

THESE - UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Ecole Doctorale
ED 251 Sciences de l'environnement

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

Spécialité
Océanographie

**Etude 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**

Par
Delphine Plaire

Thèse dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo
Soutenance publique prévue le 12 décembre 2013

Devant le jury d'examen composé de :

Pr. Awadhesh Jha	Professeur Université Plymouth	Rapporteur
Pr. Bernard Clément	Enseignant-Chercheur ENTPE	Rapporteur
Dr. Elise Billoir	Chercheur Pôle Ecotox Rovaltain	Examinateur
Dr. François Carlotti	Directeur de recherche au CNRS	Examinateur
Pr. Jean-Paul Bourdineaud	Professeur Université Bordeaux I	Examinateur
Pr. Jean-Christophe Poggiale	Professeur Université Aix Marseille	Directeur de thèse
Dr. Frédéric Alonzo	Chercheur IRSN	Tuteur de thèse

SOMMAIRE

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux	11
Liste des annexes.....	14
Glossaire	15
Introduction.....	17

PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM

1. Propriétés physico-chimiques	25
1.1. Propriétés chimiques	25
1.2. Propriétés nucléaires.....	25
1.2.1. L'uranium naturel	25
1.2.2. L'uranium appauvri	27
2. L'uranium dans l'environnement : origine et concentration	27
2.1. Origine et distribution naturelle	28
2.1.1. L'uranium dans les écosystèmes terrestres	28
2.1.2. L'uranium dans les écosystèmes aquatiques	28
2.2. Applications et impact anthropiques	29
3. La contamination à l'uranium	32
3.1. Spéciation et biodisponibilité de l'uranium	32
3.1.1. En milieu terrestre	32
3.1.2. En milieu aquatique.....	32
3.2. Bioaccumulation	33
4. La toxicité de l'uranium	34
4.1. Les mécanismes de toxicité.....	34
4.2. Les effets biologiques de l'uranium	35
4.2.1. Les interactions au niveau sub-cellulaire	35
4.2.1.1. Les effets de l'uranium sur le stress oxydant	35

4.2.1.2. La génotoxicité de l'uranium	36
4.2.2. Altérations histologiques.....	37
4.2.3. Effets à l'échelle de l'individu : altérations des traits d'histoire de vie.....	38
4.2.3.1. Toxicité aigüe	38
4.2.3.2. Toxicité chronique	39

CHAPITRE 2 : ETUDE TOXICOLOGIQUE CHEZ *DAPHNIA MAGNA*

1. Le modèle biologique de l'étude	41
1.1. Biologie de la daphnie	41
1.1.1. Morphologie	41
1.1.2. Habitat	42
1.1.3. Nutrition	42
1.1.4. Système circulatoire	43
1.1.5. Système nerveux	43
1.2. Cycle de vie de la daphnie	43
1.2.1. Cycle de vie asexué	43
1.2.2. Cycle de vie sexué	44
2. Etudes toxicologiques chez <i>Daphnia magna</i>	45
2.1. Effets sur l'histoire de vie.....	45
2.1.1. Effets sur la croissance et la reproduction	45
2.1.2. Sensibilités comparées des différents stades de vie	46
2.1.3. Effets transgénérationnels	46
2.1.4. Effets induits par l'exposition maternelle	47
2.2. Effets sur le métabolisme énergétique	47
2.2.1. L'allocation d'énergie cellulaire	48
2.2.2. La charge énergétique en adénylate (CEA)	48
2.2.3. Les réserves énergétiques	48
2.2.4. L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR).....	49
2.2.5. Influence des conditions de nutrition.....	49
2.3. Effets aux niveaux cellulaire et sub-cellulaire	50
2.3.1. Effets sur le stress oxydant.....	50
2.3.2. Etude des atteintes moléculaires	51

CHAPITRE 3 : CHOIX D'UN BIOMARQUEUR MOLECULAIRE : LA RAPD

1. Les biomarqueurs	53
1.1. Généralités.....	53
1.2. Utilisation des biomarqueurs	54
2. La géotoxicité en écologie	55
2.1. Les modifications de l'ADN.....	55
2.1.1. Les altérations de l'ADN	55
2.1.2. Les voies de réparation de l'ADN.....	59
2.2. Les différentes mesures de géotoxicité des lésions primaires de l'ADN.....	60
2.2.1. La détection des adduits.....	60
2.2.2. La détection des cassures simple et double brin	60
2.3. Biomarqueur de géotoxicité retenu dans notre étude : la RAPD	62

PARTIE B : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 4 : DEMARCHE EXPERIMENTALE

1. Conditions d'élevage de daphnies en laboratoire	67
2. Exposition à l'uranium	68
3. Dispositifs expérimentaux	68
3.1. Etude préliminaire : détermination des concentrations d'exposition	68
3.2. Etude transgénérationnelle des effets de l'uranium appauvri chez la daphnie	71
3.2.1. Exposition continue	71
3.2.2. Exposition post-éclosion	71
3.2.3. Exposition embryonnaire.....	72
4. Mesure des effets de l'uranium	73
4.1. Survie et reproduction	73
4.2. Croissance somatique en taille et en masse	73
4.3. Bioaccumulation de l'uranium dans l'organisme	73
4.4. Quantification des dommages à l'ADN	73
4.4.1. Extraction de l'ADN	74
4.4.2. Sélection des amorces.....	74

4.4.3. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD)	74
4.4.4. Analyse des produits PCR	75
4.5. Suivi des concentrations en ions majeurs et en uranium	77
5. Analyses statistiques	78

CHAPITRE 5 : APPLICATION DU MODELE DEBTOX

1. Etude des modes d'action métaboliques à l'aide d'un modèle DEBtox	79
1.1. La théorie de Dynamique de Budget Energétique (DEB) : généralités et avantages	79
1.2. Le modèle DEB en présence d'un polluant : le DEBtox	81
1.3. Le DEBtox appliqué au cas de l'uranium dans un contexte multigénération	85
2. Choix des hypothèses du modèle	86
2.1. Développement d'un modèle DEBtox à deux facteurs de stress	86
2.2. Hypothèses sur le(s) mode(s) d'action	87
2.3. Formulation des équations	87
2.4. Scénarios d'exposition	89
2.5. Hypothèses cinétiques	89
3. Ajustements de la croissance et de la reproduction	90
3.1. Méthode employée pour la réalisation des ajustements	90
3.2. Critère d'ajustement	91

PARTIE C : Résultats et discussion

CHAPITRE 6 : RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Exposition continue de daphnies à de l'uranium appauvri	95
1.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs	95
1.2. Survie	96
1.3. Croissance somatique en taille	97
1.4. Masse somatique	97
1.5. Reproduction	99
1.6. Altérations de l'ADN	100
1.6.1. Sélection des amorces discriminantes	100
1.6.2. Analyses des effets génotoxiques de l'uranium	101

2. Exposition à partir de l'éclosion de daphnies à de l'uranium appauvri	105
2.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs	105
2.2. Survie	106
2.3. Croissance somatique en taille	106
2.4. Masse somatique	108
2.5. Reproduction	109
2.6. Altérations de l'ADN.....	110
3. Exposition pendant le stade embryonnaire de daphnies à de l'uranium appauvri	114
3.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs	114
3.2. Survie	114
3.3. Croissance somatique en taille	115
3.4. Masse somatique	117
3.5. Reproduction	117
3.6. Altérations de l'ADN.....	118

CHAPITRE 7 : RESULTATS DE MODELISATION

1. Ajustement des paramètres physiologiques	123
2. Comparaison des ajustements	124
3. Coubes de croissance et de reproduction	125
4. Facteurs de stress.....	132
5. Ajustement des paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques et implications	139

CHAPITRE 8 : DISCUSSION GENERALE

1. Etude des effets de l'uranium sur l'ADN et les traits d'histoire de vie	141
1.1. Accumulation et transmission des dommages à l'ADN au cours des générations.....	141
1.2. Augmentation des effets sur les traits d'histoire de vie au cours des générations et influence de l'exposition des œufs	142
1.3. Lien entre les dommages à l'ADN et la toxicité au niveau de l'organisme	143
1.4. Mode d'action possible induisant une augmentation de la sévérité des effets	145
2. Analyse des processus métaboliques impactés par l'uranium à l'aide d'un modèle DEBtox. 146	146
2.1. Les modes d'action de l'uranium	146
2.2. Comparaison des concentrations sans effet de l'uranium et autres paramètres du modèle	147
2.3. Améliorations du modèle	149

Conclusion générale et perspectives	151
Listes des publications et des communications	157
Références	159
Annexes	175

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Liens de génotoxicité avec les différentes réponses écotoxicologiques (Jha, 2008).....	20
Figure 2 : Chaîne de désintégration de l' ²³⁸ U/ ²³⁴ U (IRSN)	27
Figure 3 : L'uranium dans les cours d'eau en Europe (Salminen, 2005).....	29
Figure 4 : Carte des mines d'uranium présentes en France (CRIIRAD, 2009)	30
Figure 5 : Production d'uranium (tonnes) en 2011 selon les pays (données provenant de World Nuclear Association).....	31
Figure 6 : Anatomie d'une femelle adulte <i>Daphnia magna</i> (Photo d'après Zeman (2008)).....	42
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Daphnia magna</i> d'après Ebert (2005).....	44
Figure 8 : Reproduction parthénogénétique de <i>Daphnia magna</i>	44
Figure 9 : L'organisation de l'ADN avec la structure de chromatine (d'après Felsenfeld et Groudine (2003))	56
Figure 10 : Les différents types de lésions primaires de l'ADN (Cachot et Dégremont, 2009).....	57
Figure 11 : Conséquences des cassures de brin de l'ADN (Jha, 2008)	58
Figure 12 : Photographie à microscopie en épifluorescence de noyaux de cellules embryonnaires de <i>Daphnia magna</i> avec le logiciel Comet IV (X40).....	61
Figure 13 : Design expérimental de l'étude préliminaire.....	69
Figure 14 : Taille (mm) et nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations. Taille : les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Taille : différences significatives (**p<0,001 dès 2 µg.L ⁻¹ . Reproduction : différences significatives (*p<0,05) à 50 µg.L ⁻¹	70
Figure 15 : Design expérimental des expositions multigénérationnelles.....	72
Figure 16 : Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR) 75	
Figure 17 : Courbe de dissociation théorique de l'ADN	76
Figure 18 : Courbe d'amplification théorique représentant l'amplification de 2 échantillons d'ADN différents.....	77
Figure 19 : Organisation conceptuelle du métabolisme d'un organisme défini par la théorie DEB (Kooijman, 2010)	80
Figure 20 : Courbes de croissance et de reproduction théoriques. L: Taille ; L _b : Taille à la naissance ; L _p : Taille à la puberté ; L _m : Taille maximale ; r _B : Taux de croissance de von Bertalanffy ; R _{cum} : Reproduction cumulée.	81
Figure 21 : Représentation schématique de la NEC (concentration sans effet)	83

Figure 22 : Représentation schématique de la NEC illustrant les résultats obtenus dans l'étude de Massarin <i>et al.</i> (2011)	86
Figure 23 : Représentation schématique des hypothèses émises concernant les modules cinétiques. (A) : apparition immédiate des effets; (B) : cinétique lente des effets; (C) : apparition immédiate et élimination lente des effets. C_e : concentration externe ; C_i : concentration interne ; D : niveau de dommage.	90
Figure 24 : Exposition continue. Bioaccumulation de l'uranium (ng.mg^{-1} de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type, n=5. Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage.	96
Figure 25 : Exposition continue. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1).	96
Figure 26 : Exposition continue. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	97
Figure 27 : Exposition continue. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse (n=5) et les lignes aux ajustements. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	99
Figure 28 : Exposition continue. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; n=3. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	100
Figure 29 : Exposition continue. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche (n=5) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	100
Figure 30 : Exposition post-éclosion. Bioaccumulation de l'uranium (ng.mg^{-1} de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium au cours de générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type, n=5. Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage.	105
Figure 31 : Exposition post-éclosion. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1).	106
Figure 32 : Exposition post-éclosion. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	108
Figure 33 : Exposition post-éclosion. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse (n=5) et les lignes aux ajustements. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	108

- Figure 34** : Exposition post-éclosion. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; n=3. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 109
- Figure 35** : Exposition post-éclosion. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche (n=5) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 109
- Figure 36** : Exposition embryonnaire. Bioaccumulation de l'uranium ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium dans 2 générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type, n=5. Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage. 114
- Figure 37** : Exposition embryonnaire. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1). 115
- Figure 38** : Exposition embryonnaire. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 115
- Figure 39** : Exposition embryonnaire. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse (n=5) et les lignes aux ajustements. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 117
- Figure 40** : Exposition embryonnaire. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; n=3. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 117
- Figure 41** : Exposition embryonnaire. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche (n=5) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 118
- Figure 42** : Ajustement des données de masse cumulée d'œufs par femelle, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance dans la génération F0 dans le cas de dommages réversibles. Points: données observées, Ligne: prédictions du modèle .. 126
- Figure 43** : Exposition continue. Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points bleus : données observées, Ligne verte : prédictions du modèle 127
- Figure 44** : Exposition embryonnaire. Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle..... 128
- Figure 45** : Exposition post-éclosion. Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de

l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle..... 129

Figure 46 : Exposition continue pendant 3 générations successives (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle 130

Figure 47 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F1 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle..... 131

Figure 48 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F2 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle..... 132

Figure 49 : Exposition continue. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium..... 134

Figure 50 : Exposition embryonnaire. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium..... 135

Figure 51 : Exposition post-éclosion. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium..... 136

Figure 52 : Exposition continue pendant 3 générations (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium 137

Figure 53 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F1 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium 138

Figure 54 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F2 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium 139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri (Aigueperse et al., 2001)	26
Tableau 2 : Composition de l'uranium selon sa toxicité (Ribera et al., 1996).....	34
Tableau 3 : Toxicité aigüe de différentes espèces aquatiques	39
Tableau 4 : Composition des milieux M4 pH8 et pH7	68
Tableau 5 : Equations et paramètres de la taille des daphnies associée à des changements de la masse sèche des adultes et des œufs (Massarin et al., 2010).	78
Tableau 6 : Paramètres du modèle DEBtox.....	82
Tableau 7 : Equations de croissance et de reproduction du modèle DEBtox	84
Tableau 8 : Combinaison des modes d'action testées.....	87
Tableau 9 : Equations différentielles de croissance et de reproduction utilisées pour les ajustements des données au modèle DEBtox avec deux fonctions de stress σ_1 (correspond à la réduction d'assimilation relative à la concentration en uranium) et σ_2 (correspondant au niveau de dommages selon l'un des 5 modes d'action)	88
Tableau 10 : Récapitulatif des scénarios d'exposition (case grise : fin de l'expérience).....	89
Tableau 11 : Exposition continue. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.	98
Tableau 12 : Cycles seuils (C_t) après une RAPD-PCR réalisées sur l'ADN génomique de daphnies témoin en utilisant 7 amorces et 2 dilutions. >c : le C_t observé est au-dessus de celui du témoin sans ADN.....	101
Tableau 13 : Exposition continue. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.	101
Tableau 14 : Exposition continue. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.	102
Tableau 15 : Exposition continue. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux	

générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 103

Tableau 16 : Exposition continue. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 104

Tableau 17 : Exposition post-éclosion. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 107

Tableau 18 : Exposition post-éclosion. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), $n=4$. Statistiques: * $p < 0,05$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience 110

Tableau 19 : Exposition post-éclosion. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), $n=4$. Statistiques: * $p < 0,05$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience 111

Tableau 20 : Exposition post-éclosion. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience 112

Tableau 21 : Exposition post-éclosion. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience 113

Tableau 22 : Exposition embryonnaire. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 116

Tableau 23 : Exposition embryonnaire. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium

au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 119

Tableau 24 : Exposition embryonnaire. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 119

Tableau 25 : Exposition embryonnaire. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: *p<0,05, n=4. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 120

Tableau 26 : Exposition embryonnaire. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: *p<0,05, n=4. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. 121

Tableau 27 : Paramètres témoin estimés pour chaque expérience et chaque génération à partir des données de ce travail de thèse..... 124

Tableau 28 : Paramètres témoin estimés pour chaque expérience et chaque génération à partir des données issue de la thèse de Massarin (2010) 124

Tableau 29 : Critères des moindres carrés obtenus avec différentes hypothèses cinétiques à partir des données de ce travail de thèse et celui de Massarin (2010). C_e : concentration externe ; C_i : concentration interne..... 129

Tableau 30 : Paramètres de toxicité estimés à partir des données de ce travail de thèse et des données issues de la thèse de Massarin (2010) 140

Tableau 31 : Synthèse des principaux effets observés lors d'une exposition de daphnies à de l'uranium appauvri au cours de 2 générations successives..... 154

Tableau 32 : Préparation du milieu M4 175

Tableau 33 : Préparation de la solution mère 176

Tableau 34 : Préparation de la solution de vitamine 176

Tableau 35 : Solutions stocks utilisées pour réaliser le milieu HSM..... 177

Tableau 36 : Composition et proportion des solutions stock utilisées pour réaliser le milieu HSM . 177

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Préparation de la culture d'algues	177
Annexe 2 : Préparation du milieu d'élevage	179
Annexe 3 : Article scientifique	180

GLOSSAIRE

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

Biomarqueurs : Indicateur permettant d'évaluer une réponse biologique d'un organisme face à un ou des produit(s) toxiques.

Cellule germinale : Cellule reproductrice susceptible de former les gamètes

Cellule somatique : Cellule non reproductrice. Elles constituent la majorité des cellules constituant un individu.

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

CL_x : Concentration à partir de laquelle x% de mortalité est observée.

DEBtox : Modèle mécaniste décrivant la Dynamique de Budget Energétique appliqué à la toxicologie.

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

Facteur de bioconcentration (BCF) : Rapport entre la concentration du composé chimique dans l'organisme vivant et celle dans le milieu d'exposition.

Gène : Unité d'hérédité contrôlant un caractère particulier correspondant à un segment d'ADN, situé à un endroit bien précis sur un chromosome.

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

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

NEC : Concentration sans effet d'un polluant sur l'organisme.

RAPD (« Random amplified Polymorphic DNA » ou « Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe ») : Test permettant de détecter les lésions primaires de l'ADN, basé sur l'amplification aléatoire de fragment d'Adn, à partir d'un ADN polymorphe, avec une seule amorce de séquence nucléotidique arbitraire.

Réaction de Fenton : Correspond à la production de radicaux hydroxyles à partir de l'espèce peu réactive H₂O₂.

Introduction

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, l'industrie s'est considérablement développée entraînant des rejets de polluants de plus en plus importants dans l'environnement. Ces pollutions, d'abord locales, se répandent dans les systèmes aquatiques du fait de divers processus naturels tel que le lessivage et l'érosion des sols (**Belfiore et Anderson, 2001**). Dans ce contexte, le devenir des polluants dans l'environnement et leurs effets sur les organismes vivants est une préoccupation grandissante des gouvernements. L'Europe a mis en vigueur la Directive Cadre Eau (DCE) du 23 octobre 2000 (2000/60/CE) afin de prévenir et réduire la pollution de l'eau. Cette directive impose à l'ensemble des Etats membres d'atteindre un bon état écologique et chimique des masses d'eau de surface et le bon état chimique et quantitatif des masses d'eau souterraines d'ici en 2015. Dans le cadre de contaminations radioactives, l'IRSN joue un rôle clé dans l'expertise des risques associés. Les éléments radioactifs issus des sous-produits des activités industrielles liées au nucléaire (déchets, armes, mines,...) représentent une menace pour les écosystèmes aquatiques. Dans ce contexte le programme ENVIROHM a été lancé à l'IRSN afin d'évaluer les risques écologiques liés à la présence de radionucléides dans l'environnement dans des conditions chroniques ou accidentelles.

Il est difficile de démontrer les effets de stress environnementaux au niveau des écosystèmes, où la réponse observée des populations et des communautés, plus pertinente au plan écologique, est latente et éloignée dans le temps de l'exposition initiale souvent difficile à établir. Quand les effets sont enfin visibles, les processus de destructions sont irréversibles. Comprendre comment les polluants affectent les espèces à différents niveaux d'organisation biologique (sub-cellulaire, histologique, physiologique, individuelle et populationnel) est un enjeu majeur à la fois en écotoxicologie et en radioécologie. Cependant, lier les réponses biologiques observées entre différents niveaux d'organisation biologique reste un enjeu complexe. Cette complexité tient entre autre au fait qu'un même niveau d'effet peut refléter des conséquences différentes pour la population, au sein d'une même espèce selon les critères d'effet mesurés et pour un même critère d'effet entre les espèces selon leurs stratégies d'histoire de vie. Ainsi, les effets d'un polluant ne sont pas directement comparables entre le niveau individuel et populationnel (**Stark et al., 2004; Lance et al., 2012**). Suite à une exposition à un polluant, les réponses biologiques peuvent être divisées en 3 niveaux d'organisation biologique (les réponses génotoxiques, les réponses toxicologiques et les réponses écologiques) liés ou non entre eux (Figure 1) (**Jha, 2008**).

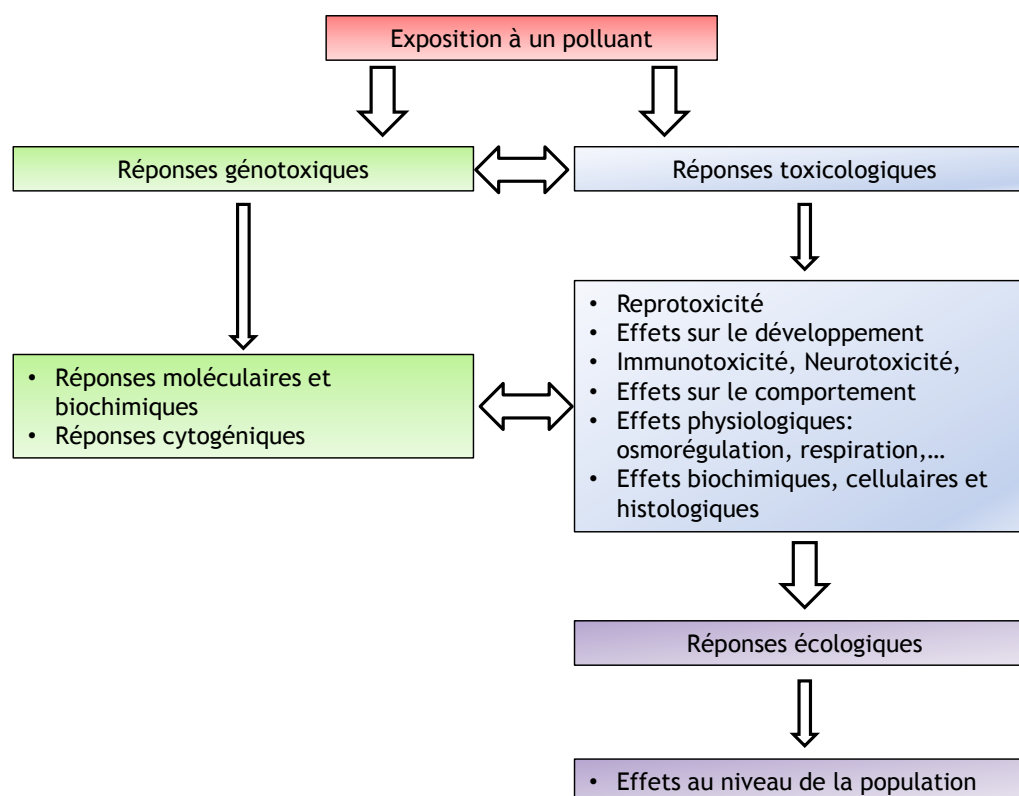


Figure 1: Liens de génotoxicité avec les différentes réponses écotoxicologiques (Jha, 2008)

Dans ce contexte, une compréhension mécanistique des liens unissant les différentes perturbations observées est nécessaire pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction, processus essentiels pour la dynamique de population (Swain *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2011; Wren *et al.*, 2011; Biron *et al.*, 2012). Cependant, les temps d'expositions auxquels les effets sont analysés en laboratoire sont rarement pertinents pour les populations naturelles dans un contexte écologique. D'une part les effets toxiques sont souvent étudiés lors d'expositions limitées à une seule génération ou à un stade de vie spécifique. D'autre part, les expositions à des polluants dans l'environnement peuvent se produire sur des temps dépassant largement la longévité individuelle. Plusieurs études évaluant les effets de composés toxiques au fil des générations chez le microcrustacé, *Daphnia magna*, montrent que les observations dans la première génération ne sont pas représentatives des effets dans les générations suivantes (LeBlanc, 1982; Bodar *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2000; Muysen et Janssen, 2004; Pane *et al.*, 2004; Guan et Wang, 2006b; Alonzo *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). De plus, la réponse des organismes à une exposition peut suivre différents scénarios selon le polluant testé. Une apparition de tolérance à du cadmium, du cuivre et du mercure est démontrée (LeBlanc, 1982; Bodar *et al.*, 1990). Dans d'autres cas, une augmentation de la sensibilité est observée suite à une exposition à du diazinon, de l'américium-241 et de l'uranium (Sánchez *et al.*, 2000; Alonzo *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010). Les daphnies sont des micro invertébrés d'eau douce vivant dans les eaux stagnantes, couramment utilisées en écotoxicologie due à leur petite taille, leur cycle de vie court et leur reproduction parthénogénétique (Ebert,

2005), rendant cette espèce particulièrement intéressante pour évaluer la toxicité de polluants au cours de plusieurs générations.

Une exposition multigénérationnelle a récemment été menée pour étudier les effets toxiques de l'uranium appauvri chez *Daphnia magna* (Massarin *et al.*, 2010). Ces résultats démontrent une augmentation de la sévérité des effets au cours des générations exposées (F0, F1 et F2). Une approche mécanistique utilisant la théorie du modèle de Dynamique de Budget Energétique appliqué à la toxicologie (DEBtox) suggère que le mode d'action primaire de l'uranium chez *Daphnia magna* est l'assimilation (Massarin *et al.*, 2011). Bien que ce mode d'action métabolique soit confirmé par des mesures de réduction de l'assimilation du carbone et par l'observation d'altérations de la paroi du tube digestif (Massarin *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2011), le mécanisme impliqué dans l'augmentation de la toxicité au fil des générations n'est, pour sa part, pas clairement élucidé. Une hypothèse possible serait la différence d'exposition entre les générations F0 et F1. En effet, l'exposition à l'uranium dans l'étude de Massarin *et al.* (2010), est commencée avec des néonates fraîchement éclos en F0 alors que le stade embryonnaire des générations F1 et F2 est exposé. Cette hypothèse pointant le stade embryonnaire comme stade de vie sensible reste à examiner. Outre la possible influence du stade embryonnaire, l'augmentation des effets de l'uranium d'une génération à la suivante, lorsque les générations sont exposées de la même manière, est une hypothèse à tester.

Si cette dernière hypothèse est confirmée, la présence d'altérations de l'ADN transmises à la descendance est à envisager. Un des principaux avantages des études centrées sur les critères moléculaires est qu'elles permettent la détection d'effets à des doses d'exposition plus faibles par rapport à ceux détectés aux niveaux de l'individu ou de la population (Dallas *et al.*, 2012). La présence de dommages moléculaires lors d'une exposition de daphnies à de l'uranium reste à étudier. Les dommages à l'ADN pourraient ainsi être utilisés pour examiner si des effets significatifs ont lieu à des concentrations inférieures à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, concentration la plus faible testée par Massarin *et al.* (2010) où les effets sur les traits d'histoire de vie deviennent difficiles à détecter. Des expérimentations à des concentrations inférieures à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ permettraient de mieux encadrer la valeur de la NEC (no-effect concentration), seuil de concentration à partir duquel un polluant à un effet sur la biologie d'un organisme dans l'approche DEBtox. L'étude récente de Massarin *et al.* (2011) indique une NEC inférieure à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, avec la possibilité d'une valeur non différente de zéro.

