans le cadre du modèle DEBtox est un sujet encore très peu exploré. L'étude de Massarin et al. (2011), traitant de la modélisation DEBtox des effets de l'uranium appauvri sur plusieurs générations de daphnies, a proposé de modéliser séparément les effets dans chaque génération. En estimant donc des valeurs de paramètres toxicologiques propres à chaque génération, l'étude constitue une approche descriptive de la réponse transgénérationnelle. Dans notre étude, nous abordons la toxicité transgénérationnelle sous un angle mécaniste. L'approche utilisée, initialement proposée par Plaire (2013), propose l'intégration d'un compartiment de dommage transmissible d'une génération à la suivante dont la cinétique au fil des générations permet d'expliquer l'apparition des effets observée à l'échelle de l'organisme et l'augmentation de son intensité au fil des générations. L'ensemble des paramètres toxicologiques liés à l'apparition du stress toxique sont alors valables pour toutes les générations.

L'approche bayésienne, utilisée pour estimer l'ensemble des paramètres du modèle, nous a permis de prendre en compte les incertitudes associées à chaque paramètre à travers leur distribution de probabilité *a posteriori* de leurs valeurs et la structure complète de leurs corrélations. Contrairement aux paramètres physiologiques qui ont été estimés précisément, certains des paramètres toxicologiques se rapportant à la cinétique d'accumulation du dommage (paramètres  $kr_{1F_0}$ ,  $kr_{1F_1-F_2}$ ,  $kr_2$ ) et à l'apparition du stress toxique (paramètres  $NEDR_1$ ,  $NEDR_2$ ) présentent de larges incertitudes. Malgré ces incertitudes, le modèle fait preuve d'un bon ajustement aux données observées de reproduction et de croissance. De plus, les distributions des paramètres toxicologiques permettent de prédire précisément les données issues d'une seconde expérimentation, dans le cas d'un arrêt de l'exposition à partir de la génération F1. Toutefois, le pouvoir prédictif des effets transgénérationnels aurait besoin d'être validé sur le long terme, en confrontant les prédictions du modèle à des effets mesurés au-delà de la génération F2.

L'inférence de paramètres toxicocinétiques a souvent été associée à l'observation d'importantes incertitudes sur la valeur de certains paramètres malgré un bon ajustement du modèle aux

données, que ce soit pour le modèle DEBtox (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Charles, 2008) ou pour des modèles pharmacocinétiques (Bernillon, Bois, 2000 ; Yates, 2006). Dans ces cas, les données expérimentales disponibles ne suffisent pas à une estimation précise de paramètres ne pouvant être mesurés directement, tels que les coefficients d'absorption et d'élimination. Cela peut représenter un problème dans un modèle mécaniste, car un paramètre dont la valeur est très incertaine ne permet pas de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent qu'il est censé représenter et perd de son applicabilité (Yates, 2006). Ainsi, les distributions postérieures de  $kr_{1F_0}$ ,  $kr_{1F_1-F_2}$  et  $kr_2$  entraînent de grandes incertitudes sur les cinétiques du dommage, celles-ci pouvant aller de très rapides à beaucoup plus lentes et en particulier, elles ne permettent pas de trancher sur la présence ou non de dommages en génération F2 et F3 pour le mode d'action 1 (augmentation du coût de l'œuf ou mortalité pendant l'ovogenèse). En conséquence, les niveaux de dommages au-delà de la génération F3 restent très incertains et l'extrapolation des effets sur le long terme semble difficile. Par ailleurs, l'estimation de débits de dose minimum pour l'apparition des effets pour chacun des modes d'action reste très imprécise. Environ 30 % des valeurs de  $NEDR_1$  et de  $NEDR_2$  se situent en dessous de  $7 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , le plus faible débit de dose testé, et l'apparition du stress toxique n'est pas exclue en dessous de  $2 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ces incertitudes pourraient avoir des causes multiples, notamment la corrélation des  $NEDR$  aux paramètres  $k_r$  également très incertains (Newman, Strojjan, 1998) ainsi que l'inclusion de données expérimentales à des débits de dose trop faibles (Péry et al., 2002). L'intérêt des  $NEDR$ , classiquement appelés  $NEC$  (No Effect Concentration) dans les modèles DEBtox traitant d'une contamination chimique, réside dans le fait qu'elles ne dépendent pas de la durée d'exposition, contrairement aux valeurs de  $NOEDR$  (No Observed Effect Dose Rate) et d'ECx (Effect Concentrations) dérivées directement des résultats des tests toxicologiques conduits à des durées fixes d'exposition (Péry et al., 2002). Toutefois, les fortes incertitudes estimées sur les valeurs de  $NEDR$  limitent fortement leur pertinence dans le cadre de l'évaluation des risques liés à l'exposition aux radiations gamma sur le long terme (De Bruijn, van Leeuwen, 1996)

Parisot (2015) a précédemment proposé des valeurs des paramètres du modèle DEBtox transgénérationnel, ajusté par une approche fréquentiste (Tableau 26). Le même jeu de données que dans notre étude avait été utilisé, l'exception faite des données à  $7 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  qui avaient été exclues. En effet, les effets significatifs sur la croissance et la reproduction observés à  $7 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$



mais absents à  $70 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , rendaient difficile l'estimation fréquentiste de la relation linéaire entre le stress toxique et le niveau de dommage normalisé. La plus grande flexibilité de l'approche bayésienne de notre étude a permis d'inclure ces données, mais cela a probablement participé à la difficulté d'obtenir une estimation précise des valeurs de *NEDR*. Toutes les valeurs (uniques) des paramètres toxicologiques issues de l'inférence fréquentiste, mis à part  $b_1$ , sont inclus dans les intervalles de crédibilité à 95% estimés par la méthode bayésienne. Les valeurs des coefficients de réparation,  $k_r$ , prédisent pour le mode d'action 1 une accumulation rapide du dommage suivi par une disparition de celui-ci en génération F2 et F3, et pour le mode d'action 2, une accumulation lente du dommage au fil des trois générations. Toutefois, ces valeurs de paramètres constituent seulement l'une des combinaisons possibles assurant un bon ajustement aux données observées, contrairement à notre étude qui prend en compte l'ensemble des combinaisons de paramètres possibles.

**Tableau 26.** Valeurs des paramètres toxicologiques estimés par une approche fréquentiste pour décrire les données issues de l'étude I (Parisot, 2015).

Symbole	Unité	Valeur
		Modèle EggGrow
$b_1$	$\text{mGy}^{-1}\cdot\text{h}$	$2,47\cdot 10^{-2}$
$b_2$	$\text{mGy}^{-1}\cdot\text{h}$	$5,60\cdot 10^{-5}$
$kr_{1F0}$	$\text{j}^{-1}$	$6,17\cdot 10^{-2}$
$kr_{1F1F2}$	$\text{j}^{-1}$	1,31
$kr_2$	$\text{j}^{-1}$	$1,76\cdot 10^{-2}$
$NEDR_1$	$\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$	0,490
$NEDR_2$	$\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$	0,144

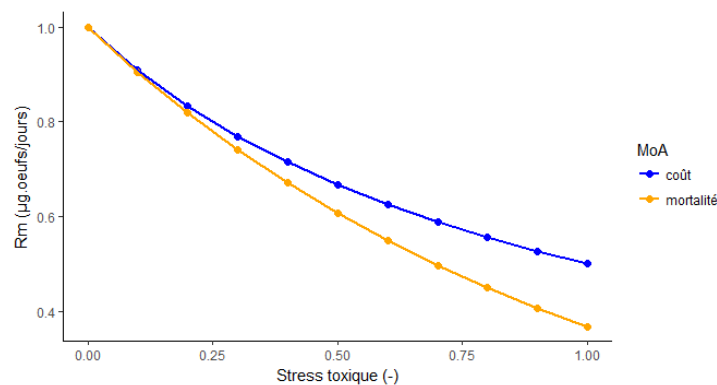
L'inférence bayésienne permet d'inclure de l'information *a priori* sur les paramètres comme, par exemple, des données issues d'expérimentations supplémentaires ou de la littérature, ou bien encore l'avis d'un expert. Cette information *a priori* est essentielle pour significativement réduire les incertitudes dans l'estimation de paramètres, fréquentes dans les modèles représentant des systèmes biologiques et écologiques du fait de la complexité de leur structure (Omlin, Reichert, 1999 ; Reichert, Omlin, 1997). Les compartiments de dommages utilisés dans notre modèle

DEBtox regroupent toutes sortes de dommages biologiques causés par les radiations gamma et restent en elles-mêmes une grandeur relativement abstraite. La mesure d'altérations à l'ADN à des débits de dose de plus en plus faibles, associée à une aggravation des effets au fil des générations (Parisot et al., 2015) a permis de construire une hypothèse sur la structure des compartiments de dommage, de la même manière que Plaire (2013). Toutefois, la méthode de mesure des altérations à l'ADN n'étant pas quantitative, elles n'ont pas pu être prises en compte dans l'information *a priori*. Ainsi, en l'absence de données facilement mesurables au laboratoire ou de connaissances supplémentaires relatives aux paramètres toxicologiques, des distributions *a priori* vagues (non-informatives) ont été utilisées. Dans ces conditions, il pourrait être intéressant de réviser la structure du modèle et de représenter explicitement certains mécanismes biologiques associés à la dynamique transgénérationnelle des effets des radiations gamma qui permettraient l'intégration de paramètres auxquels des informations *a priori* peuvent être facilement associées.

L'exposition aux radiations ionisantes est à l'origine de dommages sur diverses molécules biologiques (ADN, protéines, lipides...), via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Reisz et al., 2014). L'apparition de ces ROS et ces dommages entraînent alors l'activation d'une protection antioxydante et de mécanismes de réparation et d'élimination du dommage (Won et al., 2015). Ces mécanismes suivraient des cinétiques diverses, dépendant à la fois du type de dommage, de la cellule considérée, du débit de dose et de la dose totale reçue (Burlakova et al., 1998 ; Loucas et al., 2004 ; Vilenchik, Knudson, 2006 ; Zaichkina et al., 2004). De plus, l'héritabilité des dommages moléculaires et les mécanismes à l'origine des effets transgénérationnels des radiations gamma sont encore très mal compris (Adam-Guillermin et al., 2018). Le rôle des dommages directs sur l'ADN des cellules germinales et celui des modifications épigénétiques ne sont pas encore clairement définis (Dubrova et al., 2000 ; Taira et al., 2015). Dans ce contexte, le modèle DEBtox permettrait de tester la contribution de différents mécanismes et dommages moléculaires conduisant à l'apparition d'effets à l'échelle de l'organisme. Cette approche mécaniste, connue sous le terme des « Adverse Outcome Pathways » (AOP) (Ankley Gerald T. et al., 2009) a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche récents ou toujours en cours (Ananthasubramaniam et al., 2015 ; Garcia-Reyero, Murphy, 2017) et sera détaillée dans les perspectives de cette thèse.

## 2. Mode d'action toxique des radiations gamma

Les analyses en inférence bayésienne conduites dans cette thèse ont permis d'identifier deux modes d'action distincts nécessaires pour décrire les effets observés. L'un des modes d'action identifiés pour les radiations gamma affecte la reproduction seulement. Il pourrait correspondre soit à une augmentation des coûts de l'œuf, soit à une augmentation de la mortalité durant l'ovogenèse, les deux modes d'action décrivant aussi bien l'un que l'autre les effets sur les données de reproduction. Plusieurs études rapportent un effet prédominant des radiations gamma sur la reproduction, montrant une diminution dans le nombre d'œufs produits (Gilbin et al., 2008 ; Knowles, Greenwood, 1994, 1997 ; Lecomte-Pradines et al., 2017), ou bien une diminution de leur éclosion (Hertel-Aas et al., 2007). Dans le cadre de l'analyse DEBtox, l'irradiation gamma avait été associée à une réduction directe sur le nombre maximum d'œufs produits chez *C. elegans* suite à un phénomène d'apoptose dans les gonades et un déclin du stock de gamètes (Buisset-Goussen, 2014 ; Lecomte-Pradines et al., 2017). L'analyse DEBtox qui a également analysé des données de l'étude I par la méthode d'inférence fréquentiste (Parisot, (2015) conclut que l'augmentation du coût de l'œuf, plutôt que l'augmentation de la mortalité durant l'ovogenèse, permettait de mieux expliquer l'effet observé sur la reproduction en génération F0. Il serait intéressant de tester si ce résultat est lié à l'exclusion des données mesurées à 7  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ . Mathématiquement, les deux modes d'action, augmentation du coût de l'œuf et augmentation de la mortalité à l'ovogenèse, entraînent tous les deux une diminution du taux de reproduction maximum ( $R_m$ ) (Kooijman, Bedaux, 1996) mais leur action se différencie principalement aux forts niveaux de stress (Figure 55).



**Figure 55. Comparaison des effets sur le taux de reproduction maximum  $R_m$  (fixé à 1 en l'absence de stress toxique) entre les deux modes d'actions « coûts de l'œuf » et « mortalité à l'ovogenèse » en fonction de l'intensité du stress toxique.**

Ainsi, le choix du mode d'action direct sur la reproduction pourrait avoir des répercussions en cas d'extrapolation des résultats à des débits de dose plus élevés, non testés à ce jour. Afin de discriminer ces deux modes d'action, une première solution serait de conduire une nouvelle expérience avec une gamme de débits de dose plus large que celle utilisée dans l'étude I. Une deuxième solution serait de s'intéresser plus en détail aux mécanismes moléculaires et cellulaires en jeu. Plusieurs études ont montré que, chez *C. elegans*, les dommages moléculaires causés par les radiations gamma entraînaient l'activation de divers mécanismes de réparation des dommages dans les lignées germinales et de la surexpression de protéines liées à la reproduction (Buisset-Goussen, 2014 ; Dubois, 2017). Lorsque les mécanismes de réparation sont dépassés, l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose des cellules germinales ont été fréquemment observés chez les invertébrés (Buisset-Goussen, 2014 ; Sarantseva, Khromykh, 2001). Si l'augmentation des coûts de production de l'œuf semble plus difficile à observer au laboratoire, une étude histologique, similaire à celle conduite sur des ovaires de drosophiles dans l'étude de Drummond-Barbosa et Spradling (2001), pourrait permettre de discriminer entre les deux modes d'action pressentis. De plus, les phénomènes apoptotiques dans les lignées germinales pouvant être associés à l'expression de gènes spécifiques (Chao, Nagoshi, 1999 ; King et al., 2018), des analyses du transcriptome ou du protéome pourraient également aider à préciser les mécanismes biologiques en jeu dans la baisse de fécondité chez la daphnie exposée chroniquement aux radiations gamma.

Les effets des radiations gamma sur la croissance et la reproduction ont également été associés à un autre mode d'action, une augmentation des coûts de croissance et de maturation. Ce mode d'action est caractérisé par une diminution du taux de croissance sans impact sur la taille maximum et s'accompagne d'un retard de reproduction (Jager, Zimmer, 2012). Les caractéristiques de ce mode d'action, également pointé par l'analyse fréquentiste de (2015), sont en cohérence avec les effets observés sur la reproduction et la croissance des daphnies en F2. Ce mode d'action a également été identifié dans une précédente étude DEBtox traitant de l'effet des radiations gamma sur *C. elegans* mais à l'échelle d'une seule génération (Lecomte-Pradines et al., 2017). Notre étude permettrait alors d'impliquer directement l'augmentation des coûts de croissance et de maturation dans l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction au fil des générations. Ce mode d'action suggère que les daphnies exposées aux radiations gamma utilisent une plus grande proportion de l'énergie disponible pour l'organisme à la production de

biomasse dédiée à la croissance de l'organisme et à la maturation reproductive. Dans l'étude de Swain et al. (2010), ce mode d'action a pu être associé à des effets significatifs sur la synthèse et le turnover des protéines, suggérant que les dommages induits sur les protéines par l'exposition au fluoranthène déclencheraient leur dégradation et la nécessité de synthétiser de nouvelles protéines essentielles à la croissance et au développement, moyennant un coût énergétique élevé pour l'organisme. Dans le cas des radiations ionisantes, c'est l'apoptose des cellules somatiques, détectée chez la *D. magna* dès 24 heures d'irradiation gamma à 10,7 mGy.h<sup>-1</sup> (Gomes et al., 2018), qui pourrait être à l'origine d'une augmentation de la biosynthèse afin de remplacer les cellules éliminées, d'où une augmentation globale des coûts de croissance.



---

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---





## Conclusion générale

L'objectif principal de travail de doctorat était de mieux caractériser les effets transgénérationnels des radiations gamma chez le crustacé *Daphnia magna*. D'une part, une approche expérimentale avait pour objectif d'étudier les modifications de la méthylation de l'ADN radio-induites et leur transmission au fil des générations. D'autre part, un travail de modélisation visait à évaluer la contribution d'un modèle DEBtox à deux compartiments de dommage dans la compréhension et la prédiction des effets transgénérationnels des radiations ionisantes à l'aide d'une méthode d'inférence bayésienne.

### 1. Mise en évidence de modifications épigénétiques transgénérationnelles

Notre étude montre la présence de modifications de la méthylation de l'ADN chez les daphnies exposées aux radiations gamma pendant tout leur cycle de vie (génération F0) et dans leur descendance jusqu'à la 3<sup>e</sup> génération (F3). La majorité de ces modifications ont été détectées sous forme de DMC, c'est-à-dire des sites CpG isolés, majoritairement hypométhylés. Le débit de dose ne semble pas influencer le nombre de modifications de la méthylation observées, et certaines modifications, communes aux deux débits de dose, pourraient constituer des marqueurs d'exposition aux radiations gamma. Ces modifications de la méthylation concernent principalement des gènes impliqués dans de grandes fonctions biologiques jouant un rôle dans la réponse aux radiations ionisantes, comme le turnover des protéines ou la transduction du signal et pourraient avoir des conséquences sur leur expression. L'absence d'effet de l'irradiation gamma sur le niveau moyen de méthylation de l'ADN, contrastant avec les résultats de plusieurs études, trouverait son origine dans la mesure de la méthylation à l'échelle du nucléotide et l'utilisation de daphnies entières lors de l'extraction de l'ADN.

Le design expérimental utilisé a permis de mettre en évidence la présence de modifications transgénérationnelles de la méthylation lors d'une irradiation gamma. En effet, l'observation de modifications communes entre la génération F2, exposée au stade de cellule germinale, et la génération F3, première génération non-exposée sur la totalité de son cycle de vie, démontre la transmission par les gamètes de modifications épigénétiques radio-induites vers les générations non-exposées. Certaines de ces modifications de la méthylation transgénérationnelle concernent

un gène (Hsp70) impliqué dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes et potentiellement dans divers mécanismes adaptatifs.

A l'échelle de l'organisme, une réduction significative de la fécondité a été observée en génération F0, en accord avec les observations rapportées dans des études précédentes (Gilbin et al., 2008 ; Parisot et al., 2015). L'absence d'effet sur les traits d'histoire de vie sur les générations F1, F2 et F3 ne permet pas d'établir un lien entre les modifications de la méthylation et les effets à l'échelle de l'organisme. Toutefois, de telles modifications pourraient interférer dans la réponse biologique de la daphnie à divers stress environnementaux généralement régulée par des mécanismes épigénétiques, comme la présence de prédateurs (Harris et al., 2012). En outre, une irradiation sur plusieurs générations permettrait peut-être d'accumuler un nombre croissant de modifications épigénétiques à l'origine d'effets transgénérationnels mesurables à l'échelle de l'organisme, mais cette hypothèse n'a pas été testée lors de cette thèse.

L'utilisation des données épigénétiques reste encore limitée dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental des radiations ionisantes. Notre étude suggère deux pistes à approfondir concernant leur application future en écotoxicologie. D'une part, les modifications transgénérationnelles de la méthylation de l'ADN pourraient constituer des biomarqueurs d'une exposition aux radiations ionisantes, potentiellement intervenue plusieurs générations en amont. D'autre part, une meilleure identification du caractère transgénérationnel des modifications épigénétiques induites par les radiations ionisantes et de leur lien avec des effets favorables ou défavorables à l'échelle de l'organisme permettrait de mieux prédire et anticiper des conséquences sur le long terme.

## **2. Modéliser des effets transgénérationnels grâce à une approche mécaniste DEBtox**

Dans notre étude, l'incorporation dans le modèle DEBtox de deux compartiments de dommages transgénérationnels ayant chacun un mode d'action toxique distinct, a permis de décrire avec succès la dynamique des effets des radiations gamma sur trois générations de *D. magna*, issus des données de Parisot et al. (2015) et de celles acquises dans le cadre de cette thèse. L'un de ces modes d'action toxique, agissant directement sur la reproduction, pourrait aussi bien découler d'une augmentation des coûts de production d'un œuf, que d'une mortalité accrue pendant

l'ovogenèse. L'autre mode d'action toxique, agissant à la fois sur la reproduction et la croissance, correspond à une augmentation des coûts de croissance et de maturation. Les compartiments de dommage font l'hypothèse d'une accumulation de dommages biologiques, transmis en totalité à la génération suivante. Ainsi, les paramètres contrôlant la cinétique des dommages et l'apparition du stress toxique sont communs à toutes les générations. Ils proposent un mécanisme permettant non seulement de décrire, mais aussi d'expliquer l'aggravation des effets observés au fil des générations. Le modèle DEBtox transgénérationnel pourrait ainsi devenir un outil essentiel pour la prédiction des effets sur le long terme dans le cadre de l'évaluation des risques environnementaux associés aux radiations ionisantes.

La méthode d'inférence bayésienne utilisée dans notre étude a présenté différents avantages. Tout d'abord, elle a permis de guider l'estimation des nombreux paramètres du modèle DEBtox en incluant de l'information *a priori* sur leurs valeurs et évitant ainsi les difficultés et les biais observés lors d'une inférence classique (fréquentiste) (Billoir, Delignette-Muller, Péry, Geffard, et al., 2008). Ensuite, l'approche bayésienne a permis d'associer à chaque paramètre, un intervalle de crédibilité correspondant à l'ensemble des valeurs possibles selon un niveau de crédibilité donné (par exemple, 95 %). Ces intervalles de crédibilité reflètent l'incertitude associée à chaque paramètre. Les paramètres contrôlant la cinétique du dommage et l'apparition du stress toxique ont présenté le plus d'incertitudes, limitant fortement les prédictions des niveaux de dommages et de l'apparition d'effet au-delà de la génération F2. Ces prédictions nécessiteraient d'être validées par des données de reproduction et de croissance issues d'un éventail de situations d'exposition plus informatif.



## Perspectives de recherche

### 1. Approfondir la compréhension des mécanismes épigénétiques transgénérationnels

Notre étude a permis de mettre en évidence chez la daphnie des modifications de la méthylation de l'ADN radio-induites, en partie transmises aux générations non-exposées. Afin de préciser le lien entre ces modifications et l'expression des gènes, les conséquences de la modification de la méthylation sur la transcription des gènes concernés pourraient être étudiées avec des méthodes de séquençage d'ARN (RNA-seq), récemment adaptées à *D. magna* (Orsini et al., (2017)). Il serait alors possible de confirmer le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'épissage alternatif des gènes lors de leur transcription déjà suggéré chez *D. magna* (Asselman et al., 2017).

En outre, il pourrait être intéressant d'explorer les effets des radiations ionisantes sur d'autres mécanismes épigénétiques identifiés chez *D. magna*, comme la modification des histones (Robichaud et al., 2012). Plusieurs études ont montré que les radiations ionisantes entraînaient des modifications des histones, la phosphorylation de l'histone H2AX impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN étant la modification la plus étudiée chez les vertébrés (Hunt et al., 2013). De plus, certaines études suggèrent que la modification des histones pourrait avoir un rôle important dans l'hérédité épigénétique transgénérationnelle chez les invertébrés (Heard, Martienssen, 2014).

L'utilisation de *D. magna* en reproduction parthénogénétique a permis de garantir une homogénéité génétique entre les générations. Les particularités de cette reproduction limitent toutefois l'extrapolation de nos résultats au cas des espèces caractérisées par un mode de reproduction sexué. Il serait intéressant de tester la présence de modifications transgénérationnelles avec *D. magna* lors de la reproduction sexuée. Des conditions expérimentales propices au déclenchement de ce mode de reproduction chez la daphnie seraient indispensables, de même que l'utilisation d'un clone de daphnie (différent du clone A) produisant plus facilement des mâles.

Chez *D. magna*, un grand nombre de réponses biologiques à différents facteurs environnementaux

sont contrôlés par des mécanismes épigénétiques, par exemple la croissance de défenses morphologiques en présence de prédateurs ou la détermination du sexe pendant l'embryogenèse en présence de conditions de température particulières (Harris et al., 2012). L'étude des modifications épigénétiques intervenant lors de l'exposition conjointe aux radiations ionisantes et à d'autres facteurs environnementaux et leurs conséquences à l'échelle de l'organisme, permettrait d'évaluer les effets épigénétiques des radiations ionisantes dans des conditions plus réalistes des écosystèmes naturels.

## 2. Améliorer la prédiction mécaniste des effets sur le long terme

Le modèle DEBtox utilisé dans cette étude propose une représentation explicite des mécanismes transgénérationnels à l'origine de la modification de la sensibilité des organismes au fil des générations. Toutefois les paramètres contrôlant ces mécanismes manquent de signification biologique. L'intégration de variables quantitativement mesurables liées aux effets transgénérationnels observés à l'échelle de l'organisme permettrait d'améliorer la fiabilité et l'applicabilité du modèle DEBtox transgénérationnel. L'approche de l'Adverse Outcome Pathways (AOP) constitue un cadre intéressant pour construire, au sein du modèle DEBtox, un lien entre les dommages moléculaires, cellulaires et histologiques et les effets à l'échelle de l'organisme au fil des générations (Garcia-Reyero, Murphy, 2017). Le principe de l'AOP repose sur l'intégration de liens de cause à effet entre des événements biologiques clés (KE, Key Events en anglais), expérimentalement mesurables. Ces KE interviennent à partir d'un événement moléculaire initiateur (MIE, Molecular Initiating Event) jusqu'aux effets défavorables (AO, Adverse Outcome) sur la reproduction, la croissance ou la survie à l'échelle de l'organisme (Figure 56).