Dans cette thèse, nous étudierons si les dommages à l'ADN sont accumulés et transmis des adultes à leurs descendants au cours de deux générations successives, avec un accent spécial sur le lien de toxicité entre les niveaux moléculaire et individuel. Les dommages à l'ADN seront testés en tant que signal de futurs effets précoces sur les traits d'histoire de vie et utilisés pour déterminer la toxicité de l'uranium à de faibles concentrations (inférieures à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), où les effets sur l'individu sont difficiles à voir. Les daphnies seront exposées soit pendant la totalité de leur cycle de vie ou

pendant des stades de vie spécifiques (pendant le développement embryonnaire ou après l'éclosion) dans le but d'examiner (1) l'augmentation transgénérationnelle de la sévérité des effets sur les traits d'histoire de vie lorsque les générations F0 et F1 sont exposées pendant le stade embryonnaire et (2) le rôle et la sensibilité de stades de vie spécifiques dans l'accumulation de dommages à l'ADN et l'augmentation de la sévérité des effets au cours des générations. Enfin, le dernier objectif consistera à explorer, à l'aide d'un modèle DEBtox, l'éventualité d'un second mode d'action métabolique impliqué dans l'aggravation des effets entre les générations.

Ce document s'articule en 3 grandes parties :

- La partie A correspond à l'étude bibliographique. Dans cette partie, un chapitre est consacré à l'état de l'art sur l'uranium. Le second chapitre concerne le modèle biologique, *Daphnia magna*, et diverses études toxicologiques réalisées chez cet organisme. Enfin le dernier chapitre de cette partie concerne le choix d'un biomarqueur moléculaire pour répondre aux différents objectifs de cette étude.

- La partie B détaille le matériel et méthode de ce travail de thèse. Cette partie est divisée en 2 chapitres dont le premier correspond à l'étude expérimentale et le second à l'étude de modélisation.

- La partie C de ce document concerne les résultats et discussions associées. Le premier chapitre correspond aux résultats expérimentaux. Le deuxième est consacré aux résultats obtenus par les analyses DEBtox. Le dernier chapitre est une discussion générale.

Enfin le manuscrit se termine par une conclusion générale et les perspectives issues de ces travaux de recherche.

PARTIE A

Etude Bibliographique

Chapitre 1 :

Etat de l'art sur l'uranium

1. Propriétés physico-chimiques

1.1. Propriétés chimiques

L'uranium est un métal de numéro atomique 92, faisant partie de la famille des actinides. **Nieböer et Richardson (1980)** séparent les métaux en deux classes (A et B), basées sur des données thermodynamique. L'uranium se positionne dans la classe A des métaux, qui regroupe les éléments ayant une forte affinité pour l'oxygène.

L'uranium est l'élément le plus lourd naturellement présent dans l'environnement. Il est capable d'adopter quatre états de valence : U^{3+} (**Raikow et al.**), U^{4+} (IV), UO_2^+ (V) et UO_2^{2+} (VI) (**Ribera et al., 1996**). Les deux états majeurs d'oxydation présents dans l'environnement sont U(+IV) et U(+VI). Lorsque l'uranium passe de la valence +IV à +VI par oxydation, l'ion uranyle UO_2^{2+} se forme (**Sheppard et al., 2005**). En milieu aquatique, la forme +VI est la plus courante et domine dans les environnements oxydants (**Colle et al., 2001**).

L'uranium se rencontre fréquemment en association avec les oxydes minéraux en raison de son affinité particulière pour l'oxygène. Cet élément est fortement électropositif et sous forme de fines particules il est très pyrophorique à température ambiante, comme d'autres métaux (aluminium, fer,...) (**Aigueperse et al., 2001; Salminen, 2005**). L'uranium est également un élément chimiquement très actif qui peut réagir avec la plupart des éléments excepté avec les gaz rares (**Ribera et al., 1996**).

1.2. Propriétés nucléaires

1.2.1. *L'uranium naturel*

La famille des actinides est composée d'éléments dont le noyau instable émet des radiations en atteignant une configuration plus stable (**Ribera et al., 1996; Madic et Genet, 2001**). L'uranium est un radioélément, c'est-à-dire que tous ces isotopes sont radioactifs.

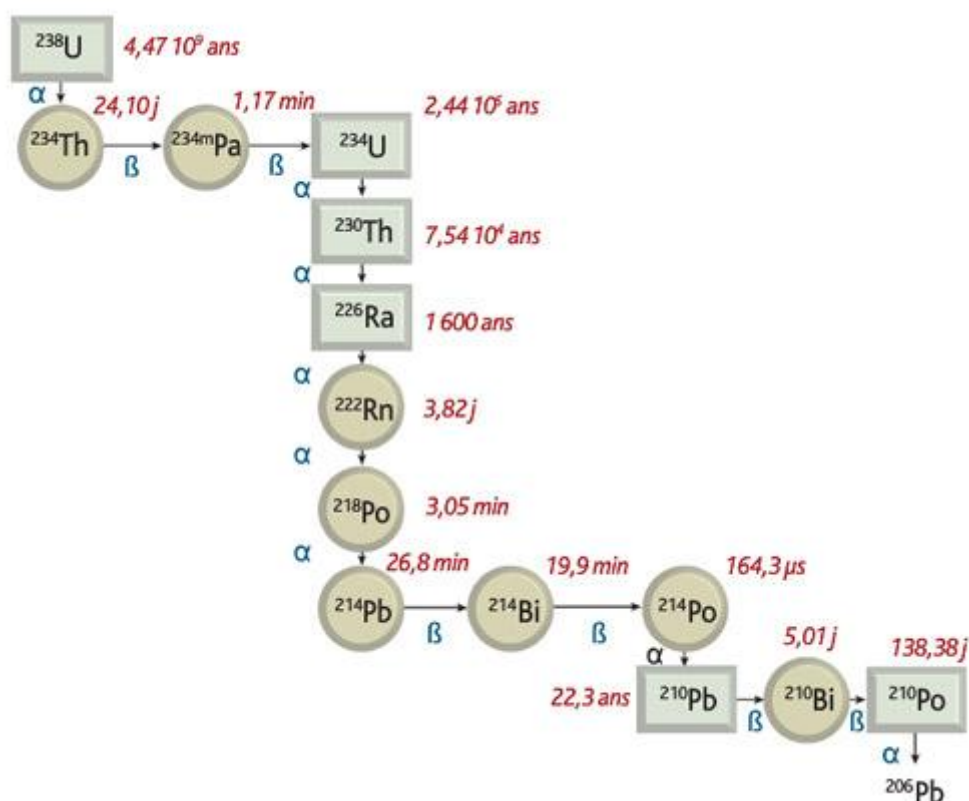
L'uranium naturel est composé d'un mélange de 3 isotopes : ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U , représentant respectivement 99,275%, 0,0720% et 0,0005% de la masse totale (Markich, 2002). Seuls ^{238}U et ^{235}U sont primordiaux, c'est-à-dire qu'ils existent depuis la création de la terre (4,5 Ga) (Madic et Genet, 2001). L'uranium 234 est produit par désintégration radioactive de ^{238}U (Markich, 2002). La radioactivité des isotopes dépend de leur demi-vie. Le plus abondant naturellement, ^{238}U , a la plus longue période radioactive et par conséquent la plus faible activité spécifique (Bleise *et al.*, 2003). Les demi-vies de ces 3 isotopes, ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U sont respectivement de $4,47 \times 10^9$, $7,04 \times 10^8$ et $2,44 \times 10^5$ ans (Ribera *et al.*, 1996; WHO, 2001). Bien que ^{234}U soit en faible proportion, sa forte activité spécifique le rend aussi radioactif que ^{238}U (Tableau 1) (Bleise *et al.*, 2003). Tous les isotopes de l'uranium ont les mêmes réactions chimiques et les mêmes caractéristiques physiques, mais leurs propriétés isotopiques diffèrent (WHO, 2001).

Tableau 1 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri (Aigueperse *et al.*, 2001)

	Masse (%)			Activité (%)			Activité (Bq) pour 1g d'uranium		
	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U
Uranium naturel	99,274	0,72	0,0055	48,2	2,3	49,5	12400	580	12474
Uranium appauvri	99,797	0,202	0,0008	86,1	1,1	12,8	12400	158	1843

Les isotopes naturels de l'uranium se désintègrent principalement par émission de rayonnement alpha (noyau d'hélium) et peuvent aussi se désintégrer par fission spontanée (Madic et Genet, 2001). Les particules alpha sont lourdes et de grande taille. De ce fait, elles perdent rapidement leur cinétique d'énergie et ont une faible capacité de pénétration : 4 cm dans l'air, 50 μm dans les tissus,... Ces particules peuvent dans certains cas, traverser la peau (par l'intermédiaire d'une plaie par exemple), et représentent alors une radiation interne (Bleise *et al.*, 2003).

La décroissance de l'uranium produit d'autres éléments radioactifs qui peuvent éventuellement se transformer en éléments stables. Dans le processus de décroissance, des radiations gamma et bêta sont émises. Les particules bêta sont plus aptes à traverser la peau que les particules alpha et les rayonnements gamma sont extrêmement pénétrants (Figure 2) (Bleise *et al.*, 2003).

Figure 2 : Chaîne de désintégration de l' $^{238}\text{U}/^{234}\text{U}$ (IRSN)

1.2.2. L'uranium appauvri

L'uranium appauvri est un sous-produit de l'industrie du nucléaire, qui peut avoir 2 origines, soit les usines d'enrichissement en ^{235}U de l'uranium naturel, soit le retraitement des combustibles irradiés (Aigueperse *et al.*, 2001). L'uranium est considéré comme appauvri lorsque les abondances en ^{235}U et ^{234}U sont réduites par rapport au ^{238}U . La commission de régulation du nucléaire des Etats-Unis (U.S. NRC) définit l'uranium appauvri comme un élément dans lequel le pourcentage en ^{235}U est inférieur à 0,711% (WHO, 2001). En général, ^{235}U est présent en faibles quantités dans l'uranium appauvri, de l'ordre de 0,2 à 0,3% au lieu de 0,72% dans l'uranium naturel. Cet uranium est également appauvri en ^{234}U d'un facteur 7 par rapport à l'uranium naturel (0,0008%), mais son activité spécifique est élevée (Aigueperse *et al.*, 2001) (Tableau 1). L'uranium appauvri est un élément 40% moins radioactif que l'uranium naturel (WHO, 2001).

2. L'uranium dans l'environnement : origine et concentration

L'uranium est largement distribué dans l'environnement où il est naturellement présent dans les roches, le sol et l'eau.

2.1. Origine et distribution naturelle

2.1.1. L'uranium dans les écosystèmes terrestres

Selon le type de roche, les teneurs en éléments radioactifs varient. La répartition de l'uranium sur la terre est très hétérogène. Son abondance est faible dans le noyau et le manteau. L'essentiel du stock d'uranium de la terre se trouve dans la croûte terrestre, avec des valeurs aux alentours de 3 gU.t^{-1} (Bonin et Blanc, 2001). Cet élément y est plus abondant que l'argent, le mercure ou l'iode par exemple (Colle *et al.*, 2001). L'uranium est largement dispersé dans les différentes roches de l'écorce terrestre.

Il peut être le composant essentiel de certains minéraux rares (par exemple, l'uranite), un élément de substitutions des minéraux communs (par exemple, le zircon), adsorbé sur la surface des minéraux, associé à de la matière organique ou encore, dissous dans l'eau interstitielle. Il entre dans la composition d'au moins 200 minéraux, classés selon leur origine en séparant les minéraux primaires, qui sont formés en profondeur dans la croûte terrestre, des minéraux secondaire, formés en surface par l'altération des minéraux primaires (Bonin et Blanc, 2001).

La présence de l'uranium dans le sol dépend des caractéristiques physico-chimiques du radionucléide considéré et du mouvement des sols (Ribera *et al.*, 1996). La gamme de concentration de l'uranium dans le sol diffère selon la profondeur considérée : $0,1$ à $30,3 \text{ mgU.kg}^{-1}$ en profondeur et $0,21$ à $53,2 \text{ mgU.kg}^{-1}$ à la surface (Salminen, 2005).

A la surface du sol, les conditions sont oxydantes, ce qui induit une forte mobilité de l'uranium (Garnier-Laplace *et al.*, 2001). La répartition de l'uranium à la surface des sols est influencée par quatre mécanismes principaux: le transport par les eaux de pluies (lixiviation), les mouvements de diffusion, les transports biologiques (plantes, micro-organismes,...) et la resuspension par l'eau et l'air (Ribera *et al.*, 1996).

2.1.2. L'uranium dans les écosystèmes aquatiques

Dans le milieu aquatique, les sédiments ont une forte capacité à fixer l'uranium ce qui leur donne le rôle de compartiment de stockage. La fixation est influencée par la granulométrie : les plus grandes quantités d'uranium s'associent aux fractions de sédiments les plus fines (Ribera *et al.*, 1996). L'uranium est présent dans la colonne d'eau, aussi bien en surface qu'en profondeur. L'abondance de l'uranium dans l'eau est variable et reflète sa concentration présente à la surface des roches. Les teneurs varient selon une large gamme de concentration : $0,01$ à $1500 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ (WHO, 2001). Dans les courants d'eau, les concentrations varient de $0,002$ à $11,1 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$ avec une moyenne de $0,32 \text{ } \mu\text{gU.L}^{-1}$. En Europe, la distribution de l'uranium dans l'eau (Figure 3) est similaire à celle des ions majeurs et est dépendante du climat. La distribution de l'uranium dans l'eau

semble être opposée à celle dans les sédiments de ruisseau (Salminen, 2005). Les sources hydrothermales représentent une des principales sources d'uranium (Ribera *et al.*, 1996).

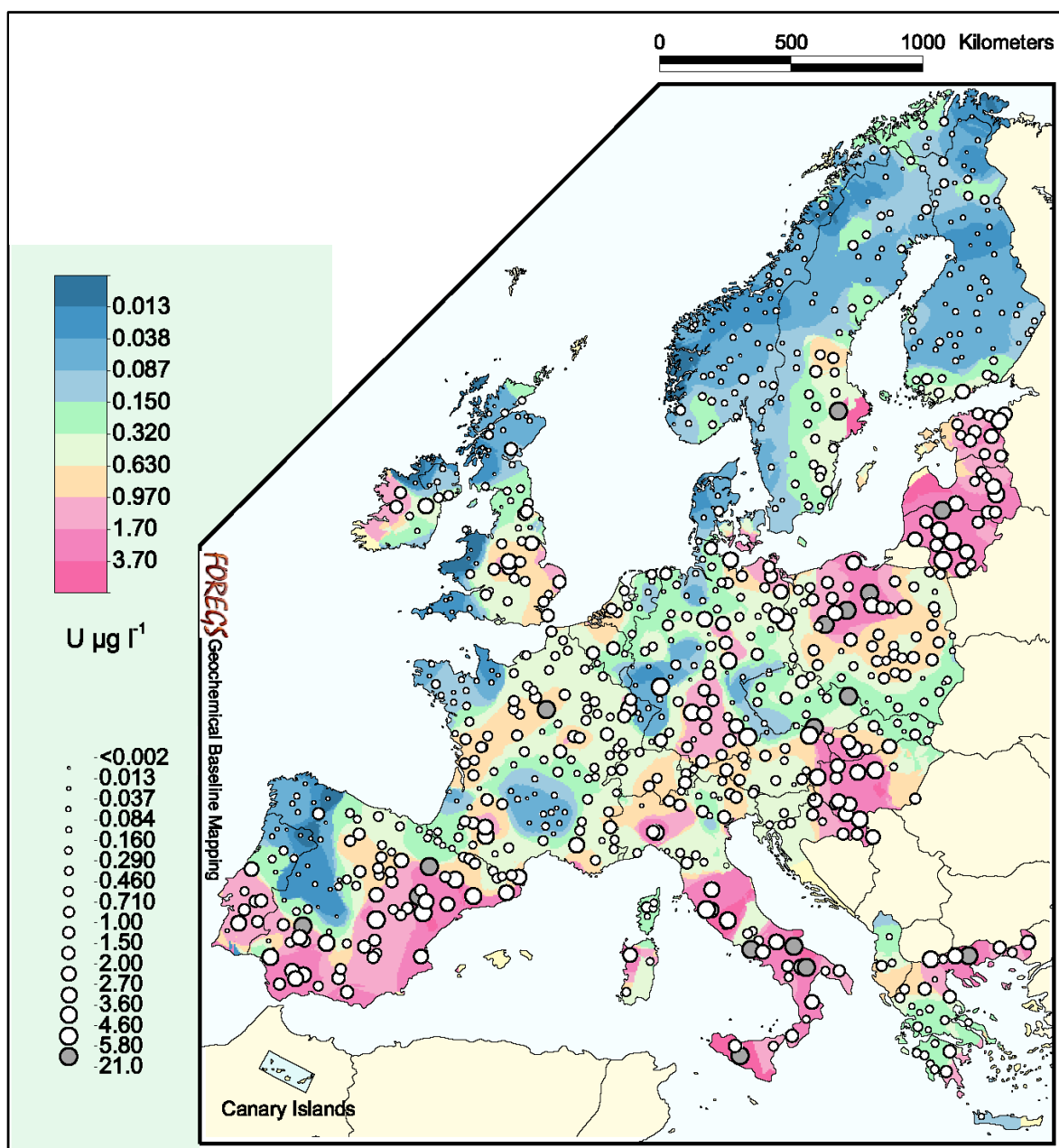


Figure 3 : L'uranium dans les cours d'eau en Europe (Salminen, 2005)

2.2. Applications et impact anthropiques

De nombreuses activités anthropiques peuvent modifier l'abondance naturelle de l'uranium dans les divers compartiments environnementaux. L'application de l'uranium appauvri peut être civile ou militaire.

L'uranium est un matériel de protection dans la production de réacteurs, où les interactions avec les neutrons produisent un combustible supplémentaire sous forme de ^{239}Pu . Il est également utilisé en tant que matériel de protection face aux radiations dans le milieu hospitalier. L'uranium étant un métal très disponible et de densité élevée, il est utilisé entre autres en contrepoids dans les avions commerciaux, les satellites, les bateaux.... (WHO, 2001; Bleise *et al.*, 2003).

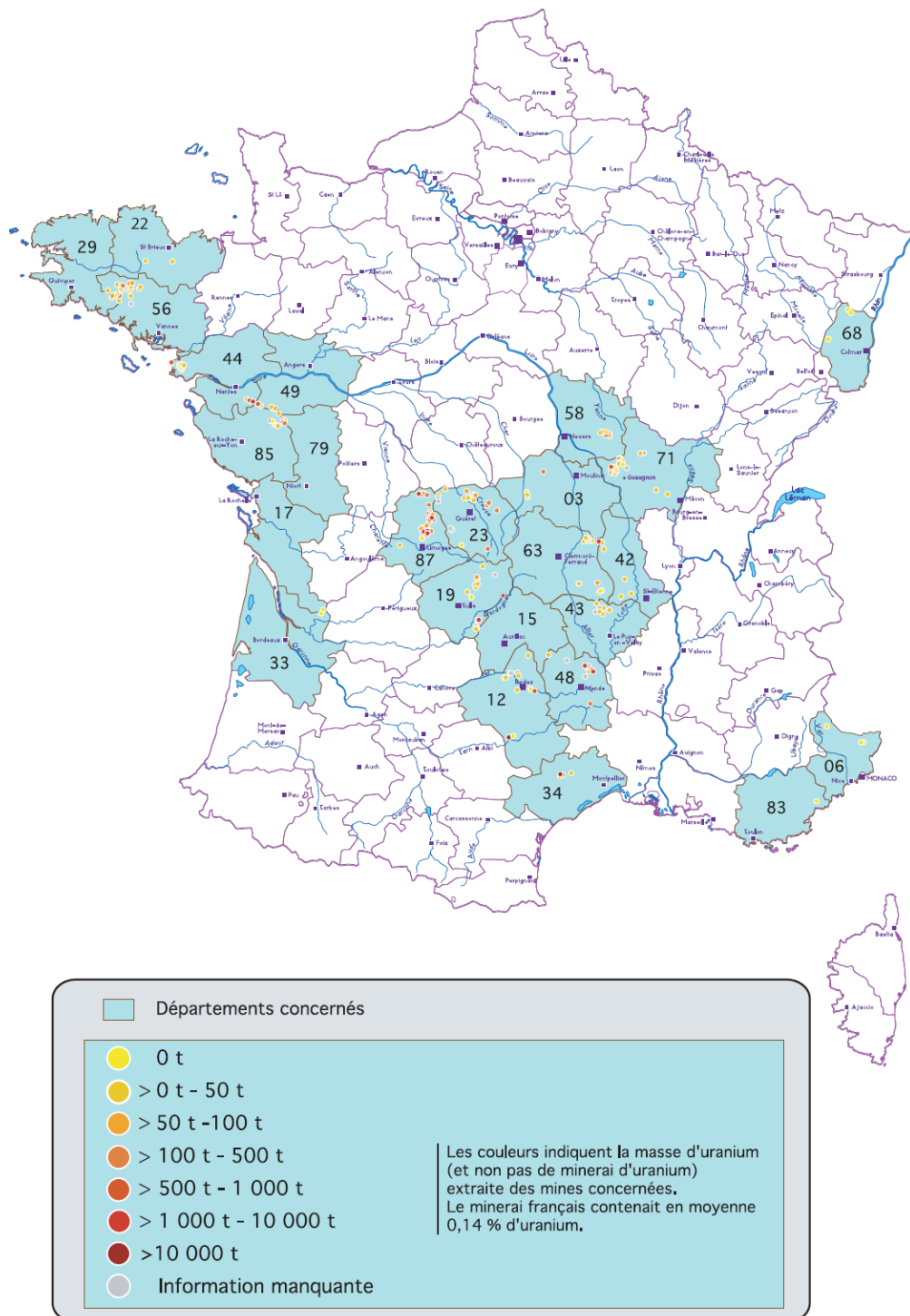


Figure 4 : Carte des mines d'uranium présentes en France (CRIIRAD, 2009)

Les apports d'uranium résultant des activités industrielles de l'homme proviennent de 3 sources principales : les rejets dans l'environnement du fait des activités minières (Figure 4) et industrielles liées au cycle du combustible nucléaire ; l'utilisation du charbon qui contient des radionucléides naturels ; l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration des compléments alimentaires pour le bétail (Colle *et al.*, 2001). La production d'uranium varie selon les pays. En effet, d'après la Figure 5, on peut clairement voir que le Kazakhstan produit quasiment 2 fois plus d'uranium que le Canada qui produit lui-même déjà 10 000 tonnes d'uranium par an. La France, fait partie des pays ayant la plus faible production avec 7 tonnes de produites en 2011. De nombreux pays européens ne produisent pas d'uranium (Allemagne, Espagne, Belgique,...).

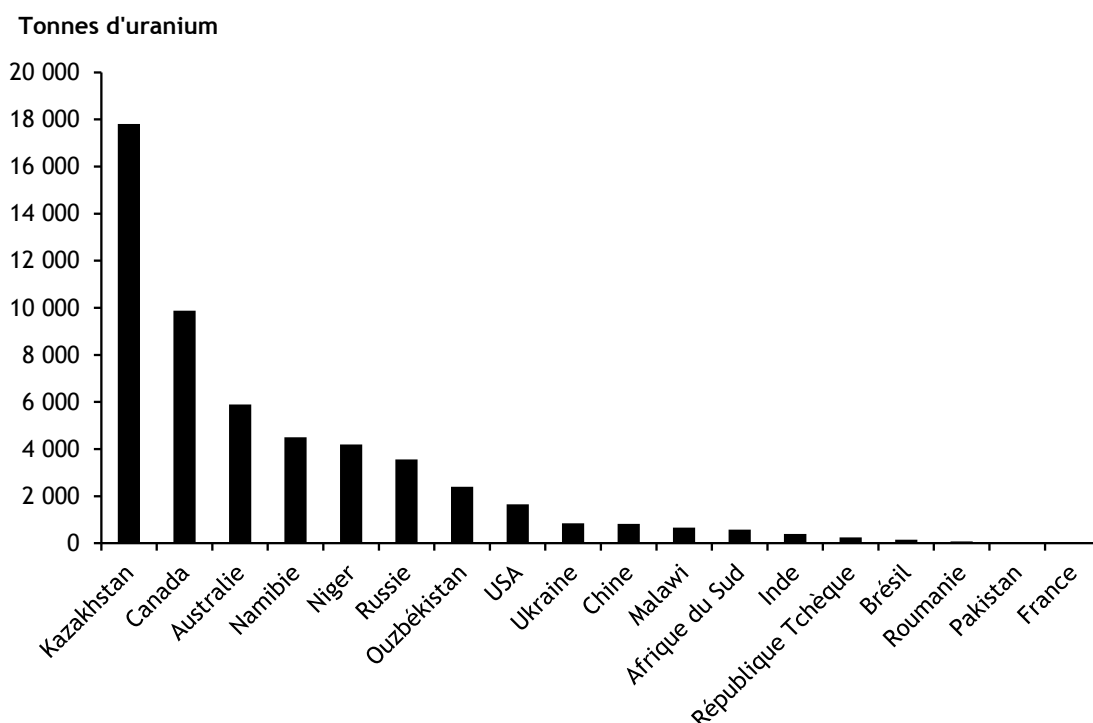


Figure 5 : Production d'uranium (tonnes) en 2011 selon les pays (données provenant de World Nuclear Association)

La forte densité et le haut point de fusion (1132°C) de l'uranium appauvri en font un matériel très efficace dans le secteur militaire. L'uranium appauvri est ainsi utilisé en tant que composant pour les véhicules blindés et les munitions. Les armes à l'uranium appauvri ont été utilisées lors de récents conflits : en Bosnie, au Kosovo, pour la guerre du Golfe,... (WHO, 2001). Ces activités militaires ont provoqué le dépôt d'uranium appauvri à la surface des sols : lors de la guerre du Golfe, 250 tonnes y ont été déposées sous forme de petites tiges métalliques à la suite de tirs (Bem et Bou-Rabee, 2004).

3. La contamination à l'uranium

3.1. Spéciation et biodisponibilité de l'uranium

Un métal est biodisponible pour la cible biologique seulement sous certaines formes chimiques, dont les proportions dépendent des caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, matière organique,...) (Environnement Canada, 2003).

3.1.1. En milieu terrestre

Le comportement de l'uranium dans le sol est lié aux conditions d'oxydoréduction du milieu (Garnier-Laplace *et al.*, 2001).

En conditions aérobies, l'uranium se trouve sous forme d'ion uranyle (UO_2^{2+}). Cet ion se complexe facilement avec la matière organique, les carbonates, les phosphates, ou les sulfates. Sous l'action du lessivage des sols par les eaux de pluies, l'uranium, étant en grande partie sous forme de complexes plus ou moins solubles, migre facilement en profondeur. C'est pourquoi, sa concentration augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface (Colle *et al.*, 2001). Riberra *et al.* (1996) établissent le profil sédimentaire de l'uranium et montrent que 97,55% de l'uranium présent dans le sol se trouve dans les trente premiers centimètres.

En conditions réductrices, l'uranium se trouve à l'état d'oxydation IV et a tendance à précipiter (Colle *et al.*, 2001).

3.1.2. En milieux aquatique

De nombreuses études démontrent que la dureté de l'eau (concentration de calcium ou magnésium) réduit la toxicité de l'uranium pour les organismes dulcicoles. Le calcium ou le magnésium inhibent, par effet de compétition, l'assimilation des métaux présents et réduisent leur toxicité. Dans les milieux aquatiques, l'uranium existe sous plusieurs états d'oxydation (de +III à +IV) (Colle *et al.*, 2001). Il apparaît à la surface de l'eau sous trois états d'oxydation différents : U^{4+} (U[IV]), UO_2^{2+} (U[V]) et UO_2^{2+} (U[VI]) (Markich, 2002).

En condition oxydante, l'ion uranium (VI) UO_2^{2+} est l'espèce la plus stable de l'uranium. C'est la forme prédominante dans l'environnement et notamment dans les eaux de surfaces en milieu oxydant jusqu'à pH=6. Sous cette forme, l'uranium est soluble et facilement transportable (Sheppard *et al.*, 2005). Dans ces conditions oxydantes et alcalines, la rétention de l'uranium est faible (Colle *et al.*, 2001). Lorsque le pH augmente, cette espèce s'hydrolyse pour former UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})\text{O}^2$, $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$, $\text{UO}_2(\text{OH})_4^{2-}$, $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ ou $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_4^{2+}$ (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). La spéciation de l'uranium en eau douce peut être influencée par le pH, la dureté, l'alcalinité, le potentiel d'oxydoréduction, mais également par la concentration en ligands organiques dans le milieu (Colle *et al.*, 2001; Sheppard *et al.*, 2005). L'ion uranyle peut facilement former des complexes stables avec les ions carbonates, phosphates et sulfates (Sheppard *et al.*, 2005). En

complexant avec les phosphates, cet ion précipite, induisant un transfert vers le compartiment sédimentaire (Colle *et al.*, 2001).

En condition réductrice, comme dans les eaux anoxiques, l'uranium est présent sous la forme de valence +IV (U_4^+ et UO_2^+), état dans lequel l'uranium est peu soluble et a une forte tendance à précipiter (Markich, 2002; Sheppard *et al.*, 2005).

La biodisponibilité de l'uranium est influencée par les paramètres physico-chimiques du milieu et dépend de sa spéciation (Markich, 2002). L'ion uranyle représente l'espèce chimique la plus toxique en solution (Garnier-Laplace *et al.*, 2001). La diminution de sa toxicité correspond à une diminution du pourcentage d'ions UO_2^{2+} et UO_2OH^+ ou à une augmentation de UO_2CO_3 due à la complexation avec les carbonates de UO_2^{2+} . Lorsque la dureté de l'eau augmente, la réduction de la toxicité de l'uranium est principalement due à la compétition entre l'uranium et le calcium ou le magnésium. La dureté de l'eau n'influence donc pas la biodisponibilité de l'uranium. (Markich, 2002). L'augmentation d'autres paramètres tels que l'alcalinité ou encore la concentration en matière organique diminuent la toxicité chimique de l'uranium (Garnier-Laplace *et al.*, 2001). Les ions UO_2OH^+ et UO_2^{2+} sont les formes majeures de la biodisponibilité de l'uranium (VI) dans l'eau. Les complexes de l'ion uranyle avec les ligands inorganiques (carbonates ou phosphates) et les substances humiques réduisent la biodisponibilité de l'uranium en diminuant l'activité d' UO_2OH^+ et d' UO_2^{2+} (Markich, 2002).

3.2. Bioaccumulation

Les voies de contaminations sont multiples chez les organismes. La contamination peut s'effectuer par voie directe (au contact de l'eau ou du sédiment), trophique ou maternelle. L'uranium est un élément ayant la capacité de se concentrer au sein de l'organisme. Les espèces pélagiques accumulent dix fois moins d'uranium que les organismes benthiques.

D'après les travaux de Labrot *et al.* (1999), les branchies et la masse viscérale sont les sites les plus contaminés chez *Corbicula fluminea* avec un coefficient multiplicateur d'environ 50 par rapport au groupe témoin. Dans cette même étude, les auteurs déterminent un facteur de bioconcentration maximum de 0,056 (poids frais) atteint en 19 jours. L'entrée de l'uranium chez les poissons s'effectue principalement par la voie branchiale (Barillet *et al.*, 2007). Labrot *et al.* (1999) estiment une valeur maximale de 0,0089 pour le facteur de concentration, atteinte en 28 jours chez *Brachydanio rerio*. Les sédiments accumulant les plus fortes concentrations d'uranium, les poissons benthiques qui évoluent dans ces milieux contaminés, peuvent accumuler de fortes quantités d'uranium (Ribera *et al.*, 1996).

Massarin *et al.* (2010) montrent que l'accumulation de l'uranium dans *Daphnia magna* augmente avec l'âge de l'individu et avec l'augmentation de la concentration dans le milieu. La bioaccumulation est maximum au bout de 20 jours d'exposition, atteignant 17 ± 1 , 32 ± 6 et 54 ± 13 ngU.daphnie⁻¹, respectivement pour des concentrations de 10, 25 et 75 $\mu\text{gU.L}^{-1}$.

4. La toxicité de l'uranium

4.1. Les mécanismes de toxicité

La toxicité induite par l'uranium peut être d'origine chimique et/ou radiologique selon la nature de l'élément et sa composition isotopique (Tableau 2). Afin de comprendre les effets biologiques de l'uranium, il est nécessaire de prendre en compte à la fois les propriétés chimiques et radiologiques de l'élément.

Tableau 2 : Composition de l'uranium selon sa toxicité (Ribera *et al.*, 1996)

Type de toxicité	Formes de l'uranium
Radiologique	^{232}U , ^{233}U , fortement enrichi
Chimique	Naturel, appauvri, enrichi
Radiologique et Chimique	^{238}U et uranium enrichi

La toxicité radiologique est directement reliée aux effets des radiations ionisantes. Seul l'uranium enrichi représente un élément radiotoxique. Cette forme de toxicité apparaît à partir d'un enrichissement d'au moins 10% de ^{235}U (Ribera *et al.*, 1996). En ce qui concerne l'uranium appauvri, sa radioactivité est faible : moins d'une particule alpha est émise chaque minute dans 1 μg d'uranium appauvri. Cependant, l'altération des tissus est possible lorsque l'uranium s'y fixe pendant de longues périodes (Aigueperse *et al.*, 2001). L'utilisation d'isotopes ayant des activités spécifiques différentes a mis en évidence que les particules alpha sont impliquées dans l'induction d'effets. Ces particules peuvent causer des dommages à l'ADN. Des études *in vitro* démontrent que les particules alpha sont impliquées dans les effets cellulaires induits par l'uranium appauvri. Ces particules sont également impliquées dans l'altération des propriétés de croissance d'un tissu. Ces travaux montrent également qu'une partie des mécanismes de transformations induit par ce radioélément pourraient être en relation avec ses propriétés chimiques (Miller *et al.*, 2002). Quelques études suggèrent que les risques les plus importants proviennent de la toxicité chimique.

Il est défini dans de précédentes études que l'ion UO_2^{2+} provoque une toxicité chimique de l'uranium (Ribera *et al.*, 1996). Lorsque l'uranium est chimiotoxique, sa toxicité est comparable à celle des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb,...) qui peuvent induire des effets toxiques sur de nombreux organes : rein, foie, système reproducteur,... Tout comme certains métaux de transition (le Fer par exemple), Miller *et al.* (2002) démontrent que l'uranium est susceptible de former des radicaux libres (hydroxyle) en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène. Les auteurs suggèrent que l'uranium peut se comporter comme le fer dans la réaction d'oxydoréduction de Fenton (production de radicaux hydroxyles à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2). Cette étude indique que les réactions biochimiques induisant ce stress oxydant (surproduction d'espèces

réactives à l'oxygène) sont provoquées par la toxicité chimique de l'uranium. Les composés solubles dans les fluides organiques, comme l'uranium hexafluoride (UF₆), sont extrêmement dangereux. A l'inverse les composés non solubles, comme les oxydes (UO₂, U₃O₈) et les tetrafluorides (UF₄), sont moins nocifs.

4.2. Les effets biologiques de l'uranium

Il est largement démontré dans la littérature que l'uranium induit un stress toxiques à différents niveaux d'organisation biologiques : moléculaire (Lerebours *et al.*, 2009; Lourenço *et al.*, 2012), tissulaire (Al Kaddissi *et al.*, 2011; Massarin *et al.*, 2011) ou encore individuel (Zeman *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010).

4.2.1. Les interactions au niveau sub-cellulaire

L'apparition des dommages sub-cellulaires se manifestent selon une chaîne de réaction : interaction physique, réaction radiochimique, altération moléculaire, dommage cellulaire, lésion tissulaire et manifestation pathologique (Ribera *et al.*, 1996).

4.2.1.1. Les effets de l'uranium sur le stress oxydant

Les espèces réactives à l'oxygène (ERO), sont des espèces naturellement présentes dans les organismes utilisant l'oxygène moléculaire pour leur énergie. En conditions normales, la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Dans le cas contraire, apparaît soit un déficit en antioxydant ou soit une surproduction importante en radicaux, souvent appelés espèces réactives de l'oxygène. L'excès est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003). Lors d'un stress oxydant, la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés. Un fort taux d'ERO peut endommager d'importantes biomolécules comme l'ADN et les protéines, les tissus,... (Kim *et al.*, 2010). La production d'ERO peut avoir plusieurs origines dont l'intoxication par des métaux lourds ou l'exposition aux radiations ionisantes (Favier, 2003). La nature et l'intensité du stress oxydant généré par les radionucléides diffèrent selon l'organisme et l'élément radioactif considéré. La plupart des études concernent les effets toxiques produits par les rayonnements ionisants, or la toxicité d'un radionucléide peut être d'origine chimique et radiologique, comme c'est le cas pour l'uranium (Pradines, 2004). L'uranium peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles selon un processus similaire à celui observé pour le nickel (Miller *et al.*, 2002).

Les études de Barillet *et al.*, (2007) chez le poisson zèbre, montrent que l'exposition à l'uranium appauvri provoque un stress oxydant. En effet, une diminution significative de la quantité dans le foie de superoxide dismutase est observée. Concernant l'activité de la catalase, un effet significatif est reporté seulement dans le cas d'une contamination à un mélange uranium appauvri - uranium 233. L'étude de Labrot *et al.* (1996) montre que chez 3 espèces différentes (*Brachydanio*

rerio, *Corbicula sp.* et *Eisenia fetida*) l'exposition à l'uranium *in vitro* induit un changement du taux de malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur de stress oxydant.

4.2.1.2. La génotoxicité de l'uranium

La réponse des organismes aux contaminants peut se manifester à tous les niveaux d'organisation biologique, notamment par des changements dans la diversité génétique.

Généralités

Dans notre société, l'exposition aux substances dites « génotoxiques » est l'un des plus sérieux problèmes associés à la pollution de l'environnement. Cette problématique est soulevée car certains des polluants sont cancérigènes ou mutagènes avec la capacité d'affecter à la fois l'intégrité de la structure de l'ADN et son expression biologique (Shugart et Theodorakis, 1998). Le génome règle le fonctionnement cellulaire de tout organisme en réponse aux messages reçus de son environnement. Tout agent physique ou chimique capable d'interférer avec ses mécanismes de régulation peut constituer un facteur de toxicité susceptible de perturber la croissance, le cycle cellulaire, la division, la différenciation des organismes exposés (Vasseur *et al.*, 2008).

Les composés génotoxiques sont des agents physiques (principalement les radiations ionisantes hautement énergétiques), chimiques (polluants) ou biologiques (virus tels que les rétrovirus) qui ont la capacité de provoquer l'apparition de dommages à l'ADN. Un élément génotoxique peut avoir deux types d'effets (Cachot et Dégremont, 2009):

- Direct : agents génotoxiques capables de modifier directement la structure de l'ADN.
- Indirect : agents génotoxiques nécessitant une activation métabolique préalable (processus de transformation de substances chimiques dans l'organisme vivant sous l'action d'agents biologiques, les métabolites en sont la résultante).

Le potentiel génotoxique de l'uranium

Il est démontré dans la littérature que l'uranium, du fait de sa faible radioactivité, exerce des effets toxiques sur la molécule d'ADN à travers la production et l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène à l'intérieur des cellules, causant différents types de lésions. En effet, l'uranium peut induire divers dommages à l'ADN résultant de la production d'adduits de l'ADN (Stearns *et al.*, 2005), de cassures d'ADN (Yazzie *et al.*, 2003) ou de stress oxydant (Barillet *et al.*, 2007; Periyakaruppan *et al.*, 2007).

Des études démontrent la génotoxicité de l'uranium chez différents organismes vivants, allant de l'être humain aux invertébrés. A notre connaissance, les effets génotoxiques induits par l'uranium n'ont jamais été examinés dans un contexte multigénérationnel. Un fort niveau de

dommages à l'ADN est observé via le test des comètes dans le sang d'une population humaine vivant près d'une mine d'uranium abandonnée (Lourenço *et al.*, 2013). Les dommages à l'ADN sont évalués dans des cellules de rat après 30h d'exposition à l'uranium (0 à 190 mgU.L⁻¹), en utilisant trois techniques complémentaires de détection : les lésions primaires de l'ADN (essai des comètes), les cassures doubles brins de l'ADN (marquage des histones γ -H2AX) et les cassures ou les pertes chromosomiques (test des micro-noyaux). L'étude démontre un effet génotoxique de l'uranium dès 71 mgU.L⁻¹. Les dommages à l'ADN causés par l'uranium peuvent être réversibles à de faibles concentrations (48-95 mgU.L⁻¹) et deviennent irréversibles aux plus fortes concentrations (120-190 mgU.L⁻¹) (Thiébaud *et al.*, 2007). Concernant les invertébrés terrestres et aquatiques, un effet génotoxique est démontré chez différents organismes à l'aide de la technique du test des comètes. En effet, l'exposition des érythrocytes de poissons zèbres, *Danio rerio*, à une gamme de concentration allant de 0 à 500 μ gU.L⁻¹ révèle des altérations à l'ADN. Un effet significatif est démontré à partir de 100 μ gU.L⁻¹ après 20 jours d'exposition (Barillet *et al.*, 2005). Une exposition *in vitro* de cellules embryonnaires de poisson zèbre démontre une augmentation des cassures doubles brin de l'ADN dès 2,3 mgU.L⁻¹ (Pereira *et al.*, 2012). Un autre travail, utilisant le test des comètes, met en évidence la capacité de l'uranium à induire des effets génotoxiques chez le poisson *Carassius auratus* à 100 mgU.L⁻¹ après 96 h d'exposition (Lourenço *et al.*, 2010). Les organismes invertébrés sont également impactés par l'uranium au niveau moléculaire. Ainsi, une récente étude de Simon *et al.* (2011) démontre des altérations de l'ADN dans les branchies et les hémocytes de *Corbicula fluminea*. Les dommages à l'ADN sont également induits chez de petits invertébrés terrestres, comme le ver de terre *Eisenia andrei* (Lourenço *et al.*, 2012).

4.2.2. Altérations histologiques

Les réactions de pathologies tissulaires aux polluants peuvent être des signaux précoces d'atteintes des organismes.

Une récente étude permet d'évaluer les dommages histologiques chez *Procambarus clarkii* suite à une contamination à l'uranium (0 à 8 mgU.L⁻¹) pendant 10 jours. Ces travaux mettent en évidence une augmentation des vacuolisations et la désintégration de l'épithélium. De plus l'intensité des effets induits par l'uranium est corrélée à sa bioaccumulation dans les organes (Al Kaddissi *et al.*, 2011). Des atteintes structurales de plusieurs organes sont mises en évidence chez divers poissons suite à une exposition à de l'uranium (Cooley *et al.*, 2000; Barillet, 2007). En effet, l'exposition de *Danio rerio* (0 et 100 μ gU.L⁻¹) pendant 20 jours met en évidence des atteintes au niveau des lamelles branchiales où un décollement de l'épithélium et de la membrane basale sont observés chez les individus exposés. Le tissu musculaire est également impacté par l'uranium, où une désorganisation des structures impliquées dans la contraction du muscle apparaît (Barillet, 2007). Une autre étude sur la toxicité de l'uranium via l'ingestion de nourriture (0 à 10000 μ gU.g⁻¹) pendant 10, 30 et 100 jours, chez le corégone, *Coregonus clupeaformis*, montre une élévation des lésions histologiques au niveau du foie et des reins, chez les individus contaminés, sans pour autant observer d'effets à l'échelle de l'organisme. Dans ces travaux, les effets sub-léthaux mis en

évidence en conditions contrôlées de laboratoire, ne permettent pas de définir si l'uranium aura un effet sur la survie, la croissance et la reproduction de populations exposées pendant de longues périodes, dû à leur cycle de vie de plusieurs années (Cooley *et al.*, 2000). Concernant les microcrustacés, peu d'études sont réalisées sur l'effet de l'uranium au niveau des tissus. Chez *Daphnia magna* des altérations au niveau du tube digestif sont mises en évidence suite à l'exposition à de l'uranium (50 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Les cellules intestinales de daphnies exposées présentent de nombreuses vacuoles et l'uranium s'y présente sous forme précipité (Zeman, 2008).

4.2.3. Effets à l'échelle de l'individu : altérations des traits d'histoire de vie

4.2.3.1. Toxicité aigue

Chez les organismes aquatiques, beaucoup de données d'écotoxicité de l'uranium concernent les effets de toxicité aigüe. Ces études visent à déterminer des concentrations d'exposition pour lesquelles 50% des organismes étudiés meurent (LC_{50}).

La sensibilité des organismes à l'uranium est dépendante de plusieurs paramètres environnementaux, notamment, l'alcalinité et la dureté de l'eau. La toxicité de l'uranium diminue lorsque l'alcalinité et la dureté du milieu augmentent. Diverses études sur poissons, cladocères,... confirment cette influence des paramètres physico-chimiques (Poston *et al.*, 1984; Barata *et al.*, 1998; Zeman *et al.*, 2008) (Tableau 3).

Tableau3 : Toxicité aigüe de différentes espèces aquatiques

	Espèce	Paramètre estimé	Valeur (mgU.L ⁻¹)	Dureté (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinité (mgCaCO ₃ /L)	Référence
Poissons	<i>Melanotaenia nigrans</i> (7j)	LC ₅₀ 96h	1,7		3,26	Bywater <i>et al.</i> , 1991
	<i>Melanotaenia nigrans</i> (90j)	LC ₅₀ 96h	1,9		3,26	
	<i>Mogurnda mogurnda</i> (7j)	LC ₅₀ 96h	1,11		3,26	
	<i>Mogurnda mogurnda</i> (90j)	LC ₅₀ 96h	1,46		3,26	
	<i>Ptycholcheilus lucius</i>					Hamilton, 1995
	<i>Xyrauchen texanus</i>	LC ₅₀ 96h	46	197	107	
	<i>Gila elegans</i>					Ribera <i>et al.</i> , 1996 Labrot <i>et al.</i> , 1999
	<i>Brachydanio rerio</i>	LC ₅₀ 96h	3,02			
	<i>Brachydanio rerio</i>	LC ₅₀ 96h	3,05	178		
Bivalves	<i>Corbicula fluminea</i>	LC ₅₀ 96h	1872,08	178		Labrot <i>et al.</i> , 1999
Cladocères	<i>Daphnia magna</i>	LC ₅₀ 48h	4,12 - 8,36	90.7	62,1	Barata <i>et al.</i> , 1998
			6,9 - 15,5			
			10,3 - 25,5	179	126	
			15,9 - 27,3			
	<i>Daphnia magna</i>	LC ₅₀ 48h	0,39	250	2,7	Zeman <i>et al.</i> , 2008
			7.8	250	34	
<i>Daphnia magna</i>	LC ₃₀ 48h	5,34 - 7,62	66-73	54-60	Poston <i>et al.</i> , 1984	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC ₅₀ 96h	10,5	176	126	Khune <i>et al.</i> , 2002	
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	LC ₅₀ 48h	0,09-0,39			Semaan <i>et al.</i> , 2001	

Bywater *et al.* (1991) montrent chez 2 espèces de poissons que le stade larvaire est plus sensible à l'uranium que des individus âgés de 90 jours. La LC₅₀ varie entre 0,39 et 25,5 mgU.L⁻¹ chez le microcrustacé *Daphnia magna* selon les paramètres abiotiques du milieu. Parmi les études figurant dans la revue bibliographique réalisée par Sheppard *et al.* (2005) concernant la toxicité de l'uranium, les valeurs de toxicité les plus sensibles proviennent de l'étude de Pickett *et al.* (1993). Dans ces travaux réalisés sur *Ceriodaphnia dubia*, une valeur de CE₂₅ reproduction à 7 jours est définie à 3 µgU.L⁻¹. Chez d'autres cladocères, la toxicité de l'uranium varie entre 0,41 mgU.L⁻¹ pour *Latonopsis fasciculata* et 1,29 mgU.L⁻¹ pour *Moinodaphnia macleayi*.

4.2.3.2. Toxicité chronique

Peu d'études se sont intéressées à la toxicité chronique de l'uranium, reflétant pourtant de manière plus réaliste les conditions environnementales.

Chez le poisson *Danio rerio*, une diminution du succès reproducteur à partir de 20 µgU.L⁻¹ est démontrée après 21 jours d'exposition. Cette étude montre également des altérations des tissus gonadiques chez les mâles et les femelles (Bourrachot, 2009). Les travaux de Barillet (2007),

mettent en évidence un stress oxydant, des atteintes neurotoxiques (cérébrales), génotoxiques (altération du matériel génétique) et histologique (modification structurale de différents tissus) chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposé à 2 concentrations d'uranium (20 et 100 $\mu\text{gU.L}^{-1}$) pendant 20 jours. Chez la même espèce, une perturbation du système olfactif des individus est mise en évidence (Lerebours, 2009).

Concernant les invertébrés aquatiques, Semaan et al. (2001) définissent une *LOEC* reproduction comprise entre 20 et 49 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ et une *LOEC* mortalité comprise entre 7 et 49 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ chez *Moinodaphnia macleayi*. Une étude dans laquelle un autre cladocère, *Ceriodaphnia dubia*, est exposé à différentes concentrations d'uranium (0 à 70 mgU.L^{-1}) pendant 7 jours, démontre une réduction de la taille lorsque les concentrations d'uranium augmentent dans le milieu (Kuhne et al., 2002). Chez *Daphnia magna* comme il est expliqué ailleurs, Poston et al. (1984) définissent une *LOEC* reproduction égale à 0,52 mgU.L^{-1} . Une autre étude sur la même espèce démontre un effet sur la reproduction et la croissance dès 25 $\mu\text{gU.L}^{-1}$, ainsi qu'une diminution de l'ingestion et de la respiration lors d'une exposition de 21 jours (Zeman et al., 2008). Massarin et al. (2010) étudient les effets d'une exposition à de l'uranium appauvri au cours de 3 générations successives (F0, F1 et F2 : 70 jours). Les auteurs démontrent une aggravation de la sévérité des effets au cours des générations avec un effet dès 10 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ sur la croissance somatique à partir de la F0, sur la nutrition à partir de la F1 et sur la reproduction à partir de la F2.

Chapitre 2 :

Daphnia magna comme modèle d'étude toxicologique

La daphnie, *Daphnia magna* est un microcrustacé d'eau douce recommandée par l'OCDE (Organisation for Economic Cooperation and Development) pour les tests d'écotoxicité (OECD, 2004; OECD, 2008). C'est un organisme facile à manipuler en laboratoire du fait de sa petite taille, de son cycle de vie court (puberté atteinte au bout de 6 jours), de sa fécondité élevée et de son mode de reproduction par parthénogénèse.

1. Le modèle biologique de l'étude

1.1. Biologie de la daphnie

1.1.1. Morphologie

Daphnia magna possède une carapace transparente, ayant une ouverture ventrale à l'intérieure de laquelle se trouve 5 paires d'appendices thoracique munies d'appareils branchiaux permettant la filtration de la nourriture (Figure 6).

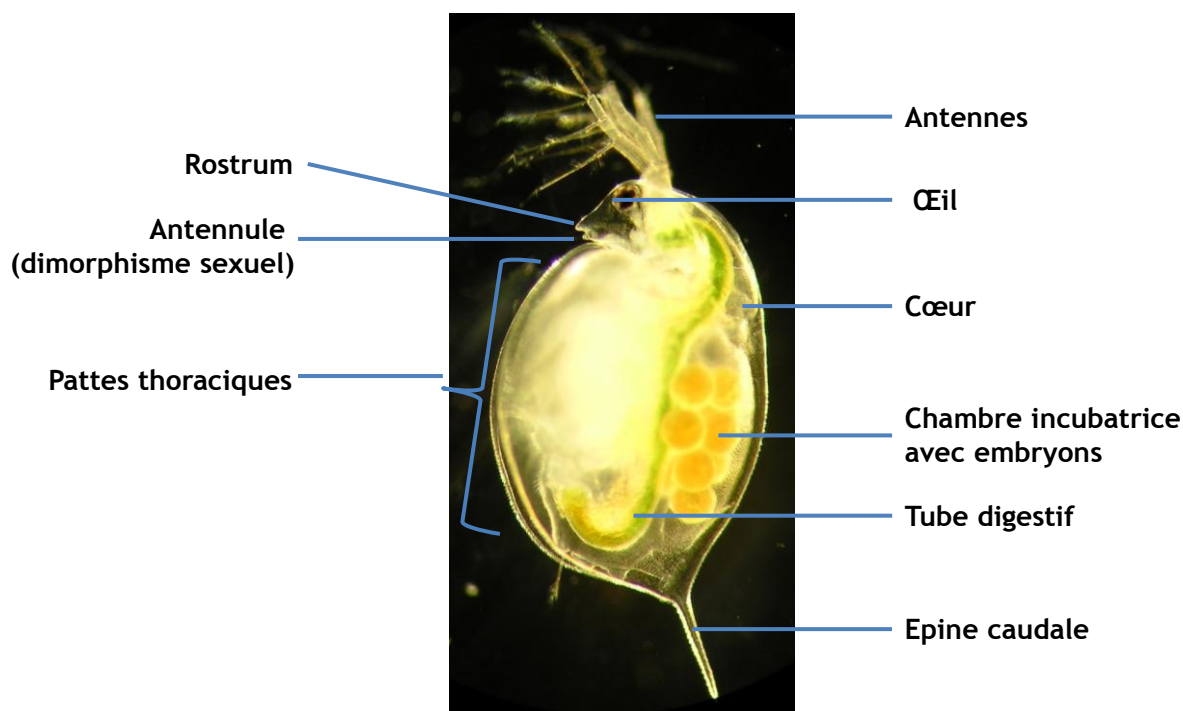


Figure 6 : Anatomie d'une femelle adulte *Daphnia magna* (Photo d'après Zeman (2008))

Les antennes biramées, pourvues de soies natatoires, présentent au niveau de la tête des individus, leur permettent de nager.

Le dimorphisme sexuel est caractérisé par la présence d'une antennule plus longue chez le mâle (près de la bouche).

1.1.2. Habitat

Les daphnies sont des microcrustacés d'eau douce, se trouvant dans les lacs et plus particulièrement dans les eaux stagnantes. La distribution des daphnies est liée à la présence de ces prédateurs, les planctophages. *Daphnia magna* est une espèce ne pouvant survivre lorsque la pression de prédation est trop intensive.

Les conditions physico-chimiques de l'eau où vivent les daphnies varient largement d'un milieu à l'autre : entre 6,5 et 9,5 avec un optimum entre 7,2 et 8,5. La daphnie peut tolérer des niveaux de salinité supérieur à 5% (jusqu'à 20%) (Ebert, 2005).

1.1.3. Nutrition

Daphnia magna se nourrit en filtrant de petite particules en suspension dans la colonne d'eau. L'acheminement des particules vers l'organisme est assuré par les pattes thoraciques (phyllopoies). La nourriture est constituée de particules d'algues planctoniques, généralement vertes, faisant ainsi des daphnies, des consommateurs primaires. Le type de nourriture va induire des variations de couleurs des individus : les daphnies se nourrissant d'algues sont transparentes avec une teinte

verte ou jaune tandis que les individus se nourrissant de bactéries sont blancs ou rose-saumon. La privation de nourriture rend les organismes transparents.

Le tube digestif des daphnies est de forme tubulaire et est composé de 3 parties : l'œsophage, la partie médiane et la partie terminale. De petits diverticules sont présents dans la partie médiane du tube digestif. Cette même partie est composée d'un épithélium et de microvillosités permettant l'absorption des particules. Concernant le pH, il diffère selon la partie du tube digestif : entre 6 et 6,8 dans la partie antérieure et entre 6,6 et 7,2 dans la partie postérieure. Les fèces sont excrétés par la partie terminale du tube digestif grâce à des mouvements péristaltiques (Ebert, 2005).

1.1.4. Système circulatoire

Les daphnies ont un système de circulation sanguine ouvert. Le cœur se situe dorsalement dans la partie antérieure de la chambre incubatrice. Les daphnies sont dotées d'une protéine d'hémoglobine respiratoire extracellulaire permettant le transport de l'oxygène (Ebert, 2005). Cette hémoglobine leur permet de résister aux faibles taux en oxygène dans le milieu.

1.1.5. Système nerveux

Le système nerveux est caractérisé par les ganglions cérébraux, qui se situent près des yeux et du tube digestif. Chez les juvéniles et les adultes, les individus ont un seul œil assez large (en réalité composé de deux yeux réunis) permettant l'orientation des individus lors de la nage tandis que chez les embryons, l'œil est composé de deux petites taches brune qui fusionnent lors de leur développement.

1.2. Cycle de vie de la daphnie

Le cycle de vie de la daphnie est composé de deux modes de reproduction : asexuée et sexuée (Figure 7).