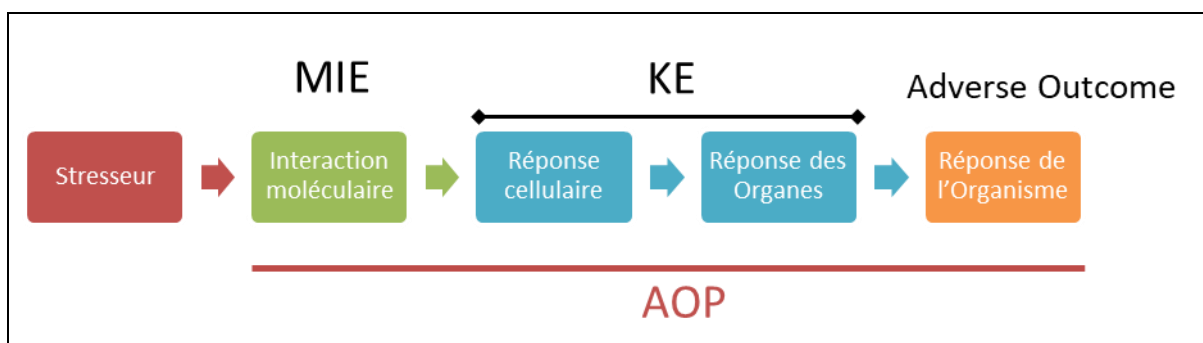
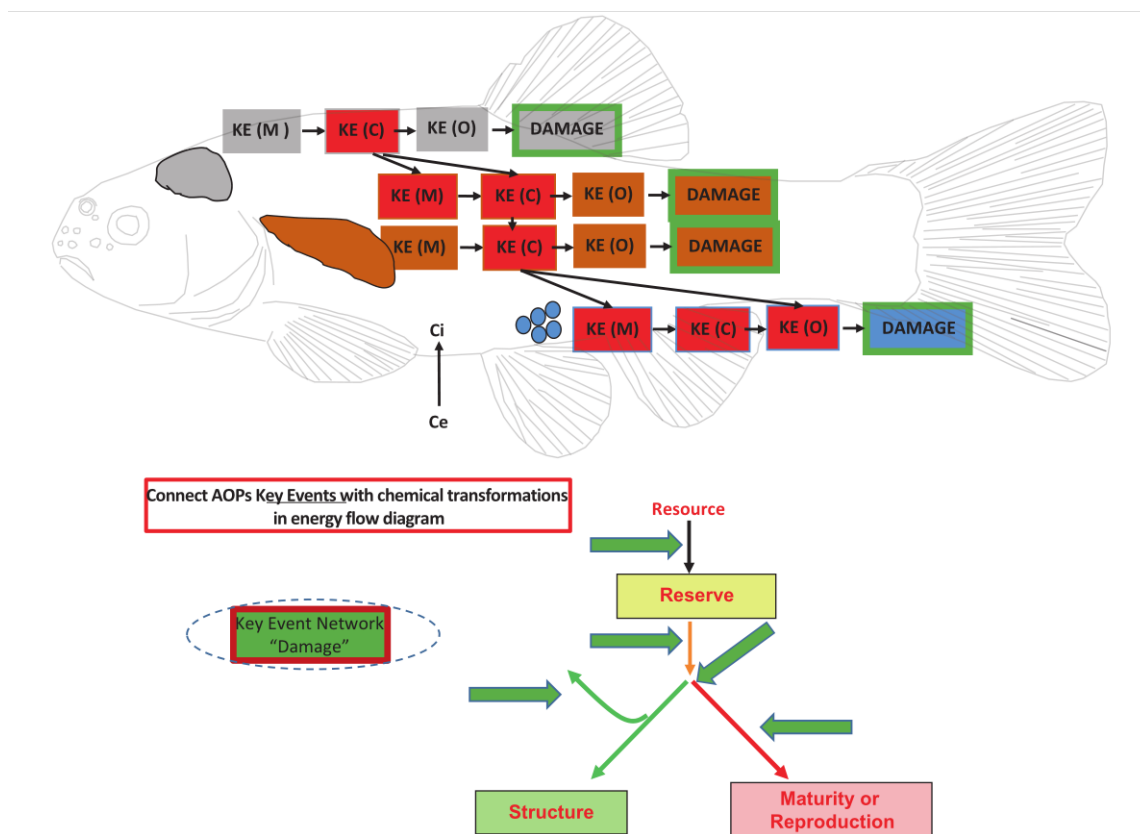


Figure 56. Structure d'un AOP (Adverse Outcome Pathway). MIE : Molecular Initiating Event, KE : Key Event.

Les KE doivent représenter une mesure du dommage qui vient directement perturber les processus énergétiques dans le modèle DEBtox. La Figure 57 est un exemple de représentation schématique d'un AOP appliqué au cas d'un poisson lors d'une contamination chimique et de son intégration dans le modèle DEBtox.



**Figure 57. Représentation schématique d'un AOP lors d'une contamination chimique chez le poisson et son intégration dans le modèle DEB. Le réseau d'évènements biologiques clefs (KE, Key Events en anglais) affecté par le contaminant dans différents organes et à différentes échelles d'organisation biologique (M : moléculaire, C : cellulaire, O : organe) est représenté. Ce réseau de KE se traduit en dommage venant directement affecter certains processus énergétiques du modèle DEBtox (flèches vertes). Schéma issu de (Garcia-Reyero and Murphy, 2017).**

Chez la daphnie, du fait de sa petite taille, il est difficile de mesurer des données biologiques à l'échelle de l'organe, contrairement à ce qui est proposé dans l'exemple de la Figure 57. Dans ce cas-là, il a été proposé de relier des mesures quantitatives de l'expression de gènes à l'échelle de l'organisme, considérés alors comme des KE, au stress toxique pouvant affecter certains paramètres DEBtox (Garcia-Reyero, Murphy, 2017). Il serait nécessaire de réaliser des études transcriptomiques et/ou protéomiques quantitatives afin d'identifier quels gènes sont différemment exprimés lors d'une perturbation telle qu'une irradiation gamma. L'ensemble des gènes identifiés doivent être alors associés à de grandes fonctions biologiques afin de pointer le processus affecté dans le modèle DEB.

Dans le cas d'un modèle transgénérationnel, l'identification des mécanismes moléculaires à l'origine d'un phénomène d'hérédité transgénérationnelle est essentielle. Etant donné que seuls les dommages biologiques intervenant dans les gamètes seront transmis aux générations suivantes, on pourrait envisager l'intégration d'un compartiment de dommage spécifique aux gamètes. Ce compartiment de dommage pourrait permettre à terme d'intégrer la contribution respective des modifications génétiques et épigénétiques transmises au fil des générations.

Une approche DEB-AOP conférerait un pouvoir prédictif bien supérieur aux altérations moléculaires. Elle permettrait leur extrapolation aux réponses de la survie, de la croissance et de la reproduction et jusqu'aux conséquences sur la dynamique de population à l'aide de matrices de Leslie ou d'IBM (Individual-Based models) (Billoir et al., 2007 ; Lopes et al., 2005 ; Martin et al., 2013).

En outre, le caractère générique des mécanismes biologiques intégrés dans le modèle DEBtox pourrait présenter un intérêt tout particulier dans le cadre des programmes d'évaluation des risques environnementaux des radiations ionisantes. En effet, il permettrait de caractériser des effets, comparables entre les espèces, fournissant une base conceptuelle pour comprendre les différences de sensibilité et extrapoler les effets de façon plus robuste aux espèces sauvages non-testées, cibles de la protection environnementale (Adam-Guillermin et al., 2018 ; Gergs et al., 2013).

De plus, divers facteurs environnementaux, comme la nourriture, la température, la présence de compétiteurs ou de prédateurs peuvent modifier la sensibilité des organismes aux radiations ionisantes. L'identification et la prise en compte de ces facteurs dans le modèle permettraient d'obtenir des prédictions plus réalistes des conditions environnementales dans lesquelles les organismes sont exposés aux radiations ionisantes et peut-être de pallier l'écart existant dans l'intensité des effets entre les tests au laboratoire et les observations sur le terrain (Garnier-Laplace et al., 2013).



---

## VALORISATION SCIENTIFIQUE

---

### Publications scientifiques

Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K. A., & Alonzo, F. (2018). **Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna* Exposed to Chronic  $\gamma$  Irradiation.** *Environmental science & technology*, 52(7), 4331-4339.

Trijau, M., Parisot, F; Billoir, E; Adam-Guillermin, C; Poggiale, JC; Alonzo, F, **A transgenerational mechanistic model to analyze sub-lethal effects of chronic gamma irradiation in the cladoceran *Daphnia magna*, in Prep.**

### Communications orales

Trijau M., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F, **Étude à différentes échelles des mécanismes d'action toxique des radiations ionisantes chez *Daphnia magna***, Journées des thèses de l'IRSN 2016, Le Croisic, France.

Trijau M., Adam-Guillermin C., Olivier Armant, Poggiale J.-C. and Alonzo F, **Étude à différentes échelles des mécanismes d'action toxique des radiations ionisantes chez *Daphnia magna***, Journées des thèses de l'IRSN 2017, Carry-le-Rouët, France.

Trijau M., Plaire D., Parisot F., Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J., Alonzo F., **Mechanistic links between molecular alterations and transgenerational effects of depleted uranium and radionuclides in *Daphnia magna***, SETAC 2016, Nantes, France.

Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K. A., & Alonzo, F., **Transgenerational effects and epigenetic inheritance following a chronic external gamma irradiation in *Daphnia magna***, SETAC 2017, Bruxelles, Belgique.

## Communications affichées

Trijau M., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F, **Étude à différentes échelles des mécanismes d'action toxique des radiations ionisantes chez *Daphnia magna***, Journées des thèses 2015

Trijau M., Adam-Guillermin C., Poggiale J.-C. and Alonzo F, **Hérédité des effets et des profils de méthylation de l'ADN suite à une exposition chronique aux radiations gamma chez *Daphnia magna***, Congrès de l'école doctorale des sciences de l'Environnement (EDSE) 2016, Luminy, France.

Trijau M., Adam-Guillermin C., Olivier Armant, Poggiale J.-C. and Alonzo F, **Transgenerational effects of a chronic external gamma irradiation on *Daphnia magna*: epigenetic modification and inheritance**, SETAC 2016, Nantes, France.

---

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## Références Bibliographiques

## A

---

ADAM-GUILLERMIN, C., HERTAL-AAS, T., OUGHTON, D., BLANCHARD, L., ALONZO, F., ARMANT, O. et HOREMANS, N., 2018. Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. In : *Annals of the ICRP*. 10 mai 2018. p. 0146645318756844. DOI 10.1177/0146645318756844.

ADAM-GUILLERMIN, Christelle, PEREIRA, Sandrine, DELLA-VEDOVA, Claire, HINTON, Tom et GARNIER-LAPLACE, Jacqueline, 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. In : *Reviews of environmental contamination and toxicology*. S.l. : Springer. p. 67–103.

ADEMA, D. M. M., 1978. Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. In : *Hydrobiologia*. 1978. Vol. 59, n° 2, p. 125-134.

AGUILERA, Oscar, FERNÁNDEZ, Agustín F., MUÑOZ, Alberto et FRAGA, Mario F., 2010. Epigenetics and environment: a complex relationship. In : *Journal of applied physiology*. 2010. Vol. 109, n° 1, p. 243–251.

ALONZO, F., GILBIN, R., ZEMAN, F. A. et GARNIER-LAPLACE, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in Daphnia magna after chronic exposure over three successive generations. In : *Aquatic Toxicology*. 1 mai 2008. Vol. 87, n° 3, p. 146-156. DOI 10.1016/j.aquatox.2008.01.015.

ALONZO, Frédéric, ZIMMER, Elke I, PLAIRE, Delphine, BUISSET-GOUSSEN, Adeline, ADAM-GUILLERMIN, Christelle, LECOMTE-PRADINES, Catherine et HOREMANS, Nele, 2014. *STAR DELIVERABLE (D-N°5.4): Understanding the « metabolic » mode of actions of two different types of radiation using biokinetics/DEB-tox models*. 2014. S.l. : s.n.

ANANTHASUBRAMANIAM, B., MCCAULEY, E., GUST, K. A., KENNEDY, A. J., MULLER, E. B., PERKINS, E. J. et NISBET, R. M., 2015. Relating suborganismal processes to ecotoxicological and population level endpoints using a bioenergetic model. In : *Ecological Applications*. 2015. Vol. 25, n° 6, p. 1691-1710. Scopus

ANDERSON, Bertil G, 1944. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of Daphnia magna. In : *Sewage Works Journal*. 1944. p. 1156-1165.

ANDERSON, Bertil G., 1945. The Toxicity of DDT to Daphnia. In : *Science (Washington)*. 1945.

ANDERSON, Bertil G. et JENKINS, Joseph C., 1942. A time study of events in the life span of Daphnia magna. In : *The Biological Bulletin*. 1942. Vol. 83, n° 2, p. 260–272.

ANDRES, A C, MUELLENER, D B et RYFFEL, G U, 1984. Persistence, methylation and expression of vitellogenin gene derivatives after injection into fertilized eggs of Xenopus laevis.

In : *Nucleic Acids Research*. 12 mars 1984. Vol. 12, n° 5, p. 2283-2302.

ANDREWARTHA, Sarah J. et BURGGREN, Warren W., 2012. Transgenerational Variation in Metabolism and Life-History Traits Induced by Maternal Hypoxia in *Daphnia magna*. In : *Physiological and Biochemical Zoology*. 1 novembre 2012. Vol. 85, n° 6, p. 625-634. DOI 10.1086/666657.

ANKLEY GERALD T., BENNETT RICHARD S., ERICKSON RUSSELL J., HOFF DALE J., HORNUNG MICHAEL W., JOHNSON RODNEY D., MOUNT DAVID R., NICHOLS JOHN W., RUSSOM CHRISTINE L., SCHMIEDER PATRICIA K., SERRRANO JOSE A., TIETGE JOSEPH E. et VILLENEUVE DANIEL L., 2009. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9 novembre 2009. Vol. 29, n° 3, p. 730-741. DOI 10.1002/etc.34.

ANWAY, Matthew D., CUPP, Andrea S., UZUMCU, Mehmet et SKINNER, Michael K., 2005. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. In : *Science*. 3 juin 2005. Vol. 308, n° 5727, p. 1466-1469. DOI 10.1126/science.1108190.

ARZUL, Geneviève, QUINIOU, Françoise et CARRIE, Cécile, 2006. In Vitro Test-Based Comparison of Pesticide-Induced Sensitivity in Marine and Freshwater Phytoplankton. In : *Toxicology Mechanisms and Methods*. 1 janvier 2006. Vol. 16, n° 8, p. 431-437. DOI 10.1080/15376520600698717.

ASHAUER, Roman, AGATZ, Annika, ALBERT, Carlo, DUCROT, Virginie, GALIC, Nika, HENDRIKS, Jan, JAGER, Tjalling, KRETSCHMANN, Andreas, O'CONNOR, Isabel et RUBACH, Mascha Nadine, 2011. Toxicokinetic-toxicodynamic modeling of quantal and graded sublethal endpoints: A brief discussion of concepts. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011. Vol. 30, n° 11, p. 2519-2524.

ASN, 2000. *Les rejets des installations nucléaires* [en ligne]. 2000. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : [https://www.asn.fr/content/download/59413/384527/version/2/.../dossier\\_137\\_bis.pdf](https://www.asn.fr/content/download/59413/384527/version/2/.../dossier_137_bis.pdf).

ASN, 2017. *Rapport annuel 2017*. 2017. S.l. : s.n.

ASSELMAN, Jana, DE CONINCK, Dieter I. M., BEERT, Eline, JANSSEN, Colin R., ORSINI, Luisa, PFRENDER, Michael E., DECAESTECKER, Ellen et DE SCHAMPHELAERE, Karel A. C., 2017. Bisulfite Sequencing with *Daphnia* Highlights a Role for Epigenetics in Regulating Stress Response to Microcystis through Preferential Differential Methylation of Serine and Threonine Amino Acids. In : *Environmental Science & Technology*. 17 janvier 2017. Vol. 51, n° 2, p. 924-931. DOI 10.1021/acs.est.6b03870.

ASSELMAN, Jana, DE CONINCK, Dieter IM, PFRENDER, Michael E et DE SCHAMPHELAERE, Karel AC, 2016. Gene Body Methylation Patterns in *Daphnia* Are Associated with Gene Family Size. In : *Genome biology and evolution*. 2016. Vol. 8, n° 4, p. 1185-1196.

ASSELMAN, Jana, DE CONINCK, Dieter IM, VANDEGEHUCHTE, Michiel B, JANSEN, Mieke, DECAESTECKER, Ellen, DE MEESTER, Luc, VANDEN BUSSCHE, Julie, VANHAECKE, Lynn, JANSSEN, Colin R et DE SCHAMPHELAERE, Karel AC, 2015. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2015. Vol. 34, n° 5, p. 1056-1061.

AUGUSTINE, Starrlight, GAGNAIRE, Béatrice, ADAM-GUILLERMIN, Christelle et KOOIJMAN, Sebastiaan A. L. M., 2012. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. In : *Aquatic Toxicology*. 15 août 2012. Vol. 118-119, p. 9-26. DOI 10.1016/j.aquatox.2012.02.029.

## B

---

BAAS, Jan, JAGER, Tjalling et KOOIJMAN, Bas, 2010. A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures. In : *Science of The Total Environment*. 15 août 2010. Vol. 408, n° 18, p. 3740-3745. DOI 10.1016/j.scitotenv.2009.09.037.

BAKSHI, Mayur V, BARJAKTAROVIC, Zarko, AZIMZADEH, Omid, KEMPF, Stefan J, MERL, Juliane, HAUCK, Stefanie M, ERIKSSON, Per, BURATOVIC, Sonja, ATKINSON, Michael J et TAPIO, Soile, 2013. Long-term effects of acute low-dose ionizing radiation on the neonatal mouse heart: a proteomic study. In : *Radiation and Environmental Biophysics*. 2013. Vol. 52, n° 4, p. 451-461.

BARBER, M. Craig, 2003. A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003. Vol. 22, n° 9, p. 1963-1992.

BARBER, Ruth C. et DUBROVA, Yuri E., 2006. The offspring of irradiated parents, are they stable? In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2006. Vol. 598, n° 1-2, p. 50-60. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2006.01.009.

BARBER, Ruth C, HICKENBOTHAM, Peter, HATCH, T, KELLY, D, TOPCHIIY, N, ALMEIDA, Gabriela M, JONES, George DD, JOHNSON, GE, PARRY, JM et ROTHKAMM, K, 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. In : *Oncogene*. 2006. Vol. 25, n° 56, p. 7336.

BARSI ALPAR, JAGER TJALLING, COLLINET MARC, LAGADIC LAURENT et DUCROT VIRGINIE, 2014. Considerations for test design to accommodate energy-budget models in ecotoxicology: A case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2 mai 2014. Vol. 33, n° 7, p. 1466-1475. DOI 10.1002/etc.2399.

BENJAMINI, Yoav et HOCHBERG, Yosef, 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. In : *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*. 1995. p. 289-300.

BERNILLON, Pascale et BOIS, Frédéric Y., 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: a

Bayesian perspective. In : *Environmental Health Perspectives*. 2000. p. 883–893.

BIESINGER, Kenneth E. et CHRISTENSEN, Glenn M., 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. In : *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 1972. Vol. 29, n° 12, p. 1691-1700.

BILLOIR, Elise, 2008. *Modélisation dynamique et inférence bayésienne pour l'analyse de données en écotoxicologie*. S.l. : Université Claude Bernard Lyon I.

BILLOIR, Elise, DELHAYE, Hélène, CLÉMENT, Bernard, DELIGNETTE-MULLER, Marie Laure et CHARLES, Sandrine, 2011. Bayesian modelling of daphnid responses to time-varying cadmium exposure in laboratory aquatic microcosms. In : *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011. Vol. 74, n° 4, p. 693–702.

BILLOIR, Elise, DELIGNETTE-MULLER, Marie Laure, PÉRY, Alexandre RR et CHARLES, Sandrine, 2008. A Bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. In : *Environmental Science & Technology*. 2008. Vol. 42, n° 23, p. 8978-8984.

BILLOIR, Elise, DELIGNETTE-MULLER, Marie Laure, PÉRY, Alexandre RR, GEFFARD, Olivier et CHARLES, Sandrine, 2008. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. In : *Journal of theoretical biology*. 2008. Vol. 254, n° 1, p. 55-64.

BILLOIR, Elise, PÉRY, Alexandre R. R. et CHARLES, Sandrine, 2007. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. In : *Ecological Modelling*. 10 mai 2007. Vol. 203, n° 3, p. 204-214. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2006.11.021.

BIRD, Adrian, 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. In : *Genes & development*. 2002. Vol. 16, n° 1, p. 6-21.

BONASIO, Roberto, LI, Qiye, LIAN, Jinmin, MUTTI, Navdeep S., JIN, Lijun, ZHAO, Hongmei, ZHANG, Pei, WEN, Ping, XIANG, Hui, DING, Yun, JIN, Zonghui, SHEN, Steven S., WANG, Zongji, WANG, Wen, WANG, Jun, BERGER, Shelley L., LIEBIG, Jürgen, ZHANG, Guojie et REINBERG, Danny, 2012. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. In : *Current biology: CB*. 2012. Vol. 22, n° 19, p. 1755-1764. DOI 10.1016/j.cub.2012.07.042. Pmc : PMC3498763

BONTJE, D., KOOI, B. W., LIEBIG, M. et KOOIJMAN, S. A. L. M., 2009. Modelling long-term ecotoxicological effects on an algal population under dynamic nutrient stress. In : *Water Research*. 1 juillet 2009. Vol. 43, n° 13, p. 3292-3300. DOI 10.1016/j.watres.2009.04.036.

BOURRACHOT, Stéphanie, 2009. *Étude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson-zèbre (D. Rerio): impact sur les stades de vie*. PhD Thesis. S.l. : Aix-Marseille 1.

BRAUSCH, John M. et SALICE, Christopher J., 2011. Effects of an environmentally realistic pesticide mixture on *Daphnia magna* exposed for two generations. In : *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. août 2011. Vol. 61, n° 2, p. 272-279. DOI 10.1007/s00244-010-



9617-z.

BREUKELMAN, John, 1932. Effect of Age and Sex on Resistance of Daphnids to Mercuric Chloride. In : *Science*. 30 septembre 1932. Vol. 76, n° 1970, p. 302-302. DOI 10.1126/science.76.1970.302.

BRIESMEISTER, Judith F., 2000. MCNP-TM-A general Monte Carlo N-particle transport code. In : *Version 4C, LA-13709-M, Los Alamos National Laboratory*. 2000. p. 2.

BUIKEMA, A. L., GEIGER, J. G. et LEE, D. R., 1980. Daphnia toxicity tests. In : *Aquatic invertebrate bioassays*. S.l. : ASTM International.

BUISSET-GOUSSEN, Adeline, 2014. *Étude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle: le nématode Caenorhabditis elegans*. PhD Thesis. S.l. : Aix-Marseille.

BUISSET-GOUSSEN, Adeline, GOUSSEN, Benoit, DELLA-VEDOVA, Claire, GALAS, Simon, ADAM-GUILLERMIN, Christelle et LECOMTE-PRADINES, Catherine, 2014. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 2014. Vol. 137, n° 0, p. 190-197. DOI 10.1016/j.jenvrad.2014.07.014.

BURLAKOVA, E. B., GOLOSHCHAPOV, A. N., GORBUNOVA, N. V., GUREVICH, S. M., ZHIZHINA, G. P., KOZACHENKO, A. I., KONRADOV, A. A., KORMAN, D. B., MOLOCHKINA, E. M. et NAGLER, L. G., 1998. Peculiarities of biological action of low irradiation doses and their probable relation to the health state of participants of chernobyl accident liquidation. In : *Research Reactor Inst, Report. Kyoto Univ., Kumatori, Osaka (Japan)*. 1998. p. 223-234.

## C

---

CAIRNS, John, HEATH, Alan G. et PARKER, Bruce C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. In : *Hydrobiologia*. 1975. Vol. 47, n° 1, p. 135-171.

CASTRO, B. B., FRECHES, A. R., RODRIGUES, M., NUNES, B. et ANTUNES, S. C., 2018. Transgenerational Effects of Toxicants: An Extension of the <Emphasis Type=« Italic »>Daphnia</Emphasis> 21-day Chronic Assay? In : *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1 mai 2018. Vol. 74, n° 4, p. 616-626. DOI 10.1007/s00244-018-0507-0.

CEDERGREEN, Nina, NØRHAVE, Nils Jakob, SVENDSEN, Claus et SPURGEON, David J., 2016. Variable Temperature Stress in the Nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas) and Its Implications for Sensitivity to an Additional Chemical Stressor. In : *PLOS ONE*. 19 janvier 2016. Vol. 11, n° 1, p. e0140277. DOI 10.1371/journal.pone.0140277.

ÇETINKAYA, Sümeýra et GÜL DURSUN, Hatice, 2016. *Cell Life and Death Decision in Endoplasmic Reticulum Stress*. S.l. : s.n.

CHAO, Sheng-Hao et NAGOSHI, Rod N, 1999. Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of *Drosophila* egg chambers. In : *Mechanisms of Development*. 1 novembre 1999. Vol. 88, n° 2, p. 159-172. DOI 10.1016/S0925-4773(99)00183-5.

CHEN, Yi, HUANG, Jin, XING, Liqun, LIU, Hongling, GIESY, John P., YU, Hongxia et ZHANG, Xiaowei, 2014. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. In : *Environmental Science and Pollution Research International*. janvier 2014. Vol. 21, n° 1, p. 234-243. DOI 10.1007/s11356-013-1692-z.

COPPLESTONE, D., HINGSTON, J. et REAL, A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 septembre 2008. Vol. 99, n° 9, p. 1456-1463. DOI 10.1016/j.jenvrad.2008.01.006.

COPPLESTONE, David, BIELBY, S., JONES, S. R., PATTON, D., DANIEL, P. et GIZE, I., 2001. Impact Assesment of ionising Radiation on Wildlife. In : . 2001.

## D

---

DALLAS, Lorna J, KEITH-ROACH, Miranda, LYONS, Brett P et JHA, Awadhesh N, 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review. In : *Radiation Research*. 2012. Vol. 177, n° 5, p. 693-716.

DAVIS, J. C., 1977. Standardization and Protocols of Bioassays- Their Role and Significance for Monitoring, Research and Regulatory Usage. In : *Proceedings of the 3 rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Nova Scotia Nov. 2-3, 1976, Environment Canada, Tech. Report*. S.l. : s.n. 1977.

DE BRUIJN, J. et VAN LEEUWEN, K., 1996. No-effect concentrations in environmental policy. In : *The Analysis of Aquatic Toxicity Data. VU University Press, Amsterdam, The Netherlands*. 1996. p. 1-8.

DELIGNETTE-MULLER, Marie Laure, LOPES, Christelle, VEBER, Philippe et CHARLES, Sandrine, 2014. Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. In : *Environmental science & technology*. 2014. Vol. 48, n° 13, p. 7544-7551.

DENSLOW, Nancy, COLBOURNE, John, DIX, David, FREEDMAN, Jonathan, HELBING, Caren, KENNEDY, Sean et WILLIAMS, Phillip, 2007. *Selection of Surrogate Animal Species for Comparative Toxicogenomics*. S.l. : s.n. ISBN 10: 1-880611-88-0.

DEPLEDGE, M. H., 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998. Vol. 399, n° 1, p. 109-122. DOI 10.1016/S0027-5107(97)00270-4.

DESOUKY, Omar, DING, Nan et ZHOU, Guangming, 2015. Targeted and non-targeted effects

of ionizing radiation. In : *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 1 avril 2015. Vol. 8, n° 2, p. 247-254. DOI 10.1016/j.jrras.2015.03.003.

DIXIT, Rakesh, RIVIERE, Jim, KRISHNAN, Kannan et ANDERSEN, Melvin, 2003. Toxicokinetics and physiologically based toxicokinetics in toxicology and risk assessment. In : *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2003. Vol. 6, n° 1, p. 1-40.

DRUMMOND-BARBOSA, Daniela et SPRADLING, Allan C., 2001. Stem Cells and Their Progeny Respond to Nutritional Changes during *Drosophila* Oogenesis. In : *Developmental Biology*. 1 mars 2001. Vol. 231, n° 1, p. 265-278. DOI 10.1006/dbio.2000.0135.

DUBOIS, Cécile, 2017. *Approche intégrée des dommages des rayonnements ionisants chez Caenorhabditis elegans : de l'ADN aux protéines*. S.l. : Université Aix-Marseille.

DUBROVA, Yuri E, JEFFREYS, Alec J et MALASHENKO, Alexey M, 1993. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. In : *Nature genetics*. 1993. Vol. 5, n° 1, p. 92-94.

DUBROVA, Yuri E., PLUMB, Mark, GUTIERREZ, Bruno, BOULTON, Emma et JEFFREYS, Alec J., 2000. Genome stability: Transgenerational mutation by radiation. In : *Nature*. 2000. Vol. 405, n° 6782, p. 37-37. DOI 10.1038/35011135.

DUNCAN, Elizabeth J., GLUCKMAN, Peter D. et DEARDEN, Peter K., 2014. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? In : *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2014. Vol. 322, n° 4, p. 208-220. DOI 10.1002/jez.b.22571.

D'URSO, Agustina et BRICKNER, Jason H., 2014. Mechanisms of epigenetic memory. In : *Trends in genetics : TIG*. 2014. Vol. 30, n° 6, p. 230-236. DOI 10.1016/j.tig.2014.04.004.  
Pmc : PMC4072033

## E

---

EBERT, Dieter, 2005. Introduction to *Daphnia* biology. In : . 2005.

EFSA, 2016. Guidance to develop specific protection goals options for environmental risk assessment at EFSA, in relation to biodiversity and ecosystem services. In : *EFSA Journal* [en ligne]. 1 juin 2016. Vol. 14, n° 6. [Consulté le 22 mai 2018]. DOI 10.2903/j.efsa.2016.4499. Disponible à l'adresse : <https://efsa-onlinelibrary-wiley-com.lama.univ-amu.fr/doi/abs/10.2903/j.efsa.2016.4499>.

ELANGO, Navin, HUNT, Brendan G., GOODISMAN, Michael A. D. et YI, Soojin V., 2009. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 7 juillet 2009. Vol. 106, n° 27, p. 11206-11211. DOI 10.1073/pnas.0900301106.

ELLISON, Aaron M., 2004. Bayesian inference in ecology. In : *Ecology letters*. 2004. Vol. 7, n° 6,

p. 509–520.

EPA, 1982. *Environmental Effects Test Guidelines: Guidelines and Support Documents for Environmental Effects Testing - Part One* [en ligne]. 1982. S.l. : s.n. [Consulté le 20 mars 2018]. Disponible à l'adresse : <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=9100OPG6.txt>.

ERICKSON, B. H., 1978. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat. In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1 octobre 1978. Vol. 52, n° 1, p. 117-128. DOI 10.1016/0027-5107(78)90100-8.

ESCHER, Beate I et HERMENS, Joop LM, 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. In : *Environmental Science & Technology*. 2002. Vol. 36, n° 20, p. 4201-4217.

## F

---

FAULK, Christopher et DOLINOY, Dana C., 2011. Timing is everything. In : *Epigenetics*. 1 juillet 2011. Vol. 6, n° 7, p. 791-797. DOI 10.4161/epi.6.7.16209.

FENG, Hao, CONNEELY, Karen N. et WU, Hao, 2014. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. In : *Nucleic Acids Research*. 2014. Vol. 42, n° 8, p. e69-e69. DOI 10.1093/nar/gku154.

FENG, Suhua, COKUS, Shawn J, ZHANG, Xiaoyu, CHEN, Pao-Yang, BOSTICK, Magnolia, GOLL, Mary G, HETZEL, Jonathan, JAIN, Jayati, STRAUSS, Steven H et HALPERN, Marnie E, 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. Vol. 107, n° 19, p. 8689-8694.

FLORES, Kevin, WOLSCHIN, Florian, CORNEVEAUX, Jason J., ALLEN, April N., HUENTELMAN, Matthew J. et AMDAM, Gro V., 2012. Genome-wide association between DNA methylation and alternative splicing in an invertebrate. In : *BMC Genomics*. 15 septembre 2012. Vol. 13, n° 1, p. 480. DOI 10.1186/1471-2164-13-480.

FORET, Sylvain, KUCHARSKI, Robert, PITTELKOW, Yvonne, LOCKETT, Gabrielle A. et MALESZKA, Ryszard, 2009. Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. In : *BMC Genomics*. 14 octobre 2009. Vol. 10, n° 1, p. 472. DOI 10.1186/1471-2164-10-472.

FUMA, Shoichi, IHARA, Sadao, TAKAHASHI, Hiroyuki, INABA, Osamu, SATO, Youji, KUBOTA, Yoshihisa, WATANABE, Yoshito, KAWAGUCHI, Isao, AONO, Tatsuo, SOEDA, Haruhi et YOSHIDA, Satoshi, 2017. Radiocaesium contamination and dose rate estimation of terrestrial and freshwater wildlife in the exclusion zone of the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 mai 2017. Vol. 171, p. 176-188. DOI 10.1016/j.jenvrad.2017.02.013.

## G

GARCIA-REYERO, Natàlia et MURPHY, Cheryl A., 2017. *Systems Biology Approach to Advancing Adverse Outcome Pathways for Risk Assessment*. S.I. : Springer.

GARNIER-LAPLACE, J., COPPLESTONE, D., GILBIN, R., ALONZO, F., CIFFROY, P., GILEK, M., AGÜERO, A., BJÖRK, M., OUGHTON, D. H., JAWORSKA, A., LARSSON, C. M. et HINGSTON, J. L., 2008. Issues and practices in the use of effects data from FREDERICA in the ERICA Integrated Approach. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. septembre 2008. Vol. 99, n° 9, p. 1474-1483. DOI 10.1016/j.jenvrad.2008.04.012.

GARNIER-LAPLACE, J., DELLA-VEDOVA, C., ANDERSSON, P., COPPLESTONE, D., CAILES, C., BERESFORD, N. A., HOWARD, B. J., P HOWE et WHITEHOUSE, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. In : *Journal of Radiological Protection*. 2010. Vol. 30, n° 2, p. 215. DOI 10.1088/0952-4746/30/2/S02.

GARNIER-LAPLACE, J., GERAS'KIN, S., DELLA-VEDOVA, C., BEAUGELIN-SEILLER, K., HINTON, T. G., REAL, A. et OUDALOVA, A., 2013. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 juillet 2013. Vol. 121, p. 12-21. DOI 10.1016/j.jenvrad.2012.01.013.

GELMAN, Andrew et RUBIN, Donald B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. In : *Statistical science*. 1992. p. 457-472.

GERAS'KIN, S. A., FESENKO, S. V. et ALEXAKHIN, R. M., 2008. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. In : *Environment International*. 1 août 2008. Vol. 34, n° 6, p. 880-897. DOI 10.1016/j.envint.2007.12.012.

GERGS, A., ZENKER, A., GRIMM, V. et PREUSS, T. G., 2013. Chemical and natural stressors combined: From cryptic effects to population extinction. In : *Scientific Reports* [en ligne]. 2013. Vol. 3. DOI 10.1038/srep02036. Disponible à l'adresse : <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84879682688&partnerID=40&md5=1edd53e0e58abaa7a030e1a8d9b52950>. Scopus

GILBIN, Rodolphe, ALONZO, Frédéric et GARNIER-LAPLACE, Jacqueline, 2008. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 2008. Vol. 99, n° 1, p. 134-145. DOI 10.1016/j.jenvrad.2007.07.004.

GLASTAD, KM, HUNT, BG, YI, SV et GOODISMAN, MAD, 2011. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. In : *Insect Molecular Biology*. 2011. Vol. 20, n° 5, p. 553-565.

GOMBEAU, Kewin, 2015. *Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez les*

*organismes exposés à de faibles niveaux de substances radioactives*. S.l. : Université de Provence - Aix-Marseille I.

GOMES, Tânia, SONG, You, BREDE, Dag A., XIE, Li, GUTZKOW, Kristine B., SALBU, Brit et TOLLEFSEN, Knut Erik, 2018. Gamma radiation induces dose-dependent oxidative stress and transcriptional alterations in the freshwater crustacean *Daphnia magna*. In : *Science of The Total Environment*. 1 juillet 2018. Vol. 628-629, p. 206-216. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.02.039.

GONG, Bendi, CHEN, Quan, ENDLICH, Brian, MAZUMDER, Suparna et ALMASAN, Alex, 1999. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. In : *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*. 1999. Vol. 10, n° 7, p. 491-502.

GOUSSEN, Benoit, BEAUDOUIN, Rémy, DUTILLEUL, Morgan, BUISSET-GOUSSEN, Adeline, BONZOM, Jean-Marc et PÉRY, Alexandre R. R., 2015. Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans*: A case study on uranium. In : *Chemosphere*. 1 février 2015. Vol. 120, p. 507-514. DOI 10.1016/j.chemosphere.2014.09.006.

GOUSSEN, Benoit, PRICE, Oliver R., RENDAL, Cecilie et ASHAUER, Roman, 2016. Integrated presentation of ecological risk from multiple stressors. In : *Scientific Reports*. 26 octobre 2016. Vol. 6, p. 36004. DOI 10.1038/srep36004.

GRAUPNER, Anne, EIDE, Dag M., INSTANES, Christine, ANDERSEN, Jill M., BREDE, Dag A., DERTINGER, Stephen D., LIND, Ole C., BRANDT-KJELSEN, Anicke, BJERKE, Hans, SALBU, Brit, OUGHTON, Deborah, BRUNBORG, Gunnar et OLSEN, Ann K., 2016. Gamma radiation at a human relevant low dose rate is genotoxic in mice. In : *Scientific Reports*. 6 septembre 2016. Vol. 6, p. 32977. DOI 10.1038/srep32977.

GRYGORYEV, D, MOSKALENKO, O, HINTON, TG et ZIMBRICK, JD, 2013. DNA damage caused by chronic transgenerational exposure to low dose gamma radiation in Medaka fish (*Oryzias latipes*). In : *Radiation Research*. 2013. Vol. 180, n° 3, p. 235-246.

## H

---

HACKETT, Jamie A. et SURANI, M. Azim, 2013. Beyond DNA: Programming and Inheritance of Parental Methylomes. In : *Cell*. 9 mai 2013. Vol. 153, n° 4, p. 737-739. DOI 10.1016/j.cell.2013.04.044.

HALL, Eric J. et GIACCIA, Amato J., 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. S.l. : Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-0-7817-4151-4.

HARRIS, Kami DM, BARTLETT, Nicholas J et LLOYD, Vett K, 2012. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. In : *Genetics research international*. 2012. Vol. 2012.

HARRISON, F. L. et ANDERSON, S. L., 1989. Reproductive success as an indicator of genotoxicity in the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. In : *Marine Environmental*

*Research*. 1989. Vol. 28, n° 1-4, p. 313-316. Scopus

HEARD, Edith et MARTIENSSEN, Robert A., 2014. Transgenerational Epigenetic Inheritance: myths and mechanisms. In : *Cell*. 27 mars 2014. Vol. 157, n° 1, p. 95-109. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.045.

HERCEG, Zdenko et VAISSIÈRE, Thomas, 2011. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. In : *Epigenetics*. juillet 2011. Vol. 6, n° 7, p. 804-819. DOI 10.4161/epi.6.7.16262.

HERTEL-AAS, Turid, BRUNBORG, Gunnar, JAWORSKA, Alicja, SALBU, Brit et OUGHTON, Deborah Helen, 2011. Effects of different gamma exposure regimes on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). In : *Science of The Total Environment*. 2011. Vol. 412–413, n° 0, p. 138-147. DOI 10.1016/j.scitotenv.2011.09.037.

HERTEL-AAS, Turid, OUGHTON, Deborah H., JAWORSKA, Alicja, BJERKE, Hans, SALBU, Brit et BRUNBORG, Gunnar, 2007. Effects of Chronic Gamma Irradiation on Reproduction in the Earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). In : *Radiation Research*. 1 novembre 2007. Vol. 168, n° 5, p. 515-526. DOI 10.1667/rr1012.1.

HIYAMA, Atsuki, NOHARA, Chiyo, KINJO, Seira, TAIRA, Wataru, GIMA, Shinichi, TANAHARA, Akira et OTAKI, Joji M, 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. In : *Scientific Reports*. 2012. Vol. 2, p. srep00570.

HOLDEN, Patricia A., NISBET, Roger M., LENIHAN, Hunter S., MILLER, Robert J., CHERR, Gary N., SCHIMEL, Joshua P. et GARDEA-TORRESDEY, Jorge L., 2013. Ecological Nanotoxicology: Integrating Nanomaterial Hazard Considerations Across the Subcellular, Population, Community, and Ecosystems Levels. In : *Accounts of Chemical Research*. 19 mars 2013. Vol. 46, n° 3, p. 813-822. DOI 10.1021/ar300069t.

HOLLIDAY, R et PUGH, JE, 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. In : *Science*. 1975. Vol. 187, n° 4173, p. 226-232. DOI 10.1126/science.187.4173.226.

HOLM, Sture, 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. In : *Scandinavian journal of statistics*. 1979. p. 65–70.

HOWARD, B. J., BERESFORD, N. A., ANDERSSON, P., BROWN, J. E., COPPLESTONE, D., BEAUGELIN-SEILLER, K., GARNIER-LAPLACE, J., HOWE, P. D., OUGHTON, D. et WHITEHOUSE, P., 2010. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context—an overview of the PROTECT coordinated action project. In : *Journal of Radiological Protection*. 2010. Vol. 30, n° 2, p. 195. DOI 10.1088/0952-4746/30/2/S01.

HU, Qin-Hong, WENG, Jian-Qing et WANG, Jin-Sheng, 2010. Sources of anthropogenic radionuclides in the environment: a review. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 juin 2010. Vol. 101, n° 6, p. 426-437. DOI 10.1016/j.jenvrad.2008.08.004.

HUH, Iksoo, WU, Xin, PARK, Taesung et YI, Soojin V, 2017. Detecting differential DNA methylation from sequencing of bisulfite converted DNA of diverse species. In : *Briefings in Bioinformatics*. 2017.

HUNT, Clayton R., RAMNARAIN, Deepti, HORIKOSHI, Nobuo, IYENGAR, Puneeth, PANDITA, Raj K., SHAY, Jerry W. et PANDITA, Tej K., 2013. Histone Modifications and DNA Double-Strand Break Repair after Exposure to Ionizing Radiations. In : *Radiation research*. avril 2013. Vol. 179, n° 4, p. 383-392. DOI 10.1667/RR3308.2.

HUTCHINSON, Franklin, 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. In : *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1985. Vol. 32, p. 115-154.

## I

---

IAEA, 1988. *Assessing the Impact of Deep Sea Disposal of Low Level Radioactive Waste on Living Marine Resources* [en ligne]. Vienna : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Disponible à l'adresse : <http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/1391/Assessing-the-Impact-of-Deep-Sea-Disposal-of-Low-Level-Radioactive-Waste-on-Living-Marine-Resources>.

IAEA, 1992. *Effects of Ionizing Radiation on Plants and Animals at Levels Implied by Current Radiation Protection Standards* [en ligne]. Vienna : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Technical Reports Series, 332. Disponible à l'adresse : <http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/1436/Effects-of-Ionizing-Radiation-on-Plants-and-Animals-at-Levels-Implied-by-Current-Radiation-Protection-Standards>.

IAEA, 1996. One Decade after Chernobyl: Summing up the Consequences of the Accident. In : [en ligne]. 1996. [Consulté le 9 avril 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/5087/One-Decade-after-Chernobyl-Summing-up-the-Consequences-of-the-Accident>.

IAEA, 1999. *Protection of the Environment from the Effects of Ionizing Radiation: A Report for Discussion* [en ligne]. Vienna : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Disponible à l'adresse : <http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/5842/Protection-of-the-Environment-from-the-Effects-of-Ionizing-Radiation-A-Report-for-Discussion>.

ICRP, 1977. *Recommendations of the ICRP. ICRP Publication 26*. 1977. S.l. : s.n.

ICRP, 1991. *1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60*. 1991. S.l. : s.n.

ICRP, 2008. *Environmental Protection - the Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108*. 2008. S.l. : s.n.

IRSN, 2006. *Radioprotection de l'Environnement, Synthèse et perspectives*. 2006. S.l. : s.n.

IRSN, 2011a. *L'IRSN publie une évaluation de la radioactivité rejetée par la centrale de*



*Fukushima Daiichi (Fukushima I) jusqu'au 22 mars 2011* [en ligne]. 2011. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : [http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations\\_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/crise-2011/impact-japon/Documents/IRSN\\_NI-Evaluation-radioactivite-rejets\\_22032011.pdf](http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/crise-2011/impact-japon/Documents/IRSN_NI-Evaluation-radioactivite-rejets_22032011.pdf).

IRSN, 2011b. *Synthèse actualisée des connaissances relatives à l'impact sur le milieu marin des rejets radioactifs du site nucléaire accidenté de Fukushima Dai-ichi* [en ligne]. 2011. S.l. : s.n. [Consulté le 24 octobre 2018]. Disponible à l'adresse : [http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations\\_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/crise-2011/impact-japon/Documents/IRSN-NI-Impact\\_accident\\_Fukushima\\_sur\\_milieu\\_marin\\_26102011.pdf](http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/crise-2011/impact-japon/Documents/IRSN-NI-Impact_accident_Fukushima_sur_milieu_marin_26102011.pdf).

IRSN, 2014. Les sources de radioactivité artificielle. In : [en ligne]. 2014. [Consulté le 16 mai 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Environnement/radioactivite-environnement/sources-radioactivite/Pages/4-sources-radioactivite-artificielle.aspx#.WvxUJpcuBPY>.

IRSN, 2016. *Radioprotection de l'Environnement*. 2016. S.l. : s.n.

## J

---

JABLONKA, E. V. A. et LAMB, Marion J., 2002. The Changing Concept of Epigenetics. In : *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. Vol. 981, n° 1, p. 82-96. DOI 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04913.x.

JABLONKA, Eva et RAZ, Gal, 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. In : *The Quarterly review of biology*. 2009. Vol. 84, n° 2, p. 131-176.

JAGER, Tjalling, 2012. Making sense of chemical stress. In : *Applications of Dynamic Energy Budget Theory in Ecotoxicology and Stress Ecology (2012)* <http://www.debtox.info/book.php> (Version 9 April 2012). 2012.

JAGER, Tjalling, ALBERT, Carlo, PREUSS, Thomas G et ASHAUER, Roman, 2011. General unified threshold model of survival-a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. In : *Environmental Science & Technology*. 2011. Vol. 45, n° 7, p. 2529-2540.

JAGER, Tjalling, CROMMENTUIJN, Trudie, VAN GESTEL, Cornelis A. M. et KOIJMAN, Sebastiaan A. L. M., 2007. Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. In : *Environmental Pollution*. 1 janvier 2007. Vol. 145, n° 2, p. 452-458. DOI 10.1016/j.envpol.2006.04.028.

JAGER, Tjalling, CROMMENTUIJN, Trudie, VAN GESTEL, Cornelis AM et KOIJMAN, Sebastiaan ALM, 2004. Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. In : *Environmental science & technology*. 2004. Vol. 38, n° 10, p. 2894-2900.

JAGER, Tjalling, HEUGENS, Evelyn HW et KOUIJMAN, Sebastiaan ALM, 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. In : *Ecotoxicology*. 2006. Vol. 15, n° 3, p. 305-314.

JAGER, Tjalling et KOUIJMAN, Sebastiaan ALM, 2007. Background Document Biology-Based Methods. In : . 2007.

JAGER, Tjalling, VANDENBROUCK, Tine, BAAS, Jan, COEN, Wim M. De et KOUIJMAN, Sebastiaan A. L. M., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. In : *Ecotoxicology*. 1 février 2010. Vol. 19, n° 2, p. 351-361. DOI 10.1007/s10646-009-0417-z.

JAGER, Tjalling et ZIMMER, Elke I, 2012. Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. In : *Ecological Modelling*. 2012. Vol. 225, p. 74-81.

JARVIS, R. B et KNOWLES, J. F, 2003. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate  $\gamma$ -radiation: detection by the alkaline comet assay. In : *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 10 novembre 2003. Vol. 541, n° 1, p. 63-69. DOI 10.1016/S1383-5718(03)00182-7.

JOHNSON, L. R., PECQUERIE, L. et NISBET, R. M., 2013. Bayesian inference for bioenergetic models. In : *Ecology*. 2013. Vol. 94, n° 4, p. 882-894. DOI 10.1890/12-0650.1. Scopus

## K

---

KALINICH, John F, CATRAVAS, George N et SNYDER, Stephen L, 1989. The effect of  $\gamma$  radiation on DNA methylation. In : *Radiation Research*. 1989. Vol. 117, n° 2, p. 185-197.

KANOST, Michael R. et JIANG, Haobo, 2015. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. In : *Current Opinion in Insect Science*. 1 octobre 2015. Vol. 11, p. 47-55. DOI 10.1016/j.cois.2015.09.003.

KAYNE, Paul S., KIM, Ung-Jin, HAN, Min, MULLEN, Janet R., YOSHIZAKI, Fuminori et GRUNSTEIN, Michael, 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. In : *Cell*. 1988. Vol. 55, n° 1, p. 27-39. DOI 10.1016/0092-8674(88)90006-2.

KIM, Hyo Jeong, KOEDRITH, Preeyaporn et SEO, Young Rok, 2015. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, Daphnia model organism. In : *International journal of molecular sciences*. 2015. Vol. 16, n° 6, p. 12261-12287.

KIM, Hyun Young, YU, Seungho, JEONG, Tae-yong et KIM, Sang Don, 2014. Relationship between trans-generational effects of tetracycline on Daphnia magna at the physiological and whole organism level. In : *Environmental Pollution*. 1 août 2014. Vol. 191, p. 111-118. DOI 10.1016/j.envpol.2014.04.022.

KING, Skylar D., GRAY, Chipu F., SONG, Luhua, NECHUSHTAI, Rachel, GUMIENNY, Tina L., MITTLER, Ron et PADILLA, Pamela A., 2018. The *cisd* gene family regulates physiological germline apoptosis through *ced-13* and the canonical cell death pathway in *Caenorhabditis elegans*. In : *Cell Death & Differentiation*. 17 avril 2018. p. 1. DOI 10.1038/s41418-018-0108-5.

KLOK, Chris, DE ROOS, AndréM., MARINISSEN, Joke C. Y., BAVECO, Hans M. et MA, Wei-Chun, 1997. Assessing the effects of abiotic environmental stress on population growth in *Lumbricus rubellus* (Lubricidae, Oligochaeta). In : *Soil Biology and Biochemistry*. 1 mars 1997. Vol. 29, n° 3, p. 287-293. DOI 10.1016/S0038-0717(96)00050-8.

KNOWLES, J. F. et GREENWOOD, L. N., 1997. A comparison of the effects of long-term  $\beta$ - and  $\gamma$ -irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1997. Vol. 34, n° 1, p. 1-7. DOI 10.1016/0265-931X(96)00029-X.

KNOWLES, JF et GREENWOOD, LN, 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). In : *Marine Environmental Research*. 1994. Vol. 38, n° 3, p. 207-224.

KOOIJMAN, S. A. L. M., HANSTVEIT, A. O. et NYHOLM, N., 1996. No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. In : *Water Research*. 1 juillet 1996. Vol. 30, n° 7, p. 1625-1632. DOI 10.1016/0043-1354(96)00056-5.

KOOIJMAN, S. A. L. M. et METZ, J. A. J., 1984. On the dynamics of chemically stressed populations: The deduction of population consequences from effects on individuals. In : *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 juin 1984. Vol. 8, n° 3, p. 254-274. DOI 10.1016/0147-6513(84)90029-0.

KOOIJMAN, S.A.L.M. et BEDAUX, J. J. M., 1996. Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. In : *Water Research*. 1996. Vol. 30, n° 7, p. 1711-1723.

KOOIJMAN, Sebastiaan Adriaan Louis Maria, 2010. *Dynamic energy budget theory for metabolic organisation*. S.l. : Cambridge university press. ISBN 0-521-13191-X.

KOTURBASH, Igor, BAKER, Mike, LOREE, Jonathan, KUTANZI, Kristy, HUDSON, Darryl, POGRIBNY, Igor, SEDELNIKOVA, Olga, BONNER, William et KOVALCHUK, Olga, 2006. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. In : *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*. 2006. Vol. 66, n° 2, p. 327-330. DOI 10.1016/j.ijrobp.2006.06.012.

KOVALCHUK, Igor, ABRAMOV, Vladimir, POGRIBNY, Igor et KOVALCHUK, Olga, 2004. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. In : *Plant Physiology*. 2004. Vol. 135, n° 1, p. 357-363.

KOVALCHUK, Olga, BURKE, Paula, ARKHIPOV, Andrey, KUCHMA, Nikolaj, JAMES, S. Jill, KOVALCHUK, Igor et POGRIBNY, Igor, 2003. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl—a mechanism for radiation adaptation? In : *Mutation*

*Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003. Vol. 529, n° 1–2, p. 13-20. DOI 10.1016/S0027-5107(03)00103-9.

KOVALCHUK, Olga, BURKE, Paula, BESPLUG, Jill, SLOVACK, Mark, FILKOWSKI, Jody et POGRIBNY, Igor, 2004. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004. Vol. 548, n° 1–2, p. 75-84. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2003.12.016.

KRISHNAN, Kannan et PEYRET, Thomas, 2009. Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) Modeling in Ecotoxicology. In : *Ecotoxicology Modeling* [en ligne]. S.l. : Springer, Boston, MA. Emerging Topics in Ecotoxicology. p. 145-175. [Consulté le 12 juillet 2018]. ISBN 978-1-4419-0196-5. Disponible à l'adresse : [https://link-springer-com.lama.univ-amu.fr/chapter/10.1007/978-1-4419-0197-2\\_6](https://link-springer-com.lama.univ-amu.fr/chapter/10.1007/978-1-4419-0197-2_6).

KRUEGER, Felix et ANDREWS, Simon R, 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. In : *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27, n° 11, p. 1571-1572.

KUBOTA, Yoshiko, SHIMADA, A. et SHIMA, Akihiro, 1995. *DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (Oryzias latipes)*. S.l. : s.n.

KUCHARSKI, R., MALESZKA, J., FORET, S. et MALESZKA, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. In : *Science (New York, N.Y.)*. 28 mars 2008. Vol. 319, n° 5871, p. 1827-1830. DOI 10.1126/science.1153069.

## L

---

LADD-ACOSTA, Christine, 2015. Epigenetic Signatures as Biomarkers of Exposure. In : *Current Environmental Health Reports*. 1 juin 2015. Vol. 2, n° 2, p. 117-125. DOI 10.1007/s40572-015-0051-2.

LANDIS, Gary, SHEN, Jie et TOWER, John, 2012. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. In : *Aging (Albany NY)*. 30 novembre 2012. Vol. 4, n° 11, p. 768-789.

LECOMTE-PRADINES, Catherine, HERTEL-AAS, Turid, COUTRIS, Claire, GILBIN, Rodolphe, OUGHTON, Deborah et ALONZO, Frédéric, 2017. A dynamic energy-based model to analyze sublethal effects of chronic gamma irradiation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In : *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2017. Vol. 80, n° 16-18, p. 830–844.

LECOUTRE, Bruno, 2005. Et si vous étiez un bayésien qui s' ignore. In : *Revue Modulad*. 2005. Vol. 32, p. 92–105.

LEE, Rosalind C, FEINBAUM, Rhonda L et AMBROS, Victor, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In : *Cell*.

1993. Vol. 75, n° 5, p. 843-854.

LEE, Su-Jae, CHOI, Sun-Ah, LEE, Kang-Hyun, CHUNG, Hee-Yong, KIM, Tae-Hwan, CHO, Chul-Koo et LEE, Yun-Sil, 2001. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. In : *Cell Stress & Chaperones*. 2001. Vol. 6, n° 3, p. 273-281. Pmc : PMC434409

LEE, T. M. et ZUCKER, I., 1988. Vole infant development is influenced perinatally by maternal photoperiodic history. In : *The American Journal of Physiology*. novembre 1988. Vol. 255, n° 5 Pt 2, p. R831-838. DOI 10.1152/ajpregu.1988.255.5.R831.

LEEB, Martin et WUTZ, Anton, 2012. Establishment of epigenetic patterns in development. In : *Chromosoma*. juin 2012. Vol. 121, n° 3, p. 251-262. DOI 10.1007/s00412-012-0365-x.

LI, Heng, 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. In : *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27, n° 21, p. 2987-2993.

LI, Lei, STORY, Michael et LEGERSKI, Randy J., 2001. Cellular responses to ionizing radiation damage. In : *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*. 15 mars 2001. Vol. 49, n° 4, p. 1157-1162. DOI 10.1016/S0360-3016(00)01524-8.

LINK, William A. et BARKER, Richard J., 2009. *Bayesian Inference: With Ecological Applications*. S.l. : Academic Press. ISBN 978-0-08-088980-1.

LOPES, C., PÉRY, A. R. R., CHAUMOT, A. et CHARLES, S., 2005. Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. In : *Ecological Modelling*. 25 octobre 2005. Vol. 188, n° 1, p. 30-40. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2005.05.004.

LORCH, Yahli, LAPOINTE, Janice W et KORNBERG, Roger D, 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. In : *Cell*. 1987. Vol. 49, n° 2, p. 203-210.

LOUCAS, Bradford D., EBERLE, Richard, BAILEY, Susan M. et CORNFORTH, Michael N., 2004. Influence of Dose Rate on the Induction of Simple and Complex Chromosome Exchanges by Gamma Rays. In : *Radiation Research*. 1 octobre 2004. Vol. 162, n° 4, p. 339-349. DOI 10.1667/RR3245.

LUDWIG, Donald, 1996. Uncertainty and the Assessment of Extinction Probabilities. In : *Ecological Applications*. 1996. Vol. 6, n° 4, p. 1067-1076. DOI 10.2307/2269591.

LUKE, Garry A, RICHES, Andrew C et BRYANT, Peter E, 1997. Genomic instability in haematopoietic cells of F1 generation mice of irradiated male parents. In : *Mutagenesis*. 1997. Vol. 12, n° 3, p. 147-152.

LUNN, David J., THOMAS, Andrew, BEST, Nicky et SPIEGELHALTER, David, 2000. WinBUGS - A Bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility. In : *Statistics and Computing*. 1 octobre 2000. Vol. 10, n° 4, p. 325-337.