1.2.1. Cycle de vie asexué

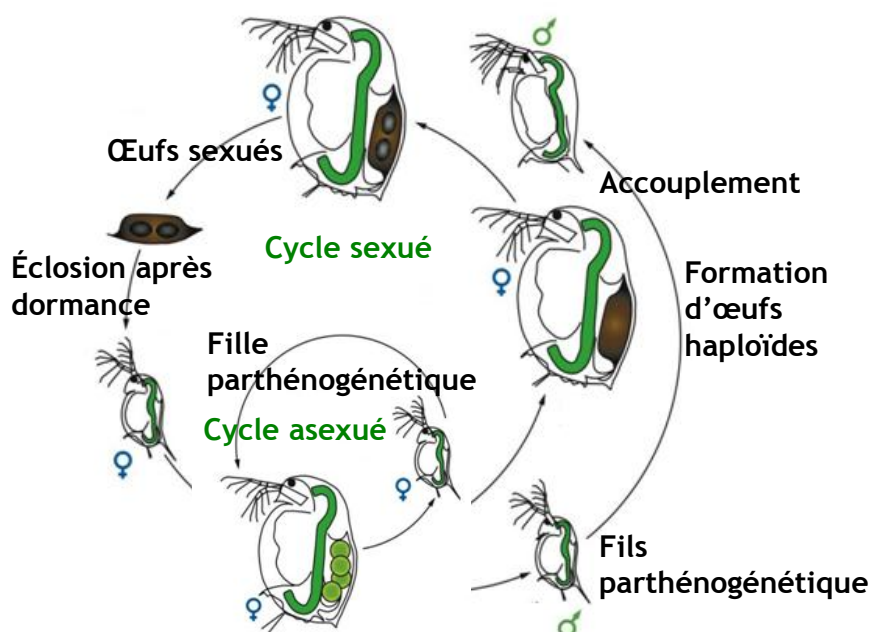


Figure 7 : Cycle de vie de *Daphnia magna* d'après Ebert (2005)

Lors des périodes de reproduction asexuée, les femelles existent seules et engendrent à partir d'ovules (non fécondés) d'autres daphnies filles génétiquement identiques à leur mère. La femelle produit une ponte après chaque mue et les œufs sont déposés dans sa poche incubatrice (Ebert, 2005). Les générations parthénogénétiques, sans apparition de mâles, se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables (Figure 8).

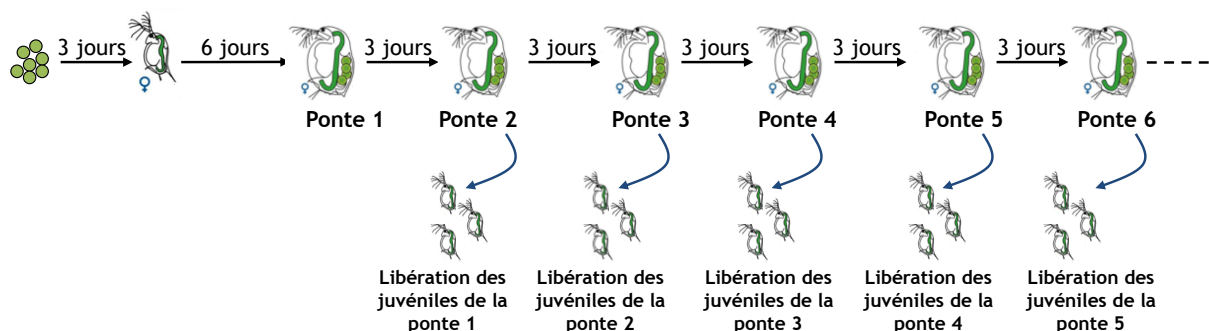


Figure 8 : Reproduction parthénogénétique de *Daphnia magna*

1.2.2. Cycle de vie sexuée

Lorsque les conditions de l'environnement deviennent défavorables (diminution de la photopériode, restrictions nutritives,...), la reproduction sexuée se met en place. Lors de ces périodes, les populations donnent naissance à une génération composée de mâles (diploïdes) et de femelles dont l'accouplement aboutit à la production d'œufs de résistance, qui éclosent lors du retour des conditions favorables de l'environnement. Les mâles sont nécessaires à la fertilisation de

ces œufs de résistance (haploïdes). Les femelles produisent deux œufs à la fois (un pour chaque ovule), encapsulés dans une structure protectrice nommée éphippium. Cette carapace modifiée permet aux éphippies (œufs de résistance) d'être résistants au froid ainsi qu'à la dessiccation (Innes, 1997; Ebert, 2005). Les œufs de résistance sont enfermés dans une capsule composée de 2 parties : une partie criblée et une cuticule entourant les œufs et la capsule. Phosphate, sulfate, potassium et calcium sont les éléments constitutifs des éphippies, et sont réparties dans les régions de l'œuf (Kawasaki *et al.*, 2004). Le développement des embryons, suivi de l'éclosion, se produit une fois que les éphippies sont sorties de leur capsule.

Les mâles sont facilement reconnaissables par rapport aux femelles. Ils grandissent moins vite et ont une taille plus faible que les femelles. Leur nage est plus rapide et s'effectue de manière horizontale dans la colonne d'eau. Leur activité de fraie induit un coût métabolique plus élevé ainsi qu'un taux de production de CO₂ plus important que pour les femelles (Brewer, 1998; Pietrzak *et al.*, 2010). De plus, les mâles sont moins sensibles que les femelles aux changements de température, à la présence de stressseurs comme des cyanobactéries, des substances chimiques... (Ikuno *et al.*, 2008).

2. Etudes toxicologiques chez *Daphnia magna*

En tant qu'organismes recommandés pour les tests écotoxicologiques standards (OECD, 2004; OECD, 2008), les daphnies font l'objet de nombreuses études concernant les effets de polluants à tous les échelons d'organisation biologique depuis l'organisme jusqu'au niveau moléculaire.

2.1. Effets sur l'histoire de vie

2.1.1. Effets sur la croissance et la reproduction

De nombreuses études traitent des effets de polluants sur les traits d'histoire de vie chez la daphnie. Selon le toxique considéré, l'impact sur la survie, la croissance ou encore la reproduction peut considérablement varier.

Lors d'une exposition à de l'uranium pendant 21 jours, la croissance et la reproduction, paramètres les plus sensibles à l'échelle individuelle, sont significativement réduits dès 25 µg.L⁻¹. Les auteurs associent ces effets à une diminution de l'ingestion et à une augmentation de la respiration observées au cours de l'expérience (Zeman *et al.*, 2008). Des travaux plus anciens sur la toxicité de l'uranium, démontrent de faibles effets sur la reproduction dès 520 µg.L⁻¹ (Poston *et al.*, 1984). L'étude d'échantillons d'eau à proximité d'anciennes mines d'uranium, révèle des effets délétères sur les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna* (Antunes *et al.*, 2007). L'exposition au tritium est toxique pour les daphnies et réduit différents paramètres biologiques : reproduction (nombre de pontes, nombre moyen d'œufs par pontes, nombre total de néonates

produits par femelles), durée de vie et taux de croissance. De plus, dans cette étude menées sur 5 générations successives, un déclin graduel des paramètres au cours des générations est observés après la deuxième génération (Gudkov et Kipnis, 1996). Une irradiation gamma démontre des effets sur la fécondité, la biomasse individuelle et sur les dépenses énergétiques (Gilbin *et al.*, 2008).

Les recommandations de l'OCDE indiquent que les tests standards en écotoxicologie chez la daphnie doivent débuter à partir de néonates de moins de 24h et doivent se déroulent sur 21 jours (OECD, 2004; OECD, 2008). Dans la logique de cette réglementation, la plupart des travaux débutent l'exposition après l'éclosion des individus pour ensuite continuer sur une ou plusieurs générations (Guan et Wang, 2006a; Alonzo *et al.*, 2008; Gilbin *et al.*, 2008; Zeman *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010). D'un côté des études s'intéressent aux effets seulement pendant le stade embryonnaire et d'un autre côté seulement à partir de l'éclosion. L'étude du cycle de vie entier, comprenant les stades embryonnaires et post-éclosion, pourrait être un outil puissant pour déterminer le(s) mode(s) d'action d'un polluant sur un organisme.

2.1.2. Sensibilités comparées des différents stades de vie

L'analyse de l'embryotoxicité est souvent réalisée sur des œufs préalablement séparés des mères (8h après la ponte). Palma *et al.* (2009) mettent en évidence que l'endosulfate induit des déformations embryonnaires sur les œufs de daphnies exposés. D'autres travaux sur les effets d'un polluant chimique (l'éthylenthiourea) démontrent des anomalies dans le développement d'embryons exposés *in vitro* (Ohta *et al.*, 1998). Des études approfondies examinent la sensibilité de chaque stade du développement embryonnaire. L'étude de la toxicité de différents métaux lourds (cadmium, zinc, cuivre et plomb) sur les stades de vie précoces de *Daphnia magna* démontre ainsi que les individus deviennent plus sensibles après l'apparition de la tête (Bodar *et al.*, 1989).

Plusieurs auteurs ont examiné au cours des dernières années, s'il existe une différence de sensibilité entre les stades de vies embryonnaire et adulte. Sobral *et al.* (2001) indiquent une sensibilité plus élevée des stades de vie précoces (œuf) que lors de tests chroniques classiques sur 21 jours débutant à partir de l'éclosion. Une étude récente conclut que les embryons sont de 1,4 à 3,1 fois plus sensibles que les jeunes adultes suite à une pollution à des désinfectants (Ton *et al.*, 2012). Les travaux de Abe *et al.* (2001) mettent en évidence une faible corrélation entre les juvéniles et les embryons, suite à une exposition à l'aniline. Les auteurs concluent que les stades de vie embryonnaire et juvénile ont des sensibilités différentes, impliquant qu'il est essentiel d'étudier les différents stades de vie pour comprendre entièrement l'effet d'un polluant.

2.1.3. Effets transgénérationnels

Dans l'environnement, l'exposition des individus peut être supérieure à leur durée de vie. En effets, plusieurs études évaluant les effets de composés toxiques au cours de générations exposées montrent que les observations dans la première génération ne sont pas représentatives des effets

chez les descendants (LeBlanc, 1982; Bodar *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2000; Muysen et Janssen, 2004; Pane *et al.*, 2004; Guan et Wang, 2006b; Alonzo *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). La réponse d'un organisme à une exposition évolue au cours des générations et peut suivre différents scénarios selon le polluant considéré. L'apparition d'une tolérance au cadmium, au cuivre et au mercure est démontrée chez *Daphnia magna* exposé pendant plusieurs générations (LeBlanc, 1982; Bodar *et al.*, 1990). Dans d'autres cas, une augmentation de la sensibilité au polluant est observée au cours des générations successives, comme pour des expositions à un pesticide (la diazinon) (Sánchez *et al.*, 2000) ou à des éléments radioactifs (Américium 241 et Uranium appauvri) (Alonzo *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010).

L'étude de Ward et Robinson (2005) démontre une augmentation de la résistance de *Daphnia magna* au cadmium qui se produit au bout de quelques générations. Dans ce travail, des individus provenant de femelles exposées sont placés en milieu non contaminé pendant plusieurs générations. A certaines générations, la sensibilité de ces individus au cadmium est vérifiée via des tests de toxicité aiguë pour comparer la génération exposée (F0) et les générations suivantes qui ne le sont pas. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de la tolérance au cadmium observée résulte de l'adaptation génétique plutôt que l'acclimatation car les néonates ne sont jamais exposés au cadmium. Cependant ils n'excluent pas un potentiel transfert maternel. Il est important de noter, que la capacité à acquérir une résistance à un toxique n'assure pas une meilleure survie car les coûts énergétiques associés à la détoxification induisent une perte de la fitness.

2.1.4. Effets induits par l'exposition maternelle

Même après un retour en milieu non contaminé, les effets peuvent persister chez les individus et des dommages peuvent être transmis à leur descendance. De nombreuses études se sont penchées sur ce mécanisme.

Sanchez *et al.* (1999) étudient les effets de l'exposition de femelles (F0) à un pesticide, le diazinon, sur leur descendant (F1) remis en eau non contaminée. Une réduction de la reproduction est observée dans la génération F1 par rapport aux témoins. Une étude plus récente concernant l'exposition à des toxines de cyanobactéries indique des effets sur leur descendance non exposée. En effet, l'âge à la maturité de la descendance, remise en milieu non contaminé, augmente et leur survie diminue après l'exposition parentale aux toxines (Dao *et al.*, 2010). Dans d'autres travaux, les néonates provenant de femelles exposées à 75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'uranium ne survivent pas. Une amélioration de la survie et de la reproduction est observée seulement pour les individus provenant de femelles exposées à des concentrations inférieures ou égales à 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Massarin *et al.*, 2010). La valeur de EC_{50} diminue pour des individus F1 non exposés par rapport à leurs mères, F0, contaminées à du tétradifon (Villarroel *et al.*, 2000).

2.2. Effets sur le métabolisme énergétique

L'énergie disponible pour un organisme vient de sa nourriture qui est intégrée, assimilée puis allouée à différentes fonctions telles que la croissance ou la reproduction. L'approche énergétique permet d'estimer la quantité d'énergie disponible pour la maintenance, la croissance et la reproduction (Glazier et Calow, 1992). Face à un stress induit par un produit toxique sur l'organisme, des processus compensatoires apparaissent pour lutter contre la toxicité du polluant entraînant des coûts additionnels en énergie. Ainsi, l'hypothèse des coûts métaboliques est émise. L'augmentation des coûts métaboliques due à un stress intervient au dépens des autres processus énergétiques important dans la dynamique de population (survie, croissance somatique et reproduction) (Calow et Sibly, 1990; Calow, 1991).

Il existe différents biomarqueurs permettant d'étudier les perturbations du métabolisme énergétique. Cette approche permet d'évaluer l'état de santé des organismes à différents niveaux d'organisation biologique. Les plus connus sont : l'allocation d'énergie cellulaire (AEC), la charge énergétique en adénylates (CEA), les réserves énergétiques et l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR) (Durou *et al.*, 2008).

2.2.1. L'allocation d'énergie cellulaire

L'allocation d'énergie cellulaire établit le budget énergétique net de la cellule. Ce type de paramètre fait partis des marqueurs biochimiques les plus rapides et les plus sensibles (Durou *et al.*, 2008). Cette technique développée par De Coen et Janssen (1997), évalue les effets d'un stress toxique sur la balance métabolique. Avec cette méthode, les réserves énergétiques disponibles (E_a) et l'énergie consommée (E_c) sont quantifiées biochimiquement afin de calculer le budget énergétique net total par la différence entre ces deux valeurs. Ces auteurs testent cette méthode lors d'une exposition à deux polluants (lindane et mercure). Les résultats montrent une diminution de l'allocation d'énergie cellulaire avec l'exposition. Des résultats similaires sont observés lors d'une exposition de néonates à six polluants différents (métaux et chimiques) (De Coen et Janssen, 2003). En comparant les effets aux niveaux énergétique et populationnel, ces auteurs mettent en évidence une corrélation linéaire indiquant que ce biomarqueur énergétique pourrait être utilisé pour prédire les effets à ce niveau supérieur d'organisation biologique.

2.2.2. La charge énergétique en adénylate (CEA)

La charge énergétique en adénylate (CEA) est utilisée pour mesurer l'énergie métabolique potentiellement disponible au sein d'un organisme vivant. Ce marqueur est basé sur la mesure en adénylates (ATP, ADP et AMP) (Durou *et al.*, 2008).

2.2.3. Les réserves énergétiques

Les réserves énergétiques reflètent le stockage de l'énergie disponible sous forme de lipides, protéines et glycogène. Lorsque l'énergie assimilée est supérieure aux demandes, le surplus est stocké sous forme de glycogène et/ou de lipides. Le glycogène et les lipides sont toujours utilisés en

priorité, les protéines étant mobilisées qu'en cas de stress sévère (Durou *et al.*, 2008). Les réserves énergétiques sont considérées comme des biomarqueurs d'exposition de long terme et des études prouvent qu'ils répondent à un stress chimique induit chez *Daphnia magna* (Bergman Filho *et al.*, 2010). Lors d'une exposition de daphnies à du zinc, Canli (2005) démontrent que les réserves énergétiques varient selon la voie d'exposition des individus (directe ou par voie trophique). Une autre étude se penche sur les effets de stressseurs naturels, température, nourriture (qualité et quantité) et oxygène, sur les réserves énergétiques de *Daphnia magna*. Ces travaux démontrent que seules la température et la concentration de nourriture induisent des variations de réserves énergétiques chez les organismes. Les auteurs suggèrent que les mesures d'énergie sont de bons indicateurs de sensibilité pour évaluer les stress environnementaux (Bergman Filho *et al.*, 2010).

2.2.4. L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR)

L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR), également nommée « Scope for growth » se base sur l'hypothèse qu'une hausse des dépenses énergétiques pour le métabolisme de base afin de faire face aux stress endurés, peut conduire à une réduction de l'investissement énergétique vers la croissance et/ou la reproduction. L'AECR tient compte de l'énergie assimilée par la nourriture, de l'énergie dépensée pour la respiration et perdue par excrétion des dérivés azotés. Le budget énergétique net disponible pour la croissance et la reproduction peut être considéré comme un biomarqueur de l'état de santé général des individus (Durou *et al.*, 2008). Knops *et al.* (2001) observent une réduction de croissance mais pas de variation des coûts métaboliques totaux lors d'une exposition de daphnies à du cuivre, du cadmium et du cethyltriméthylammonium (CTAB). Cependant, les auteurs soulignent que soit la demande énergétique face à un stress toxique est faible ou soit les coûts additionnels sont masqués par d'autres effets. L'uranium induit une diminution de l'AECR masse-spécifique dès 25 µgU.L⁻¹ associée à une diminution de l'ingestion. Dans cette même étude, les auteurs mettent en évidence une augmentation de la consommation en oxygène chez des individus exposés à des concentrations de sélénium (supérieures à 110 µg.L⁻¹) traduisant des coûts métaboliques supplémentaires liés au stress engendré par ce polluant (Zeman, 2008). Smolders *et al.* (2005) étudient la capacité de daphnies à faire face à un stress toxique (salinité ou cadmium) en condition de nourriture élevées (de 100 à 800.10³ cellules.mL⁻¹). Ces travaux mettent en évidence qu'un haut niveau énergétique individuel obtenue via une forte quantité de nourriture n'induit pas d'augmentation des capacités pour faire face à un stress toxique.

2.2.5. Influence des conditions de nutrition

Un polluant peut également induire des changements de l'allocation de l'énergie se répercutant sur la progéniture. L'induction d'un stress toxique combiné à une variation de la quantité de nourriture disponible induit des modifications des pontes produites. En effet, une exposition à du

plomb associée à des quantités de nourriture faibles ou fortes, indique une modification de la taille et de la masse des pontes produites. L'exposition à du plomb en faible condition nutritive induit la production de petites pontes contenant des néonates de masse élevée. Dans le cas de nourriture abondante, le stress toxique induit par le plomb est différent (Enserink *et al.*, 1995). Les auteurs suggèrent des échanges dans l'allocation d'énergie entre la croissance et la reproduction qui affectent le processus de maturation des individus. Le plomb interagit avec le modèle d'allocation d'énergie qui détermine le processus de la maturation, principalement en condition de faible nourriture. Cette stratégie de reproduction, produisant de larges pontes avec de petits néonates quand la nourriture est abondante et inverse en cas de nourriture limitante, est démontrée (Enserink *et al.*, 1990). Dans ces travaux, les auteurs combinent également l'effet nutrition à un polluant, le cadmium. Les résultats indiquent une sensibilité des néonates au cadmium dépendant de la nutrition des mères.

2.3. Effets aux niveaux cellulaire et sub-cellulaire

L'étude des effets d'un contaminant ne s'arrêtent pas seulement à l'observation des traits d'histoire de vie qui correspondent au niveau individuel. Si le succès reproducteur est le paramètre écotoxicologique le plus pertinent et le plus important, il est plus raisonnable d'accepter que moins de temps et de plus faibles concentrations sont nécessaires pour induire une réponse à des niveaux d'organisations biologiques plus faibles (Jha, 2008). Les marqueurs moléculaires sont reconnus comme étant des critères d'effets sensibles répondant à de faibles doses et après de courtes durées d'exposition par rapport aux traits d'histoire de vie (Jha, 2008; Dallas *et al.*, 2012). En effet, les dommages moléculaires et cellulaires précédant toujours les effets macroscopiques, il est important d'étudier ces effets de polluants à des niveaux sub-individuels afin de prédire les effets futurs d'une contamination.

2.3.1. Effets sur le stress oxydant

Le stress oxydant est une réponse cellulaire lors de la production d'espèces réactives à l'oxygène. De nombreuses études se sont penchées sur le cas des effets de polluant sur la balance oxydative chez *Daphnia magna*.

L'exposition à du cadmium induit une augmentation de l'expression de la catalase, une enzyme antioxydante, chez des juvéniles (Kim *et al.*, 2010). L'exposition à un autre métal, le cuivre, démontre une augmentation de la quantité d'espèces réactives à l'oxygène dans les cellules dès de faibles niveaux d'exposition (0,63 μM) chez des juvéniles. Ces travaux mettent également en évidence une protection de la cellule en présence d'acide ascorbique (vitamine C) (Xie *et al.*, 2006). Les travaux de Kim *et al.* (2009) concernant l'exposition à un polluant chimique (sulfathiazole) indiquent une augmentation d'espèces réactives à l'oxygène. L'étude montre une augmentation de la production d'enzymes antioxydantes, catalase et glutathion S-transférase, en relation avec l'augmentation de la concentration d'exposition.

L'induction d'un stress oxydant dans la cellule peut avoir un impact au niveau moléculaire en altérant l'ADN.

2.3.2. Etude des atteintes moléculaires

Les dommages à l'ADN peuvent causer des effets irréversibles et tératogènes. Différentes fonctions biologiques peuvent être impactées par des altérations de l'ADN telles que les traits d'histoire de vie (fécondité, croissance et survie), les fonctions immunitaires ou encore le métabolisme énergétique. De plus, les modifications de l'ADN peuvent être transmises aux générations suivantes.

De nombreuses études se sont intéressées à l'étude des dommages à l'ADN par différentes techniques moléculaires chez *Daphnia magna* au cours d'expositions diverses.

Une étude concernant les effets de nanoparticules met en évidence un effet génotoxique du dioxyde de cérium (CeO₂), par le test des comètes, avec une augmentation des cassures doubles brins de l'ADN. Une corrélation significative entre les dommages à l'ADN et la mortalité est démontrée lors de cette étude. Les auteurs suggèrent que ce toxique induit des dommages ADN induisant des conséquences à des échelles biologiques plus élevées (Lee *et al.*, 2009). La génotoxicité du bisphénol A est démontrée par l'intermédiaire de cette méthode (Park et Choi, 2009). L'expression génique est un outil idéal pour étudier la différence d'expression génique de milliers de gènes simultanément. Poynton *et al.* (2012) testent le caractère génotoxique des nanoparticules d'argent (AgNPs) en comparaison à la toxicité de nitrate d'argent (AgNO₃) en étudiant l'expression génique par les techniques de PCR quantitative en temps réel et les puces à ADN. L'expression des gènes est différente, AgNO₃ et AgNPs ont des profils d'expression distincte, suggérant différents modes d'action. Les principaux processus biologiques altérés par AgNPs incluent le métabolisme des protéines et le signal de transduction alors qu'AgNO₃ induit une diminution de la régulation des processus de développement, en particulier le développement sensoriel. Une inhibition de la réplication de l'ADN est observée lors d'une contamination à un métal, le cuivre, via la méthode de RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Atienzar *et al.*, 2001).

Une transmission des altérations de l'ADN de la mère à sa descendance est mise en évidence par Atienzar et Jha (2004) lors d'une exposition de daphnies à du benzo(a)pyrène. Les auteurs suggèrent alors que les changements de l'ADN se produisent dans les cellules germinales où ils sont transmis à la génération suivante. Dans cette même étude, les effets sur l'ADN disparaissent après une remise en eau propre des individus. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une apparition de mécanismes de réparations de l'ADN.

Chapitre 3 :

Choix d'un biomarqueur moléculaire : La RAPD

Pour expliquer l'augmentation transgénérationnelle de la toxicité de l'uranium chez *Daphnia magna*, nous considérons l'hypothèse que l'uranium induit des dommages à l'ADN accumulés et transmis au cours des générations. Ces dommages à l'ADN pourraient impliquer le mode d'action déjà identifié dans les études antérieures, à savoir une réduction d'assimilation (Massarin *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2011), ou un second mode d'action métabolique.

Diverses études chez *Daphnia magna* se sont penchées sur les altérations biologiques aux niveaux moléculaire et individuel. Cependant, le lien de toxicité entre les différentes échelles biologiques n'a jamais fait l'objet d'une seule et même étude. Dans ce contexte, en complément des effets mesurés au niveau individuel sur la survie, la croissance et la reproduction, un biomarqueur de génotoxicité est à sélectionner.

Dans un premier temps il apparaît important de définir précisément le terme « biomarqueur » avant de développer l'étude sur la génotoxicité.

1. Les biomarqueurs

1.1. Généralités

Les biomarqueurs permettent d'évaluer les modifications d'une structure ou encore une variation anormale d'une activité biologique chez un organisme. Ce sont des paramètres biologiques de réponses sub-létales incluant un certain nombre de paramètres moléculaires, cellulaires et physiologiques, qui peuvent en principe être mesurés par différentes méthodes. Les biomarqueurs représentent la réponse initiale à une perturbation environnementale et à une contamination (de Lafontaine *et al.*, 2000).

Au cours des années, plusieurs définitions de biomarqueurs ont été données par les scientifiques. Une des premières définitions est faite par Henderson *et al.* (1987) « un marqueur

biologique est un indicateur signalant des événements dans les systèmes biologiques et dans des échantillons». Cette définition est complétée par **Depledge et Fossi (1994)**: « un biomarqueur est une réponse biologique à un ou des produits chimiques qui donne une mesure de l'exposition et parfois aussi d'un effet toxique ». Suite à cette définition, d'autres auteurs ont redéfini le terme biomarqueur en faisant une distinction entre biomarqueur et bioindicateur. Dans ce cadre, le terme biomarqueur désigne un changement observable et/ou mesurable (niveau moléculaire, biochimique, cellulaire,...) qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à un xénobiotique. Le terme bioindicateur désigne un organisme permettant de caractériser l'état d'un écosystème par référence à des variables biologiques, cellulaires, physiologiques,... et de mettre en évidence de façon précoce les modifications engendrées par le polluant. Cette distinction étant complexe, elle n'est pas adoptée par la totalité du monde scientifique (**Roméo et Giambérini, 2008**).

Après avoir défini le terme « biomarqueur », il est essentiel d'adopter une classification. Selon le Conseil national de Recherches (NRC) (**Henderson et al., 1987**) les biomarqueurs sont classés en 3 catégories : les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité. Cette classification est adoptée par de nombreux scientifiques (**WHO, 1993; van der Oost et al., 2003**).

- Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu pénètre dans l'organisme. Dans cette catégorie se trouvent entre autre, les analyses physico-chimiques (nourriture, air, eau,...) ou encore des mesures de fluides biologiques.
- Les biomarqueurs d'effet indiquent, qu'après avoir pénétré, le polluant se répand dans les différents tissus, en exerçant des altérations biologiques ou non. Ils incluent les mesures biochimiques, physiologiques ou d'autres altérations dans les tissus ou les fluides corporels de l'organisme. Ce type de biomarqueurs regroupe les mesures des altérations aux niveaux des organes et des tissus.
- Les biomarqueurs de susceptibilité sont définis comme des indicateurs de la santé d'un système qui est spécialement sensible à l'exposition à une substance exogène spécifique. Ces marqueurs correspondent par exemple à des mesures métaboliques, génétiques ou encore à l'analyse de mécanismes compensatoires.

1.2. Utilisation des biomarqueurs

Différents biomarqueurs relatifs à une exposition à l'uranium sont mesurés chez des organismes aquatiques, notamment les poissons et certains invertébrés. Il existe des biomarqueurs pour tous les niveaux d'organisation biologique. Chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, une neurotoxicité via des mesures d'acétylcholinestérase (AChE) et un stress oxydant est mis en évidence lors d'une exposition à l'uranium (**Barillet et al., 2007**). Des altérations histologiques sont démontrées lors d'une exposition à ce polluant chez le poisson zèbre (**Bourrachot, 2009; Augustine, 2012**), chez l'écrevisse, *Procambarus clarkii* (**Al Kaddissi et al., 2011**) et chez la daphnie, *Daphnia magna* (**Zeman et al., 2008; Massarin et al., 2011**). Au niveau moléculaire, des altérations de l'ADN

(Simon *et al.*, 2011) ou encore des modifications des réponses transcriptomiques (Lerebours *et al.*, 2010) sont observées respectivement chez le mollusque bivalve, *Corbicula fluminea*, et chez le poisson zèbre.

Des niveaux d'organisations biologiques inférieures à l'organe n'ont encore jamais fait l'objet d'étude dans le cas de la daphnie et de l'uranium. De plus, la génotoxicité de l'uranium n'a jamais été étudié dans des conditions multigénérationnelles. Une corrélation des altérations génotoxiques et des effets mesurés au niveau individuel permettrait de tester si dans le cas de l'uranium et de la daphnie, l'ADN est un bon biomarqueur pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction.

2. La génotoxicité en écologie

Dans ce travail de thèse, les altérations de l'ADN chez *Daphnia magna* induites par l'uranium sont analysées à l'aide d'une analyse quantitative, la RAPD-PCR. Un état l'art sur les différentes altérations et réparations possibles de l'ADN et leurs mesures est effectué avant d'étudier la RAPD, pour mieux comprendre le choix de la technique moléculaire employée dans cette étude.

2.1. Les modifications de l'ADN

2.1.1. Les altérations de l'ADN

En raison de la variété de composés génotoxiques présent dans l'environnement, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possible. Ces altérations de l'ADN les plus communes sont les lésions primaires, correspondant à des modifications de bases ou à des cassures simple ou double brin de l'ADN (Figure 10) (Cachot et Dégremont, 2009). De plus, il semble pertinent d'étudier les lésions primaires de l'ADN dans la mesure où elles représentent le premier stade d'altération suite à l'action d'un agent génotoxique.

L'ADN

Le génome, correspondant à l'ensemble du matériel génétique d'un individu, est impliqué dans l'ensemble du métabolisme cellulaire. L'ADN, support de l'hérédité, est une molécule très longue composée d'une succession de nucléotides (l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine). L'ADN joue un rôle clé dans l'expression et dans la transmission du patrimoine génétique d'un individu. Mais lors de son altération, l'ADN peut transmettre des informations erronées à sa descendance.

Dans les cellules, l'ADN se présente sous forme condensée et il est associé à des protéines nucléaires nommées histones. Les histones sont associées pour former des nucléosomes autour desquels s'enroule l'ADN. Le nucléosome, premier niveau de compactage de l'ADN et correspondant au complexe ADN-protéine (histones), constitue l'unité de base de la chromatine et est impliqué dans la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN (Figure 9).

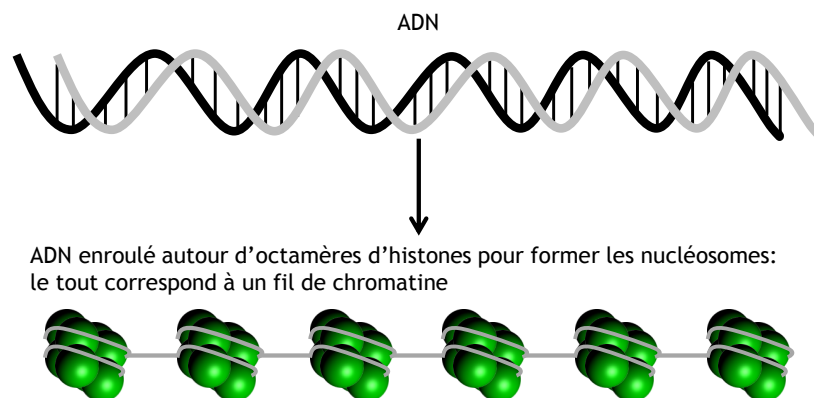


Figure 9 : L'organisation de l'ADN avec la structure de chromatine (d'après Felsenfeld et Groudine (2003))

L'ADN est une macromolécule biologique à laquelle sont attribuées différentes structures (Orsière *et al.*, 2005):

- la structure primaire correspondant à la séquence en nucléotides
- la structure secondaire correspondant à la configuration et à la situation des nucléotides
- la structure tertiaire correspondant à l'état sous lequel se trouve la molécule d'ADN (réplication, transcription, chromosome ou chromatide).

Ces différentes structures citées ci-dessus, jouent un rôle considérable dans l'apparition des lésions puis des mutations (Orsière *et al.*, 2005).

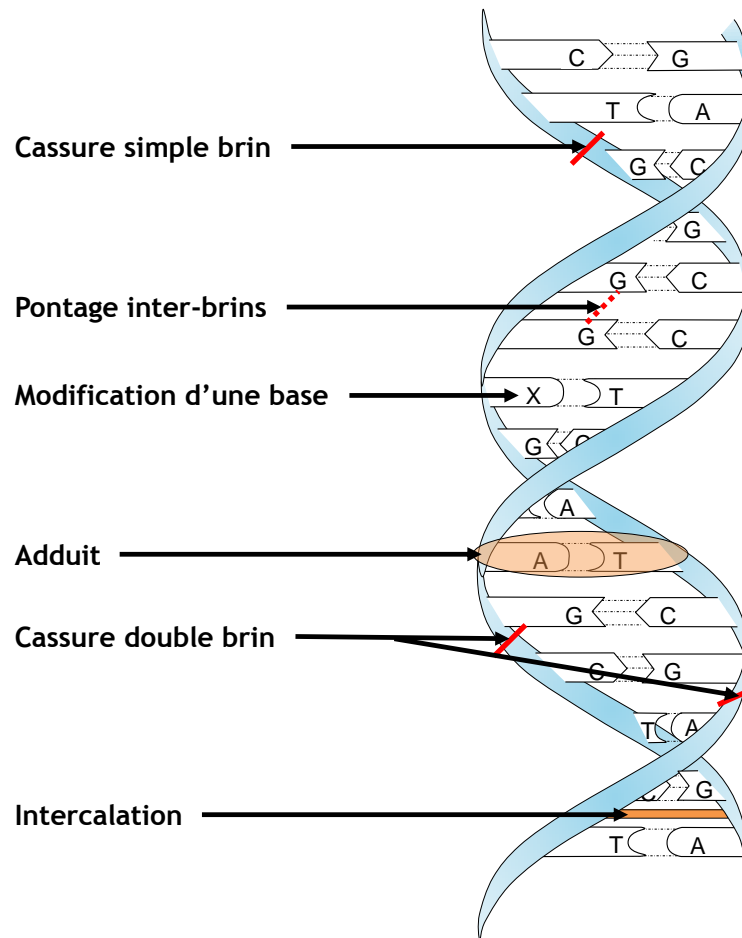


Figure 10 : Les différents types de lésions primaires de l'ADN (Cachot et Dégremont, 2009)

Les cassures de la chaîne d'ADN, résultent d'une rupture de liaisons phosphate-sucre et entraînent des cassures simples ou doubles brin de l'ADN. Les cassures doubles brin sont définies comme deux cassures ou plus, présentes sur des brins opposés. Ce type de cassure est considéré comme étant difficilement réparable (Adam *et al.*, 2006). C'est pourquoi, ces altérations de l'ADN font partie des lésions les plus importantes au niveau moléculaire. Ces dommages induisent les aberrations chromosomiques si elles sont mal ou non-réparées (Figure 11) (Jha, 2008).

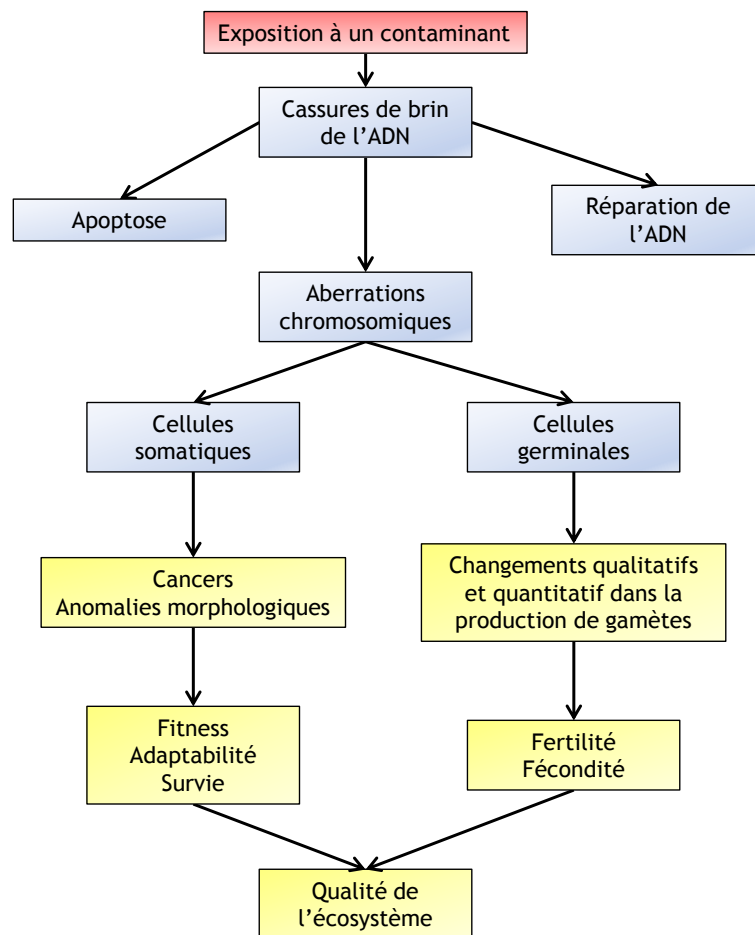


Figure 11 : Conséquences des cassures de brin de l'ADN (Jha, 2008)

Les adduits correspondent à la formation de liaisons covalentes entre un polluant ou ses métabolites et l'ADN (Figure 10). Ils entraînent une modification de la structure spatiale de l'ADN à leur voisinage. La reconnaissance de la molécule d'ADN par l'ADN polymérase est perturbée au cours du processus de réplication. Ce type de lésions de l'ADN induit la mutagenèse et le développement tumoral (Cachot et Dégrement, 2009). Des études démontrent la rapidité de la formation des adduits (24 à 48h) (Vasseur *et al.*, 2008).

Les altérations de bases, par pertes, insertions ou modifications d'une ou plusieurs bases de l'ADN peuvent se produire en présence d'un polluant génotoxique. Ce type de dommage peut provoquer des mutations en générant des appariements incorrects de bases. Certaines modifications de bases entraînent la formation de sites abasiques, c'est-à-dire la déstabilisation de la liaison N-glycosidique et l'élimination de la base (Adam *et al.*, 2006; Cachot et Dégrement, 2009). Ce type de modifications de la structure primaire de l'ADN peut faire l'objet ou non d'une réparation parfaite ou fautive. Dans ce deuxième cas, il y a apparition de mutations (Orsière *et al.*, 2005).

Les composés génotoxiques peuvent altérer l'intégrité de la structure de l'ADN causant des mutations et puis des effets héréditaires (Shugart et Theodorakis, 1998). Un agent mutagène est une substance qui provoque des mutations au niveau du matériel génétique. Les mutations sont

transmissibles à la descendance via la division cellulaire. **Bickham et Smolen (1994)** suggèrent que les mutations peuvent réduire la viabilité, affecter la survie et les capacités de reproduction des espèces pouvant mener éventuellement à l'extinction de certaines espèces. Cependant, le caractère défavorable des mutations héréditaires est discutable. En effet, l'évolution des êtres vivants n'est possible que par la sélection d'individus porteurs de mutations favorables leur permettant de s'adapter à des conditions d'environnements stressantes (**Vasseur et al., 2008**).

Un autre type de modification de l'ADN peut être induit lors de la présence d'un polluant génotoxique, ce sont les modifications épigénétiques. L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes se produisant sans changement de la séquence d'ADN. Une perturbation du statut épigénétique peut entraîner des modifications de l'expression des gènes, ce qui a un effet sur les organismes et les populations. Cela en fait un outil très pertinent en écotoxicologie. Il existe trois mécanismes principaux d'épigénétique : la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non codant. Le modèle de méthylation de l'ADN change quand la cellule devient cancéreuse : le génome ayant la tumeur, devient globalement hypométhylé (**Vandegheuchte et Janssen, 2011**). Les changements épigénétiques peuvent être transmis aux générations suivantes non exposées au facteur environnemental causant le changement. Cet effet transgénérationnel est démontré chez la daphnie (*Daphnia magna*) lors d'une exposition à du zinc (**Vandegheuchte et al., 2009**) et à divers produits chimiques (**Vandegheuchte et al., 2010**). La plasticité phénotypique, résultant de mécanismes épigénétiques, peut modifier les effets toxiques d'un contaminant. La distinction entre les phénomènes génétiques et épigénétiques est importante pour prédire le potentiel à court et long terme affectant une population (**Jha, 2004**).

2.1.2. Les voies de réparation de l'ADN

Les organismes peuvent percevoir les composés génotoxiques et essayer d'éliminer les agents toxiques ou réparer les modifications de l'ADN (**Shugart et Theodorakis, 1998**). L'apparition de lésions à l'ADN est suivie de l'activation des systèmes de réparation capables de restaurer rapidement un ADN intact. Il est indispensable que ce mécanisme de réparation ait eu lieu avant que la réplication ne fixe les mutations (**Amiard et Amiard-Triquet, 2008**). En effet, lorsque les lésions primaires ne sont pas ou mal réparées, elles sont fixées définitivement sous forme de mutations dans le génome de la cellule et seront ensuite transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire (**Cachot et Dégremont, 2009**).

En raison de l'existence de mécanismes de réparation, la majorité des lésions citées dans le paragraphe précédent, peuvent être réparées. Il existe deux types de réparations : les mécanismes conservatifs (processus excision-resynthèse garantissant une réparation fidèle) et les systèmes fautifs (interviennent quand le premier mécanisme est dépassé par un trop grand nombre de lésions de l'ADN) (**Cachot et Dégremont, 2009**).

Il faut une certaine quantité de dommages avant que ces voies s'activent, pour des niveaux de dommages plus faibles mais néanmoins au-delà du bruit de fond moyen, ces voies ne sont pas encore activées, et les dommages apparaissent. Lors d'une étude sur les effets d'effluents métallurgiques chez *Daphnia magna*, il est démontré que les individus présents dans les stations les moins contaminées présentaient un ADN fortement altéré contrairement aux organismes des stations les plus polluées. Les auteurs suggèrent qu'il n'y a pas suffisamment d'altérations dans ces stations pour que des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place (De Coen *et al.*, 2006). Une récente étude met en évidence une forte capacité à transcrire les gènes en réponse à des dommages à l'ADN chez des adultes de *D. magna* par rapport aux juvéniles suite à une exposition à du dichromate de sodium et à du benzo(a)pyrène. Les auteurs émettent deux hypothèses pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, les adultes pourraient avoir une meilleure capacité à répondre à un composé toxique. La seconde hypothèse suggère que les néonates seraient plus sensibles aux dommages à l'ADN que les adultes, en se basant sur une faible capacité à réparer l'ADN (David *et al.*, 2011).

2.2. Les différentes mesures de génotoxicité des lésions primaires de l'ADN

Dû à la grande diversité des anomalies susceptibles d'être induites au niveau de l'ADN, il existe différents indicateurs biologiques permettant de mesurer et de quantifier les altérations de l'ADN. L'étude de Jha (2008) montre l'intérêt d'utiliser les tests de génotoxicité pour mettre en évidence les conséquences potentielles sur le court ou le long terme sur la survie des espèces.

2.2.1. La détection des adduits

La technique du post-marquage au ^{32}P permettant de mesurer les adduits à l'ADN est décrite par Randerath *et al.* (1981). Les adduits sont détectés par autoradiographie et sont quantifiés par un comptage par scintillation (Shugart, 2000). Ce type de dommage peut servir de biomarqueurs moléculaires lors d'exposition environnementale à certains agents génotoxiques. En effet, plusieurs études révèlent la présence d'adduits à l'ADN en présence de polluants tels que la fumée de cigarette chez l'homme (Randerath *et al.*, 1989), le benzo(a)pyrène chez le rat (Harrigan *et al.*, 2004) ou encore les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) chez la morue d'atlantique (Aas *et al.*, 2000).

2.2.2. La détection des cassures simple et double brin

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de détecter les cassures simple et double brin d'ADN selon le pH appliqué. En conditions alcalines, l'électrophorèse de l'ADN induit sa migration en fonction du poids moléculaire des fragments d'ADN. La détection des différents fragments se réalise après ajout de bromure d'éthidium, un intercalent d'ADN (Shugart, 2000).

Pour détecter les cassures doubles brins, une technique d'immunofluorescence peut être utilisée. La technique d'immunofluorescence visant à détecter des histones phosphorylées γ -H₂AX est employée dans des cellules de poisson zèbre, *Danio rerio*, lors d'exposition à de l'uranium appauvri et lors d'une irradiation gamma la protéine H₂AX apparaît sous forme phosphorylée en réaction à des cassures doubles brin (Pereira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012).

Une autre méthode simple à réaliser, le test des comètes en condition alcaline ou « Single Cell Gel Electrophoresis » (SCGE), mise au point par Singh *et al.* (1988) permet de détecter les cassures simple et double brin d'ADN ainsi que les sites alcali-labiles de cellules individualisées, grâce à une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose. Les cellules isolées sont incluses dans un gel d'agarose, lysées et soumises à une électrophorèse. Les nucléoïdes ayant un ADN intact migrent peu et s'observent par épifluorescence sous forme d'une sphère. Quant aux fragments des molécules d'ADN endommagées (de poids moléculaire plus faible que les molécules intactes), ils migrent hors de la sphère. Les images obtenues sont comparables à la forme de comètes, d'où le nom donné à ce test (Figure 12).

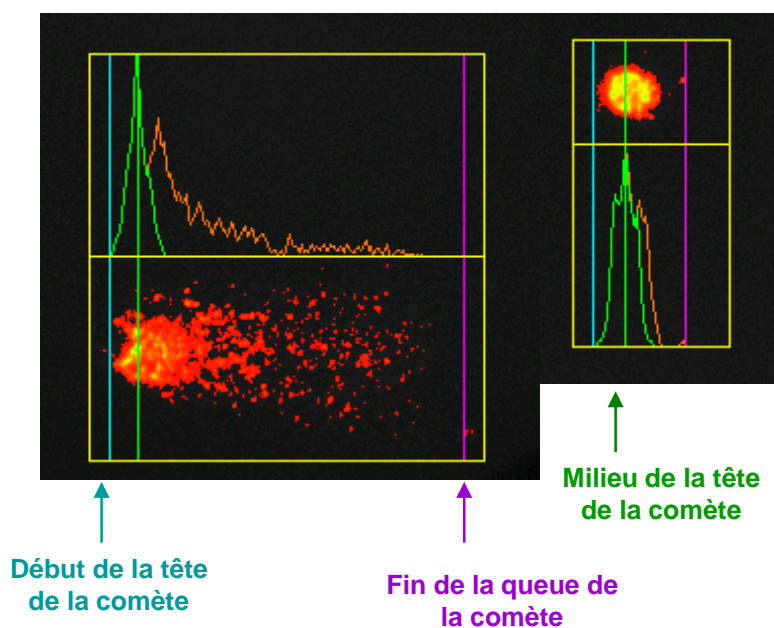


Figure 12 : Photographie à microscopie en épifluorescence de noyaux de cellules embryonnaires de *Daphnia magna* avec le logiciel Comet IV (X40)

Dans un premier temps, au début de ce travail de thèse, cette technique plutôt simple à réaliser et s'appliquant à n'importe quel type cellulaire (sang, gonades,...) était le biomarqueur moléculaire choisi. De plus, quelques études utilisent déjà avec succès le test comète chez *Daphnia magna* (den Besten et Tuk, 2000; Lee *et al.*, 2009; Park et Choi, 2009). Hors, lors des différents tests, il s'est avéré que la dissociation cellulaire n'est pas évidente et produit dans la plupart des cas des nucléoïdes de témoins endommagés. Il est donc nécessaire de choisir une autre technique permettant de quantifier les lésions de l'ADN. La méthode d'amplification aléatoire de l'ADN

polymorphique (RAPD) étant bien développée chez *Daphnia magna*, nous avons choisi de l'utiliser. Cette technique fait l'objet de la partie suivante de ce chapitre (2.3).

2.3. Biomarqueur de génotoxicité retenu dans notre étude : la RAPD

La technique de la RAPD fut décrite pour la première fois par **Williams *et al.* (1990)**. La RAPD a le potentiel de détecter une large variété de dommages à l'ADN et de mutations sur le génome entier. Ce test est basé sur l'amplification aléatoire de fragment d'ADN, avec une seule amorce de séquence nucléotidique arbitraire. Ces auteurs indiquent que cette technique semi-quantitative peut être utilisée pour construire des cartes génétiques chez de nombreuses espèces. Ainsi la RAPD est réalisée au départ pour détecter le polymorphisme intra-populationnel.

Généralement, les réactions de RAPD sont réalisées avec une amorce de 10 paires de bases (pb) et les fragments amplifiés sont visualisés par une électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide et mis en évidence par du bromure d'éthidium. Les bandes de RAPD sont perdues ou créées quand des mutations, des inversions, des délétions, des additions ou encore des réarrangements de chromosomes affectent l'hybridation des amorces. L'intensité des bandes peut s'analyser visuellement ou par l'intermédiaire de logiciels (**De Wolf *et al.*, 2004b**). Ainsi le profil RAPD permet de détecter des altérations du génome de l'ADN et plus précisément les changements nucléotidiques de l'ADN et les variations de l'activité de la Taq polymérase (**Atienzar *et al.*, 1999**).

Cependant cette méthode est critiquée, notamment à cause de la faible température d'hybridation (36°C) utilisée avec ces courtes séquences d'amorces. En effet, cette température peut affecter la reproductibilité et la détection de la transmission de matériel génétique. La RAPD est optimisée par **Atienzar *et al.* (2000a)**. Dans cette étude, les auteurs font varier différents paramètres : la température d'hybridation, la pureté de l'ADN, la séquence d'amorce et la concentration relative de chaque réactif de PCR. Ces différentes expériences permettent de mettre en évidence qu'une augmentation de la température d'hybridation des amorces est nécessaire (nouvelle température fixée à 50°C). Cette augmentation de température à l'avantage de limiter les réactions non-spécifiques. De plus, ces auteurs démontrent que l'utilisation d'une amorce de 10 paires de bases est primordiale dans le succès du protocole d'amplification aléatoire.

La revue d'**Atienzar et Jha (2006)** présente les avantages et les inconvénients de la RAPD. Concernant les avantages, la RAPD peut être appliquée sur des organismes avec peu d'informations sur son génome. De plus, la RAPD nécessite de très faibles sources de matériel génétique et une seule amorce aléatoire. Un autre avantage est le haut niveau de sensibilité de cette technique. Cette méthode est plutôt rapide et peu expansive (pas de matériel spécifique nécessaire). Enfin la RAPD permet la détection d'une grande variété de dommages à l'ADN et de mutations à tous les niveaux du génome. Malgré tous ces avantages, certains problèmes peuvent apparaître réduisant la capacité de discrimination de la RAPD. En effet, due à l'amplification aléatoire, de l'ADN présent dans les organites peut être amplifié pendant la PCR. Certaines études critiquent le manque de

reproductibilité de cette méthode du, par exemple, à la faible température d'hybridation, ce qui a fait l'objet d'une optimisation de la méthode par **Atienzar et al. (2000a)**. Différents types de lésions de l'ADN et de mutations peuvent induire le même type d'altération dans les profils de RAPD comme une variation de l'intensité des bandes, des disparitions ou apparitions de bandes. Il est ainsi souvent nécessaire de réaliser des analyses complémentaires à l'aide d'autres techniques de génotoxicité permettant entre autre de détecter les adduits d'ADN ou les effets cytogénétiques.

Que ce soit avec la méthode à faible ou forte température d'hybridation, la RAPD par électrophorèse est largement utilisée par de nombreux auteurs afin d'étudier la génotoxicité de différents polluants chez diverses espèces aquatiques telles que chez les poissons *Gambusia affinis* (**Theodorakis et Shugart, 1997**) ou *Danio rerio* (**Zhiyi et Haowen, 2004**), chez le gastéropode *Littorina littorea* (**De Wolf et al., 2004a**), chez la macro-algue *Palmaria palmata* (**Atienzar et al., 2000b**) et également chez les crustacés *Elminius modestus* (**Atienzar et al., 2002**) et *Daphnia magna* (**Atienzar et al., 1999**).

Cette technique s'appuie seulement sur une analyse sur gel d'agarose en étudiant les disparitions ou les apparitions de produits de PCR entre les différentes conditions étudiées. **Cambier et al. (2010)** améliorent la méthode, afin d'obtenir une caractérisation fiable, rapide et non expansive des effets génotoxiques dû à un polluant à des doses environnementales pertinentes. L'analyse n'est plus réalisée par électrophorèse mais avec un équipement d'analyse quantitative, la PCR en temps réel. La RAPD-PCR permet d'obtenir une efficacité de l'hybridation de l'amorce sur l'ADN génomique et permet la comparaison des températures de fusion entre chaque réaction d'amplification. Les auteurs démontrent la sensibilité de cette nouvelle technique chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposé à différentes concentrations de cadmium. La sensibilité de la RAPD quantitative est démontrée pour divers polluants (cadmium, nanoparticules d'or, zinc et uranium) mais seulement chez le poisson zèbre (**Cambier et al., 2010; Orieux et al., 2011; Geffroy et al., 2012; Lerebours et al., 2013**).

PARTIE B

Matériels et méthodes

Chapitre 4 :

Démarche expérimentale

1. Conditions d'élevage de daphnie en laboratoire

Un élevage de *Daphnia magna* (clone A, INERIS, France) est maintenu en reproduction parthénogénétique, conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE (1998), depuis plusieurs années au laboratoire. L'élevage est effectué dans des pichets en plastique contenant 2 L de milieu M4 (Annexe 1), à une densité d'un individu pour 50 mL. Les pichets sont conservés dans des incubateurs à 20°C, sous une intensité lumineuse de 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et une photopériode de 16:8h. Le milieu, renouvelé deux fois par semaine, est maintenu à un pH égal à 7 grâce à une composition légèrement différente du milieu à pH8 Tableau 4 (Elendt et Bias, 1990; Zeman *et al.*, 2008).

Les individus sont triés tous les jours à l'aide de deux tamis de mailles différentes (180 et 1000 μm) afin de séparer adultes et juvéniles. Les juvéniles de moins de 24h issus des pontes 3 à 5 sont utilisés à la mise en place de nouveaux élevages ou de tests de toxicité.

Les daphnies sont nourries quotidiennement avec des algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii*, cultivées dans des conditions axéniques à 24°C dans des erlens contenant 1 L de milieu HSM (High Salt Medium) (Harris, 1989) (Annexe 2). La ration journalière est de 100 $\mu\text{gC.daphnie}^{-1}$, équivalent à 80 000 cellules. mL^{-1} . Les algues sont centrifugées à 2500 rpm pendant 15 minutes, mises en suspension dans du milieu M4-pH7 puis distribuées aux individus.

Tableau 4 : Composition des milieux M4 pH8 et pH7

	M4 pH8	M4 pH7
Eléments	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Ca	79,95	79,95
Mg	12,03	12,03
Na	20,07	3,52
K	0,13	0,13
Cl	144,84	170,36
SO4	48,82	48,82
NO3	0,20	0,20
PO4	0,20	0,20
EDTA	4,63.10 ⁻⁰⁸	4,63.10 ⁻⁰⁸
SiO3	2,68	2,68

2. Exposition à l'uranium

L'uranium appauvri est obtenu auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) sous forme de nitrate d'uranyle hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en solution à 0,2% d'acide nitrique (1g U.L⁻¹).