DOI 10.1023/A:1008929526011.

## M

---

MACKAY, D et FRASER, A, 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. In : *Environmental Pollution*. 2000. Vol. 110, n° 3, p. 375-391.

MACLEOD, D., CLARK, V. H. et BIRD, A., 1999. Absence of genome-wide changes in DNA methylation during development of the zebrafish. In : *Nature Genetics*. octobre 1999. Vol. 23, n° 2, p. 139-140. DOI 10.1038/13767.

MAIER, Patrick, HARTMANN, Linda, WENZ, Frederik et HERSKIND, Carsten, 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. In : *International Journal of Molecular Sciences* [en ligne]. 14 janvier 2016. Vol. 17, n° 1. DOI 10.3390/ijms17010102. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730344/>.

MAKI, A. W., 1979. Correlations between *Daphnia magna* and fathead minnow (*Pimephales promelas*) chronic toxicity values for several classes of test substances. In : *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 1979. Vol. 36, n° 4, p. 411-421.

MANIKKAM, Mohan, TRACEY, Rebecca, GUERRERO-BOSAGNA, Carlos et SKINNER, Michael K., 2012a. Dioxin (TCDD) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult Onset Disease and Sperm Epimutations. In : *PLOS ONE*. 26 septembre 2012. Vol. 7, n° 9, p. e46249. DOI 10.1371/journal.pone.0046249.

MANIKKAM, Mohan, TRACEY, Rebecca, GUERRERO-BOSAGNA, Carlos et SKINNER, Michael K., 2012 b. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. In : *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*. décembre 2012. Vol. 34, n° 4, p. 708-719. DOI 10.1016/j.reprotox.2012.08.010.

MANIKKAM, Mohan, TRACEY, Rebecca, GUERRERO-BOSAGNA, Carlos et SKINNER, Michael K., 2013. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. In : *PLOS ONE*. 24 janvier 2013. Vol. 8, n° 1, p. e55387. DOI 10.1371/journal.pone.0055387.

MARK, Ute et SOLBÉ, John, 1998. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database V—the relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. In : *Chemosphere*. 1998. Vol. 36, n° 1, p. 155-166.

MARTIN, Benjamin T., JAGER, Tjalling, NISBET, Roger M., PREUSS, Thomas G., HAMMERS-WIRTZ, Monika et GRIMM, Volker, 2013. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations: a generic approach based on Dynamic Energy Budget theory and individual-based modeling. In : *Ecotoxicology*. 1 avril 2013. Vol. 22, n° 3, p. 574-583.

DOI 10.1007/s10646-013-1049-x.

MARTINS, Alexandra et GUILHERMINO, Lúcia, 2018. Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. In : *Science of The Total Environment*. 1 août 2018. Vol. 631-632, p. 421-428. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.03.054.

MARTINS, J., TELES, L. Oliva et VASCONCELOS, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. In : *Environment International*. 2007. Vol. 33, n° 3, p. 414-425.

MASSARIN, Sandrine, ALONZO, Frédéric, GARCIA-SANCHEZ, Laurent, GILBIN, Rodolphe, GARNIER-LAPLACE, Jacqueline et POGGIALE, Jean-Christophe, 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. In : *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 99, n° 3, p. 309-319. DOI 10.1016/j.aquatox.2010.05.006.

MASSARIN, Sandrine, BEAUDOUIN, Remy, ZEMAN, Florence, FLORIANI, Magali, GILBIN, Rodolphe, ALONZO, Frederic et PERY, Alexandre R. R., 2011. Biology-Based Modeling To Analyze Uranium Toxicity Data on *Daphnia magna* in a Multigeneration Study. In : *Environmental Science & Technology*. 1 mai 2011. Vol. 45, n° 9, p. 4151-4158. DOI 10.1021/es104082e.

MAY, Martin et HAHN, Stefan, 2015. *Comparison of species sensitivity of Daphnia and fish in acute and chronic testing* [en ligne]. 2015. S.l. : Umwelt bundesamt. [Consulté le 21 mars 2018]. Disponible à l'adresse : [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte\\_87\\_2015\\_comparison\\_of\\_species.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_87_2015_comparison_of_species.pdf).

MÉNAGER, Marie-Thérèse, GOYFFON, Max et GARNIER-LAPLACE, Jacqueline, 2009. Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. In : *BIOFUTUR*. 2009. Vol. 295, p. 1.

MILLER, Robert J., LENIHAN, Hunter S., MULLER, Erik B., TSENG, Nancy, HANNA, Shannon K. et KELLER, Arturo A., 2010. Impacts of Metal Oxide Nanoparticles on Marine Phytoplankton. In : *Environmental Science & Technology*. 1 octobre 2010. Vol. 44, n° 19, p. 7329-7334. DOI 10.1021/es100247x.

MILLER, Robert J., MULLER, Erik B., COLE, Bryan, MARTIN, Tyronne, NISBET, Roger, BIELMYER-FRASER, Gretchen K., JARVIS, Tayler A., KELLER, Arturo A., CHERR, Gary et LENIHAN, Hunter S., 2017. Photosynthetic efficiency predicts toxic effects of metal nanomaterials in phytoplankton. In : *Aquatic Toxicology*. 1 février 2017. Vol. 183, p. 85-93. DOI 10.1016/j.aquatox.2016.12.009.

MIRBAHAI, Leda et CHIPMAN, James K., 2014. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. In : *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014. Vol. 764-765, n° 0, p. 10-17. DOI 10.1016/j.mrgentox.2013.10.003.

MIRBAHAI, Leda, WILLIAMS, Timothy D., ZHAN, Huiqing, GONG, Zhiyuan et CHIPMAN, J. Kevin, 2011. Comprehensive profiling of zebrafish hepatic proximal promoter CpG island methylation and its modification during chemical carcinogenesis. In : *BMC genomics*. 4 janvier 2011. Vol. 12, p. 3. DOI 10.1186/1471-2164-12-3.

MØLLER, Anders Pape et MOUSSEAU, Timothy A., 2011. Efficiency of bio-indicators for low-level radiation under field conditions. In : *Ecological Indicators*. 1 mars 2011. Vol. 11, n° 2, p. 424-430. DOI 10.1016/j.ecolind.2010.06.013.

MUYSSSEN, Brita T. A. et JANSSEN, Colin R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001. Vol. 20, n° 9, p. 2053-2060. DOI 10.1002/etc.5620200926.

## N

---

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999. *Evaluation of guidelines for exposures to technologically enhanced naturally occurring radioactive materials*. S.l. : National Academies Press.

NAUMANN, Einar, 1929. Grundlinien der experimentellen Planktonforschung. In : . 1929.

NEWMAN, Michael C. et STROJAN, Carl, 1998. *Risk Assessment: Logic and Measurement*. S.l. : CRC Press. ISBN 978-1-57504-048-6.

NZABARUSHIMANA, Etienne, MIOUSSE, Isabelle R, SHAO, Lijian, CHANG, Jianhui, ALLEN, Antiño R, TURNER, Jennifer, STEWART, Blair, RABER, Jacob et KOTURBASH, Igor, 2014. Long-term epigenetic effects of exposure to low doses of <sup>56</sup>Fe in the mouse lung. In : *Journal of Radiation Research*. 2014. Vol. 55, n° 4, p. 823-828.

## O

---

OECD, 1982. *OECD guideline for testing of chemicals 202* [en ligne]. 1982. S.l. : s.n. [Consulté le 20 mars 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/45376166.pdf>.

OECD, 2004. *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test* [en ligne]. 2004. S.l. : s.n. [Consulté le 12 juillet 2018]. Disponible à l'adresse : [https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test\\_9789264069947-en](https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en).

OECD, 2012. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test* [en ligne]. S.l. : OECD Publishing. Disponible à l'adresse : [/content/book/9789264185203-en](http://dx.doi.org/10.1787/9789264185203-en) <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185203-en>.

OMLIN, Martin et REICHERT, Peter, 1999. A comparison of techniques for the estimation of



model prediction uncertainty. In : *Ecological Modelling*. 1 février 1999. Vol. 115, n° 1, p. 45-59. DOI 10.1016/S0304-3800(98)00174-4.

ORSINI, Luisa, GILBERT, Donald, PODICHETI, Ram, JANSEN, Mieke, BROWN, James B, SOLARI, Omid Shams, SPANIER, Katina I, COLBOURNE, John K, RUSCH, Douglas B et DECAESTECKER, Ellen, 2017. *Daphnia magna* transcriptome by RNA-seq across 12 environmental stressors. In : *Scientific Data*. 2017. Vol. 4, p. 170006.

## P

---

PANTER, H. C., 1986. Variations in radiosensitivity during development of the frog *Limnodynastes tasmaniensis*. In : *Journal of Experimental Zoology*. 1 mai 1986. Vol. 238, n° 2, p. 193-199. DOI 10.1002/jez.1402380209.

PARISOT, Florian, 2015. *Étude mécaniste des effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha et gamma chez Daphnia magna*. S.l. : Université Aix-Marseille.

PARISOT, Florian, BOURDINEAUD, Jean-Paul, PLAIRE, Delphine, ADAM-GUILLERMIN, Christelle et ALONZO, Frédéric, 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. In : *Aquatic Toxicology*. 2015. Vol. 163, n° 0, p. 27-36. DOI 10.1016/j.aquatox.2015.03.002.

PARK, Jungsun, PENG, Zuogang, ZENG, Jia, ELANGO, Navin, PARK, Taesung, WHEELER, Dave, WERREN, John H. et YI, Soojin V., 2011. Comparative Analyses of DNA Methylation and Sequence Evolution Using Nasonia Genomes. In : *Molecular Biology and Evolution*. décembre 2011. Vol. 28, n° 12, p. 3345-3354. DOI 10.1093/molbev/msr168.

PARK, S. H., LEE, S. J., CHUNG, H. Y., KIM, T. H., CHO, C. K., YOO, S. Y. et LEE, Y. S., 2000. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. In : *Radiation Research*. mars 2000. Vol. 153, n° 3, p. 318-326.

PERERA, Frederica et HERBSTMAN, Julie, 2011. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. In : *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. avril 2011. Vol. 31, n° 3, p. 363-373. DOI 10.1016/j.reprotox.2010.12.055.

PÉRY, A. R. R., GUST, M., VOLLAT, B., MONS, R., RAMIL, M., FINK, G., TERNES, T. et GARRIC, J., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. In : *Chemosphere*. 1 septembre 2008. Vol. 73, n° 3, p. 300-304. DOI 10.1016/j.chemosphere.2008.06.029.

PÉRY, Alexandre et GARRIC, Jeanne, 2017. *Les effets écotoxicologiques: De la molécule à la population*. S.l. : ISTE Editions. ISBN 978-1-78405-275-1.

PÉRY, Alexandre R. R., DUCROT, Virginie, MONS, Raphaël et GARRIC, Jeanne, 2003. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. In : *Aquatic Toxicology*. 2003. Vol. 65, n° 3, p. 281-292.

DOI 10.1016/S0166-445X(03)00151-6.

PÉRY, Alexandre RR, FLAMMARION, Patrick, VOLLAT, Bernard, BEDAUX, Jacques JM, KOOIJMAN, Sebastiaan ALM et GARRIC, Jeanne, 2002. Using a biology-based model (DEBtox) to analyze bioassays in ecotoxicology: Opportunities and recommendations. In : *Environmental toxicology and chemistry*. 2002. Vol. 21, n° 2, p. 459-465.

PIETERS, Barry J, JAGER, Tjalling, KRAAK, Michiel HS et ADMIRAAL, Wim, 2006. Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: intrinsic versus apparent sensitivity. In : *Ecotoxicology*. 2006. Vol. 15, n° 7, p. 601-608.

PLAIRE, D., BOURDINEAUD, J. P., ALONZO, A., CAMILLERI, V., GARCIA-SANCHEZ, L., ADAM-GUILLERMIN, C. et ALONZO, F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. In : *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 2013. Vol. 158, n° 4, p. 231-243. Scopus

PLAIRE, Delphine, 2013. *Étude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de Daphnia magna exposé à l'uranium appauvri*. PhD Thesis. S.l. : Aix-Marseille.

PLUMMER, Martyn, 2003. JAGS: A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. In : . 2003.

POGRIBNY, Igor, RAICHE, Joe, SLOVACK, Mark et KOVALCHUK, Olga, 2004. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. Vol. 320, n° 4, p. 1253-1261. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.06.081.

POTOK, Magdalena E., NIX, David A., PARNELL, Timothy J. et CAIRNS, Bradley R., 2013. Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. In : *Cell*. 9 mai 2013. Vol. 153, n° 4, p. 759-772. DOI 10.1016/j.cell.2013.04.030.

PUTIRI, Emily L. et ROBERTSON, Keith D., 2011. Epigenetic mechanisms and genome stability. In : *Clinical Epigenetics*. 2011. Vol. 2, n° 2, p. 299-314. DOI 10.1007/s13148-010-0017-z. Pmc : PMC3172155

## R

---

RAFTERY, Adrian E. et LEWIS, Steven, 1992. How Many Iterations in the Gibbs Sampler? In : *In Bayesian Statistics 4*. S.l. : Oxford University Press. 1992. p. 763-773.

RAKYAN, Vardhman K., DOWN, Thomas A., BALDING, David J. et BECK, Stephan, 2011. Epigenome-Wide Association Studies for common human diseases. In : *Nature reviews. Genetics*. 12 juillet 2011. Vol. 12, n° 8, p. 529-541. DOI 10.1038/nrg3000.

RAVENZWAAIJ, Don van, CASSEY, Pete et BROWN, Scott D., 2018. A simple introduction to Markov Chain Monte-Carlo sampling. In : *Psychonomic Bulletin & Review*. 1 février 2018. Vol. 25, n° 1, p. 143-154. DOI 10.3758/s13423-016-1015-8.

REAL, A., SUNDELL-BERGMAN, S., KNOWLES, J. F., WOODHEAD, D. S. et ZINGER, I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. In : *Journal of Radiological Protection: Official Journal of the Society for Radiological Protection*. décembre 2004. Vol. 24, n° 4A, p. A123-137.

REICHERT, Peter et OMLIN, Martin, 1997. On the usefulness of overparameterized ecological models. In : *Ecological Modelling*. 14 février 1997. Vol. 95, n° 2, p. 289-299. DOI 10.1016/S0304-3800(96)00043-9.

REISZ, Julie A, BANSAL, Nidhi, QIAN, Jiang, ZHAO, Weiling et FURDUI, Cristina M, 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection. In : *Antioxidants & redox signaling*. 2014. Vol. 21, n° 2, p. 260-292.

RIGGS, Arthur D, 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. In : *Cytogenetic and Genome Research*. 1975. Vol. 14, n° 1, p. 9-25.

ROBICHAUD, Nicole F, SASSINE, Jeanette, BEATON, Margaret J et LLOYD, Vett K, 2012. The epigenetic repertoire of *Daphnia magna* includes modified histones. In : *Genetics research international*. 2012. Vol. 2012.

ROHR, Jason R, SALICE, Christopher J et NISBET, Roger M, 2016. The pros and cons of ecological risk assessment based on data from different levels of biological organization. In : *Critical reviews in toxicology*. 2016. Vol. 46, n° 9, p. 756-784.

RÖNNBÄCK, C., 1967. Effect on Fertility of Continuous Gamma-Irradiation During the Suckling Period in Mice. In : *Acta Radiologica: Diagnosis*. 1 janvier 1967. Vol. 6, n° 1, p. 53-60. DOI 10.3109/02841856709138563.

RÖNNBÄCK, C., 1983. Effects on Foetal Ovaries after Protracted, External Gamma Irradiation as Compared with Those from Internal Depositions. In : *Acta Radiologica: Oncology*. 1 janvier 1983. Vol. 22, n° 6, p. 465-471. DOI 10.3109/02841868309135972.

ROSE, K. S. B., 1991. Lower limits of radiosensitivity in organisms, excluding man. In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 janvier 1991. Vol. 15, n° 2, p. 113-133. DOI 10.1016/0265-931X(91)90047-J.

RUSSO, Vincenzo EA, MARTIENSSEN, Robert A et RIGGS, Arthur D, 1996. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. S.l. : Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-490-4.

## S

---

SAGAWA, Kazunori, YAMAGATA, Hideo et SHIGA, Yasuhiro, 2005. Exploring embryonic

germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. In : *Gene Expression Patterns*. 2005. Vol. 5, n° 5, p. 669-678. DOI 10.1016/j.modgep.2005.02.007.

SAKAMOTO-HOJO, Elza T., MELLO, Stephano S., PEREIRA, Elayne, FACHIN, Ana L., CARDOSO, Renato S., JUNTA, Cristina Moraes, SANDRIN-GARCIA, Paula, DONADI, Eduardo A. et PASSOS, Geraldo A. S., 2003. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. In : *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2003. Vol. 544, n° 2-3, p. 403-413. DOI 10.1016/j.mrrev.2003.07.004.

SARANTSEVA, S. V. et KHROMYKH, Yu M., 2001. Effects of Gamma-Radiation in Oogenesis of *Drosophila* Mutants Defective for Repair and Meiotic Recombination. In : *Russian Journal of Genetics*. 1 juin 2001. Vol. 37, n° 6, p. 631-638. DOI 10.1023/A:1016669123397.

SCHÜBELER, Dirk, 2015. Function and information content of DNA methylation. In : *Nature*. 2015. Vol. 517, n° 7534, p. 321-326.

SEISENBERGER, Stefanie, PEAT, Julian R., HORE, Timothy A., SANTOS, Fátima, DEAN, Wendy et REIK, Wolf, 2013. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [en ligne]. 5 janvier 2013. Vol. 368, n° 1609. DOI 10.1098/rstb.2011.0330. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539359/>.

SHAW, Joseph R., PFRENDER, Michael E., EADS, Brian D., KLAPER, Rebecca, CALLAGHAN, Amanda, SIBLY, Richard M., COLSON, Isabelle, JANSEN, Bastiaan, GILBERT, Donald et COLBOURNE, John K., 2008. *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. In : *Advances in Experimental Biology*. 2008. Vol. 2, p. 165-328.

SHIMADA, Atsuko et SHIMA, Akihiro, 2004. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. In : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004. Vol. 552, n° 1, p. 119-124.

SKINNER, Michael K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. In : *Reproductive Toxicology*. 2008. Vol. 25, n° 1, p. 2-6. DOI 10.1016/j.reprotox.2007.09.001.

SKINNER, Michael K., 2011. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. In : *Epigenetics*. juillet 2011. Vol. 6, n° 7, p. 838-842.

SONG, Kai, LI, Li et ZHANG, Guofan, 2017. The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In : *PLOS ONE*. 25 septembre 2017. Vol. 12, n° 9, p. e0185224. DOI 10.1371/journal.pone.0185224.

SPARROW, A. H., ROGERS, Anne F. et SCHWEMMER, Susan S., 1968. Radiosensitivity studies with woody plants — I acute gamma irradiation survival data for 28 species and predictions for 190 species. In : *Radiation Botany*. 1 janvier 1968. Vol. 8, n° 2, p. 149-174. DOI 10.1016/S0033-7560(68)80071-7.

SPIEGELHALTER, David J., BEST, Nicola G., CARLIN, Bradley P. et VAN DER LINDE, Angelika, 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. In : *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 2002. Vol. 64, n° 4, p. 583–639.

SPIEGELHALTER, David, THOMAS, Andrew, BEST, Nicky et LUNN, Dave, 2003. *WinBUGS user manual*. S.l. : version.

STANCHEVA, I. et MEEHAN, R. R., 2000. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. In : *Genes & Development*. 1 février 2000. Vol. 14, n° 3, p. 313-327.

SUZUKI, Miho et BIRD, Adrian, 2008. *Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet 9: 465-476*. S.l. : s.n.

SUZUKI, Miho M. et BIRD, Adrian, 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. In : *Nature Reviews. Genetics*. juin 2008. Vol. 9, n° 6, p. 465-476. DOI 10.1038/nrg2341.

SUZUKI, Miho M, KERR, Alastair RW, DE SOUSA, Dina et BIRD, Adrian, 2007. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. In : *Genome research*. 2007. Vol. 17, n° 5, p. 625-631.

SWAIN, Suresh, WREN, Jodie F., STÜRZENBAUM, Stephen R., KILLE, Peter, MORGAN, A. John, JAGER, Tjalling, JONKER, Martijs J., HANKARD, Peter K., SVENDSEN, Claus, OWEN, Jenifer, HEDLEY, B. Ann, BLAXTER, Mark et SPURGEON, David J., 2010. Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. In : *BMC Systems Biology*. 23 mars 2010. Vol. 4, p. 32. DOI 10.1186/1752-0509-4-32.

## T

---

TAIRA, Wataru, HIYAMA, Atsuki, NOHARA, Chiyo, SAKAUCHI, Ko et OTAKI, Joji M., 2015. Ingestional and transgenerational effects of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. In : *Journal of Radiation Research*. décembre 2015. Vol. 56, n° Suppl 1, p. i2-i18. DOI 10.1093/jrr/rrv068.

TATUSOV, Roman L., FEDOROVA, Natalie D., JACKSON, John D., JACOBS, Aviva R., KIRYUTIN, Boris, KOONIN, Eugene V., KRYLOV, Dmitri M., MAZUMDER, Raja, MEKHEDOV, Sergei L., NIKOLSKAYA, Anastasia N., RAO, B. Sridhar, SMIRNOV, Sergei, SVERDLOV, Alexander V., VASUDEVAN, Sona, WOLF, Yuri I., YIN, Jodie J. et NATALE, Darren A., 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. In : *BMC Bioinformatics*. 2003. Vol. 4, p. 41-41. DOI 10.1186/1471-2105-4-41. Pmc : PMC222959

TAWA, Riichi, KIMURA, Yutaka, KOMURA, Jun-Ichiro, MIYAMURA, Yoshinori, KURISHITA, Akihiro, SASAKI, Masao S., SAKURAI, Hiromu et ONO, Tetsuya, 1998. Effects of X-ray Irradiation on Genomic DNA Methylation Levels in Mouse Tissues. In : *Journal of Radiation Research*. 1 décembre 1998. Vol. 39, n° 4, p. 271-278. DOI 10.1269/jrr.39.271.

THOMPSON, Paul M., 1988. Environmental monitoring for radionuclides in marine ecosystems; Are species other than man protected adequately? In : *Journal of Environmental Radioactivity*. 1 janvier 1988. Vol. 7, n° 3, p. 275-283. DOI 10.1016/0265-931X(88)90033-1.

TUBIANA, M., ARENGO, A., AVERBECK, D. et MASSE, R., 2007. Letters to the Editor Low-Dose Risk Assessment: Comments on the Summary of the International Workshop. In : *Radiation Research*. 2007. Vol. 167, n° 6, p. 742-744.

## U

---

UNITED NATIONS, 1992a. *United Nations Conference on Environment and Development, Rio, Convention on Biological Diversity*. 1992. S.l. : s.n.

UNITED NATIONS, 1992b. *United Nations Conference on Environment and Development, Rio, Declaration on Environment and Development*. 1992. S.l. : s.n.

UNSCEAR, 1996. *Sources and effects of ionizing radiation- ANNEX Effects of radiation on the environment*. 1996. S.l. : s.n.

UNSCEAR, 2000. *Sources and effects of ionizing radiation: sources*. S.l. : United Nations Publications.

UNSCEAR, 2006. *Effects of Ionizing Radiation- Volume II*. S.l. : United Nations Publications. ISBN 978-92-1-142270-2.

## V

---

VANDEGEHUCHTE, M. B. et JANSSEN, C. R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. In : *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014. Vol. 764-765, p. 36-45. Scopus

VANDEGEHUCHTE, M. B., LEMIÈRE, F. et JANSSEN, C. R., 2009. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2009. Vol. 150, n° 3, p. 343-348. DOI 10.1016/j.cbpc.2009.05.014.

VANDEGEHUCHTE, Michiel B., LEMIÈRE, Filip, VANHAECKE, Lynn, VANDEN BERGHE, Wim et JANSSEN, Colin R., 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2010. Vol. 151, n° 3, p. 278-285. DOI 10.1016/j.cbpc.2009.11.007.

VILENCHIK, Michael M. et KNUDSON, Alfred G., 2006. Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 novembre 2006. Vol. 103, n° 47, p. 17874-17879. DOI 10.1073/pnas.0607995103.

## W

---

WADDINGTON, Conrad Hal, 1947. *Organisers and genes*. S.l. : University Press; Cambridge.

WADDINGTON, Conrad Hal, 1956. Genetic assimilation of the bithorax phenotype. In : *Evolution*. 1956. Vol. 10, n° 1, p. 1-13.

WADDINGTON, Conrad Hal, 2014. *The strategy of the genes*. S.l. : Routledge. ISBN 1-317-65755-1.

WANG, Xiaotong, LI, Qiye, LIAN, Jinmin, LI, Li, JIN, Lijun, CAI, Huimin, XU, Fei, QI, Haigang, ZHANG, Linlin, WU, Fucun, MENG, Jie, QUE, Huayong, FANG, Xiaodong, GUO, Ximing et ZHANG, Guofan, 2014. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. In : *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, n° 1, p. 1119. DOI 10.1186/1471-2164-15-1119.

WARD, Timothy J. et ROBINSON, William E., 2009. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009. Vol. 24, n° 9, p. 2341-2349. DOI 10.1897/04-429R.1.

WINNER, Robert W. et FARRELL, Michael P., 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. In : *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 1976. Vol. 33, n° 8, p. 1685-1691.

WON, Eun-Ji, DAHMS, Hans-U., KUMAR, K. Suresh, SHIN, Kyung-Hoon et LEE, Jae-Seong, 2015. An integrated view of gamma radiation effects on marine fauna: from molecules to ecosystems. In : *Environmental Science and Pollution Research*. 1 novembre 2015. Vol. 22, n° 22, p. 17443-17452. DOI 10.1007/s11356-014-3797-4.

WU, Hao, XU, Tianlei, FENG, Hao, CHEN, Li, LI, Ben, YAO, Bing, QIN, Zhaohui, JIN, Peng et CONNEELY, Karen N, 2015. Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. In : *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, n° 21, p. e141-e141.

## Y

---

YATES, James W. T., 2006. Structural Identifiability of Physiologically Based Pharmacokinetic Models. In : *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 1 août 2006. Vol. 33, n° 4, p. 421-439. DOI 10.1007/s10928-006-9011-7.

YOUNGSON, Neil A et WHITELOW, Emma, 2008. Transgenerational epigenetic effects. In : *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2008. Vol. 9, p. 233-257.

## Z

---

ZAICHKINA, S. I., ROZANOVA, O. M., APTIKAEVA, G. F., ACHMADIEVA, A. Ch. et KLOKOV, D. Y., 2004. Low Doses of Gamma-Radiation Induce Nonlinear Dose Responses in Mammalian and Plant Cells. In : *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine*. 1 juillet 2004. Vol. 2, n° 3, p. 15401420490519860. DOI 10.1080/15401420490519861.

ZEMACH, Assaf, MCDANIEL, Ivy E., SILVA, Pedro et ZILBERMAN, Daniel, 2010. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. In : *Science*. 2010. Vol. 328, n° 5980, p. 916-919. DOI 10.1126/science.1186366.

ZHANG, Bo, WANG, Yan, PANG, Xueli, SU, Yongping, AI, Guoping et WANG, Tao, 2010. ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. In : *International journal of radiation biology*. 1 juin 2010. Vol. 86, n° 6, p. 429-435. DOI 10.3109/09553001003668014.

ZHOU, Ping-Kun et RIGAUD, Odile, 2001. Down-Regulation of the Human CDC16 Gene after Exposure to Ionizing Radiation: A Possible Role in the Radioadaptive Response. In : *Radiation Research*. 2001. Vol. 155, n° 1, p. 43-49.



---

## **ANNEXES**

---



## Annexe 1. Préparation du milieu d'élevage M4

Le milieu d'élevage M4 à pH8 pour les daphnies est préparé à partir de la solution mère I, de divers sels préalablement mélangés à de l'eau UHQ et à une solution mère de vitamines (Tableau 27). La composition de la solution mère I se trouve en Tableau 28 et celle de la solution mère de vitamines en Tableau 29.