Les expériences sont réalisées dans le milieu M4 à pH7, assurant une meilleure biodisponibilité de l'uranium tout en restant compatible avec les besoins physiologiques des daphnies. L'ajout d'uranium apportant des ions NO_3^- , la concentration de nitrate est systématiquement ajustée à 0,2 mg.L⁻¹ valeur correspondant à la plus forte concentration testée, et ce dans toutes les conditions d'exposition (y compris dans le témoin sans uranium). Avant l'introduction des daphnies, les bouteilles sont pré-exposées à l'uranium, pendant une semaine pour limiter les pertes par adsorption sur les parois pendant la phase d'exposition.

La concentration en uranium dans le milieu fraîchement renouvelé ne diffère pas de plus de 8% des concentrations nominales. Pendant la phase d'exposition, les pertes en uranium sont relativement plus fortes pour les concentrations faibles, avec une diminution après 24h allant de 23% (à 2 µgU.L⁻¹) à 5% (à 50 µgU.L⁻¹).

3. Dispositifs expérimentaux

3.1. Etude préliminaire : détermination des concentrations d'exposition

Cette expérience est réalisée afin d'encadrer la valeur de la *NEC* (concentration sans effet) à l'aide d'une gamme de concentrations d'uranium appauvri : 0 ; 2 ; 2,9 ; 4,4 ; 6,6 ; 9,9 ; 14,8 ; 22,2 ; 33,3 et 50 µgU.L⁻¹.

L'exposition aux différentes concentrations est initiée à l'aide d'œufs issus de la ponte 3 (B3). Les néonates sont maintenus après l'éclosion dans les mêmes conditions et suivis jusqu'au dépôt de la ponte 4 (B4) dans la poche incubatrice, soit pendant 15 jours (Figure 13).

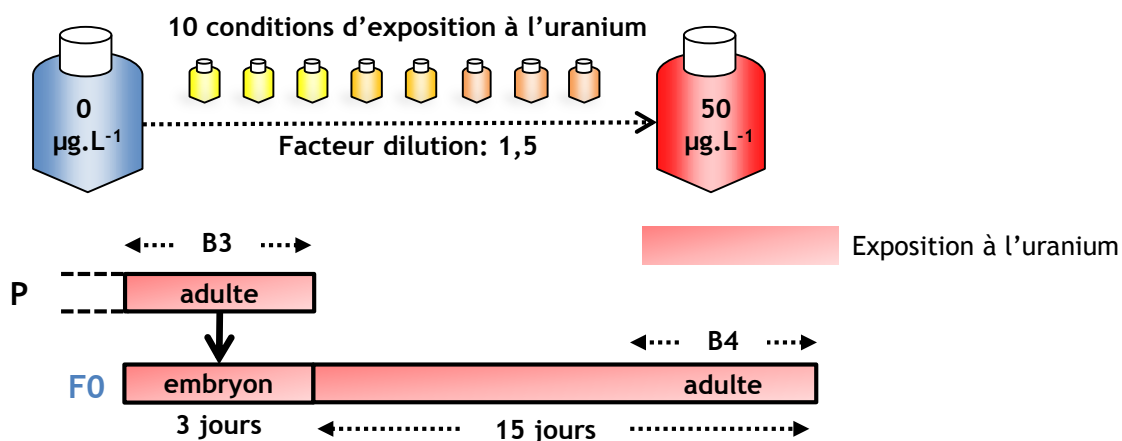


Figure 13 : Design expérimental de l'étude préliminaire

Chaque condition est composée de 4 unités de 250 mL (en polycarbonate pour limiter l'adsorption de l'uranium sur les parois), contenant chacune 5 individus. Trois unités sont utilisées pour le suivi quotidien de la survie et la reproduction. Des mesures de taille sont réalisées sur 5 femelles au moment du dépôt des pontes 1 et 4 dans la poche incubatrice (respectivement environ 6-7 et 15-16 jours).

Cette étude préliminaire met en évidence des effets de l'uranium sur les traits d'histoire de vie à des concentrations inférieures à 10 µg.L⁻¹ (Figure 14). Suite à cette expérience, 4 concentrations sont retenues pour réaliser les expériences principales :

- 2 µg.L⁻¹, une concentration sans effet (inférieure à la *NEC*, au moins dans la première génération) ;
- 9,9 µg.L⁻¹, une condition où des effets significatifs apparaissent dès la première génération ;
- 22,2 µg.L⁻¹, comme concentration intermédiaire ;
- 50 µg.L⁻¹, une concentration n'entraînant pas la mort des individus dès la fin de la première génération.

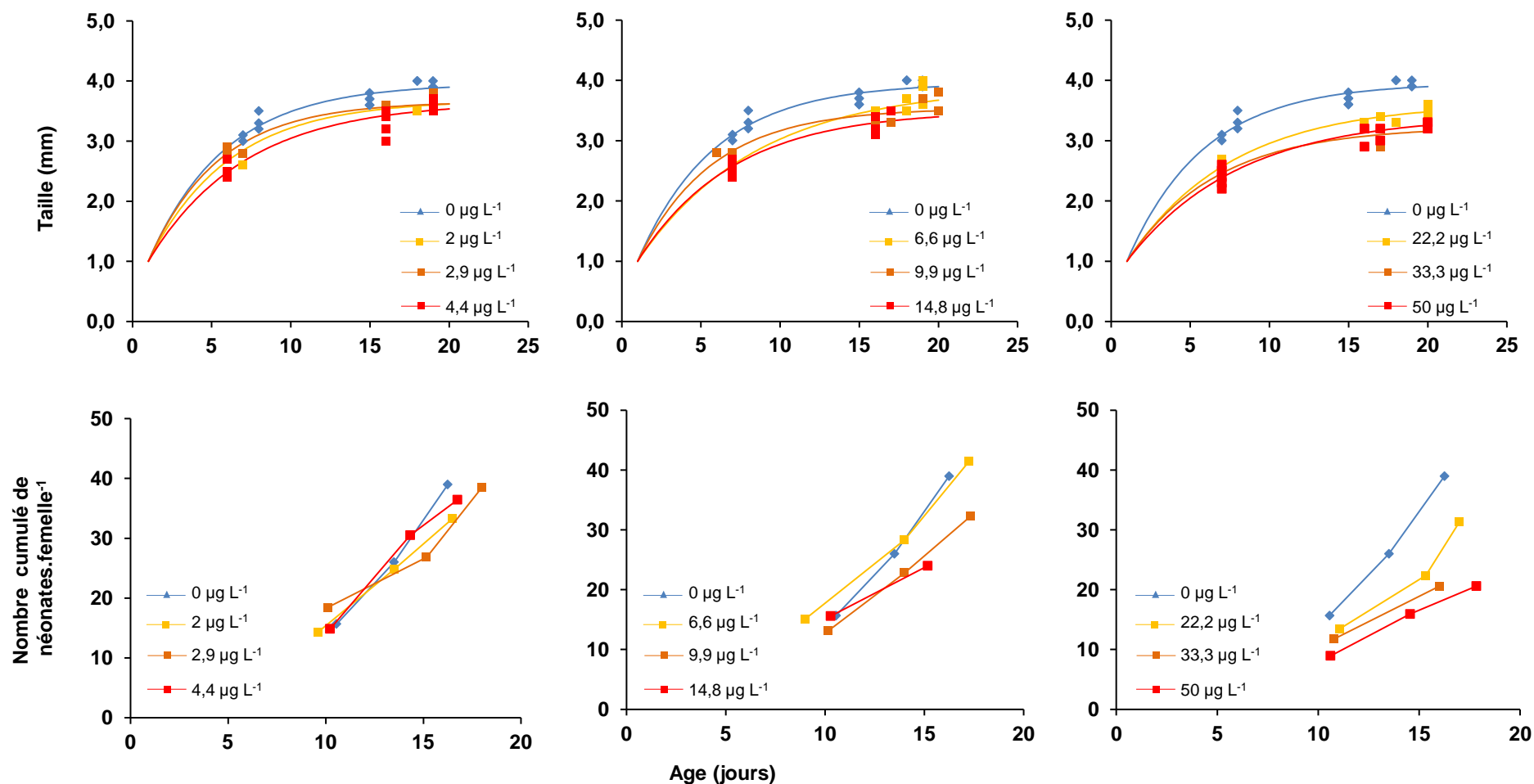


Figure 14 : Taille (mm) et nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations. Taille : les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Taille : différences significatives (**p<0,001) dès 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Reproduction : différences significatives (*p<0,05) à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$

3.2. Etude transgénérationnelle des effets de l'uranium appauvri chez la daphnie

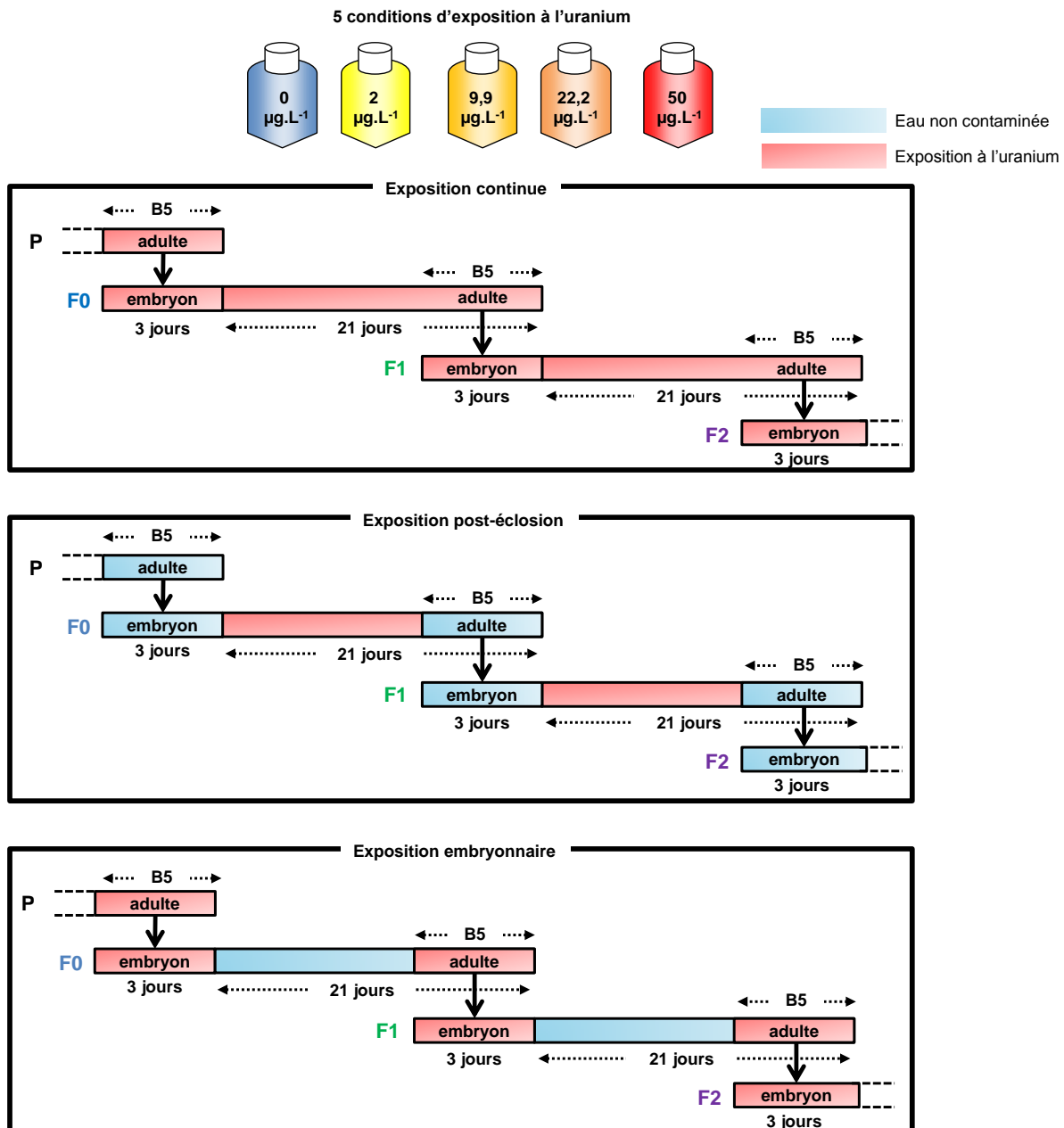
Deux générations successives (F0 et F1) sont exposées à la gamme de concentration retenue (0 ; 2 ; 9,9 ; 22,2 et 50 $\mu\text{gU.L}^{-1}$). Chaque condition est composée de neuf unités expérimentales d'un litre (en polycarbonate) contenant chacune 20 individus. Trois bouteilles sont utilisées pour le suivi quotidien de la survie et de la production de néonates. Trois autres bouteilles sont utilisées pour mesurer la taille, la masse corporelle, la bioaccumulation en uranium dans le corps et les œufs des daphnies. Ces mesures sont réalisées chez les néonates (<24h) au début de chaque génération et au moment du dépôt des pontes 1, 3 et 5 dans la poche incubatrice des femelles. Les trois dernières bouteilles sont utilisées pour collecter les échantillons pour l'extraction d'ADN et les analyses de RAPD, chez les néonates et les adultes, au moment de l'éclosion des pontes 1 et 5. Toutes les générations sont initiées à l'aide d'œufs issus de ponte 5, fraîchement déposés (<24h) dans la poche incubatrice de leur mère. Trois scénarios d'expositions différents sont réalisés (Figure 15) et décrits dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Exposition continue

Le stade embryonnaire est exposé, pendant que la ponte est incubée dans la poche incubatrice des femelles, impliquant que la génération P (parents de F0) est exposée pendant 3 jours, du dépôt à l'éclosion de la ponte 5, au début de l'expérience. Les néonates fraîchement éclos sont collectés, exposés à la même concentration que leurs mères et suivis pendant 21 jours, jusqu'à la libération de la ponte 5 (Figure 15).

3.2.2. Exposition post-éclosion

L'exposition post-éclosion (Figure 15) est initiée à l'aide de néonates fraîchement éclos (<24h) issus de la ponte 5. Ces individus constituant la génération F0 sont maintenus en milieu contaminé pendant 18 jours jusqu'au dépôt de la ponte 5 dans la poche incubatrice. Puis les femelles sont placées en milieu non contaminé pendant 3 jours du dépôt à l'éclosion de cette 5^{ème} ponte. Les néonates fraîchement éclos (F1) sont collectés, exposés à la même concentration que leurs mères et suivis pendant 18 jours, jusqu'au dépôt de la ponte 5. De la même manière, les femelles de la génération F1 incubant la ponte 5 (F2) sont maintenues en milieu non contaminé. Ainsi le stade embryonnaire de la ponte 5 de chaque génération n'est pas exposé.



3.2.3. Exposition embryonnaire

L'exposition au stade embryonnaire (Figure 15) est initiée à l'aide d'œufs issus de ponte 5 fraîchement déposés dans la poche incubatrice des femelles (<24h). Au moment de l'éclosion, les néonates constituant la génération F0 sont placés dans un milieu non contaminé et suivis pendant 18 jours. Au moment du dépôt de la ponte 5 dans la poche incubatrice, les femelles sont transférées en milieu contaminé à la même concentration que lors de l'exposition embryonnaire. A l'éclosion, les individus constituant la génération F1 sont remis en milieu non contaminé, suivis de la même manière que la génération F0 et réexposés pendant l'incubation de la ponte 5 (F2). Ainsi seul le stade embryonnaire de chaque génération est exposé.

4. Mesure des effets de l'uranium

4.1. Survie et reproduction

Le nombre de daphnies survivantes et le nombre de néonates produits dans chaque unité expérimentale sont comptés quotidiennement, tout au long des différentes expériences. L'âge des femelles au moment du dépôt de chaque ponte et à l'éclosion des néonates est également suivi.

4.2. Croissance somatique en taille et en masse

La taille et la masse des daphnies sont mesurées dans chaque condition au début de chaque génération (néonates de moins de 24h) et au moment du dépôt des pontes 1, 3 et 5 dans la poche incubatrice des femelles. La taille des daphnies est mesurée sous une loupe binoculaire équipée d'une règle micrométrique, depuis l'apex de la tête jusqu'à l'épine caudale. Les œufs sont délicatement séparés des femelles adultes et comptés. Les néonates, les daphnies et les œufs (ponte entière) sont rincés avec de l'eau ultra-pure et transférés dans des microcoupelles en aluminium pré-pesées. Les échantillons sont séchés pendant 48 h dans une étuve à 60°C, puis refroidis dans un dessiccateur et pesés immédiatement à l'aide d'une ultra microbalance de type SE2 Sartorius (Göttingen, Germany) avec une précision de 0,1 µg. A chaque mesure correspond 5 réplicats, chacun composés de 5 néonates, d'une daphnie adulte ou d'une ponte.

4.3. Bioaccumulation de l'uranium dans l'organisme

La bioaccumulation en uranium dans les daphnies et les œufs est analysée à l'aide des échantillons de daphnies, d'œufs et de néonates précédemment utilisés pour les mesures de taille et de masse sèche. Les échantillons biologiques, de masse sèche connue, sont transférés dans des tubes à scintillation liquide et minéralisés successivement dans 1 mL d'HNO₃ (69%) et 1 mL d'H₂O₂ (30%). Après chaque ajout, les échantillons sont chauffés sur un bain de sable à 90°C jusqu'à évaporation.

Les échantillons minéralisés sont repris dans 5 mL d'HNO₃ 2% (v/v) dans de l'eau ultra-pure et analysés par ICP-MS (Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif). Cette technique utilise un plasma à couplage inductif, assemblé à un spectromètre de masse (Agilent 7500 Cx) permettant la séparation des éléments en fonction du rapport masse sur charge (m/Z). La limite de détection est de 0,11 ng.L⁻¹. La concentration interne en uranium est exprimée par rapport à la masse sèche (µg).

4.4. Quantification des dommages à l'ADN

4.4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN des daphnies est extrait par la méthode de phénol/chloroforme selon **Atienzar *et al.* (1999)**. Quatre réplicats par temps d'échantillonnage et par condition, chacun composé de 4 daphnies adultes ou de 150-200 néonates (<24h), sont réalisés au début des générations (néonates fraîchement éclos) et à l'éclosion des pontes 1 et 5 (adultes et néonates).

Les échantillons sont broyés dans 400 µL d'une solution de lyse (100 mM Tris-HCl, 500 mM, 10 mM EDTA, 1% de SDS et 2% de β-mercaptoéthanol) à l'aide d'une tige. Une solution de RNase est ajoutée (40 µg par échantillon) et les tubes sont placés 1h à 60°C. Quatre cent microlitres de phénol-chloroforme sont ajoutés et les échantillons sont homogénéisés au vortex pendant 30 secondes. Une centrifugation est réalisée (5 minutes, 20°C, vitesse maximale) à l'issue de laquelle la phase aqueuse, contenant l'ADN, est transférée dans un nouveau tube Eppendorf. L'ADN est précipité dans 2 volumes d'éthanol pur en présence à 0,27 M d'acétate de sodium. Les tubes sont incubés à -80°C pendant 30 minutes et sont centrifugés (15 minutes, 4°C, vitesse maximale). Le surnageant est éliminé et l'ADN, sous forme de précipité, est stocké dans 1 mL d'éthanol pur à 70% et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse RAPD. Avant de réaliser les analyses, les échantillons sont centrifugés (4°C, 10 minutes, vitesse maximale) et l'éthanol est retiré. Les pelotes d'ADN sont séchées à l'air libre puis reprises dans du Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM et EDTA 1 mM), pour faire précipiter l'ADN.

4.4.2. Sélection des amorces

Une analyse RAPD préliminaire est réalisée sur 2 échantillons d'ADN génomique extraits de néonates et d'adultes témoins. Cette analyse a pour objectif de tester 2 dilutions (10 et 20) et de sélectionner 2 oligonucléotides de 10 paires de base parmi 7 testés : OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPB5 (5'-TGCGCCCTC-3'), OPB6 (5'-TGTCTGCCC-3'), OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3'), OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3'), OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3') et OPB12 (5'-CCTTGACGCA-3'). Ces 7 amorces sont obtenues auprès de Sigma-Proligo (Missouri, USA).

4.4.3. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD)

Les RAPD-PCR en temps réel sont réalisées avec un Lightcycler Roche (Meylan, France) à l'aide du kit de réactifs « LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I » (Roche). Cette méthode consiste à amplifier une partie de l'ADN grâce à une amorce aléatoire. Les réactions de PCR sont préparées dans des capillaires en verre contenant :

- 16 µL d'un mélange réactionnel : 1 µL de solution contenant de la Taq polymérase, du dNTPs et le colorant fluorescent SYBR Green, 3,2 µL de MgCl₂ à 25 mM et 11,8 µL d'eau ultrapure)
- 2 µL d'amorce (6 µM)
- 2 µL d'ADN

La Taq polymérase, extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*, a la propriété de résister aux très hautes températures utilisées lors de la PCR, et de rester active pendant la réaction. Cette enzyme a besoin de MgCl₂ pour fonctionner et réaliser la réaction de polymérisation en chaîne.

Les capillaires sont placés sur un carrousel afin de mélanger les réactifs, puis dans le thermocycleur pour l'amplification de l'ADN dont les différents cycles thermiques sont :

- une dénaturation à 95°C pendant 10 minutes permettant la séparation et l'obtention de deux simple brins d'ADN.
- l'amplification impliquant 50 cycles de 40 secondes composés chacun de 3 phases différentes : la dénaturation (5 secondes à 95°C), l'hybridation des amorces (5 secondes à 50°C) et l'élongation (30 secondes à 72°C) pendant laquelle le brin d'ADN complémentaire est synthétisé par la Taq polymérase (Figure 16).
- l'obtention des courbes de dissociations, en suivant la baisse de fluorescence du colorant SYBER Green sur un gradient de température de 65 à 95°C (sur 600 secondes).
- une phase de refroidissement amenant la température à 40°C.

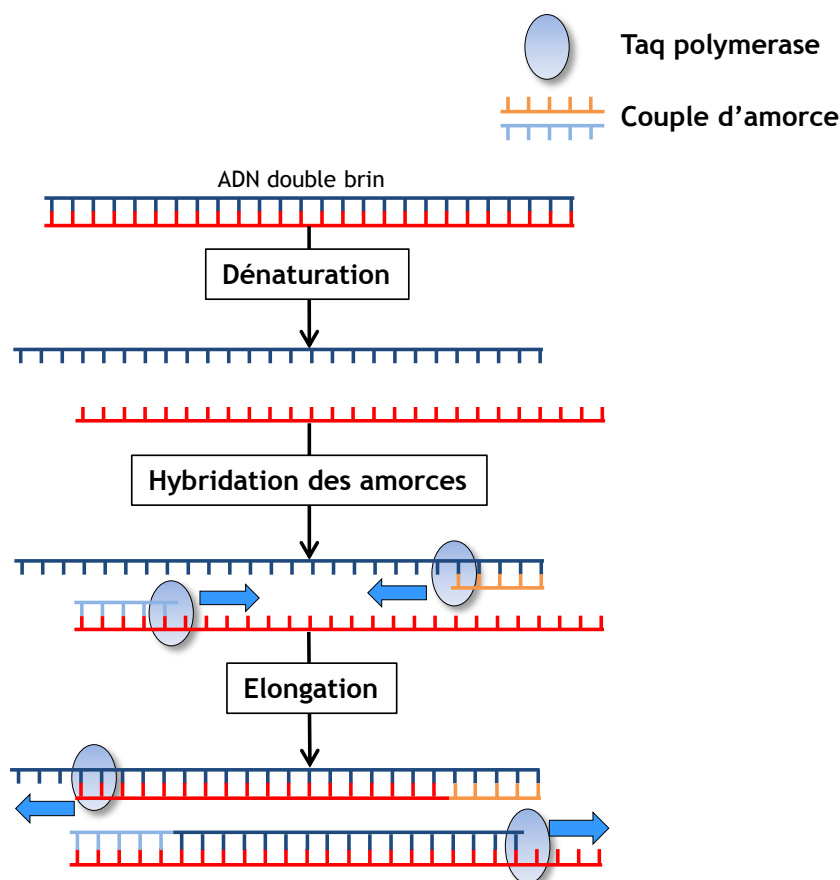


Figure 16 : Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR)

4.4.4. Analyse des produits PCR

La quantité et la composition des produits de PCR dépend à la fois du nombre de sites d'hybridation et de leur position sur l'ADN amplifié. L'occurrence de dommages à l'ADN (résultant soit de pertes ou de créations de sites d'hybridation) est quantifiée à l'aide des courbes de dissociations et les variations du nombre de sites d'hybridation.

Les courbes de dissociations de l'ADN (Figure 17) permettent d'obtenir une distribution des températures de fusion (T_m) dont chacune caractérise un produit de PCR, c'est-à-dire un fragment particulier d'ADN amplifié (ou amplicon).

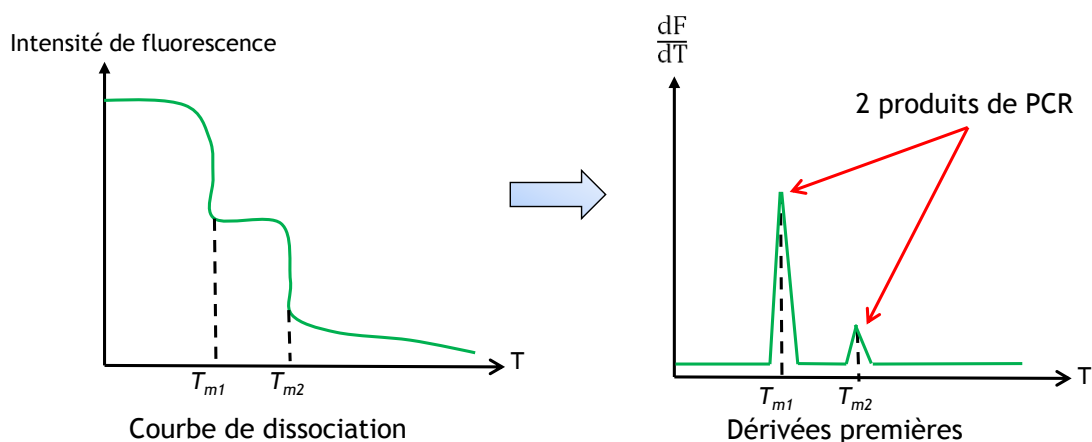


Figure 17 : Courbe de dissociation théorique de l'ADN

Les courbes de température de fusion sont analysées par le logiciel LightCycler Software 3.5 (Roche). La distribution des T_m , obtenue pour chaque échantillon d'ADN et amorce RAPD testée à l'aide des dérivées premières des courbes de dénaturation, est classée par intervalle de température (12 intervalles allant de 71 à 92°C). Les fréquences d'apparition de pics de température pour chaque intervalle sont calculées et comparées entre individus témoins et exposés pour chaque point d'échantillonnage. Une différence significative indique une modification de la composition nucléotidique de l'ADN, impliquant la perte ou la création d'un site d'hybridation pour une amorce donnée.

Le cycle seuil (C_t) est défini comme le nombre moyen de cycles thermiques nécessaires pour entrer en phase exponentielle d'amplification de l'ADN au cours de chaque analyse et sa valeur diminue avec l'augmentation du nombre de sites d'hybridation. La valeur de C_t est calculée à l'aide de la courbe d'amplification de l'ADN, obtenue en suivant l'augmentation de la fluorescence du SYBR Green, proportionnelle à la quantité d'ADN présent, mesurée au terme de chaque phase d'élongation (Figure 18).