**Tableau 27. Composition de la solution M4 à pH8**

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

**Tableau 28. Composition de la solution mère I**

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

\* les solutions Na<sub>2</sub>EDTA et FeSO<sub>4</sub> sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises à l'étuve à 120 °C pendant 30 min, donnant le Fe-EDTA

**Tableau 29. Composition de la solution mère de vitamines**

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

## Annexe 2. Préparation du milieu de culture des algues

Les micro-algues *Chlamydomonas reinhardtii* sont cultivées dans le milieu HSM (High Salt Medium) dont la composition est décrite au Tableau 30.

**Tableau 30. Composition des solutions stock utilisées pour la préparation du milieu HSM**

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



### **Annexe 3. Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit DNeasy blood & tissu de QIAGEN**

- Eppendorf 1,5 mL autoclavés.
- Pointes autoclavés (200 et 1000  $\mu$ L).
- Potter autoclavés.
- Kit QIAGEN DNeasy blood & tissu.
- RNase A (100 mg/mL)
- Portoirs.
- H<sub>2</sub>O stérile.
- Ethanol 100%.
- PBS filtré conservé à 4 °C
- Boîte de stockage à -20 °C.
- Etuve.

#### **Protocole :**

- Sortir les daphnies une à une du congélateur où elles sont stockées, réchauffer rapidement l'Eppendorf à la main, ajouter quelques gouttes de PBS et verser le contenu dans une grosse boîte de petri contenant du PBS filtré à 4 °C.
- Sous une loupe binoculaire, retirer délicatement les œufs/neonates de la poche incubatrice de la daphnie.
- Se munir d'Eppendorf 1,5 mL déjà autoclavés.  
Annoter les Eppendorf en double série (première série pour l'étape de broyage et seconde série pour l'étape de lecture et de stockage à -20 °C).
- Placer les daphnies adultes complètement séchées à l'aide d'une pince dans un tube Eppendorf en fonction de la condition concerné.
- Ajouter dans chaque tube Eppendorf 180  $\mu$ L de Buffer ATL, 20  $\mu$ L de protéinase K et 4  $\mu$ L de RNase A.
- Ecraser le plus efficacement possible les daphnies adultes avec un premier Potter en essuyant bien le bord du Potter sur les parois du tube Eppendorf afin de ne pas laisser de matériel génétique dessus. Rincer le potter à l'eau stérile entre chaque condition adulte.
- Ecraser le plus efficacement possible les néonates avec un autre potter en essuyant également bien le bord du potter sur les parois du tube Eppendorf afin de ne pas laisser de

matériel génétique dessus. Rincer le Potter à l'eau stérile entre chaque condition « néonates. Mixer chaque condition au vortex pendant 10 sec. Placer les échantillons à 56 °C toute une nuit.

- Annoter les DNeasy mini Spin-Column du Kit QUIAGEN correspondant aux Eppendorf. Et allumer le spectrophotomètre pour qu'il chauffe.
  
- Sortir les Eppendorf de l'étuve et vortexer chacun d'eux pendant 15 sec.  
Ajouter 200 µL de Buffer AL. Vortexer 15 sec.  
Ajouter 200 µL d'éthanol à 100%. Vortexer 15 sec.
  
- Pipetter l'intégralité du tube Eppendorf y compris le quelconque surnageant.  
Transférer le tout dans un Dneasy mini Spin-Column.  
Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.  
Jeter l'effluent du tube collecteur.
  
- Prendre un nouveau tube collecteur.  
Ajouter 500 µL de Buffer AW1. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.  
Jeter l'effluent du tube collecteur.
  
- Prendre un nouveau tube collecteur.  
Ajouter 500 µL de Buffer AW2. Centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.  
Jeter l'effluent du tube collecteur.
  
- Placer le DNeasy mini Spin-Column dans un nouvel Eppendorf de 1,5 mL annoté et autoclavé. Et ajouter 75 µL de Buffer AE directement sur la membrane du mini Spin. On ajoute seulement 75 µL de tampon d'éluion pour concentrer encore plus l'ADN. Jeter la pointe de pipette à chaque fois.  
Incuber à température ambiante pendant 1 minute et centrifuger pendant 1 minute à 8000 rpm pour éluer.
  
- Mesurer les concentrations d'ADN avec Qubit et Nanodrop.



## Annexe 4. Caractéristiques et qualité des lectures (reads) générées par le séquençage bisulfite.

Tableau 31. Caractéristiques des lectures « en paire » (paired-end reads) de 100 paires de base de longueur générées par le séquençage bisulfite. Le nombre total de séquences est indiqué pour les reads 1 (R1) et les reads 2 (R2). Le pourcentage de lecture avec un score Phred (Q) supérieur à 30 est précisé.

Sample	R1	% Q >30	R2	% Q >30
F0 Control	41648229	99.51	41648229	99.08
F0 41.3 mGy/h	41461900	99.70	41461900	98.99
F0 6.5 µGy/h	40363651	99.73	40363651	98.67
F2 Control	40532764	99.69	40532764	98.83
F2 41.3 mGy/h	40506906	99.70	40506906	99.29
F2 6.5µGy/h	41619455	99.70	41619455	99.00
F3 Control	41452884	99.68	41452884	98.22
F3 41.3mGy/h	40453096	99.59	40453096	98.79
F3 6.5µGy/h	40489007	99.86	40489007	99.16



## Annexe 5. Modification de la fonction call\_DMR

```
new_callDMR <- function(DMLresult, p.threshold=1e-5,
                        minlen=50, minCG=3, dis.merge=100, pct.sig=0.5) {
  ## remove the NA entries
  ix.keep = !is.na(DMLresult$stat)
  if(mean(ix.keep) < 1) ## with NA entries in the results
    DMLresult = DMLresult[ix.keep,]

  if(dis.merge > minlen)
    dis.merge = minlen

  scores <- DMLresult$fdr

  ## bump finding
  dmrs <- findBumps(DMLresult$chr, DMLresult$pos, scores,
                  cutoff=p.threshold, sep=5000, dis.merge=dis.merge,
                  pct.sig=pct.sig, minCG=minCG)

  ## compute average methylation levels in two groups
  if(is.null(dmrs)) {
    warning("No DMR found! Please use less stringent criteria. \n")
    return(NULL)
  }

  ## Looping seems to be very slow.
  nCG <- dmrs[,"idx.end.global"] - dmrs[,"idx.start.global"] + 1
  ix.good <- dmrs$length>minlen & nCG>minCG
  if(sum(ix.good) == 0) {
```

```

warning("No DMR found! Please use less stringent criteria. \n")
return(NULL)
}
dmrs <- dmrs[ix.good,]
nCG <- dmrs[, "idx.end.global"] - dmrs[, "idx.start.global"] + 1

## create final result data frame

areaStat = rep(0, nrow(dmrs))
for(i in 1:nrow(dmrs)) { ## this part is kind of slow when number of DMRs is large
  ii=dmrs[i, "idx.start.global"]:dmrs[i, "idx.end.global"]
  areaStat[i] = sum(DMLresult[ii, "stat"])
}
result <- data.frame(dmrs[,1:4], nCG=nCG, areaStat=areaStat)

## single factor
meanMethy1 = meanMethy2 = areaStat = rep(0, nrow(dmrs))
for(i in 1:nrow(dmrs)) { ## this part is kind of slow when number of DMRs is large
  ii=dmrs[i, "idx.start.global"]:dmrs[i, "idx.end.global"]
  meanMethy1[i] = mean(DMLresult[ii, "mu1"])
  meanMethy2[i] = mean(DMLresult[ii, "mu2"])
  areaStat[i] = sum(DMLresult[ii, "stat"])

result <- data.frame(dmrs[,1:4], nCG=nCG, meanMethy1, meanMethy2,
                    diff.Methy=meanMethy1-meanMethy2, areaStat=areaStat)
}

## sort by areaStat

```

```
ix = sort(abs(result$areaStat), decreasing=TRUE, index.return=TRUE)$ix
result[ix,]
}
```



## Annexe 6. Liste des gènes comportant des DMC

Liste des gènes comportant des DMC dans la génération F0 (Tableau 32), dans la génération F2 et F3 séparément (Tableau 33, Tableau 34) et en commun entre les générations F2 et F3 (Tableau 35).

**Tableau 32. Liste de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la génération F0**

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC	
			F0	
			41,3	0,0065
Dapma7bEVm009609t1	Neutral alpha-glucosidase AB	M,O ,G	/	2
Dapma7bEVm000337t1	Uncharacterized protein	O	2	/
Dapma7bEVm002026t1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	O	2	/
Dapma7bEVm004047t1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2, putative	O	/	5
Dapma7bEVm010085t1	Tribolium castaneum heat shock-like protein	O	2	/
Dapma7bEVm003591t1	Anaphase-promoting complex subunit Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14	O,D T	2	2
Dapma7bEVm000386t1		T	2	/
Dapma7bEVm001767t1	Serine/threonine-protein kinase TBK1	T	/	1
Dapma7bEVm003294t1	Uncharacterized protein	T	2	/
Dapma7bEVm004841t1	Inositol monophosphatase 3	T	/	2
Dapma7bEVm004863t1	Defective proboscis extension response	T	/	2
Dapma7bEVm002647t1	Uncharacterized protein	T,R	/	2
Dapma7bEVm002092t1	Uncharacterized protein	T,V	/	1
Dapma7bEVm000381t1	Alpha-N-acetylglucosaminidase	U	/	2
Dapma7bEVm005656t1	F-actin-capping protein subunit beta	Z	1	/
Dapma7bEVm005785t1	Uncharacterized protein	Z	/	2
Dapma7bEVm016225t1	Tubulin alpha-1 chain	Z	1	/
Dapma7bEVm003101t1	ATP-dependent RNA Helicase DHX35, putative	A	3	/
Dapma7bEVm003243t1	ATP-dependent RNA Helicase DDX49	A	2	/
Dapma7bEVm004653t1	WD repeat-containing protein 46	A	/	1
Dapma7bEVm011631t1	Splicing factor U2af 50 kDa subunit	A	/	1
Dapma7bEVm023212t1	Ribosomal RNA methyltransferase NOP2, putative	A	/	1
Dapma7bEVm004537t1	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1, putative	B	/	2
Dapma7bEVm006374t1	Methyl-CpG-binding domain protein 3	B,K	/	2
Dapma7bEVm022612t1	Structural maintenance of chromosomes protein 5, putative	B,L, D	/	2
Dapma7bEVm010143t1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	J	/	1
Dapma7bEVm643582t1	60S ribosomal protein L15	J	2	2
Dapma7bEVm002724t1	Dolichyl pyrophosphate Glc1Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase	K	/	1

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC	
			F0	
			41,3	0,0065
Dapma7bEVm004850t1	Protein transferase	K	/	4
Dapma7bEVm006986t1	Uncharacterized protein	K	/	2
Dapma7bEVm007629t1	X-box-binding protein, putative	K	2	2
Dapma7bEVm008775t1	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II Polypeptide A small phosphatase 1	K	/	1
ID=Dapma1EVg026582t1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 protein	K	1	/
Dapma7bEVm004210t1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	C	/	1
Dapma7bEVm006045t1	Kidney mitochondrial carrier protein 1	C	/	2
Dapma7bEVm006616t1	SCO1 , protein	C	2	/
Dapma7bEVm001707t1	Wings apart, protein	D	1	/
Dapma7bEVm010604t1	RFT1 , protein	D	/	1
Dapma7bEVm012298t1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B	D	2	
Dapma7bEVm002237t1	Xaa-Pro aminopeptidase 1	E	/	/
Dapma7bEVm002668t1	Low affinity cationic amino acid transporter 2, putative	E	/	1
Dapma7bEVm005724t1	Clip-domain serine protease	E	1	/
Dapma7bEVm008087t1	Diamine acetyltransferase 2	E	1	/
Dapma7bEVm006210t1	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'- phosphosulfate synthase	F	/	2
Dapma7bEVm003512t1	Phosphorylase B kinase regulatory subunit beta	G	/	2
Dapma7bEVm003639t1	Malonyl-CoA decarboxylase, putative	G	/	1
Dapma7bEVm005882t1	FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein	G	2	/
Dapma7bEVm006480t1	Phosphoglucomutase-2	G	2	/
Dapma7bEVm010687t1	Lysosomal alpha-glucosidase	G	5	4
Dapma7bEVm005929t1	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase	I	1	
Dapma7bEVm018509t1	Sodium-independent sulfate anion transporter, putative	P	2	2
Dapma7bEVm003078t1	Uncharacterized protein	P,R	/	1
Dapma7bEVm000138t1	Zinc finger protein ccch domain-containing protein, putative	R	2	/
Dapma7bEVm001116t1	Sequestosome-1, putative	R	/	2
Dapma7bEVm001409t1	RNA-binding protein 10	R	/	2
Dapma7bEVm002377t1	Leucine-rich repeat-containing protein	R	2	/
Dapma7bEVm003123t1	Glycerophosphocholine phosphodiesterase GPCPD1	R	2	/
Dapma7bEVm003654t1	U3 small nucleolar RNA-associated protein WD repeat protein l2k07824, putative	R	2	/
Dapma7bEVm004207t1	Uncharacterized protein	R	/	3
Dapma7bEVm005235t1	Arrestin domain-containing protein 3	R	/	2
Dapma7bEVm005590t1	Zinc finger 674/sw-like protein	R	2	/



Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC	
			F0	
			41,3	0,0065
Dapma7bEVm005713t1	Uncharacterized protein	R	1	/
Dapma7bEVm005782t1	PR domain zinc finger 4/sw-like protein	R	/	1
Dapma7bEVm009812t1	Myotubularin-related protein 10-B	R	2	2
Dapma7bEVm009887t1	Dymeclin	R	/	1
Dapma7bEVm011423t1	Uncharacterized protein	R	/	1
Dapma7bEVm000893t1	Uncharacterized protein	S	/	2
Dapma7bEVm001194t1	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2 A	S	1	/
Dapma7bEVm003237t1	Uncharacterized protein	S	1	/
Dapma7bEVm008465t1	COX assembly mitochondrial protein	S	/	2
Dapma7bEVm010031t1	Otopettrin-3	S	1	3
Dapma7bEVm030722t1	UPF0595 protein	S	/	4
Dapma7bEVm000180t1	AMP deaminase 2, putative	NA	1	/
Dapma7bEVm001776t1	ATP-dependent Zinc metalloprotease YME1	NA	3	/
Dapma7bEVm002869t1	40S ribosomal protein S6	NA	3	/
Dapma7bEVm003138t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
Dapma7bEVm003802t1	Uncharacterized protein	NA	/	1
Dapma7bEVm003939t1	Uncharacterized protein	NA	/	1
Dapma7bEVm005203t1	DDI1 2, protein, putative	NA	5	/
Dapma7bEVm006332t1	Uncharacterized protein	NA	2	/
Dapma7bEVm006611t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
Dapma7bEVm006847t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
Dapma7bEVm007112t1	Uncharacterized protein	NA	/	2
Dapma7bEVm007840t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
	Multidrug resistance-associated protein		/	
Dapma7bEVm009449t1	lethal03659	NA	/	2
Dapma7bEVm010093t1	Uncharacterized protein	NA	2	/
Dapma7bEVm010219t1	Constitutive coactivator of PPAR-gamma protein 1	NA	1	/
Dapma7bEVm010269t1	Uncharacterized protein	NA	2	/
Dapma7bEVm010406t1	Spindle D, putative	NA	4	/
Dapma7bEVm028767t1	Uncharacterized protein	NA	/	1
Dapma7bEVm030068t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
Dapma7bEVm030427t1	Uncharacterized protein	NA	/	1
Dapma7bEVm630104t1	Uncharacterized protein	NA	1	/
ID=Dapma1EVg016703t1	Uncharacterized protein	NA	2	/
ID=Dapma1EVg029257t1	Uncharacterized protein	NA	1	/

**Tableau 33.** Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la génération F2, mis à part pour les DMC en commun entre les générations F2 et F3.

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC F2	
			0,0065	41,3
Dapma7bEVm002391t1	RMD5 A, protein	O	0	2
Dapma7bEVm004748t1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SDCCAG10	O	2	0
Dapma7bEVm005097t1	Fidgetin protein 1	O	1	0
Dapma7bEVm005166t1	Ariadne-2, protein	O	0	1
Dapma7bEVm005834t1	Ubiquitin conjugation factor E4 A	O	0	2
Dapma7bEVm007660t1	STIP1 Y and U box-containing protein 1	O	0	2
Dapma7bEVm008388t1	Prefoldin subunit 2	O	1	0
Dapma7bEVm009960t1	HEAT shock 70 kDa protein cognate 4	O	0	3
ID=Dapma1EVg029561t1	Small ubiquitin-related modifier	O	0	1
Dapma7bEVm003762t1	Hsc70-interacting protein 1, putative	O,T	0	1
Dapma7bEVm000649t1	Uncharacterized protein	T	0	2
Dapma7bEVm002367t1	Differentially expressed in FDCP 8	T	0	2
Dapma7bEVm002957t1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	T	0	3
Dapma7bEVm004815t1	Uncharacterized protein	T	0	2
Dapma7bEVm004841t1	Inositol monophosphatase 3	T	2	2
Dapma7bEVm009801t1	Rho GTPase-activating protein	T	2	0
Dapma7bEVm010150t1	Rho GTPase-activating protein	T	0	1
Dapma7bEVm018660t1	Smad nuclear-interacting protein, putative	T	2	0
Dapma7bEVm630210t1	Uncharacterized protein	T	1	0
Dapma7bEVm002647t1	Uncharacterized protein	T,R	0	2
Dapma7bEVm010911t1	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	T,U	2	2
Dapma7bEVm004120t1	Collagen type IV alpha-3-binding protein	T,V	0	1
Dapma7bEVm000381t1	Alpha-N-acetylglucosaminidase	U	2	0
Dapma7bEVm003893t1	Charged multivesicular body protein 5	U	1	1
Dapma7bEVm004553t1	Vacuolar protein sorting-associated protein	U	0	1
Dapma7bEVm004908t1	Bridging integrator 3	U	0	1
Dapma7bEVm024319t1	Mitochondrial import receptor subunit TOM22, putative	U	1	0
Dapma7bEVm027863t1	Transmembrane 9 superfamily member 2	U	0	2
Dapma7bEVm004139t1	Islet cell autoantigen, putative	U,T	1	0
Dapma7bEVm018435t1	Uncharacterized protein	V,W	3	0
Dapma7bEVm001580t1	Actin-related protein 10	Z	1	1
Dapma7bEVm002256t1	Actin-interacting protein 1	Z	0	2
Dapma7bEVm002392t1	Actin-related protein	Z	5	0
Dapma7bEVm004786t1	Actin-related protein 2	Z	0	1
Dapma7bEVm005656t1	F-actin-capping protein subunit beta	Z	1	0
Dapma7bEVm005688t1	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Z	2	0
Dapma7bEVm005785t1	Uncharacterized protein	Z	0	5
Dapma7bEVm016225t1	Tubulin alpha-1 chain	Z	3	3
Dapma7bEVm003907t1	Splicing factor U2af 38 kDa subunit, putative	A	0	1
Dapma7bEVm004075t1	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA	A	0	1

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC F2	
			0,0065	41,3
	Helicase DHX15			
Dapma7bEVm006338t1	Pre-mRNA-splicing regulator female-lethalD Survival of motor neuron-related-splicing factor	A	0	2
Dapma7bEVm006886t1	30	A	0	2
Dapma7bEVm010159t1	Serine/arginine-rich splicing factor 4, putative	A	0	1
Dapma7bEVm001796t1	Uncharacterized protein	B	1	0
Dapma7bEVm018414t1	Polybromo-1, protein	B,K	0	2
Dapma7bEVm004450t1	60S ribosomal protein L10	J	0	2
Dapma7bEVm005288t1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	J	0	1
Dapma7bEVm005405t1	Eukaryotic translation initiation factor 1A	J	3	0
Dapma7bEVm009851t1	60S ribosomal protein L7a	J	0	1
Dapma7bEVm010654t1	40S ribosomal protein S19a	J	0	1
Dapma7bEVm012603t1	28S ribosomal protein S10, putative	J	0	1
Dapma7bEVm629869t1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	J	2	1
Dapma7bEVm001706t1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	K	1	0
Dapma7bEVm002172t1	Bromodomain-containing protein 7, putative	K	0	1
Dapma7bEVm002286t1	Activating Signal cointegrator 1 asc-1 thyroid receptor-interacting protein 4 trip-4	K	1	1
Dapma7bEVm002466t1	Vacuolar-sorting protein SNF8	K	0	1
Dapma7bEVm010204t1	Uncharacterized protein	K	1	0
Dapma7bEVm019330t1	Uncharacterized protein	K	1	0
Dapma7bEVm015403t1	at-rich interactive domain-containing protein	K,B	0	5
Dapma7bEVm004582t1	DNA excision repair protein haywire	K,L	0	1
Dapma7bEVm007038t1	Inositol hexakisphosphate kinase 2	K,T,I	1	0
Dapma7bEVm001090t1	DNA replication licensing factor Mcm3	L	0	1
Dapma7bEVm004126t1	Inverted repeat-binding protein, putative	L	2	0
Dapma7bEVm636577t1	DNA polymerase epsilon subunit 4, putative	L	2	0
Dapma7bEVm004210t1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	C	0	1
Dapma7bEVm006033t1	Congested trachea protein	C	0	2
Dapma7bEVm006045t1	Kidney mitochondrial carrier protein 1	C	1	0
Dapma7bEVm006145t1	V-type proton ATPase subunit F 1	C	2	2
Dapma7bEVm006617t1	S-adenosylmethionine mitochondrial carrier protein	C	0	2
Dapma7bEVm011059t1	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	C	0	2
Dapma7bEVm001358t1	Cell division cycle 2 protein kinase 5, putative	D	0	1
Dapma7bEVm001562t1	Uncharacterized protein	D	2	0
Dapma7bEVm002668t1	Low affinity cationic amino acid transporter 2, putative	E	2	0
Dapma7bEVm029527t1	GMP synthase, putative	F	2	0
Dapma7bEVm640880t1	GMP synthase, putative	F	2	0
Dapma7bEVm001940t1	Uncharacterized protein	F,Q	2	0
Dapma7bEVm002639t1	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	G	0	3

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC F2	
			0,0065	41,3
Dapma7bEVm003201t1	Sugar phosphate exchanger 3/sw, putative	G	0	1
ID=Dapma1EVg028440t1	Uncharacterized protein	G	2	0
Dapma7bEVm009609t1	Neutral alpha-glucosidase AB	G,M	0	2
Dapma7bEVm003798t1	Protoheme IX farnesyltransferase	,O	2	1
Dapma7bEVm000399t1	Peroxisomal acyl-Coenzyme A oxidase 1	H	0	1
Dapma7bEVm001250t1	Uncharacterized protein	I	0	1
Dapma7bEVm003896t1	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	I	1	0
Dapma7bEVm009682t1	Phospholipase A-2-activating protein	I	0	1
Dapma7bEVm003562t1	Uncharacterized protein	P	2	0
Dapma7bEVm005252t1	Nitrogen permease regulator 2 protein	P	1	0
Dapma7bEVm000090t1	Xaa-Pro dipeptidase, putative	R	0	2
Dapma7bEVm000314t1	Alkylated DNA repair protein alkB 8	R	0	1
Dapma7bEVm001409t1	RNA-binding protein 10	R	0	5
Dapma7bEVm001671t1	Furry, protein	R	1	0
Dapma7bEVm001772t1	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1, putative	R	0	1
Dapma7bEVm002306t1	GTP-binding protein 6, putative	R	2	0
Dapma7bEVm003575t1	Zyg-11 B, protein	R	1	0
Dapma7bEVm003801t1	Deoxyhypusine hydroxylase	R	1	3
Dapma7bEVm004407t1	Transformer-2 protein beta	R	0	1
Dapma7bEVm007418t1	Uncharacterized protein	R	2	0
Dapma7bEVm007646t1	Prostaglandin reductase 1	R	0	1
Dapma7bEVm009603t1	Phospholipid-transporting ATPase ID	R	0	5
Dapma7bEVm009723t1	Arginine N-methyltransferase 7, protein	R	1	0
Dapma7bEVm011847t1	Uncharacterized protein	R	0	2
Dapma7bEVm028559t1	Uncharacterized protein	R	3	0
Dapma7bEVm001661t1	Uncharacterized protein	S	0	1
Dapma7bEVm001676t1	Integrator complex subunit	S	3	0
Dapma7bEVm001989t1	Golgi to ER traffic protein 4	S	1	0
Dapma7bEVm002058t1	CWC15 A, protein	S	1	0
Dapma7bEVm003534t1	UPF0614 protein	S	0	8
Dapma7bEVm004010t1	Pseudouridylate synthase 7-like protein	S	0	1
Dapma7bEVm005418t1	Nuclear pore complex protein Nup205	S	1	1
Dapma7bEVm005887t1	Glycosyltransferase AER61-like protein	S	0	1
Dapma7bEVm006226t1	UPF0061 protein ydiU	S	0	2
Dapma7bEVm010861t1	Coiled-coil domain-containing protein, putative	S	0	2
Dapma7bEVm011454t1	MMP37 protein	S	0	2
Dapma7bEVm028856t1	TIP41 protein	S	1	1
ID=Dapma1EVg029348t1	RWD domain-containing protein 1	S	1	0
Dapma7bEVm000610t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm000693t1	Asparagine synthetase domain-containing protein 1	NA	0	1
Dapma7bEVm002584t1	Ras GTPase-activating protein 1	NA	2	0
Dapma7bEVm002600t1	Metabotropic glutamate receptor	NA	1	0

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de	
			DMC	F2
			0,0065	41,3
Dapma7bEVm002869t1	40S ribosomal protein S6	NA	0	1
Dapma7bEVm003124t1	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	NA	0	2
Dapma7bEVm003465t1	E3 ubiquitin-protein ligase hyd	NA	1	0
Dapma7bEVm003479t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma7bEVm003702t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm004601t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm004920t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm006280t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma7bEVm007316t1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1, putative	NA	0	1
Dapma7bEVm008508t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm009248t1	Uncharacterized protein	NA	2	1
Dapma7bEVm010295t1	Cytochrome C1, putative	NA	1	0
Dapma7bEVm010683t1	Uncharacterized protein	NA	2	2
Dapma7bEVm010893t1	Glutathione S-transferase 1	NA	0	2
Dapma7bEVm011022t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm011251t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma7bEVm012516t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm013378t1	Hemocyte protein-glutamine gamma-glutamyltransferase, putative	NA	3	2
Dapma7bEVm013482t1	SRR1 protein, putative	NA	0	2
Dapma7bEVm013982t1	Uncharacterized protein	NA	0	4
Dapma7bEVm015497t1	Uncharacterized protein	NA	3	3
Dapma7bEVm015594t1	Uncharacterized protein	NA	2	2
Dapma7bEVm015679t1	Bardet-Biedl Syndrome 5 protein	NA	2	1
Dapma7bEVm018555t1	Polyubiquitin-B	NA	3	0
Dapma7bEVm018583t1	Uncharacterized protein	NA	1	2
Dapma7bEVm026913t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm027193t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm028605t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm029134t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma1EVg001937t1	Paired amphipathic helix protein sin3a	NA	1	0
Dapma1EVg003690t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma1EVg004055t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma1EVg004174t1	Metaxin-1, putative	NA	0	2
Dapma1EVg005783t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma1EVg010662t1	Uncharacterized protein	NA	2	2
Dapma1EVg022912t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma1EVg032669t1	Uncharacterized protein	NA	1	0

**Tableau 34.** Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC dans la génération F3, mis à part pour les DMC en commun entre les générations F2 et F3.

Gene ID	Annotation	KO G	Nombre de DMC	
			F3 0,0065	41,3
Dapma7bEVm000634t1	b-box type zinc finger ncl-1-like protein	O	1	0
Dapma7bEVm002018t1	Prohibitin-2	O	0	6
Dapma7bEVm002699t1	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	O	1	0
Dapma7bEVm002890t1	Proteasome subunit alpha type	O	0	5
Dapma7bEVm003898t1	Zinc finger protein 1	O	1	0
Dapma7bEVm028326t1	Zinc metalloproteinase nas-4	O	2	0
Dapma1EVg026329t1	DnaJ subfamily C member 1	O	1	0
Dapma7bEVm003591t1	Anaphase-promoting complex subunit	O,D	0	1
Dapma7bEVm000469t1	Semaphorin-1A	T	0	2
Dapma7bEVm001059t1	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit Delta	T	0	1
Dapma7bEVm001767t1	Serine/threonine-protein kinase TBK1	T	0	1
Dapma7bEVm002563t1	Uncharacterized protein	T	3	0
Dapma7bEVm004863t1	Defective proboscis extension response	T	3	0
Dapma7bEVm006503t1	Uncharacterized protein	T	2	2
Dapma7bEVm009671t1	Uncharacterized protein	T	3	0
Dapma7bEVm645094t1	Uncharacterized protein	T	0	1
Dapma1EVg011087t1	Centaurin-gamma-1A	T	2	0
Dapma7bEVm002016t1	Uncharacterized protein	U	0	2
Dapma7bEVm001711t1	Importin-4	U,Y	0	1
Dapma7bEVm001063t1	Uncharacterized protein	Y	2	0
Dapma7bEVm001325t1	Dynein heavy chain 64C	Z	2	0
Dapma7bEVm002607t1	Calcium-dependent protein kinase 4	Z	4	0
Dapma7bEVm006073t1	FRG1, protein	Z	0	2
Dapma7bEVm009671t1	Uncharacterized protein	Z	3	0
Dapma7bEVm629787t1	Centrosome-associated-like protein	Z,R	2	0
Dapma7bEVm004747t1	Uncharacterized protein	Z,T	0	1
Dapma7bEVm000202t1	RNA-binding protein squid	A	1	0
Dapma7bEVm002873t1	Pre-mRNA-splicing factor ISY1	A	1	0
Dapma7bEVm004757t1	Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1	A	0	2
Dapma7bEVm006029t1	Neuroguidin-A	A	0	1
Dapma7bEVm008754t1	U6 snRNA-associated Sm protein LSm3	A	1	0
Dapma7bEVm011631t1	Splicing factor U2af 50 kDa subunit	A	0	2
Dapma7bEVm637684t1	ATP-dependent RNA Helicase me31b	A	0	2
Dapma7bEVm006161t1	Uncharacterized protein	B,K	0	4
Dapma7bEVm002123t1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	J	0	2
Dapma7bEVm003079t1	tRNA-C -methyltransferase	J	1	0
Dapma7bEVm011866t1	Translation factor SUI1 protein	J	4	6
Dapma7bEVm002479t1	Uncharacterized protein	K	0	2

Gene ID	Annotation	KO G	Nombre de DMC F3	
			0,0065	41,3
Dapma7bEVm002547t1	Intraflagellar transport protein 172 RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3	K	0	2
Dapma7bEVm002695t1	Polycomb protein Sfmt, putative	K	1	0
Dapma7bEVm004566t1	TATA box binding protein tbp-associated factor	K	2	0
Dapma7bEVm001283t1	Proliferating cell nuclear antigen	L	2	0
Dapma7bEVm005993t1	DNA repair protein RAD51 1 NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit	L	0	1
Dapma7bEVm004953t1	ATP synthase subunit gamma	C	4	3
Dapma7bEVm009572t1	Cullin-3	C	1	0
Dapma7bEVm003082t1	Uncharacterized protein	D	0	1
Dapma7bEVm006488t1	Isocitrate dehydrogenase NAD subunit beta	E	0	4
Dapma7bEVm009918t1	Trypsin-7, putative	E	1	0
Dapma7bEVm016053t1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	F	1	0
Dapma7bEVm002333t1	GMP synthase, putative	F	0	2
Dapma7bEVm028777t1	3',5'-bisphosphate nucleotidase 1	F	0	2
Dapma7bEVm029455t1	GMP synthase, putative	F	0	1
Dapma1EVg017946t1	Chitinase domain-containing protein 1 Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1	G	2	0
Dapma7bEVm003296t1	Uncharacterized protein	I	1	0
Dapma1EVg006238t1	Carnitine O-palmitoyltransferase	I	0	2
Dapma7bEVm000677t1	Uncharacterized protein	P	3	0
Dapma7bEVm002222t1	Uncharacterized protein	P	0	2
Dapma7bEVm001093t1	Voltage-dependent anion-selective channel	P	0	2
Dapma7bEVm003562t1	Chondroitin sulfate proteoglycan 4, putative	R	0	1
Dapma7bEVm637707t1	WD repeat-containing protein	R	1	0
Dapma7bEVm001328t1	F-box/LRR-repeat protein	R	2	0
Dapma7bEVm001753t1	SET domain-containing protein	R	0	3
Dapma7bEVm004024t1	Uncharacterized protein	R	0	2
Dapma7bEVm004211t1	Clusterin-associated protein 1, putative	R	0	1
Dapma7bEVm005199t1	Uncharacterized protein	R	2	0
Dapma7bEVm005206t1	Uncharacterized protein	R	0	3
Dapma7bEVm005713t1	Uncharacterized protein	R	3	0
Dapma7bEVm008242t1	Zinc finger protein 227, putative	R	1	0
Dapma7bEVm028467t1	Stromal interaction molecule, putative	R	3	0
Dapma7bEVm029423t1	Kanadapin, putative	R	2	2
Dapma1EVg004394t1	tRNA- methyltransferase	R	2	0
Dapma1EVg016273t1	Uncharacterized protein	R,T	3	0
Dapma7bEVm004238t1	Uncharacterized protein	S	1	0
Dapma7bEVm001238t1	Tubulin-specific chaperone cofactor E protein	S	1	2
Dapma7bEVm004233t1	Transmembrane protein 185B	S	1	0
Dapma7bEVm004831t1				

Gene ID	Annotation	KO G	Nombre de	
			DMC F3 0,0065	41,3
Dapma7bEVm005866t1	Regulator of chromosome condensation, putative	S	1	0
Dapma7bEVm006020t1	YIF1B, protein	S	2	0
Dapma7bEVm006566t1	FAM203 family protein	S	2	0
Dapma7bEVm007272t1	Secretion-regulating guanine nucleotide exchange factor	S	2	0
Dapma7bEVm011201t1	Solute carrier family 35 member C2	S	2	0
Dapma7bEVm011743t1	Multivesicular body subunit 12B	S	1	1
Dapma7bEVm015303t1	Protein MAGE, putative	S	3	0
Dapma7bEVm028224t1	TP53RK-binding protein	S	2	0
Dapma7bEVm000212t1	Limkain-B1	NA	0	1
Dapma7bEVm000845t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm000956t1	Acidic fibroblast growth factor intracellular- binding protein	NA	2	0
Dapma7bEVm001147t1	Transmembrane 7 superfamily member 3	NA	1	1
Dapma7bEVm001955t1	Mitochondrial transcription termination factor	NA	2	0
Dapma7bEVm001965t1	Uncharacterized protein	NA	3	0
Dapma7bEVm002055t1	Uncharacterized protein	NA	4	0
Dapma7bEVm003066t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm003452t1	40S ribosomal protein S15	NA	1	0
Dapma7bEVm003865t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm005477t1	Uncharacterized protein	NA	1	1
Dapma7bEVm005728t1	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A, putative	NA	0	1
Dapma7bEVm006208t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma7bEVm007026t1	Inositol polyphosphate 5-phosphatase K, putative	NA	1	0
Dapma7bEVm007262t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm011272t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm012686t1	Uncharacterized protein	NA	3	0
Dapma7bEVm014876t1	Uncharacterized protein	NA	1	1
Dapma7bEVm016334t1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1- like protein	NA	0	3
Dapma7bEVm018399t1	Myosin heavy chain	NA	0	1
Dapma7bEVm018792t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm024131t1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	NA	2	1
Dapma7bEVm029088t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma7bEVm629989t1	Uncharacterized protein	NA	2	0
Dapma7bEVm637670t1	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase-like protein	NA	2	0
Dapma7bEVm637694t1	Malate dehydrogenase	NA	0	2
Dapma7bEVm642340t1	Uncharacterized protein	NA	0	2
Dapma7bEVm643101t1	Uncharacterized protein	NA	1	0
Dapma7bEVm646317t1	Uncharacterized protein	NA	0	1



Gene ID	Annotation	KO G	Nombre de DMC	
			F3 0,0065	41,3
Dapma1EVg003537t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma1EVg006885t1	GMP synthase, putative	NA	0	3
Dapma1EVg007413t1	Uncharacterized protein	NA	1	1
Dapma1EVg019676t1	Uncharacterized protein	NA	3	0
Dapma1EVg019755t1	Uncharacterized protein	NA	0	1
Dapma1EVg021256t1	Sec1 family domain-containing protein	NA	0	2
Dapma1EVg025021t1	Uncharacterized protein	NA	0	2

Tableau 35. Liste de de l'ensemble des gènes comportant une ou plusieurs DMC en commun entre les générations F2 et F3

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC			
			F2		F3	
			0,0065	41,3	0,0065	41,3
Dapma7bEVm000337t1	Uncharacterized protein Mitochondrial-processing	O	2	0	0	1
Dapma7bEVm001898t1	peptidase subunit beta HEAT shock 70 kDa protein cognate	O	1	1	1	1
Dapma7bEVm636207t1	4	O	2	2	2	2
Dapma7bEVm001699t1	Tyrosine-protein kinase jak2	T	0	3	1	0
Dapma7bEVm011438t1	Uncharacterized protein	T	0	4	0	5
Dapma7bEVm637841t1	Uncharacterized protein	T,E, P	0	1	0	1
Dapma7bEVm005057t1	Exocyst complex component 3	U	2	0	0	2
Dapma7bEVm000150t1	Filamin-A	Z	2	0	0	1
Dapma7bEVm002538t1	Uncharacterized protein	Z	0	2	2	0
Dapma7bEVm004770t1	60S ribosomal protein L28	J	1	1	1	1
Dapma7bEVm643574t1	60S ribosomal protein L19	J	1	0	1	0
Dapma7bEVm646007t1	40S ribosomal protein SA	J	3	0	0	3
Dapma7bEVm000452t1	Tudor domain-containing protein 7	K	1	0	0	1
Dapma7bEVm000594t1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	K,O	2	0	2	2
Dapma7bEVm004667t1	Sphingosine-1-phosphate lyase	E	0	2	2	0
Dapma7bEVm004767t1	Phosphoglycerate kinase FGGY carbohydrate kinase domain-	G	1	0	0	1
Dapma7bEVm005882t1	containing protein	G	0	3	4	1
Dapma7bEVm008419t1	Uncharacterized protein	G	0	3	0	2
Dapma7bEVm005020t1	Uncharacterized protein	I	1	0	1	0
Dapma7bEVm002459t1	ADP-ribose pyrophosphatase U3 small nucleolar RNA-associated	P	0	2	2	0
Dapma7bEVm005519t1	protein 6 Zinc finger protein ccch domain-	R	2	0	1	0
Dapma7bEVm000138t1	containing protein, putative	R	2	0	0	2
Dapma7bEVm001187t1	Pre-mRNA-processing factor 19 Arrestin domain-containing	R	0	2	1	0
Dapma7bEVm005235t1	protein 3	R	0	2	2	0
Dapma7bEVm007106t1	Density-regulated protein Coiled-coil domain-containing	R	2	0	0	2
Dapma7bEVm004226t1	protein Acidic repeat-containing-like	S	2	2	2	2
Dapma7bEVm007421t1	protein Regulator of microtubule dynamics	S	0	2	0	1
Dapma7bEVm001273t1	protein 1	NA	6	0	0	6
Dapma7bEVm001664t1	Uncharacterized protein E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B,	NA	2	2	2	2
Dapma7bEVm004647t1	putative S-methyl-5'-thioadenosine	NA	0	1	0	1
Dapma7bEVm005328t1	phosphorylase, putative	NA	0	2	2	0
Dapma7bEVm006332t1	Uncharacterized protein	NA	2	0	0	2
Dapma7bEVm006642t1	UPF0534 protein	NA	1	0	2	0

Gene ID	Annotation	KOG	Nombre de DMC			
			F2		F3	
			0,0065	41,3	0,0065	41,3
Dapma7bEVm010587t1	Uncharacterized protein	NA	4	0	5	0
Dapma7bEVm028903t1	Uncharacterized protein	NA	0	1	1	0



## Annexe 7. Convergence des chaines MCMC : critère de Gelman

- Modèle Coût-Assimilation

```
gelman.diag(jags_mc_EggAssim,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburnin=TRUE,multivariate=TRUE)
```

Potential scale reduction factors:

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.00
b1	1.01	1.01
b2	1.19	1.21
kr1_F0	1.00	1.00
kr1_F1	1.00	1.00
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.00
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.03	1.03
nec2	1.00	1.01
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00

- Modèle Coût-Croissance

```
gelman.diag(jags_mc_EggGrow,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburnin=TRUE,multivariate=TRUE)
```

Potential scale reduction factors:

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.00
b1	1.00	1.00
b2	1.01	1.01
kr1_F0	1.00	1.00
kr1_F1	1.00	1.00
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.00
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.00	1.00
nec2	1.03	1.03
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00

- Modèle Coût-Maintenance

```
> gelman.diag(jags_mc_EggMaint,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburnin=TRUE,multivariate=TRUE)
Potential scale reduction factors:
```

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.00
b1	1.03	1.03
b2	1.00	1.00
kr1_F0	1.00	1.00
kr1_F1	1.00	1.00
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.00
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.00	1.00
nec2	1.00	1.01
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00

- Modèle Mortalité-Assimilation

```
gelman.diag(jags_mc_HazAssim,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburnin=TRUE,multivariate=TRUE)
Potential scale reduction factors:
```

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.00
b1	1.04	1.06
b2	1.09	1.09
kr1_F0	1.00	1.01
kr1_F1	1.00	1.01
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.01
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.00	1.00
nec2	1.01	1.01
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00

- Modèle Mortalité-Croissance

```
> gelman.diag(jags_mc_HazGrow,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburni
n=TRUE,multivariate=TRUE)
Potential scale reduction factors:
```

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.00
b1	1.00	1.00
b2	1.00	1.00
kr1_F0	1.00	1.01
kr1_F1	1.00	1.00
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.00
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.01	1.02
nec2	1.01	1.01
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00

- Modèle Mortalité-Maintenance

```
gelman.diag(jags_mc_HazMaint,confidence = 0.95, transform=FALSE, autoburnin
=TRUE,multivariate=TRUE)
Potential scale reduction factors:
```

	Point est.	Upper C.I.
Lm[1]	1.00	1.00
Lm[2]	1.00	1.00
Lm[3]	1.00	1.00
Rm[1]	1.00	1.00
Rm[2]	1.00	1.00
Rm[3]	1.00	1.01
b1	1.16	1.23
b2	1.01	1.02
kr1_F0	1.00	1.00
kr1_F1	1.00	1.00
kr2	1.00	1.00
lp[1]	1.00	1.01
lp[2]	1.00	1.00
lp[3]	1.00	1.00
nec1	1.01	1.01
nec2	1.00	1.00
pR	1.00	1.00
rB[1]	1.00	1.00
rB[2]	1.00	1.00
rB[3]	1.00	1.00
tauG	1.00	1.00





## Annexe 8. Nombre d'itérations pour atteindre la convergence des chaînes MCMC

Tableau 36. Nombre d'itérations nécessaires à chaque modèle testé pour atteindre la convergence des chaînes MCMC, calculé grâce à la méthode de Raftery et Lewis (Raftery, Lewis, 1992). Le nombre de « thin » indique à quelle fréquence les itérations sont enregistrées, le reste des itérations sont éliminées.

Modèle	Nombre d'itérations	Thin
Coût-Assimilation	191 046	51
Coût-Croissance	131 110	35
Coût-Maintenance	108 634	29
Mortalité-Assimilation	116 126	31
Mortalité-Croissance	123 618	33
Mortalité-Maintenance	82 412	22



## Annexe 9. Ajustements du modèle « mortalité-croissance » aux données de croissance et de reproduction issues de Parisot et al. 2015

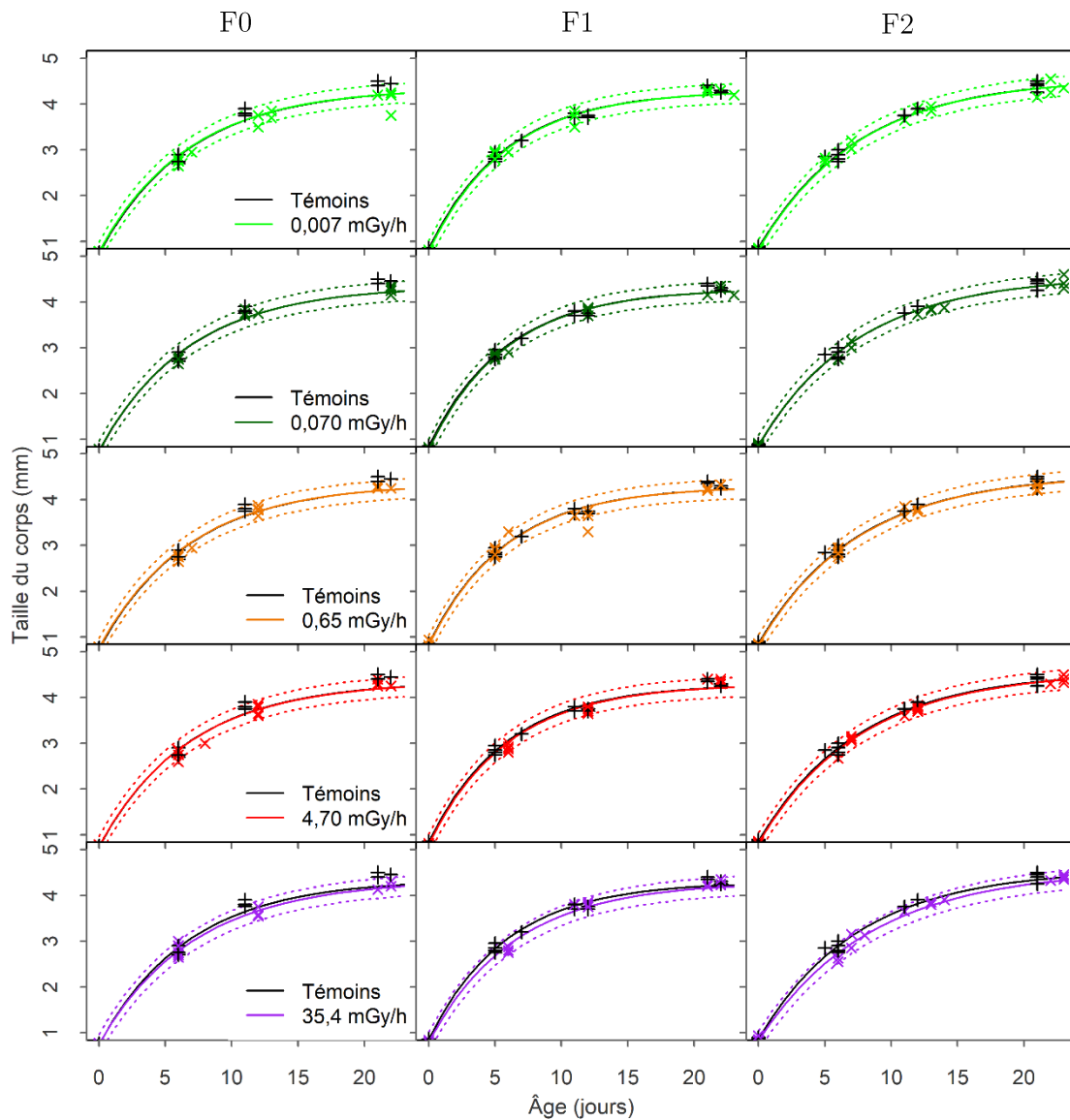


Figure 58. Ajustements du modèle DEBtox « mortalité-croissance » aux données observées de croissance (taille du corps) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.

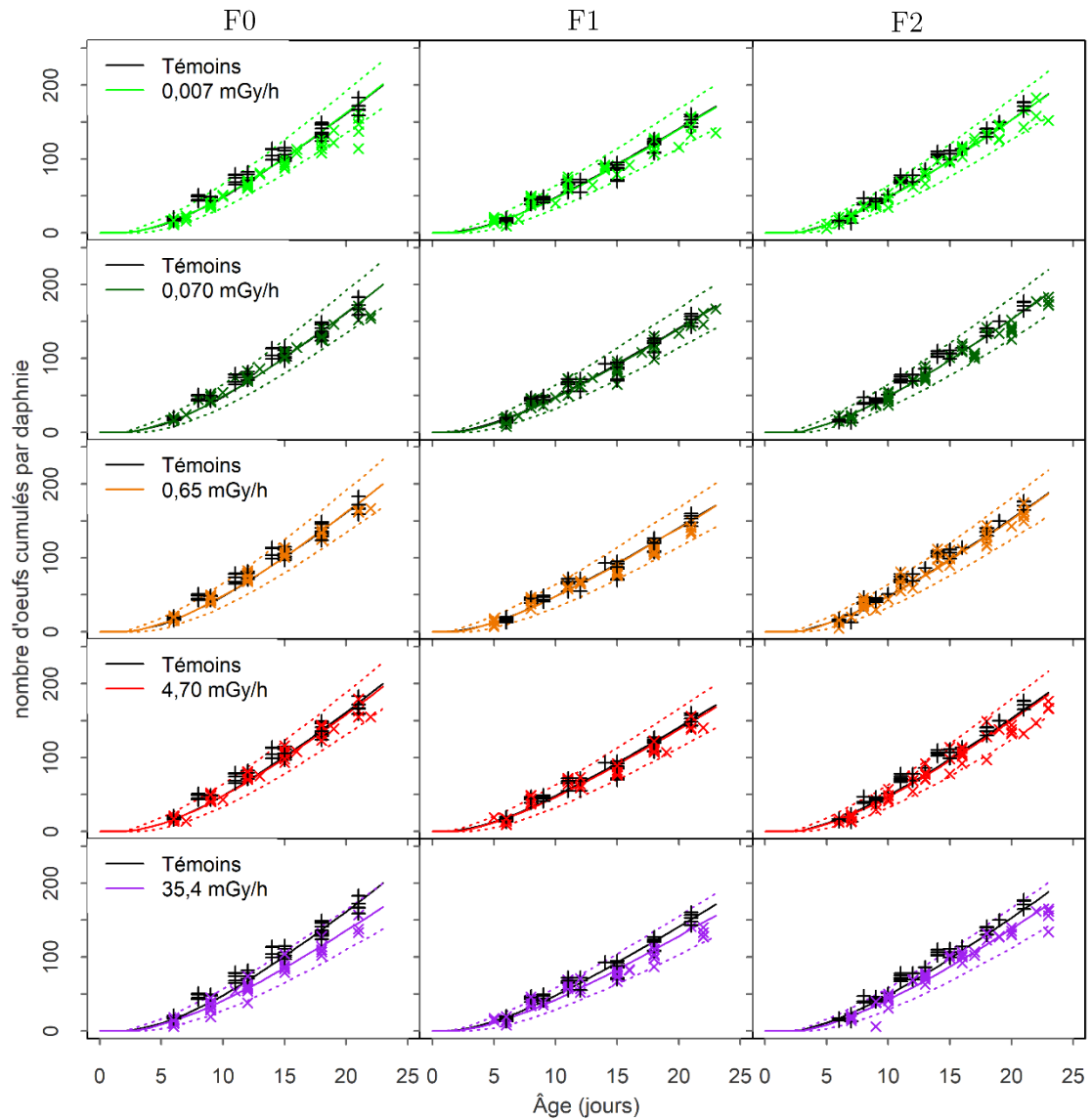


Figure 59. Ajustements du modèle DEBtox « Mortalité-Croissance » aux données observées de reproduction (nombre d'œufs cumulés par daphnie) de daphnies exposées à une irradiation gamma (0, 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy.h<sup>-1</sup>) multigénérationnelle (F0, F1 et F2) réalisée dans le cadre de l'étude I (Parisot, 2015). Les croix (+) : données observées, les lignes pleines : médiane des données prédites à chaque pas de temps, les lignes en pointillés : les intervalles de crédibilité à 95% des données de croissance et de reproduction prédites.

## Annexe 10. Article scientifique

---

Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna*

Exposed to Chronic  $\gamma$  Irradiation

---

Marie Trijau<sup>1</sup>, Jana Asselman<sup>2</sup>, Olivier Armant<sup>1</sup>, Christelle Adam-Guillermin<sup>1</sup>, Karel A.  
C. De Schamphelaere<sup>2</sup>, and Frédéric Alonzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSE-ENV, SRTE, LECO, Cadarache,  
Saint-Paul-lès-Durance 13115, France

<sup>2</sup> Laboratory for Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University, Ghent  
9000, Belgium

Publié dans *Environmental Science and Technology* 2018, 52, 4331–4339



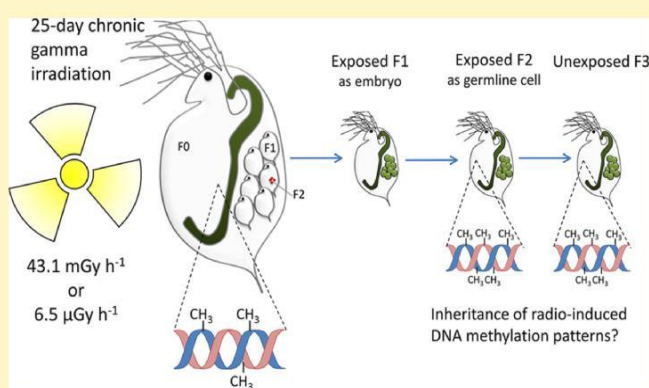
# Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna* Exposed to Chronic $\gamma$ Irradiation

Marie Trijau,<sup>†</sup> Jana Asselman,<sup>‡</sup> Olivier Armant,<sup>†</sup> Christelle Adam-Guillermin,<sup>‡</sup> Karel A. C. De Schamphelaere,<sup>‡</sup> and Frédéric Alonzo<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucleaire, PSE-ENV, SRTE, LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France <sup>‡</sup>Laboratory for Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University, Ghent 9000, Belgium

\* [Supporting Information](#)

**ABSTRACT:** Our aim was to investigate epigenetic changes in *Daphnia magna* after a 25-day chronic external  $\gamma$  irradiation (generation F0 exposed to 6.5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  or 41.3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) and their potential inheritance by subsequent recovering generations, namely, F2 (exposed as germline cells in F1 embryos) and F3 (the first truly unexposed generation). Effects on survival, growth, and reproduction were observed and DNA was extracted for whole-genome bisulfite sequencing in all generations. Results showed effects on reproduction in F0 but no effect in the subsequent generations F1, F2, and F3. In contrast, we observed significant methylation changes at specific CpG positions in every generation independent of dose rate, with a majority of hypomethylation. Some of these changes were shared between dose rates and between generations. Associated gene functions included gene families and genes that were previously shown to play roles during exposure to ionizing radiation. Common methylation changes detected between generations F2 and F3 clearly showed that epigenetic modifications can be transmitted to unexposed generations, most likely through the germline, with potential implications for environmental risk.