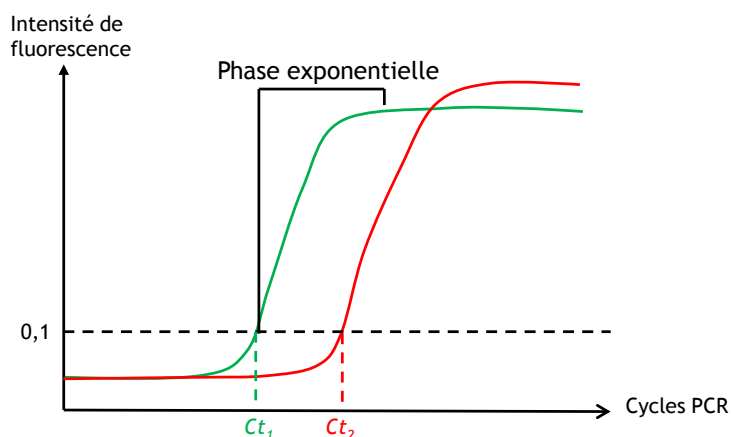


Figure 18 : Courbe d'amplification théorique représentant l'amplification de 2 échantillons d'ADN différents

Le nombre de sites d'hybridation est rapporté par unité génomique à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques, les oligonucléotides ENO5 (5'-CTCATCAGCACTGCCATCG-3') et ENO3 (5'-CAAGTAGGTAGCCGGGTCTAG-3'), correspondant au gène de l'énolase (JN994253) et permettant la synthèse de 2 séquences complémentaires (2 introns consécutifs et encadrant un petit exon) dont on mesure le cycle seuil Ct_{ENO} . Les courbes de dissociations de l'énolase indiquent la présence de 2 isoformes de ce gène dans la réaction de PCR. L'utilisation d'ENO3 et ENO5 comme amorce entraîne 8 événements d'hybridation par génome (2 amorces s'hybridant sur 2 isoformes portés chacun par une paire de chromosome). Le nombre de site d'hybridation par unité génomique est déterminé par la formule :

$$2^{(\Delta+3)} \text{ avec } \Delta = Ct_{ENO} - Ct_{\text{amorce RAPD}}$$

Il y a, par exemple, 8 sites d'hybridation pour l'amorce RAPD par unité génomique (soit autant que pour les amorces spécifiques) lorsque $\Delta = 0$.

4.5. Suivi des concentrations en ions majeurs et en uranium

Des prélèvements de milieu sont effectués après son renouvellement et après 24h d'exposition, dans une unité expérimentale par condition. Les échantillons sont acidifiés à 2% par une solution de HNO_3 à 69%, puis analysés.

Les cations (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} et Na^+) sont dosés par ICP-AES (plasma à couplage inductif associé à un spectromètre d'émission atomique) sur Optima 4300DV. L'uranium est dosé par ICP-AES pour les concentrations de 25 et 50 $\mu g.U.L^{-1}$ (avec une limite de détection de 10 $\mu g.L^{-1}$), et ICP-MS (Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif) sur Agilent 7500 Cx (avec une limite de détection de 0,11 $ng.L^{-1}$) pour les concentrations inférieures à 25 $\mu g.U.L^{-1}$. Le principe de la spectrométrie d'émission atomique repose sur le fait que les atomes ou les molécules excités par un apport externe d'énergie émettent des raies caractéristiques lors du retour à leur état stable. Dans le cas présent, la stimulation des atomes est réalisée par un plasma d'argon comme source d'énergie à haute température.

5. Analyses statistiques

Les effets de l'uranium sur la taille et la masse sont testés en utilisant les équations reportées dans le Tableau 5. Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.14.2) (R Development Core Team, 2012). Les modèles linéaires et non linéaires sont ajustés avec les routines *lm* et *gnls*. Les courbes associées aux différentes concentrations en uranium sont comparées simultanément au control avec le test de Fisher dans le cas d'une normalité (testée avec le test de Shapiro-Wilk), et avec le test de Wilcoxon dans l'autre cas, en appliquant la procédure séquentielle de Holm (1979) (seuil de signification de 5%).

Les nombres de sites d'hybridation obtenus lors des analyses de RAPD sont comparés avec le test de Wilcoxon. Pour les courbes de températures de fusion, l'association entre le nombre de pics et les concentrations en uranium à chaque classe de température sont testés à l'aide d'une table de contingence avec le test de Monte Carlo (préféré au test du chi-square à cause du faible nombre d'échantillons, $n < 5$).

Tableau 5 : Equations et paramètres de la taille des daphnies associée à des changements de la masse sèche des adultes et des œufs (Massarin *et al.*, 2010).

Critères d'effets (unité)	Equations	Paramètres
Taille (mm)	$L_t = L_m - (L_m - L_b) \cdot e^{(-r_B t)}$	L_m : Taille maximale (mm) L_b : Taille à la naissance (mm) r_B : Taux de croissance de von Bertalanffy (d^{-1})
Masse des daphnies (μg)	$W_t = \delta \cdot L_t$	δ : Coefficient de forme ($\mu g \cdot mm^{-3}$)
Masse des œufs (μg)	$W_t = \beta \cdot L_t + \omega$	β : Pente de la régression linéaire ($\mu g \cdot mm^{-1}$) ω : Intersection de la régression linéaire (μg)

Chapitre 5 :

Application du DEBtox

1. Etude des modes d'action métaboliques à l'aide d'un modèle DEBtox

Le modèle DEBtox décrit dans ce chapitre est adapté pour analyser simultanément les données issues des expériences multigénérationnelles réalisées dans ce travail de thèse, dans les différents scénarios d'expositions décrits au chapitre 4 : exposition continue, post-éclosion et embryonnaire.

1.1. La théorie de Dynamique de Budget Énergétique (DEB): généralités et avantages

De façon générale, les modèles de budget énergétique décrivent l'acquisition de l'énergie par un organisme et son utilisation dans des processus relatifs à la survie, la croissance et la reproduction. Dans la littérature, la plupart des modèles développés pour différents organismes se classent dans deux familles, appelées modèles de production nette et modèles d'assimilation nette. Ces deux groupes de modèles diffèrent principalement dans leurs hypothèses concernant l'allocation d'énergie à la reproduction (Lika et Nisbet, 2000). Dans un modèle de production nette, l'acquisition de l'énergie est directement minorée de l'énergie allouée à la maintenance de l'organisme, indispensable à la survie. Ainsi, la croissance et la reproduction sont prédites à partir de la différence entre l'assimilation et la respiration (Noonburg *et al.*, 1998; Lika et Nisbet, 2000). Dans un modèle d'assimilation nette, l'énergie issue de la nutrition est allouée directement à la croissance et la reproduction, tandis que la respiration ne représente que la dépense énergétique associée à la réalisation de ces deux grandes fonctions. En conséquence, la croissance, la reproduction et la respiration sont prédites à partir de l'assimilation. C'est ce type de modèle d'assimilation nette qui est utilisé dans ce travail de thèse.

Le modèle DEB décrit par Kooijman (2010) modélise les flux d'énergie dans l'organisme et permet de déterminer comment l'énergie acquise par la nourriture est stockée dans une réserve, et allouée aux processus physiologiques majeurs (Figure 19). Il utilise des équations différentielles pour décrire la vitesse à laquelle les organismes assimilent et utilisent l'énergie provenant de la nourriture pour survivre, se développer, grandir et se reproduire.

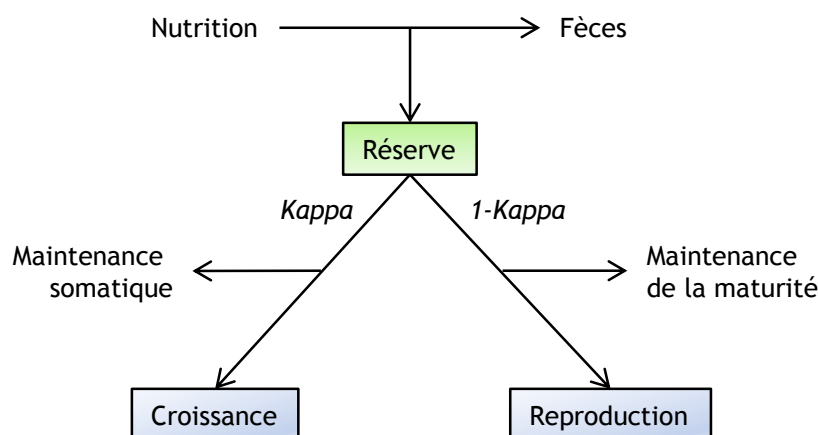


Figure 19 : Organisation conceptuelle du métabolisme d'un organisme défini par la théorie DEB (Kooijman, 2010)

Le modèle suppose que l'énergie stockée est répartie selon une loi dite « *Kappa* » qui consiste à allouer une fraction *Kappa* au soma d'une part, et le reste ($1 - Kappa$) aux processus relatifs à la reproduction d'autre part. Dans la fraction *Kappa*, l'énergie est tout d'abord allouée aux coûts de maintenance somatique, puis le reste à la croissance. De manière similaire dans la fraction ($1 - Kappa$), l'énergie est allouée d'abord à la maintenance de la maturité avant d'être utilisée pour la maturation (chez les embryons et juvéniles) et la reproduction (chez les adultes) (Jager et Zimmer, 2012). A une densité de nourriture constante, cette fraction *Kappa* est constante pendant le cycle de vie de l'individu. Un changement de cette fraction implique la présence de toxiques ou de parasites modifiant profondément le fonctionnement de l'organisme. Dans cette théorie, le cycle de vie est divisée en trois stades, où la transition d'un stade à l'autre est liée à des niveaux de maturité : embryonnaire (les individus ne se nourrissent pas), juvénile (début de la nutrition mais la puberté n'est pas encore atteinte) et adulte (individus capables de se reproduire) (Kooijman, 2010).

Le modèle DEB fournit des prédictions de croissance et de reproduction (Figure 20). La taille des organismes augmente au cours du temps jusqu'à atteindre une taille maximale (L_m) lorsque la totalité de la fraction *Kappa* est dévolue aux coûts de maintenance somatique (qui augmentent avec la taille de l'organisme) et qu'aucune énergie n'est disponible pour la croissance. Concernant la reproduction, l'énergie disponible est allouée à la production des œufs uniquement lorsque les individus ont stocké assez d'énergie dans la maturation des gonades, correspondant à l'atteinte de la taille à la puberté (L_p).

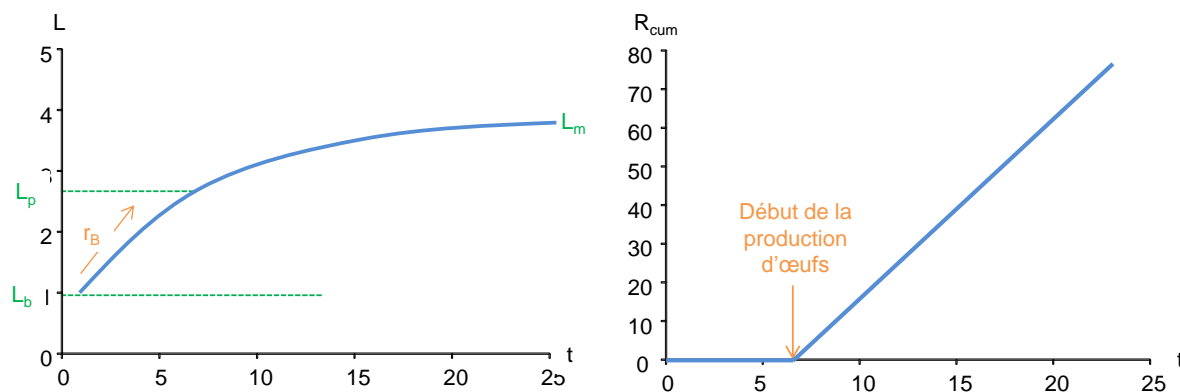


Figure 20 : Courbes de croissance et de reproduction théoriques. L: Taille ; L_b: Taille à la naissance ; L_p: Taille à la puberté ; L_m: Taille maximale ; r_B: Taux de croissance de von Bertalanffy ; R_{cum}: Reproduction cumulée.

1.2. Le modèle DEB en présence d'un polluant : le DEBtox

La théorie de la Dynamique de Budget Énergétique appliquée à la toxicologie (DEBtox) offre d'importants avantages dans l'analyse et l'interprétation des effets de toxiques sur les traits d'histoire de vie. En effet, cette théorie prend en compte les effets mesurés sur la croissance, la reproduction et la survie comme des processus dynamiques et en estime des paramètres communs indépendants du temps et de la concentration d'exposition, contrairement aux paramètres de *NOEC* et *EC* qui dépendent des conditions d'exposition (en particulier du critère d'effet mesuré et de la durée d'exposition) (Kooijman et Bedaux, 1996). Cette théorie établit le lien entre les perturbations métaboliques et leurs conséquences pour la survie et la fécondité, essentiel pour l'extrapolation au niveau de la population (Nisbet *et al.*, 2000; Jager et Zimmer, 2012). Les récentes études de Swain *et al.* (2010) et Wren *et al.* (2011) proposent de coupler l'approche DEBtox à l'interprétation des effets au niveau moléculaire au travers de l'expression de gènes spécifiques du métabolisme chez le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Le modèle DEBtox (Dynamic Energy Budget in toxicology) développé par Kooijman et Metz (1984) puis par Kooijman et Bedaux (1996) est récemment remanié par Billoir *et al.* (2008b) et Jager et Zimmer (2012). Ce modèle décrit comment un composé toxique est accumulé au sein d'un organisme au cours du temps lors de l'exposition et comment cette contamination altère les paramètres du modèle DEB. Le DEBtox couple ainsi la cinétique du toxique et la dynamique des effets. Dans ce contexte, un modèle cinétique simple à un compartiment est utilisé. Dans ce modèle, l'entrée et l'élimination du toxique sont proportionnelles à la surface de l'organisme et respectivement, à la concentration d'exposition et à la concentration interne.

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

Pour simplifier l'équation, la concentration interne C_i est normalisée par le facteur de bioconcentration correspondant au ratio entre la concentration interne maximale et la

concentration externe. La cinétique est ainsi représentée par l'équation suivante (Kooijman et Bedaux, 1996) :

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

avec la concentration en uranium (C_i^*) normalisée par son facteur de bioconcentration, de la façon suivante :

$$C_i = \frac{k_a}{k_e} C_i^*$$

tous les paramètres sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Paramètres du modèle DEBtox

Symbole	Unité	Interprétation
L_m	mm	Taille maximale
L_0	mm	Taille à la naissance
L_p	-	Taille à la puberté
l	-	Taille normalisée maximale
r_B	j^{-1}	Taux de croissance de von Bertalanffy
R_m	$\mu\text{g.oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction maximum
R	$\mu\text{g.oeufs.j}^{-1}$	Taux de reproduction journalier
k_a	j^{-1}	Taux d'accumulation
k_e	j^{-1}	Taux d'élimination
k_r	j^{-1}	Taux de réparation
k_d	j^{-1}	Taux d'accumulation des dommages
NEC	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentration sans effet
b	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Pente d'effet
C_e	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentration d'exposition
C_i	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentration interne
C_i^*	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentration interne normalisée par le facteur de bioconcentration
c^*	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentration externe ou interne selon le cas modèle cinétique choisi
D^*	$\mu\text{g.L}^{-1}$	Niveau de dommages normalisé
σ	-	Fonction de stress
g	-	Taux d'investissement d'énergie
f	-	Réponse nutritive fonctionnelle

Un composé toxique est supposé affecter la gestion (acquisition et/ou utilisation) de l'énergie selon une fonction de stress σ (Kooijman et Bedaux, 1996), quand sa concentration à l'intérieur de l'organisme excède une valeur seuil nommée NEC (Figure 21), pour concentration sans effet (No Effect Concentration) :

$$\sigma(C_i^*) = b (C_i^* - NEC) \quad \text{si } C_i^* \geq NEC$$

Cette *NEC* correspondant au seuil d'effet sur le budget énergétique a l'avantage d'être indépendante du temps et commune aux différents processus biologiques (croissance et reproduction) (Billoir *et al.*, 2008b).

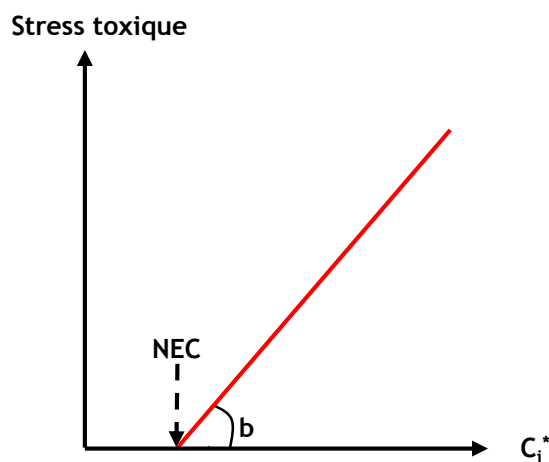


Figure 21 : Représentation schématique de la *NEC* (concentration sans effet)

Kooijman et Bedaux (1996) proposent 5 modes d'action métaboliques différents pour interpréter l'effet d'un toxique sur la reproduction : deux effets directs où seule la reproduction est affectée et 3 effets indirects où la croissance et la reproduction sont simultanément affectées. Concernant les modes d'action directs sur la reproduction, soit le composé toxique induit une mortalité pendant l'ovogénèse (*Modèle Hasard*) ou soit il provoque une augmentation des coûts de production des œufs (*Modèle des Coûts*). Les modes d'action indirects affectent la reproduction au travers d'une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité (*Modèle de Maintenance*), d'une augmentation des coûts de croissance et de maturation (*Modèle de Croissance*) ou enfin d'une réduction de l'entrée d'énergie (*Modèle d'Assimilation*). Les équations proposées initialement par Kooijman et Bedaux (1996) pour ces différents modes d'action sont re-dérivées par Billoir *et al.* (2008b). Ces nouvelles équations correspondant aux 5 modes d'actions d'un composé toxique sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Equations de croissance et de reproduction du modèle DEBtox

Modèles d'effets	Croissance	Reproduction
Modèle de Croissance	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f + g(1 + \sigma(c_*))} (f - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1 + \sigma(c_*)) + l}{g(1 + \sigma(c_*)) + f} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle de Maintenance	$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l(1 + \sigma(c_*)))$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} (1 + \sigma(c_*)) \left[fl^2 \left(\frac{g(1 + \sigma(c_*))^{-1} + l}{g + f} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle d'Assimilation	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f(1 - \sigma(c_*)) + g} (f(1 - \sigma(c_*)) - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - \sigma(c_*)) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - \sigma(c_*))} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle Hasard	$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g + l}{g + f} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma(c_*)}$
Modèle des Coûts	$\frac{dl}{dt} = r_B (f - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g + l}{g + f} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma(c_*))^{-1}$

Le modèle DEBtox est appliqué chez *Daphnia magna* dans le cadre de contaminations diverses. Dans l'étude de **Kooijman et Bedaux (1996)**, une exposition au cadmium induit une mortalité pendant l'ovogénèse (*Modèle Hasard*) tandis qu'une exposition à 2 produits chimiques (phénol et 3,4-dichloroaniline) induit un effet sur les modèles d'effets indirects sur la reproduction (*Modèles de Croissance, d'Assimilation et de Maintenance*). Dans ce dernier cas, les auteurs ne sont pas parvenus à identifier un seul mode d'action parmi les 3 possibilités formulées. Une contamination à du fluorenthène induit un effet direct sur la reproduction en augmentant les coûts de production des œufs (*Modèle des coûts*) (**Jager et Zimmer, 2012**).

D'autres espèces font également l'objet d'études toxicologiques à l'aide de ce modèle. Des travaux sur les effets du cuivre sur le ver de terre, *Dendrobaena octoedra*, démontrent un effet sur le taux d'ingestion (**Jager et Klok, 2010**). Il est mis en évidence chez *Folsomia candida*, que le cadmium induit une réduction de l'assimilation et le triphényltine provoque une augmentation des coûts de maintenance (**Jager et al., 2004**). Pour cette espèce, 2 modes d'actions différents sont observés lors d'une contamination à un même polluant, le chlorpyrifos. En effet, **Jager et al. (2007)** démontrent que selon le temps d'exposition, ce toxique a un effet sur le modèle des coûts (exposition pendant 45 jours) ou sur le modèle de maintenance (exposition pendant 120 jours). Une autre étude concernant le poisson zèbre, *Danio rerio*, met également en évidence la présence de plusieurs modes d'action suite à une exposition à l'uranium, selon les stades de vie contaminés : augmentation de la maintenance somatique lors d'une exposition du stade adulte et augmentation de la mortalité pendant l'ovogénèse accompagnée d'une augmentation des coûts de croissance lors d'une exposition des stades de vie précoces (**Augustine et al., 2012**).

1.3. Le DEBtox appliqué au cas de l'uranium dans un contexte multigénération

L'étude de **Massarin et al. (2010)** démontre que l'uranium a un effet sur l'assimilation des daphnies. L'analyse DEBtox des effets sur la croissance et la reproduction (**Massarin et al., 2011**) souligne que ces effets observés sur la croissance et la reproduction peuvent s'expliquer par une réduction de l'assimilation corrélées à la concentration externe. Elle montre que l'aggravation des effets au travers des générations est décrite par une augmentation du stress toxique pour une concentration donnée, à travers la diminution de la *NEC* et l'augmentation de *b* (Figure 22).

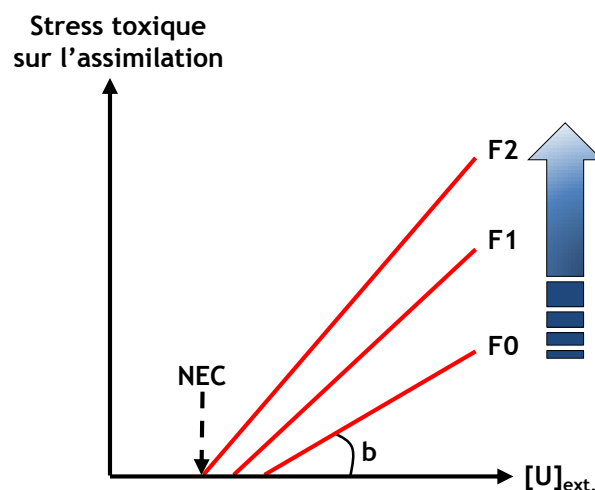


Figure 22 : Représentation schématique de la NEC illustrant les résultats obtenus dans l'étude de Massarin *et al.* (2011)

Au terme de cette étude, l'aggravation des effets et l'augmentation du stress toxique au fil des générations demeurent, pour leur part, inexplicables et la combinaison de deux stress toxiques - l'un lié à la concentration d'exposition et le second à un niveau de dommages - est pressenti. Ces deux facteurs de stress pourraient agir conjointement sur l'assimilation ou impliquer l'intervention d'un second mode d'action (indépendant de la réduction d'assimilation).

2. Choix des hypothèses du modèle

2.1. Développement d'un modèle DEBtox à deux facteurs de stress

Pour tester ces hypothèses, on introduit un modèle à 2 facteurs de stress : la concentration en uranium (interne et/ou externe) induisant une réduction de l'assimilation telle que décrite dans Massarin *et al.* (2011) et un niveau de dommages nécessairement héritable d'une génération à la suivante pour expliquer l'augmentation de l'intensité des effets. Les deux facteurs de stress sont supposés agir indépendamment (sans interaction) au travers de deux fonctions de stress, σ_1 correspondant à la réduction d'assimilation et σ_2 correspondant au stress toxique relatif au niveau de dommages hératables.

Les stress σ_1 et σ_2 sont exprimés par les formules suivantes :

$$\sigma_1(C_i^*) = b_1 \cdot (C_i^* - NEC_1)$$

$$\sigma_2(D^*) = b_2 \cdot (D^* - NEC_2)$$

Avec C_i^* et D^* les facteurs de stress. Comme la concentration en uranium (C_i^*) normalisée par le facteur de bioconcentration, le niveau de dommages (D^*) est normalisé par son facteur de bioconcentration de la façon suivante :

$$D^* = \frac{k_r}{k_d} D$$

avec k_r la constante de réparation et k_d la constante d'accumulation de dommages.

L'accumulation des dommages est représentée de la manière suivante :

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

2.2. Hypothèses sur le(s) mode(s) d'action

Cinq hypothèses différentes sont testées pour tenter d'identifier un second mode d'action relatif à σ_2 (Tableau 8).

Tableau 8 : Combinaison des modes d'action testées

Mode d'action 1	Mode d'action 2	Nomenclature
Assimilation	Croissance	A-C
	Assimilation	A-A
	Maintenance	A-M
	Œufs	A-O
	Hasard	A-H

2.3. Formulation des équations

Suite aux hypothèses posées, les équations utilisées pour réaliser les ajustements sont formulées dans le Tableau 9, où le stress correspondant à l'assimilation et le stress relatif aux dommages sont combinés selon la nature du second mode d'action.

Tableau 9 : Equations différentielles de croissance et de reproduction utilisées pour les ajustements des données au modèle DEBtox avec deux fonctions de stress σ_1 (correspond à la réduction d'assimilation relative à la concentration en uranium) et σ_2 (correspondant au niveau de dommages selon l'un des 5 modes d'action)

Second mode d'action	Croissance	Reproduction
Modèle de Croissance	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f + g(1 + \sigma_2) + f(1 - \sigma_1)} (f(1 - \sigma_1) - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - \sigma_1) l^2 \left(\frac{g(1 + \sigma_2) + l}{g(1 + \sigma_2) + f(1 - \sigma_1)} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle de Maintenance	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f(1 - \sigma_1) + g} (f(1 - \sigma_1) - l(1 + \sigma_2))$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} (1 + \sigma_2) \left[f(1 - \sigma_1) l^2 \left(\frac{g(1 + \sigma_2)^{-1} + l}{g + f(1 - \sigma_1)} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle d'Assimilation	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f(1 - \sigma_1)(1 - \sigma_2) + g} (f(1 - \sigma_1)(1 - \sigma_2) - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - \sigma_1)(1 - \sigma_2) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - \sigma_1)(1 - \sigma_2)} \right) - l_p^3 \right]$
Modèle des Coûts	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f(1 - \sigma_1) + g} (f(1 - \sigma_1) - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - \sigma_1) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - \sigma_1)} \right) - l_p^3 \right] (1 + \sigma(\sigma_2))^{-1}$
Modèle Hasard	$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f + g}{f(1 - \sigma_1) + g} (f(1 - \sigma_1) - l)$	$R(l) = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - \sigma_1) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - \sigma_1)} \right) - l_p^3 \right] e^{-\sigma_2}$

Il est établi dans les précédentes études que chez *Daphnia magna*, le taux d'investissement g est égal à 1 (Billoir *et al.*, 2008b; Massarin *et al.*, 2011). D'autre part, les daphnies dans les expériences étant nourries *ad libitum*, la réponse nutritive f est fixée à 1.

2.4. Scénarios d'exposition

Le modèle développé est utilisé pour analyser les données expérimentales issues de cette thèse et de celle de Sandrine Massarin (2010). Différents scénarios d'exposition doivent être introduits pour décrire l'ensemble des situations testées (Tableau 10). Les générations successives sont exposées de façon identique dans le présent travail (expériences 1, 2 et 3) et de façon différente dans celui de Massarin *et al.* (2010) (expériences 4, 5 et 6). Les concentrations d'exposition diffèrent selon les expériences considérées : 0 ; 2 ; 9,9 ; 22,2 et 50 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ pour les expériences issues de ce travail et 0 ; 10 ; 25 et 75 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ pour les expériences issues de Massarin *et al.* (2010).

Tableau 10 : Récapitulatif des scénarios d'exposition (case grise : fin de l'expérience)

	Exposition F0		Exposition F1		Exposition F2	
	Embryon	Après éclosion	Embryon	Après éclosion	Embryon	Après éclosion
Expérience 1	OUI	OUI	OUI	OUI		
Expérience 2	OUI	NON	OUI	NON		
Expérience 3	NON	OUI	NON	OUI		
Expérience 4	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Expérience 5	NON	OUI	OUI	NON		
Expérience 6	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON

2.5. Hypothèses cinétiques

Le niveau d'exposition variant entre les stades de vie et entre les générations dans la plupart des scénarios, il est nécessaire d'émettre des hypothèses sur le devenir du stress au cours du temps.

L'héritabilité, qui décrit la transmission entre une daphnie et ses œufs du niveau de dommages accumulé au cours du temps est nécessaire pour expliquer l'aggravation des effets d'une génération à la suivante. Elle est réalisée en donnant au niveau de dommages initial dans les œufs la valeur accumulée dans la daphnie au moment du dépôt de la ponte. Le stress affectant l'assimilation est causé par une altération de la paroi du tube digestif des femelles et n'est donc pas transmis à la descendance.

Les résultats de Massarin *et al.* (2010), tout comme ceux issus de ce travail, montrent que le stress présent au stade embryonnaire pourrait perdurer au-delà de l'éclosion, y compris dans le cas d'un retour en eau non contaminée, ce qui reflète une certaine inertie dans la réversibilité des effets. Cette inertie peut être appliquée en donnant une valeur faible aux constantes cinétiques k_e ou k_r . Pour permettre toutefois, l'apparition rapide des effets décrite par Massarin *et al.* (2010), il

est nécessaire d'envisager une irréversibilité complète, la décroissance du facteur de stress n'étant alors plus autorisée.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant l'accumulation et l'application des facteurs de stress (Figure 23).