## 1. INTRODUCTION

Ecosystems can be chronically exposed to ionizing radiation, due to releases of radionuclides during the normal functioning of nuclear facilities or after major accidents such as in Chernobyl in 1986 and Fukushima in 2011. Three decades after the accident in Chernobyl, wildlife organisms can absorb dose rates ranging from 0.1  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  to 10  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  in the Exclusion Zone, due to the persistence of long-lived isotopes such as  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{240}\text{Pu}$ , and  $^{239}\text{Pu}$ .<sup>1</sup> In this context, ecologically relevant predictions of long-term biological effects induced by chronic low doses of ionizing radiation in nonhuman organisms are necessary. These predictions can gain in robustness by understanding radiotoxicity mechanisms over several generations and underlying processes involved at the molecular scale. While effects of ionizing radiation on biomolecules, especially DNA, have been extensively described and are now well-understood,<sup>2</sup> the contribution of other radiation-induced molecular alterations that might be transmitted from irradiated parents to their progeny remains unclear. Studies of radiation effects in fish and rodents on several generations reported a situation of genomic instability in the unexposed progeny, characterized by an increased frequency of mutations and other DNA aberrations compared to parents.<sup>3–7</sup> The observation that inheritance of genomic instability did not follow a classical Mendelian pattern suggested that an epigenetic mechanism might be involved.<sup>8</sup>

Epigenetic processes, which include all mitotically and/or meiotically heritable modifications that occur without changes in the DNA sequence,<sup>9</sup> are mechanisms of growing interest in ecotoxicology and environmental risk assessment. A large body of work suggested that epigenetic changes (DNA methylation, histone modifications, noncoding RNA) could be transmitted via the germline and cause adverse effects or adaptive responses in subsequent generations in the absence of exposure.<sup>10,11</sup> Field studies on frogs and plants in Fukushima and Chernobyl contaminated areas and laboratory-based tests on rodents showed that ionizing radiation could affect DNA methylation,<sup>12–18</sup> a well-studied epigenetic mechanism known to play key roles in diverse cellular mechanisms in different taxonomic groups.<sup>19–22</sup> In particular, DNA methylation of cytosines followed by a guanine (commonly referred to as CpG) is involved in the regulation of gene expression in various species.<sup>19,23, 24</sup> The transgenerational inheritance of DNA methylation remains discussed and requires specific experimental design to be demonstrated. In fact, exposure designs in most standard toxicity tests imply that at least one following generation (F1 as embryos, and in some cases F2 as germline

Received: November 7, 2017

Revised: February 1, 2018

Accepted: February 27, 2018

Published: February 27, 2018

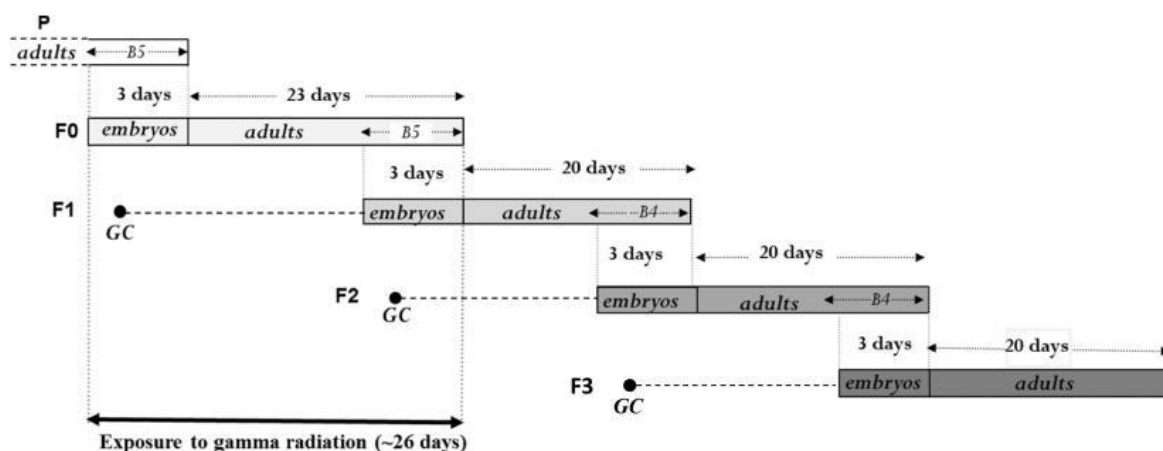


Figure 1. Experimental design. GC = germline cell; B4 and B5 = fourth and fifth brood used to start the next generation before DNA was extracted from daphnids.

cells) is possibly exposed at the same time as generation F0, especially in gestating mammals, ovoviparous fish, or cladoceran crustaceans.<sup>25,26</sup> This needs to be taken into consideration in order to correctly assess true transgenerational epigenetic effects.

To our knowledge, a true transgenerational inheritance of radio-induced DNA methylation changes has never been demonstrated yet. The freshwater cladoceran *Daphnia magna* is a particularly appropriate model organism to address this issue. With its short life cycle and parthenogenetic reproduction, *D. magna* has been successfully used to study epigenetic patterns and DNA methylation under limited genetic variation, during exposure to different environmental stressors.<sup>27,28</sup> In addition, effects of  $\gamma$  radiation ( $^{137}\text{Cs}$ ) on *D. magna* survival, growth, and reproduction were previously shown to increase in severity, together with genotoxicity, across three continuously exposed generations.<sup>29</sup> The present study aimed to investigate the possible involvement of epigenetic mechanisms in this increase. To do so, *D. magna* were exposed to external  $\gamma$  irradiation for one generation (F0) until hatching of the following generation (F1), and DNA methylation modifications were examined up to the unexposed generation F3, by whole-genome bisulfite sequencing. Our objectives were to test the following: (1) whether DNA methylation varied with the absorbed radiation dose, (2) whether radio-induced epigenetic changes were transmitted from exposed generations to subsequent unexposed generations, and (3) whether epigenetic modifications were associated with effects on survival, growth, and reproduction, with potential direct implications for ecological risk assessment.

## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1. Exposure Conditions.** *Daphnia magna* (strain A) were obtained from INERIS (Verneuil-en-Halatte, France) and were kept for many generations (>30) in optimal laboratory conditions: 1 daphnid/50 mL renewed every day, in M4 medium at pH 8 (composition of medium given in [Supporting Information](#)); temperature  $20 \pm 1$  °C; 16 h/8 h light/dark cycle; light intensity  $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ; daily ration of 100  $\mu\text{g}$  of *C. daphnid* using axenic cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. Daphnids were chronically exposed to external  $\gamma$  radiation at IRSN irradiation facility MIRE (Mini Irradiator for Radio-Ecology, Cadarache, France). Irradiation was performed in individual experimental units of 50 mL, placed in circles around

$^{137}\text{Cs}$  sources of 1.64 MBq and 1.93 GBq from CERCA-LEA (Framatome ANP, Pierrelatte, France), in separate ventilated thermostatic chambers protected by 10-cm-thick lead walls in order to avoid cross-irradiation among treatments. Exposure included a 25-day irradiation phase of a first generation (F0) followed with a recovery phase in subsequent generations F1, F2, and F3 ([Figure 1](#)). Exposure of generation F0 was started with freshly laid eggs (<24 h) contained in the brood pouch of their mother. After hatching, irradiation was maintained until F0 daphnids released neonates from their fifth brood. Generations F1 and F2 were not irradiated any further and were therefore exposed to  $\gamma$  radiation as embryos and as germ cells, respectively. Generation F3 was the first truly unexposed generation. An unexposed control treatment (24 daphnids/generation) was monitored at all times throughout the experiment. Each treatment was composed of 22–24 daphnids/generation. Average dose rates absorbed by daphnids were estimated at experimental unit centers by Monte Carlo N-particle calculations and confirmed by radiophotoluminescent dosimetry ([Table S1](#)). Two dose rates were selected, based on previous results with *D. magna*:<sup>29</sup>  $41.3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , as a high exposure level at which genotoxicity and reprotoxicity were detected early in F0 adults, and  $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , as a low exposure level at which genotoxicity was detected late in F0 adults and early in F2 adults, with no observed effect on reproduction.

**2.2. DNA Extraction and Bisulfite Sequencing.** Daphnids were collected upon release of fifth (generation F0) or fourth brood (generations F2 and F3) and immediately flash-frozen in liquid nitrogen for methylation analysis. Eggs were removed from the brood pouch, prior to DNA extraction (DNeasy blood and tissue kit, Qiagen). Two to eight whole daphnids were pooled to form a genomic DNA sample per treatment. Pooling individuals was possible because variability is considered limited among individual daphnids with clonal reproduction, compared to variability among tissues. Library preparation, bisulfite conversion, and whole-genome bisulfite sequencing (see [Supporting Information](#) for details) were performed by the BGI sequencing facility (Hong Kong, China). More than 80 M of high-quality (more than 98%  $Q > 30$ ) 100-bp paired-end reads were generated per sample ([Table S2](#)). The data were made accessible in Geo under accession number GSE108426.

**2.3. Quality Assessment and Mapping.** Methylation analysis (see [Supporting Information](#) for details) followed the



protocol described for *D. magna*.<sup>30</sup> Genetic variability at CpG sites might act as a confounding factor because the detection of nonmethylated cytosines was based on C to T transitions after bisulfite treatment.<sup>31</sup> In order to avoid this source of confusion, SNPs (single-nucleotide polymorphisms) were detected by comparing a control genome, sequenced without bisulfite treatment (blank) with the reference genome by use of the function mpileup in SAMtools.<sup>32</sup> All C to T transitions that were not due to the bisulfite treatment (but were due to genetic variation between the reference genome and the blank) were removed.

**2.4. CpG Methylation Level.** For every read, cytosine methylation status (methylated or not methylated) at each CpG site was extracted with Bismark.<sup>33</sup> A total of  $\sim 5.4 \times 10^6$  CpGs were selected for analysis, including those that were present in all DNA samples with a minimum coverage of five reads. False positives were detected by a binomial testing procedure at each CpG, based on the bisulfite conversion efficiency (from 99.4% to 99.6%) calculated on an unmethylated DNA ( $\lambda$  phage) spiked in all samples.<sup>34</sup> For each truly methylated cytosine, a methylation level was calculated by dividing the number of methylated reads by the total number of reads at the CpG site.

**2.5. Differential Methylation Analysis.** Following recommendations in ref 35, all CpGs that showed no variation in methylation levels in any sample were eliminated, and differential methylation analysis was conducted on 74 020 CpGs (out of the  $5.4 \times 10^6$  total). Differentially methylated cytosines (DMC) and differentially methylated regions (DMR) were detected using Dispersion Shrinkage for Sequencing data package (DSS) in R.<sup>36</sup> DSS can estimate the biological variance in the absence of replicates, based on the spatial correlation in methylation levels from nearby CpGs, used as pseudoreplicates.<sup>37</sup> A Wald test was performed on smoothed methylation levels in order to calculate a p-value and a false discovery rate (FDR) at each CpG site. This was achieved by use of the DMLtest function based on a simple moving average procedure (window size of 80 base pairs) and an empirical Bayesian procedure to estimate the dispersion among all CpGs within the smoothing window. DMCs were considered significant at FDR below 5%. DMRs were defined as a region of minimum 50 base pairs length, with a least three CpGs and 50% significant DMCs. Differential methylation in each generation (F0, F2, or F3) was determined by use of the control sample from the same generation (i.e., F0 control, F2 control, or F3 control) for reference. An additional pairwise analysis among control samples was conducted in order to test whether some of the detected methylation differences might reflect a change in the control across generations rather than a response to radiation exposure.

**2.6. Functional Analysis.** The annotation information (daphmagna\_2011pubfc8.gff3) available for *D. magna* through wFleabase.org<sup>38</sup> was used to identify the genomic feature to which each DMC belongs. Intergenic regions were defined as all regions that did not correspond to gene body (exon or intron). An enrichment analysis was performed for each treatment, by use of the Fisher exact test. Resulting p-values were corrected for multiple testing by use of the FDR Benjamini–Hochberg method,<sup>39</sup> in order to identify in which genomic features DMCs were overrepresented, compared to the distribution of CpGs among different genomic features. Genome annotations are poor in *D. magna* and this limits the Gene Ontology (GO) analysis in this organism. In this

situation, we used the eukaryotic orthologous groups system (KOG), which provides a gene classification per functional categories based on orthologous relationships between genes.<sup>40</sup> We classified genes in 23 defined KOG categories representative of different cellular functions, based on the reference *Daphnia pulex* orthologous genes, available through the Joint Genomic Institute Web site (<http://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/kogBrowser?db=Dappu1>).

**2.7. Effects on Survival, Growth, and Reproduction.** Survival, age at brood release, and brood size were measured every day in 10 units/treatment. Neonates were removed on the day of their release. Body size was measured in neonates and in adults upon deposition of broods 1, 3, and 5 (F0) or brood 6 (F1, F2, and F3). Body size was measured from apex of the helmet to the base of the apical spine under a binocular microscope with a micrometer. All statistical analyses were performed with R (version 3.3.2) as previously described<sup>29</sup> (see [Supporting Information](#) for details), with a statistical significance level of 0.05.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Radiation Effects on DNA Methylation at the Whole-Genome Scale.** Effects of ionizing radiation on DNA methylation levels were assessed in the whole genome and the genomic features (exons, introns, intergenic regions). A global methylation level of  $\sim 0.85\%$  was found at the whole-genome scale ([Figure S1](#)). The value was slightly higher than, but of the same order of magnitude as, the values previously reported for *D. magna*, ranging from 0.25% to 0.52%.<sup>27,30,41</sup> A variability in global methylation among *D. magna* genotypes could explain this difference.<sup>27</sup> This global methylation level was consistent with the low methylation levels in invertebrate genomes in general, in contrast with most vertebrate genomes, such as mammals, in which methylation ranges from 60% to 90%.<sup>42</sup>

Average methylation levels at the whole-genome scale and in the genomic features did not differ between control and exposed samples across three generations ([Figure S1](#)). This result contrasted with previous findings showing significant global hypermethylation measured in plants and frogs from the contaminated areas in Chernobyl and Fukushima.<sup>12–14</sup> Other in vivo studies with rodents exposed to acute or chronic ionizing radiation reported global DNA hypomethylation in specific tissues, like liver and thymus.<sup>15–17</sup> In our study, analyses of DNA methylation were conducted on whole-body samples including 3–8 individuals, thereby averaging inter-individual variability. Thus, our approach detected methylation changes that occurred most frequently, independent of the type of organ, but could not distinguish tissue-specific methylation changes.

Our results showed that CpG methylation level varied among genomic features ([Figure S1](#)), with the highest levels observed in exons ( $\sim 1.38\%$  independent of generation and dose rate, compared to introns with  $\sim 0.49\%$  and intergenic regions with  $\sim 0.69\%$ ). This observation was in accordance with ref 43, which reported similar methylation patterns in gene bodies, supporting the hypothesis that gene body might be the main target of DNA methylation in invertebrates.<sup>19,44</sup>

**3.2. Distribution of Differentially Methylated Cytosines and Differentially Methylated Regions among Genomic Features.** Significant changes in methylation (FDR < 0.05 compared to the controls) were detected in all treatments, including generations F0 exposed to both dose rates and their subsequent generations F2 and F3 ([Figure 2](#)). In

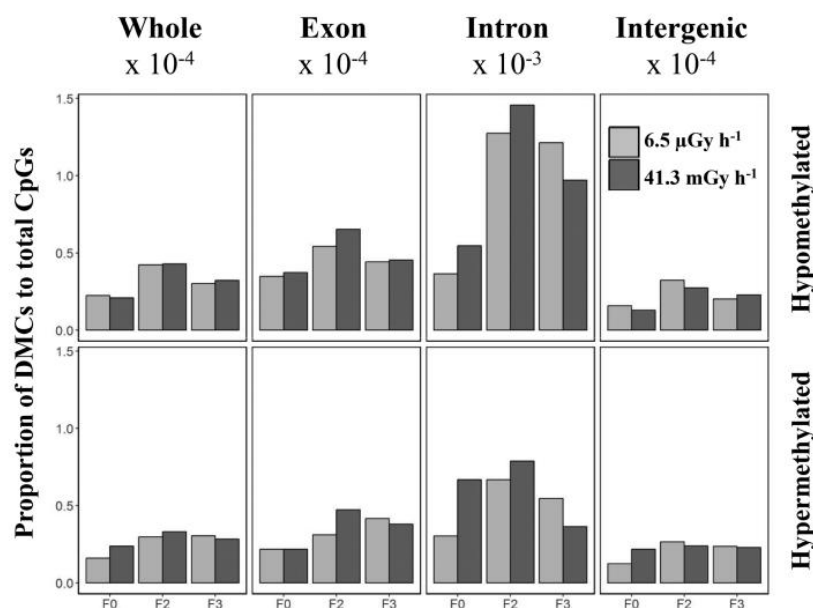


Figure 2. Proportion of hypomethylated and hypermethylated DMCs (to total CpGs) in generations F0, F2, and F3 exposed or recovering from exposure to  $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $41.3 \text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  per genomic features.

generation F0, DMCs represented proportions of  $0.39 \times 10^{-4}$  and  $0.46 \times 10^{-4}$  (209 and 247 DMCs detected out of  $5.4 \times 10^6$  CpGs) at  $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $41.3 \text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. This proportion was greater in generation F2, with values of  $0.73 \times 10^{-4}$  and  $0.76 \times 10^{-4}$  (393 and 413 DMCs detected) at  $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $41.3 \text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. Finally, in generation F3 we detected DMC proportions of  $0.62 \times 10^{-4}$  and  $0.61 \times 10^{-4}$  (334 and 330 DMCs) at  $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $41.3 \text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. Differences in DMC distribution among genomic features (exon, intron, and intergenic regions) were tested against that of all CpGs (Figure 2). In all treatments, DMC numbers in intergenic regions were significantly lower ( $p < 0.001$ ) than expected from a random distribution of methylation changes over the whole genome. Conversely, significantly higher than expected numbers of DMC ( $p < 0.01$ ) were found in exon and intron regions. In every treatment and genomic feature, both hypomethylated and hypermethylated DMCs (i.e., with methylation levels significantly lower or higher than in the control, respectively) were observed (Figure 2).

The total number of detected DMRs ranged from 4 to 9 among treatments and generations (Table S3). These small numbers of DMRs reflected a low clustering of DMCs in the analyzed samples. Two hypotheses might explain the difference. First, our whole-body approach possibly smoothed differences in cytosine methylation levels among tissues, thereby reducing the detection rate of DMCs. Second, the scarcity of DMRs might be a specificity of the methylation pattern in the genome of daphnids or invertebrates in general. In fact, methylation in invertebrates was previously shown to form mosaic patterns, occurring primarily in exonic regions, whereas intergenic regions were sparsely methylated. Hence, such methylation patterns might make it difficult to detect long methylated regions in the genome.<sup>19</sup>

Our observations suggested that methylation changes in introns and exons might play important functional roles in the response to ionizing radiation. Results in *D. magna* exposed to cyanobacteria similarly suggested that methylation changes in exons might be part of an adaptive response to environmental

stress, through the expression of different protein isoforms.<sup>43</sup> Although the role of methylation is not clear in invertebrates, it might be linked to the regulation of alternative gene splicing.<sup>45–47</sup> In honeybees, methylation levels were shown to vary among exons depending on whether they were transcribed or not.<sup>45</sup>

### 3.3. Methylation Changes as a Function of Dose Rate.

The dependence of methylation changes on absorbed radiation dose was an important issue. The comparison between the two treatments suggested that a similar proportion of DMCs (to total 74 020 CpGs) was observed between dose rates, with values of 0.3%, 0.5%, and 0.4% in generations F0, F2, and F3, respectively. Common DMCs, responding to the two dose rates, were in a large majority of cases (>75%) represented by hypomethylated DMCs. Numbers of common DMCs between dose rates (50, 86, and 74 in generations F0, F2, and F3, respectively) largely exceeded what might be expected from chance. In fact, observed proportions of DMCs (to total 74 020 CpGs) of 0.5% maximum suggested a much smaller probability to share DMCs between dose rates (0.0025% maximum), with expected numbers ranging from 0 to 2 DMCs out of 74 020 CpGs. In other words, DMCs commonly detected at both dose rates were largely overrepresented in our samples. This observation suggested that methylation changes did not follow a random pattern and occurred on specific CpGs at the two dose rates, which might reflect the response of specific molecular mechanisms induced in the somatic cells of generation F0 and in the germ cells of generation F1.

The observed situation in our study contrasted with previous in vivo and in vitro results suggesting that the number of induced methylation changes might depend on the received radiation dose in mouse organs<sup>17,48</sup> and in rodent and human cells.<sup>49</sup> However, a strict comparison among studies is not straightforward, considering that differences in exposure conditions (between acute and chronic exposures, between high and low doses), analyzed tissue, sex, and biological species might have a strong influence on DNA methylation.<sup>15,17,18</sup>

### 3.4. Biological Functions of Genes with Differentially Methylated Cytosines and Differentially Methylated

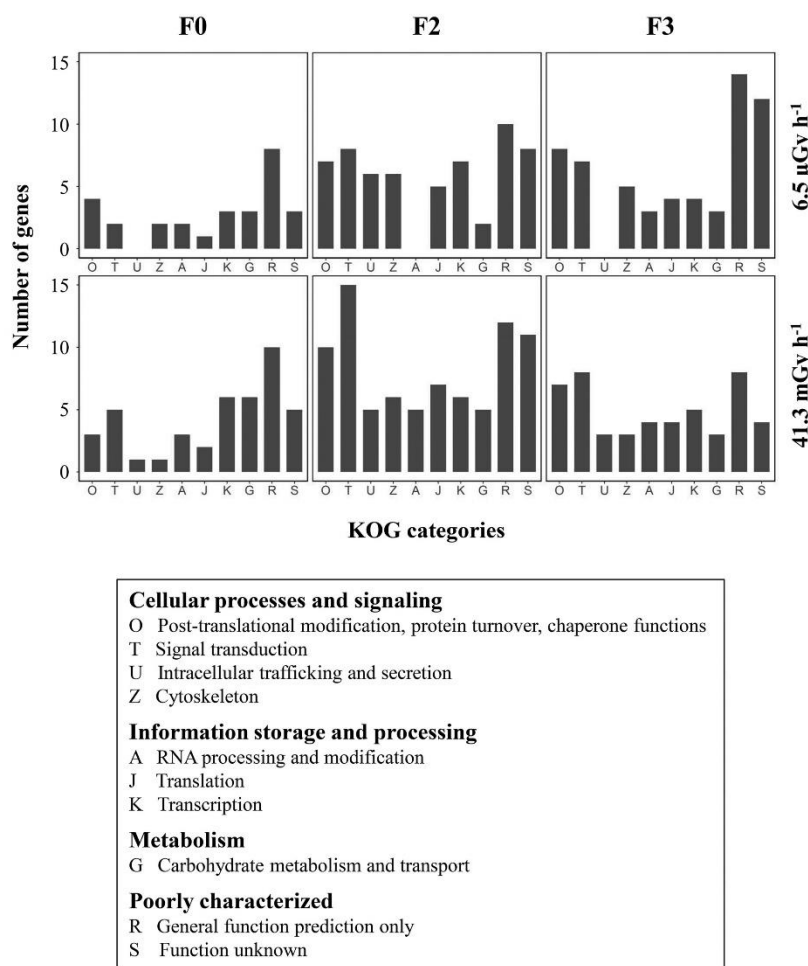


Figure 3. Number of genes containing at least one DMC in generations F0, F2, and F3, exposed to or recovering from exposure to 6.5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and 41.3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  per KOG category. Only the 10 most represented KOG categories are represented (including ex aequo counts). Some genes, representing proportions of 38% and 12% in generation F0, 26% and 23% in generation F2, and 28% and 27% in generation F3 at 6.5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and 41.3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  respectively, could not be linked to any KOG category.

**Regions.** Previous studies showed that gene body methylation could play a major role in gene expression in bees.<sup>23,50</sup> In order to examine this hypothesis in *D. magna*, an identification of genes associated with observed DMCs or DMRs and their corresponding biological functions (KOG categories) was carried out when possible (Figure 3, Tables S3–S6). The most represented biological functions across all dose rates and generations were associated with signal transduction (KOG category T), protein modification and turnover (KOG category O), transcription (KOG category K), RNA processing and modification (KOG category A), cytoskeleton (KOG category Z), and translation (KOG category J). These observations were consistent with previous findings that these gene families were involved in the cellular response to ionizing radiation.<sup>51</sup>

A few genes with DMCs identified in generation F0 (irradiated across life cycle) were previously involved in radiological stress in in vitro and in vivo studies in humans or rodents. Two of these genes, with common DMCs to both dose rates, coded respectively for a X-box-binding protein (Dapma7bEVm007629t1), which was associated with endoplasmic reticulum (ER) stress following irradiation<sup>52</sup> and with cell death,<sup>53</sup> and for an anaphase-promoting complex subunit (Dapma7bEVm003591t1), which was downregulated after irradiation to delay mitosis of damaged cells.<sup>54</sup> One of the genes with DMCs detected at 6.5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  coded for a Clip-

domain serine protease (Dapma7bEVm005724t1). Serine proteases were involved in radiation-induced apoptosis in human cells,<sup>55</sup> although Clip-domain serine proteases might have a different function in arthropods (immune responses).<sup>56</sup> In addition, a gene homologous to methyl-CpG-binding domain protein 3 (Dapma7bEVm006374t1), which binds differentially depending on methylation status,<sup>57</sup> was hypo-methylated at 41.3  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  in generation F0. Complementary studies [with mRNAseq analyses and DNA methyltransferase (DNMT) activity assays, for example] are needed in *D. magna* in order to understand the molecular mechanisms leading to hypo- or hypermethylation and determine the consequences of gene body methylation changes for gene expression.

**3.5. Methylation Changes across Generations.** The hypothesis that CpG methylation status was transmitted across generations was investigated by comparing DMC identities and methylation levels among generations. In order to remain cautious with interpretation of DMCs, it is important to note that some of the detected methylation changes were also detected as DMCs in the control across generations (representing 30%, 25%, and 24% of total DMCs detected in generations F0, F2, and F3, respectively). These DMCs might result from changes in unexposed daphnids and might not reflect a response to radiation exposure.

The comparison of DMC identities (Figure 4) showed that the total number of common DMCs was smallest (one

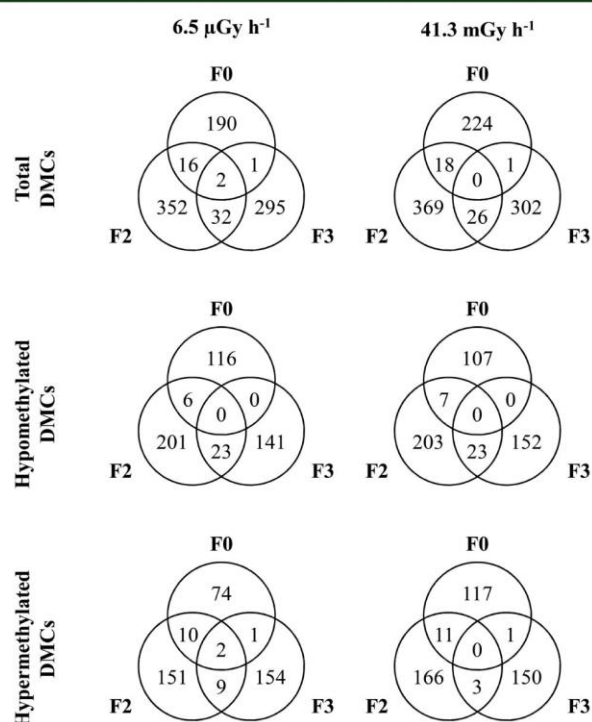


Figure 4. Venn diagrams for hypomethylated, hypermethylated, and total DMCs, showing numbers of common DMCs among generations F0, F2, and F3 in the 6.5 µGy·h<sup>-1</sup> and 41.3 mGy·h<sup>-1</sup> treatments.

independent of dose rate) between generations F0 and F3. This number was greater (18 independent of dose rate) between generations F0 and F2. A large proportion of methylation changes observed in generation F0 after  $\gamma$  irradiation were induced in somatic cells. These changes could not be transferred through the germline and were thus absent from subsequent generations.<sup>58</sup> This could explain why generation F0 shared comparatively fewer similarities with other generations. Beside this, few methylation changes (two hypermethylated DMCs) were common to generations F0, F2, and F3 (Figure 4), showing that changes induced in the germline were possibly transferred across generations.

The total number of common DMCs was greatest between generations F2 and F3, ranging from 26 to 34, depending on dose rate (Figure 4). A large proportion (23 out of 26 or 34) of these DMCs in common between generations F2 and F3 were hypomethylated. A majority of these hypomethylated DMCs (16 out of 26) were also shared between dose rates. Finally, the comparison of DMC methylation levels of DMCs detected in gene bodies (Figure 5) showed that common DMCs most often had similar methylation levels between generations F2 and F3. These observations strongly suggested that methylation changes (induced in the gametes of F1 during irradiation) could potentially be transmitted to generations F2 and F3, particularly in the case of hypomethylation. One could hypothesize that hypomethylated CpGs might contribute to the genomic instability observed in *D. magna*.<sup>29</sup> Hypomethylation is often associated with genomic instability in vertebrates,<sup>59</sup> although a similar mechanism was not confirmed in invertebrates.<sup>19,60</sup> One can also wonder whether the transmission of radiation-induced methylation changes is

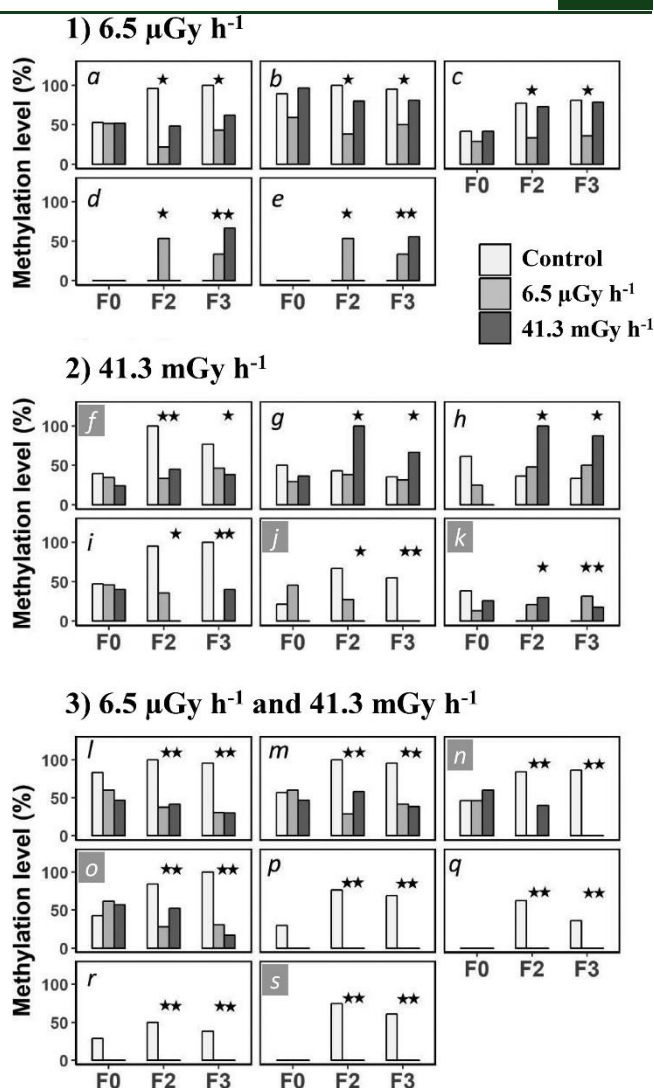


Figure 5. Changes in methylation level (%) across generations F0, F2, and F3 for CpGs located in gene bodies and corresponding to common DMCs between generation F2 and F3, at (a–e) 6.5 µGy·h<sup>-1</sup>, (f–k) 41.3 mGy·h<sup>-1</sup>, or (l–s) both 6.5 µGy·h<sup>-1</sup> and 41.3 mGy·h<sup>-1</sup>. DMCs are marked with a star. Letters with gray shading indicate that CpGs are also detected as DMCs across generations in the control. Corresponding gene codes: (a) Dapma7bEVm643574t1, (b) Dapma7bEVm006642t1, (c) Dapma7bEVm005020t1, (d, e) Dapma7-bEVm000594t1, (f) Dapma7bEVm007421t1, (g, h) Dapma7-bEVm008419t1, (i) Dapma7bEVm004647t1, (j) Dapma7-bEVm637841t1, (k) Dapma7bEVm005882t1, (l, m) Dapma7-b E V m 6 3 6 2 0 7 t 1, (n, o) D a p m a 7 b E V m 0 0 1 6 6 4 t 1, (p) Dapma7bEVm004770t1, (q, r) Dapma7bEVm004226t1, and (s) Dapma7bEVm001898t1.

limited to parthenogenetic reproduction and whether a similar observation would be possible across generations of sexually reproducing *D. magna*. The generalization of the phenomenon to other species is an important question that needs further investigation. Inheritance of epigenetic marks is expected to be limited in rodents, where most DNA methylation marks are erased after fertilization,<sup>61</sup> in contrast to other vertebrates like zebrafish, where no epigenetic erasure occurs during development.<sup>62,63</sup>

Interestingly, genes among those with common DMCs between generations F2 and F3 (Table S6) included those coding for proteins previously associated with radiation

exposure. A 60S ribosomal protein, L28 (Dapma7-bEVm004770t1; [Figure 5p](#)), involved in translation regulation was involved in a radio-induced dysregulation of gene expression observed in vivo in developing murine heart.<sup>64</sup> A 70 kDa heat-shock protein (Hsp70) (Dapma7bEVm636207t1; [Figure 5l,m](#)), involved in cellular responses to various stresses, protein stability, and prevention of cell death,<sup>65</sup> was upregulated after exposure to ionizing radiation<sup>66</sup> and was linked to an adaptive response.<sup>67,68</sup> The association of this gene with common DMCs between generations F2 and F3 might suggest that *D. magna* can develop a resistance to radiation. This resistance ability was supported by fecundity results in daphnids during  $\gamma$  irradiation across generations F0 and F1.<sup>29</sup>

### 3.6. Effects on Survival, Growth, and Reproduction.

Our study finally tested whether methylation changes were associated with biological effects at the organism level. In generation F0, a significant reduction in fecundity ([Figure S2](#)) was observed at the highest tested dose rate only (41.3 mGy·h<sup>-1</sup>). This reduction occurred as early as brood 2 and reached 17% over the five broods ( $p \leq 0.05$ ). No radiation effect was observed on survival and growth in body size at any dose rate in this generation (data not shown). These results were in agreement with previous results obtained with *D. magna* and with other studies in the marine polychaete *Ophryotrocha*<sup>29,69</sup> *diadema* and the terrestrial oligochaete *Eisenia fetida*, showing that  $\gamma$  radiation induced reprotoxicity at dose rates ranging from 0.19 to 43 mGy·h<sup>-1</sup> in the first exposed generation.<sup>70–72</sup> A slight effect on growth was previously reported in generation F0 at 35.4 mGy·h<sup>-1</sup>.<sup>29</sup> This was not observed in our study, possibly due to relatively greater individual variability.

In our study, no radiation effect was observed on survival, growth, or reproduction at any dose rate in generations F1, F2, and F3 (data not shown). These results were in agreement with those in *Caenorhabditis elegans*<sup>73</sup> showing that fecundity in unexposed generation F1 after a parental irradiation (F0) did not differ from the control up to 42.7 mGy·h<sup>-1</sup>. In our study, the transmitted methylation changes that we observed from generation F2 to F3 could not easily be linked to any specific phenotype at the organismal level. Despite the absence of significant macroscopic effects in recovering offspring generations, methylation changes remained good candidates as biomarkers of a parental exposure to  $\gamma$  radiation. One can hypothesize that the  $\gamma$  irradiation conducted in our experiment was not sufficient (in dose rate or duration) to accumulate an amount of methylation changes that would lead to detectable effects in the unexposed generation F3. This cumulative mechanism was well-described<sup>58</sup> and was also suggested in studies showing that radiation effects at the organism level increased in intensity over successive exposed generations.<sup>29,70,72,73</sup> In the future, extending irradiation over a larger number of generations ( $N = 2$  or more) and investigating epigenetic changes and their inheritance and potential phenotypic consequences in unexposed generations  $N + 2$  and  $N + 3$  would be interesting.<sup>74</sup>

## ASSOCIATED CONTENT

### \* Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the [ACS Publications website](#) at DOI: [10.1021/acs.est.7b05695](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05695).

Additional text describing composition of M4 medium, sequencing of DNA samples, DNA quality assessment and mapping, and effects on survival, growth, and reproduction; six tables listing dose rates delivered to *D. magna*, summary statistics of 100-bp paired-end reads generated by WGBS, detected DMRs, and genes with DMCs in generation F2 but not F3, in generation F3 but not in F2, and in both

generations F2 and F3; two figures showing average CpG methylation levels in whole genome and in different genomic features and cumulative production of neonates per daphnid as a function of age ([PDF](#))

## AUTHOR INFORMATION

### ORCID

Jana Aşselman: [0000-0003-0185-6516](https://orcid.org/0000-0003-0185-6516)

Frederic Alonzo: [0000-0002-7526-8058](https://orcid.org/0000-0002-7526-8058)

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## REFERENCES

- Garnier-Laplace, J.; Geras'kin, S.; Della-Vedova, C.; Beaugelin-Seiller, K.; Hinton, T. G.; Real, A.; Oudalova, A. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. *J. Environ. Radioact.* 2013, 121, 12–21.
- Reisz, J. A.; Bansal, N.; Qian, J.; Zhao, W.; Furdui, C. M. Effects of ionizing radiation on biological molecules mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid. Redox Signaling* 2014, 21 (2), 260–292.
- Kubota, Y.; Shimada, A.; Shima, A. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 330–334.
- Luke, G. A.; Riches, A. C.; Bryant, P. E. Genomic instability in haematopoietic cells of F1 generation mice of irradiated male parents. *Mutagenesis* 1997, 12 (3), 147–152.
- Dubrova, Y. E.; Jeffreys, A. J.; Malashenko, A. M. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. *Nat. Genet.* 1993, 5 (1), 92–94.
- Shimada, A.; Shima, A. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2004, 552 (1), 119–124.
- Barber, R. C.; Hickenbotham, P.; Hatch, T.; Kelly, D.; Topchiy, N.; Almeida, G. M.; Jones, G. D.; Johnson, G.; Parry, J.; Rothkamm, K.; Dubrova, Y. E. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 2006, 25 (56), 7336.
- Dubrova, Y. E.; Plumb, M.; Gutierrez, B.; Boulton, E.; Jeffreys, A. J. Genome stability: Transgenerational mutation by radiation. *Nature* 2000, 405 (6782), 37–37.
- Russo, V. E.; Martienssen, R. A.; Riggs, A. D. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1996.
- Daxinger, L.; Whitelaw, E. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.* 2010, 20 (12), 1623–1628.
- Youngson, N. A.; Whitelaw, E. Transgenerational epigenetic effects. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2008, 9, 233–257.
- Kovalchuk, O.; Burke, P.; Arkhipov, A.; Kuchma, N.; James, S. J.; Kovalchuk, I.; Pogribny, I. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl: a mechanism for radiation adaptation? *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2003, 529 (1–2), 13–20.
- Kovalchuk, I.; Abramov, V.; Pogribny, I.; Kovalchuk, O. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. *Plant Physiol.* 2004, 135 (1), 357–363.
- Gombéau, K. Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez les organismes exposés à faibles niveaux de substances radioactives; Université Provence - Aix-Marseille I, 2015; [www.theses.fr/2015AIXM4391.pdf](http://www.theses.fr/2015AIXM4391.pdf).

- (15) Tawa, R.; Kimura, Y.; Komura, J.-I.; Miyamura, Y.; Kurishita, A.; Sasaki, M. S.; Sakurai, H.; Ono, T. Effects of X-ray Irradiation on Genomic DNA Methylation Levels in Mouse Tissues. *J. Radiat. Res.* 1998, 39 (4), 271–278.
- (16) Koturbash, I.; Baker, M.; Loree, J.; Kutanzi, K.; Hudson, D.; Pogribny, I.; Sedelnikova, O.; Bonner, W.; Kovalchuk, O. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* 2006, 66 (2), 327–330.
- (17) Pogribny, I.; Raiche, J.; Slovack, M.; Kovalchuk, O. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 320 (4), 1253–1261.
- (18) Kovalchuk, O.; Burke, P.; Besplug, J.; Slovack, M.; Filkowski, J.; Pogribny, I. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2004, 548 (1–2), 75–84.
- (19) Zemach, A.; McDaniel, I. E.; Silva, P.; Zilberman, D. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science* 2010, 328 (5980), 916–919.
- (20) Smith, Z. D.; Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 2013, 14 (3), 204.
- (21) Li, E.; Beard, C.; Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993, 366 (6453), 362–365.
- (22) Regev, A.; Lamb, M. J.; Jablonka, E. The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation or genome defense? *Mol. Biol. Evol.* 1998, 15 (7), 880–891.
- (23) Elango, N.; Hunt, B. G.; Goodisman, M. A. D.; Yi, S. V. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106 (27), 11206–11211.
- (24) Lou, S.; Lee, H.-M.; Qin, H.; Li, J.-W.; Gao, Z.; Liu, X.; Chan, L. L.; KL Lam, V.; So, W.-Y.; Wang, Y.; et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biol.* 2014, 15 (7), No. 408, DOI: [10.1186/s13059-014-0408-0](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0408-0).
- (25) Skinner, M. K. What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reprod. Toxicol.* 2008, 25 (1), 2–6.
- (26) Sagawa, K.; Yamagata, H.; Shiga, Y. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. *Gene Expression Patterns* 2005, 5 (5), 669–678.
- (27) Asselman, J.; De Coninck, D. I.; Vandegehuchte, M. B.; Jansen, M.; Decaestecker, E.; De Meester, L.; Vanden Bussche, J.; Vanhaecke, L.; Janssen, C. R.; De Schampelaere, K. A. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environ. Toxicol. Chem.* 2015, 34 (5), 1056–1061.
- (28) Vandegehuchte, M. B.; Lemiere, F.; Vanhaecke, L.; Vanden Berghe, W.; Janssen, C. R. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2010, 151 (3), 278–285.
- (29) Parisot, F.; Bourdineaud, J.-P.; Plaire, D.; Adam-Guillermin, C.; Alonzo, F. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 2015, 163 (0), 27–36.
- (30) Asselman, J.; De Coninck, D. I.; Pfrender, M. E.; De Schampelaere, K. A. Gene Body Methylation Patterns in *Daphnia* Are Associated with Gene Family Size. *Genome Biol. Evol.* 2016, 8 (4), 1185–1196.
- (31) Daca-Rozsak, P.; Pfeifer, A.; Zebracka-Gala, J.; Rusinek, D.; Szybińska, A.; Jarzab, B.; Witt, M.; Ziętkiewicz, E. Impact of SNPs on methylation readouts by Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array: implications for comparative population studies. *BMC Genomics* 2015, 16, No. 1003, DOI: [10.1186/s12864-015-2202-0](https://doi.org/10.1186/s12864-015-2202-0).
- (32) Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetic parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011, 27 (21), 2987–2993.
- (33) Krueger, F.; Andrews, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 2011, 27 (11), 1571–1572.
- (34) Bonasio, R.; Li, Q.; Lian, J.; Mutti, N. S.; Jin, L.; Zhao, H.; Zhang, P.; Wen, P.; Xiang, H.; Ding, Y.; et al. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr. Biol.* 2012, 22 (19), 1755–1764.
- (35) Huh, I.; Wu, X.; Park, T.; Yi, S. V. Detecting differential DNA methylation from sequencing of bisulfite converted DNA of diverse species. *Briefings Bioinf.* 2017, No. bbx077, DOI: [10.1093/bib/bbx077](https://doi.org/10.1093/bib/bbx077).
- (36) Feng, H.; Conneely, K. N.; Wu, H. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42 (8), e69–e69.
- (37) Wu, H.; Xu, T.; Feng, H.; Chen, L.; Li, B.; Yao, B.; Qin, Z.; Jin, P.; Conneely, K. N. Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (21), e141.
- (38) Orsini, L.; Gilbert, D.; Podicheti, R.; Jansen, M.; Brown, J. B.; Solari, O. S.; Spanier, K. I.; Colbourne, J. K.; Rusch, D. B.; Decaestecker, E.; et al. *Daphnia magna* transcriptome by RNA-seq across 12 environmental stressors. *Sci. Data* 2017, 4, No. 170006, DOI: [10.1038/sdata.2017.6](https://doi.org/10.1038/sdata.2017.6).
- (39) Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc., Ser. B: Methodol.* 1995, 57 (1), 289–300.
- (40) Tatusov, R. L.; Fedorova, N. D.; Jackson, J. D.; Jacobs, A. R.; Kiryutin, B.; Koonin, E. V.; Krylov, D. M.; Mazumder, R.; Mekhedov, S. L.; Nikolskaya, A. N.; et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinf.* 2003, 4, 41–41.
- (41) Vandegehuchte, M. B.; Lemiere, F.; Janssen, C. R. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2009, 150 (3), 343–348.
- (42) Glastad, K.; Hunt, B.; Yi, S.; Goodisman, M. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.* 2011, 20 (5), 553–565.
- (43) Asselman, J.; De Coninck, D. I. M.; Beert, E.; Janssen, C. R.; Orsini, L.; Pfrender, M. E.; Decaestecker, E.; De Schampelaere, K. A. C. Bisulfite Sequencing with *Daphnia* Highlights a Role for Epigenetics in Regulating Stress Response to *Microcystis* through Preferential Differential Methylation of Serine and Threonine Amino Acids. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51 (2), 924–931.
- (44) Suzuki, M. M.; Kerr, A. R.; De Sousa, D.; Bird, A. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Res.* 2007, 17 (5), 625–631.
- (45) Flores, K.; Wolschin, F.; Comevaux, J. J.; Allen, A. N.; Huentelman, M. J.; Amdam, G. V. Genome-wide association between DNA methylation and alternative splicing in an invertebrate. *BMC Genomics* 2012, 13 (1), 480.
- (46) Song, K.; Li, L.; Zhang, G. The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 2017, 12 (9), e0185224.
- (47) Park, J.; Peng, Z.; Zeng, J.; Elango, N.; Park, T.; Wheeler, D.; Werren, J. H.; Yi, S. V. Comparative Analyses of DNA Methylation and Sequence Evolution Using *Nasonia* Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28 (12), 3345–3354.
- (48) Nzabarushimana, E.; Mioussé, I. R.; Shao, L.; Chang, J.; Allen, A. R.; Turner, J.; Stewart, B.; Raber, J.; Koturbash, I. Long-term epigenetic effects of exposure to low doses of <sup>56</sup>Fe in the mouse lung. *J. Radiat. Res.* 2014, 55 (4), 823–828.
- (49) Kalinich, J. F.; Catravas, G. N.; Snyder, S. L. The effect of  $\gamma$  radiation on DNA methylation. *Radiat. Res.* 1989, 117 (2), 185–197.
- (50) Foret, S.; Kucharski, R.; Pittelkow, Y.; Lockett, G. A.; Maleszka, R. Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics* 2009, 10 (1), 472.

- (51) Sakamoto-Hojo, E. T.; Mello, S. S.; Pereira, E.; Fachin, A. L.; Cardoso, R. S.; Junta, C. M.; Sandrin-Garcia, P.; Donadi, E. A.; Passos, G. A. S. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 2003, 544 (2–3), 403–413.
- (52) Zhang, B.; Wang, Y.; Pang, X.; Su, Y.; Ai, G.; Wang, T. ER stress induced by ionizing radiation in IEC-6 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2010, 86 (6), 429–435.
- (53) Çetinkaya, S.; GülDursun, H. Cell Life and Death Decision in Endoplasmic Reticulum Stress. *Sakarya Med. J.* 2016, 6, 56–63.
- (54) Zhou, P.-K.; Rigaud, O. Down-Regulation of the Human CDC16 Gene after Exposure to Ionizing Radiation: A Possible Role in the Radioadaptive Response. *Radiat. Res.* 2001, 155 (1), 43–49.
- (55) Gong, B.; Chen, Q.; Endlich, B.; Mazumder, S.; Almasan, A. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ.* 1999, 10(7), 491–502.
- (56) Kanost, M. R.; Jiang, H. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 11, 47–55.
- (57) Du, Q.; Luu, P.-L.; Stirzaker, C.; Clark, S. J. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* 2015, 7 (6), 1051–1073.
- (58) Jablonka, E.; Raz, G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 2009, 84 (2), 131–176.
- (59) Putiri, E. L.; Robertson, K. D. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin. Epigenet.* 2011, 2 (2), 299–314.
- (60) Feng, S.; Cokus, S. J.; Zhang, X.; Chen, P.-Y.; Bostick, M.; Goll, M. G.; Hetzel, J.; Jain, J.; Strauss, S. H.; Halpern, M. E.; et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, 107 (19), 8689–8694.
- (61) Seisenberger, S.; Peat, J. R.; Hore, T. A.; Santos, F.; Dean, W.; Reik, W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos. Trans. R. Soc., B* 2013, 368 (1609), No. 20110330.
- (62) Hackett, J. A.; Surani, M. A. Beyond DNA: Programming and Inheritance of Parental Methylomes. *Cell* 2013, 153 (4), 737–739.
- (63) Potok, M. E.; Nix, D. A.; Parnell, T. J.; Cairns, B. R. Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Cell* 2013, 153 (4), 759–772.
- (64) Bakshi, M. V.; Barjaktarovic, Z.; Azimzadeh, O.; Kempf, S. J.; Merl, J.; Hauck, S. M.; Eriksson, P.; Buratovic, S.; Atkinson, M. J.; Tapio, S. Long-term effects of acute low-dose ionizing radiation on the neonatal mouse heart: a proteomic study. *Radiat. Environ. Biophys.* 2013, 52 (4), 451–461.
- (65) Lee, S.-J.; Choi, S.-A.; Lee, K.-H.; Chung, H.-Y.; Kim, T.-H.; Cho, C.-K.; Lee, Y.-S. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress Chaperones* 2001, 6 (3), 273–281.
- (66) Landis, G.; Shen, J.; Tower, J. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging* 2012, 4 (11), 768–789.
- (67) Park, S. H.; Lee, S. J.; Chung, H. Y.; Kim, T. H.; Cho, C. K.; Yoo, S. Y.; Lee, Y. S. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.* 2000, 153 (3), 318–326.
- (68) Lee, Y.-J.; Park, G.-H.; Cho, H.-N.; Cho, C.-K.; Park, Y.-M.; Lee, S.-J.; Lee, Y.-S. Induction of adaptive response by low-dose radiation in RIF cells transfected with Hspb1 (Hsp25) or inducible Hspa (Hsp70). *Radiat. Res.* 2002, 157 (4), 371–377.
- (69) Gilbin, R.; Alonzo, F.; Garnier-Laplace, J. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J. Environ. Radioact.* 2008, 99 (1), 134–145.
- (70) Knowles, J.; Greenwood, L. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *Mar. Environ. Res.* 1994, 38 (3), 207–224.
- (71) Hertel-Aas, T.; Brunborg, G.; Jaworska, A.; Salbu, B.; Oughton, D. H. Effects of different gamma exposure regimes on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Sci. Total Environ.* 2011, 412–413 (0), 138–147.
- (72) Hertel-Aas, T.; Oughton, D. H.; Jaworska, A.; Bjerke, H.; Salbu, B.; Brunborg, G. Effects of Chronic Gamma Irradiation on Reproduction in the Earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiat. Res.* 2007, 168 (5), 515–526.
- (73) Buisset-Goussen, A.; Goussen, B.; Della-Vedova, C.; Galas, S.; Adam-Guillermin, C.; Lecomte-Pradines, C. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *J. Environ. Radioact.* 2014, 137 (0), 190–197.
- (74) Mirbahai, L.; Chipman, J. K. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014, 764–765 (0), 10–17.

## Résumé

Les écosystèmes aquatiques et terrestre sont exposés aux radionucléides lors de rejets planifiés ou accidentels, en grande partie liés à leur utilisation dans les centrales nucléaires de production d'électricité. Afin de protéger durablement ces écosystèmes et leur fonctionnement, il est nécessaire d'évaluer l'impact de leur exposition aux radiations ionisantes sur le long terme. La sensibilité des organismes pouvant varier au fil des générations, l'évaluation des effets des radiations ionisantes sur des échelles multigénérationnelles est essentielle. Dans ce contexte, ce travail de doctorat a visé à améliorer la caractérisation des processus moléculaires et la prédiction des effets transgénérationnels lors d'une exposition aux radiations gamma. Afin de répondre à cet objectif, deux approches, l'une expérimentale et l'autre basée sur la modélisation, ont été mises en place. La première approche concerne l'étude des processus épigénétiques, c'est-à-dire des mécanismes régulant l'activité des gènes sans modification de la séquence d'ADN elle-même, de leurs modifications transgénérationnelles radio-induites, pouvant perdurer dans la progéniture après une irradiation parentale, et du lien entre ces modifications épigénétiques et la radiotoxicité à l'échelle de l'organisme. Pour cela, le micro-crustacé *Daphnia magna* a été exposé aux radiations gamma externe ( $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  et  $41.3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) pendant 25 jours (génération F0). Une évaluation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction a été réalisée sur la génération F0 et chez sa descendance, à savoir la génération F1, exposée au stade d'embryon, la génération F2, exposée au stade de cellule germinale et la génération F3, première génération non-exposée. Les résultats ont montré une réduction de la fécondité en F0, mais aucun effet à l'échelle de l'organisme en générations F1, F2 et F3. Une analyse des modifications épigénétiques a été conduite dans les générations F0, F2 et F3, à l'aide du séquençage bisulfite sur le génome entier. Grâce à cette technique, des modifications significatives de la méthylation de l'ADN ont été détectées à l'échelle du nucléotide dans toutes les générations, indépendamment du débit de dose. Certaines de ces modifications sont communes aux débits de dose et/ou aux générations. Les gènes concernés par ces modifications de la méthylation sont en partie associés à des fonctions déjà connues pour être impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes. Les modifications de la méthylation communes aux générations F2 et F3 démontrent clairement que certaines modifications épigénétiques peuvent être transmises par la lignée germinale vers les générations non-exposées. Dans la seconde approche, la modélisation avait pour objectif d'analyser les effets des radiations gamma sur la croissance et la reproduction de *D. magna* à l'échelle de plusieurs générations. Un modèle mécaniste, le DEBtox (Budget Energétique Dynamique appliqué à la toxicologie), a été modifié pour inclure des compartiments de dommage, dont le niveau peut être hérité d'une génération à la suivante. Le modèle a été ajusté aux données avec des méthodes d'inférence bayésienne afin d'estimer les paramètres tout en tenant compte des incertitudes qui leur sont associées. Nos résultats ont montré que ce modèle permet une bonne description de données acquises lors d'études multigénérationnelles. Toutefois, les incertitudes associées aux paramètres contrôlant la cinétique d'accumulation des dommages et l'apparition des effets, soulignent la nécessité de préciser davantage la nature des mécanismes moléculaires et métaboliques sous-jacents, afin de garantir une meilleure prédiction de l'évolution des effets sur le long terme.

Mots-clefs : irradiation gamma, effets transgénérationnels, modifications épigénétiques, méthylation de l'ADN, DEBtox, *Daphnia magna*

Aquatic and terrestrial ecosystems are exposed to radionuclides during planned or accidental releases, mainly linked to their use in nuclear power plants. In this context, the protection of ecosystems and their functioning requires that the impact of long-term exposure to ionizing radiation is assessed. Because radiosensitivity of organisms can vary from one generation to another, effects of ionizing radiation must be studied on a multigenerational scale. The aim of this PhD is to improve the characterization of molecular processes and the prediction of transgenerational effects during a gamma irradiation. In order to do so, an experimental approach and a modelling approach were carried out. First, the experimental approach investigated on epigenetic processes, i.e. mechanisms that regulate gene expression without changing DNA sequence itself, on their radio-induced transgenerational modifications, that might persist in the progeny after a parental irradiation, and on the link between these epigenetic modifications and radiotoxicity at organism scale. In this aim, the crustacean *Daphnia magna* was exposed to external gamma radiation ( $6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $41.3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) for 25 days (generation F0). Effects on survival, growth and reproduction were estimated in generation F0 and in its progeny, namely generation F1, exposed as embryonic stage, generation F2, exposed as germ cell and generation F3, the first truly unexposed generation. Results showed a decrease in fecundity in F0 and no effect at the organism scale in generations F1, F2 and F3. Epigenetic modifications were analyzed in generations F0, F2 and F3, using whole genome bisulfite sequencing. Significant changes in DNA methylation were detected at the nucleotide level in all generations independent of dose rate. Some of these changes were shared among dose rates and/or among generations. Associated gene functions included gene families and genes that were previously shown to play roles during exposure to ionizing radiation. Common methylation changes detected between generations F2 and F3 clearly showed that some epigenetic modifications could be transmitted through the germline to unexposed generations. Second, the modelling approach aimed to analyze effects of gamma radiation on *D. magna* growth and reproduction over several generations. A mechanistic model, the DEBtox (Dynamic Energy Budget model applied to toxicology), was modified in order to include damage compartments, with damage levels that were transmitted from one generation to the next. The model was fitted to data using Bayesian inference methods, in order to estimate the parameters while considering their associated uncertainty. Results showed that this model could provide a good description of data obtained during multigenerational studies. However, the uncertainties associated with parameters driving the damage kinetics and the onset of effects, highlighted the necessity to clarify further the nature of underlying molecular and metabolic mechanisms, in order to improve the prediction of changes in gamma radiation effects on the long term.

Key words: gamma irradiation, transgenerational effects, epigenetic modification, DNA methylation, DEBtox, *Daphnia magna*