- Dans le premier cas, la réduction d'assimilation est corrélée à la concentration externe (Figure 23 A), ce qui correspond à une cinétique immédiate.
- Dans le deuxième cas, la réduction d'assimilation est corrélée à la concentration interne (Figure 23 B), ce qui laisse la possibilité d'une cinétique lente.

Concernant le niveau de dommages (D) lié au second mode d'action, il est corrélé à la concentration externe.

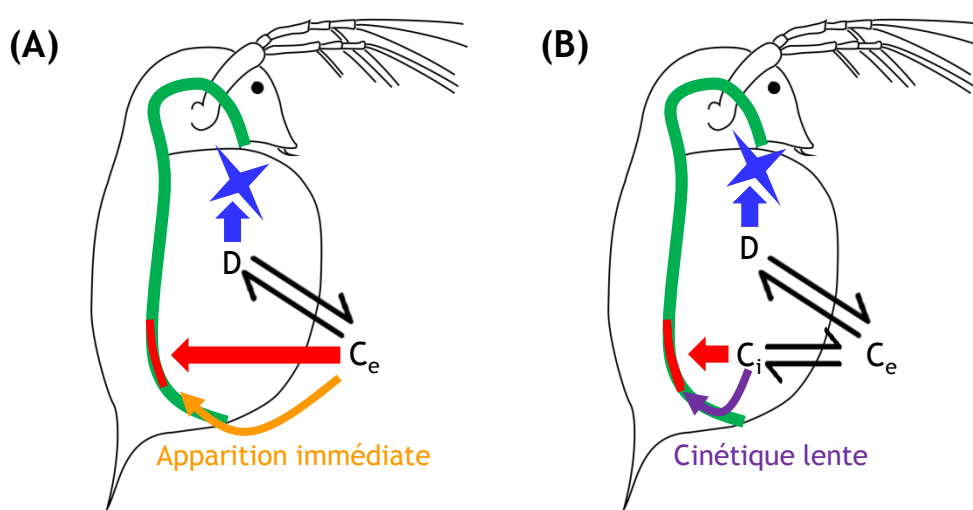


Figure 23 : Représentation schématique des hypothèses émises concernant les modules cinétiques. (A) : apparition immédiate des effets; (B) : cinétique lente des effets. C_e : concentration externe ; C_i : concentration interne ; D : niveau de dommages.

3. Ajustements de la croissance et de la reproduction

3.1. Méthode employée pour la réalisation des ajustements

L'ensemble des ajustements est réalisé simultanément pour les données de croissance et de reproduction.

Les ajustements aux données de reproduction sont réalisés en utilisant la masse cumulée d'œufs, nos mesures confirmant l'observation de *Massarin et al. (2010)* que la masse d'un œuf est corrélée à la taille de la daphnie. Les femelles plus grande produisant des œufs de plus grande masse, l'utilisation de la masse comme métrique de l'investissement énergétique dans la reproduction semble donc plus judicieuse (*Massarin et al., 2011*).

La méthode consiste à ajuster les paramètres physiologiques fondamentaux du DEBtox (l_b , l_p , L_m , r_B et R_m) aux données issues des individus témoins dans un premier temps, puis les paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques (NEC_1 , b_1 et k_e pour la réduction d'assimilation et NEC_2 , b_2 et k_r pour le mode d'action 2) aux données issues des individus exposées dans un second temps. Un ajustement des paramètres physiologiques commun à l'ensemble des données témoins toutes expériences et générations confondues est réalisé. Toutefois, les données trop différentes d'une expérience à l'autre et d'une génération à l'autre délivrent un ajustement peu satisfaisant, imposant un ajustement séparé par expérience et par génération. Par contre, les paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques sont estimés pour l'ensemble des expériences et des générations. Chaque hypothèse cinétique et combinaison de modes d'action est testée lors des calculs.

3.2. Critère d'ajustement

Tous les ajustements sont réalisés selon le critère des moindres carrés moyens pondérés. Une division par l'écart type est réalisée afin de donner un même poids à toutes les observations que leur valeur soit peu et très variable. Pour chaque critère d'effet calculé (taille et reproduction), le nombre d'observations varie entre les conditions et la somme est donc divisée par le nombre d'observations.

La moyenne des carrés des écarts du critère d'effet Y (taille ou reproduction), pour les témoins et les différentes conditions d'exposition, est calculée selon l'équation suivante :

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

où :

- $n_r(Y,j)$ est le nombre de réplicats observés dans la condition j .
- Y_{jir} est le réplicat r de la mesure de Y dans la condition j au temps i .
- \hat{Y}_{ji} est la valeur estimée de Y
- $\sigma(Y_{ij})$ est l'écart-type des observations Y_{jir} dans la condition j au temps i .

Afin d'équilibrer la contribution de la taille et de la reproduction au critère d'ajustement, la somme des écarts des carrés est multipliée par le poids du critère d'effet considéré selon l'équation suivante :

$$SSQ(tot) = \sum_Y W(Y) \cdot SSQ(Y)$$

avec:

$$W(Y) = \frac{1}{SSQ_{max}(Y)}$$

où :

$$SSQ_{max}(Y) = \sum_j \frac{1}{n_r(Y,j)} \sum_r^{n_r(Y,j)} \left(\frac{\bar{Y} - Y_{jir}}{\sigma(Y_{ji})} \right)^2$$

où :

- $W(Y)$ est le poids associé à chaque critère d'effet
- \bar{Y} est la valeur moyenne des observations Y dans toutes les conditions j .
- SSQ_{max} est une somme des écarts des carrés maximale, utilisée pour corriger l'importance relative de la reproduction dû à la rythmicité des pontes liée au cycle de mue dans le cas des daphnies (**Massarin *et al.*, 2010**).

PARTIE C

Résultats et Discussion

Chapitre 6 :

Résultats expérimentaux

La démarche expérimentale vise à tester si les altérations de l'ADN sont accumulées et transmises de la mère à sa descendance avec un accent spécial sur le lien de toxicité entre les niveaux moléculaire et individuel. Les dommages à l'ADN sont utilisés pour explorer la toxicité de l'uranium à des concentrations inférieures à $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$, la plus faible concentration testée dans de précédentes études (Massarin *et al.*, 2010), où les effets sont difficiles à détecter à des niveaux d'organisation biologique plus élevés. Les daphnies sont soumises à différents scénarios d'exposition pour étudier le rôle et la sensibilité de stades de vie spécifiques dans l'accumulation des dommages à l'ADN et dans l'augmentation de la sévérité des effets au cours de générations.

1. Exposition continue de daphnies à l'uranium appauvri

1.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs

La bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs augmente avec la concentration en uranium et diffère légèrement entre les générations F0 et F1. En effet, globalement, les individus accumulent plus d'uranium dans la génération F0 que dans la génération F1 (respectivement $62,42 \pm 18,24$ et $29,84 \pm 11,07$ ng par mg au moment de l'éclosion à $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$). Mais au sein d'une même génération, il n'y a pas de différence significative au cours du temps entre les temps d'échantillonnage. La bioaccumulation de l'uranium dans les œufs tend à diminuer entre les générations F0 et F1 (respectivement $4,78 \pm 3,05$ et $1,93 \pm 2,01$ ng par mg dans les œufs de la ponte 5 à $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$) (Figure 24).

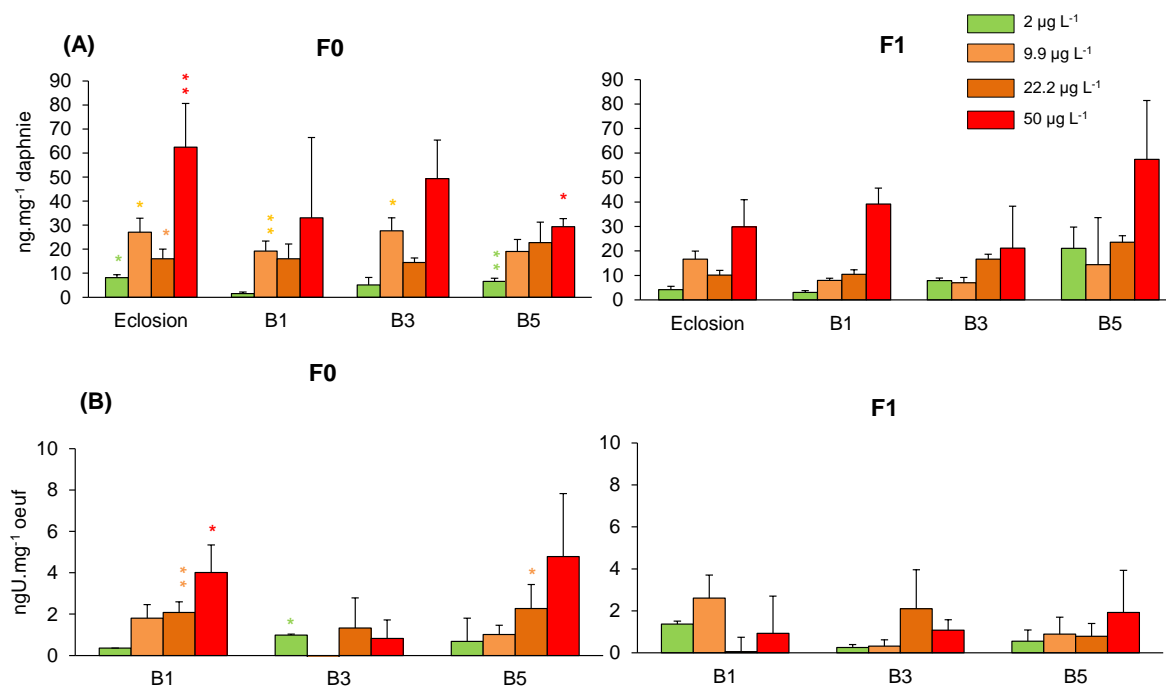


Figure 24 : Exposition continue. Bioaccumulation de l'uranium (ng.mg⁻¹ de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne ± Ecart-type, n=5. Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage.

1.2. Survie

La mortalité des daphnies est très faible dans la génération F0, n'excédant pas 10%, et n'augmente pas significativement avec la concentration en uranium (Figure 25).

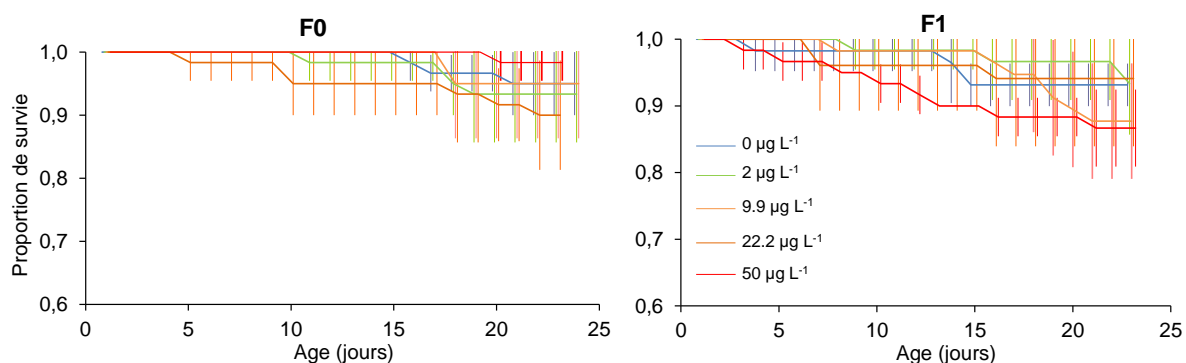


Figure 25 : Exposition continue. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1).

Dans la génération F1, l'augmentation de la mortalité avec la concentration reste faible et non significative par rapport au témoin. Dans les conditions 9,9 et 50 µgU.L⁻¹, cette augmentation

équivalent à 8% et 12% après 23 jours d'exposition. A $2 \mu\text{gU.L}^{-1}$, la mortalité est de 7% comme dans la F0.

1.3. Croissance somatique en taille

Les résultats montrent une réduction significative de la taille des daphnies avec la concentration d'exposition dans les deux générations (Figure 26). Cet effet augmente entre la génération F0 et la génération F1. D'après les ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy, les paramètres affectés sont (Tableau 11):

- la taille maximale des daphnies (L_m) réduite de 10 et 6% par rapport aux individus témoins, respectivement à $22,2$ et $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ dans la génération F0 et de 9% dès $9,9 \mu\text{gU.L}^{-1}$ dans la génération F1.

- la taille des néonates à la naissance (L_b) réduite de 3, 10 et 14% à $9,9$, $22,2$ et $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ dans la génération F1.

- le taux de croissance de Von Bertalanffy (r_B), réduit par rapport au témoin de 28% à $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ dans la génération F1.

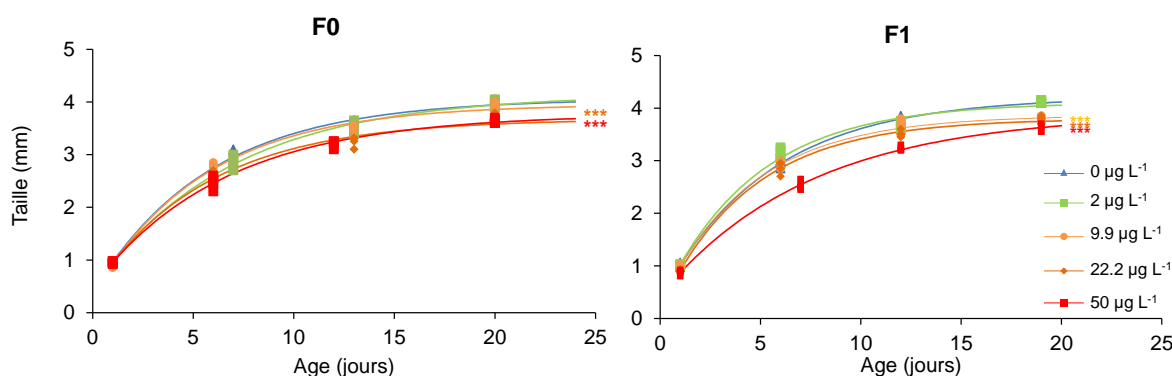


Figure 26 : Exposition continue. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

1.4. Masse somatique

La masse somatique est significativement affectée par l'uranium dès la première génération à partir de $22,2 \mu\text{gU.L}^{-1}$. La réduction observée est imputable à la taille plus petite des daphnies exposées. En effet, les daphnies exposées à cette concentration présentent à taille égale une masse volumique 17% plus élevée que le témoin (Figure 27). L'effet s'amplifie dans la génération F1, dont les individus à $22,2$ et $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ ont respectivement une masse plus élevée de 25 et 18% par rapport au témoin.

Tableau 11 : Exposition continue. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Génération	[U] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taille				Masse sèche des adultes		Masse sèche des œufs		
		L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (j^{-1})	p	δ ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$)	p	B ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$)	ω (μg)	p
F0	0	0,960	4,061	0,172		5,223		4,909	-7,483	
	2	0,956	4,144	0,146		5,272		2,482	-0,527	**
	9,9	0,926	3,957	0,180		5,311		3,293	-2,725	*
	22,2	0,949	3,678	0,176	***	6,122	**	1,405	3,650	**
	50	0,955	3,768	0,153	***	5,447	*	1,715	1,984	*
F1	0	1,015	4,209	0,186		5,496		3,248	-2,569	
	2	1,027	4,107	0,214		5,218		5,855	-12,268	
	9,9	0,989	3,863	0,224	***	5,350		4,982	-8,515	
	22,2	0,914	3,799	0,224	***	6,475	***	2,413	-0,938	
	50	0,872	3,902	0,134	***	6,322	*	3,510	-3,583	

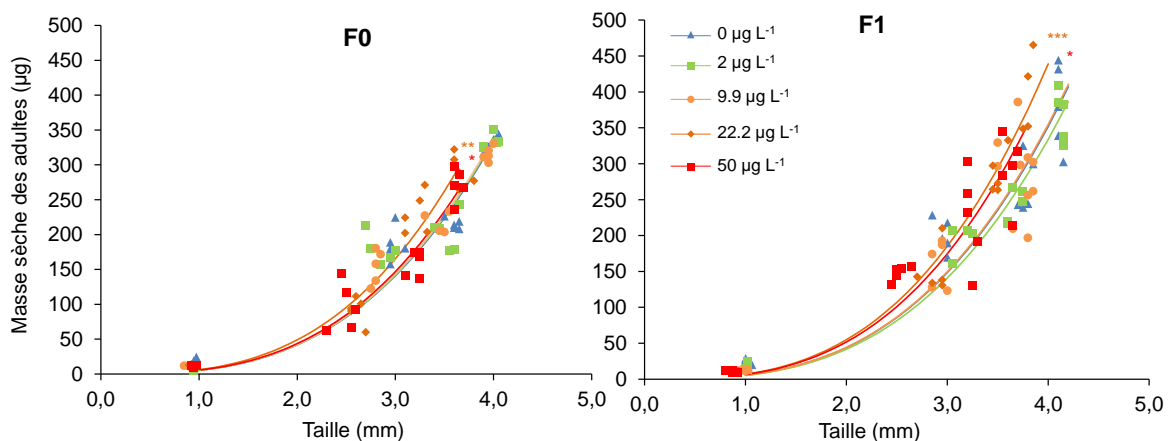


Figure 27 : Exposition continue. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse ($n=5$) et les lignes aux ajustements. Statistiques : * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$.**

1.5. Reproduction

Les effets de l'uranium sur la reproduction, incluent une réduction à la fois de la fécondité et de la masse sèche investie par œuf avec la concentration d'exposition. Ces effets augmentent entre les générations F0 et F1. Aucun retard significatif de jour de ponte n'est observé au cours de l'exposition des 2 générations successives.

Dans la génération F0, la fécondité est significativement réduite par rapport au témoin dès la ponte 1 à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans la génération F1, les effets sont significatifs dès l'éclosion de la ponte 2 à $9,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (22%) et de la ponte 3 à la plus faible concentration, $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (10%). Par rapport au témoin, la réduction de fécondité cumulée sur 5 pontes à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ atteint 20% dans la génération F0 et 30% dans la génération F1 (Figure 28).

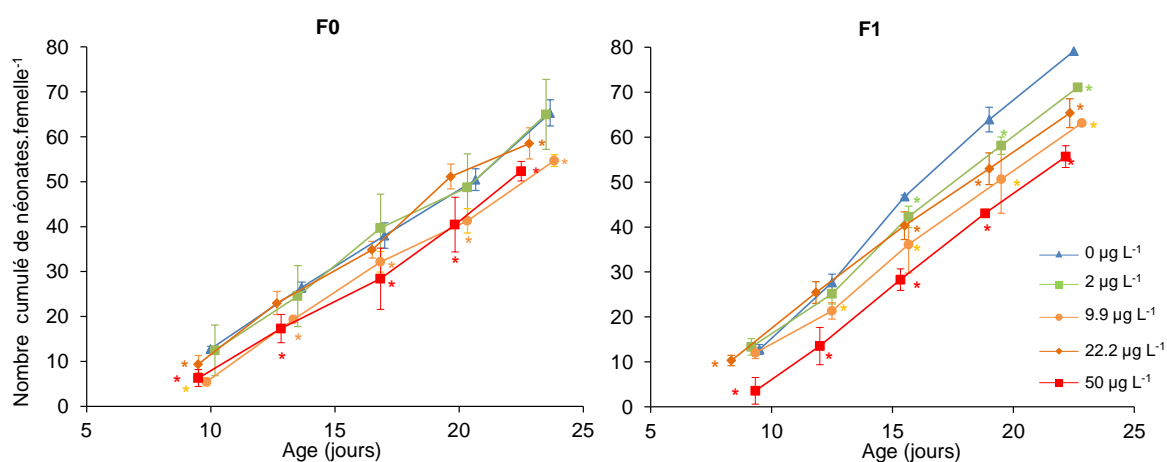


Figure 28 : Exposition continue. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; n=3. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001.**

Les résultats indiquent que la masse sèche par œuf augmente linéairement avec la taille des femelles (Figure 29). Cette relation linéaire diffère significativement du témoin à partir de 2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ dans la génération F0, mais à aucune concentration dans la génération F1.

Les daphnies exposées étant de taille plus petite que le témoin, l'uranium induit donc une diminution de la masse investie par œuf. Il en résulte que les daphnies investissent dans la reproduction une masse plus faible, bien que la fécondité apparaisse plus importante à 22,2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ qu'à 9,9 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ (respectivement 302 et 405 μg en F0 et 377 et 331 μg en F1).

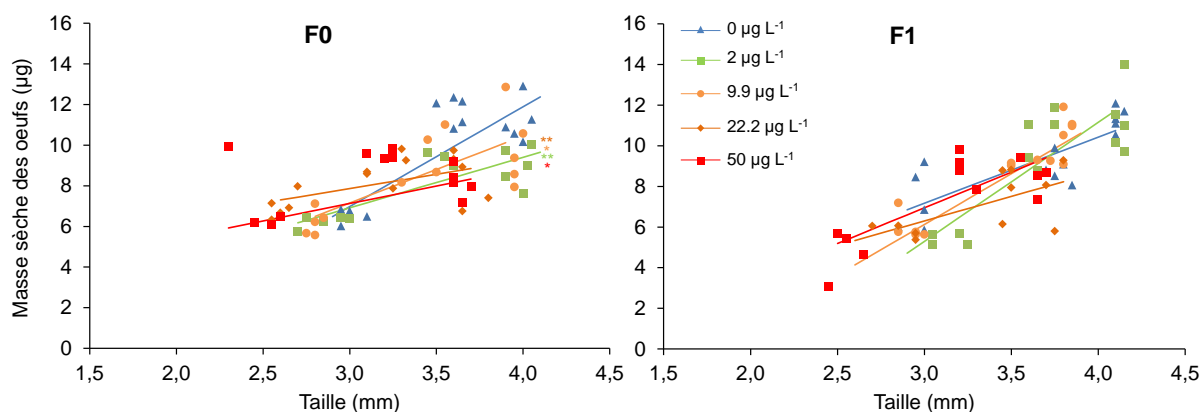


Figure 29 : Exposition continue. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche (n=5) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001.**

1.6. Altérations de l'ADN

1.6.1. Sélection des amorces discriminantes

Des RAPD-PCR préliminaires sont réalisées sur 2 échantillons d'ADN génomiques témoins (adultes et néonates) où sept amorces différentes et deux dilutions (10 et 20) par amorce sont testées (Tableau 12).

Tableau 12 : Cycles seuils (C_t) après une RAPD-PCR réalisées sur l'ADN génomique de daphnies témoin en utilisant 7 amorces et 2 dilutions. $>c$: le C_t observé est au-dessus de celui du témoin sans ADN.

	OPA9	OPB5	OPB6	OPB7	OPB10	OPB11	OPB12
<i>Dilution x10</i>							
Adultes	30,86	40,23	42,09	30,31	31,92	37,7	>c
Néonates	>c	39,85	41,44	27,53	30,59	35,86	>c
<i>Dilution x20</i>							
Adultes	31,26	41,67	42,83	30,77	32,74	30,5	>c
Néonates	28,89	39,45	40,58	28,18	30,84	35,8	>c

Les résultats permettent d'exclure les amorces avec lesquelles l'ADN n'est pas assez ou est trop amplifié (nombre de cycles supérieur à 40). Ainsi les amorces potentiellement utilisables pour les analyses RAPD-PCR sont OPA9, OPB7, OPB10 et OPB11. Parmi ces 4 amorces, OPA9 et OPB10 sont sélectionnées avec une dilution de 20.

1.6.2. Analyse des effets génotoxiques de l'uranium

Tableau 13 : Exposition continue. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), $n=4$. Statistiques: * $p<0,05$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P	F0		F1						
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(9,59 \pm 3,72)	(11,74 \pm 2,86)	(5,05 \pm 2,10)	(8,94 \pm 2,48)	(21,99 \pm 4,65)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(9,62 \pm 1,97)	(9,13 \pm 1,87)	(4,43 \pm 0,96)	(67,08 \pm 3,74) *	(5,04 \pm 3,38) *					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(21,25 \pm 8,00)	(10,12 \pm 4,67)	(10,33 \pm 1,62)	(19,71 \pm 0,72)	(4,85 \pm 2,64) *					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(8,80 \pm 0,22)	(34,22 \pm 18,64)	(18,92 \pm 5,56) *	(10,46 \pm 5,01)	(8,32 \pm 5,51)					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(11,35 \pm 2,06)	(35,10 \pm 16,10)	(13,25 \pm 4,61)	(1,94 \pm 0,66)	(7,83 \pm 1,88) *					
Néonates	F0	F1		F2						
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(10,35 \pm 1,77)	(8,12 \pm 2,59)	(1,36 \pm 0,21)	(16,02 \pm 3,28)	(30,24 \pm 21,61)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,41 \pm 1,78)	(8,52 \pm 2,21)	(4,45 \pm 1,35) *	(10,94 \pm 2,09)	(11,64 \pm 0,69) *					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(5,11 \pm 0,37)	(20,46 \pm 8,46) *	(12,44 \pm 4,10) *	(5,81 \pm 0,04)	(4,11 \pm 0,22) *					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(3,99 \pm 1,17)	(2,34 \pm 2,19)	(1,05 \pm 2,10)	(4,02 \pm 0,75)	(1,29 \pm 0,90) *					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(6,02 \pm 0,38)	(2,18 \pm 0,42) *	(6,82 \pm 3,13) *	(7,87 \pm 1,41)	(1,44 \pm 1,15)					

Tableau 14 : Exposition continue. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P	F0		F1		F1		F1		
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(2,81 \pm 0,77)	(7,32 \pm 1,63)	(2,96 \pm 0,96)	(6,29 \pm 1,10)	(10,41 \pm 3,66)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,91 \pm 2,38)	(8,65 \pm 2,81)	(7,56 \pm 4,89)	(26,14 \pm 4,80) *	(2,45 \pm 1,05)					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(12,19 \pm 7,69) *	(6,42 \pm 2,55)	(5,94 \pm 2,65)	(14,80 \pm 5,55)	(3,22 \pm 1,11)					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(4,15 \pm 0,84)	(7,27 \pm 3,06)	(8,04 \pm 2,09)	(28,36 \pm 19,59)	(3,39 \pm 1,04)					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(15,52 \pm 6,25) *	(21,22 \pm 13,17)	(11,39 \pm 2,06) *	(7,13 \pm 3,01)	(8,54 \pm 3,02)					

Néonates	F0		F1		F2	
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(3,63 \pm 0,21)	(4,03 \pm 2,21)	(0,82 \pm 0,23)	(12,93 \pm 3,19)	(7,88 \pm 3,69)	
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(8,32 \pm 0,73)	(4,70 \pm 0,72)	(4,45 \pm 0,48) *	(6,83 \pm 1,67)	(0,14 \pm 0,05) *	
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(8,46 \pm 4,47)	(6,59 \pm 2,06)	(4,03 \pm 1,3)	(8,21 \pm 2,67)	(0,10 \pm 0,03)	
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(3,32 \pm 0,74)	(8,40 \pm 4,70)	(2,93 \pm 0,52)	(3,24 \pm 1,34)	(19,80 \pm 16,47)	
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,02 \pm 1,35)	(1,98 \pm 1,00)	(4,13 \pm 1,21) *	(5,46 \pm 2,30)	(0,14 \pm 0,06) *	

Les résultats de RAPD-PCR observés avec l'amorce OPA9 reflètent une augmentation des dommages à l'ADN au cours des générations et entre les générations (Tableaux 13 et 15). Le nombre de sites d'hybridation chez les néonates fraîchement éclos (Tableau 13) diffère significativement du témoin à aucune des concentrations testées dans la génération F0, à 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ dans la génération F1 et à 2 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ dans la génération F2. La corrélation avec les températures de fusion (Tableau 15) révèle cependant une perte significative de produit PCR dès 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ à l'éclosion des néonates de F0. A l'éclosion de la ponte 1 (soit à environ 10 jours), aucun effet n'est observé chez les adultes de la génération F0, bien que les néonates F1 produits présentent un ADN altéré dès 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$. A l'éclosion de la ponte 5, l'ADN des adultes de la génération F0 diffère significativement du témoin à partir de 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ (Tableau 15). Cet effet génotoxique est confirmé seulement à 22,2 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ par l'analyse des cycles seuil (Tableau 13). Les résultats dans la génération F1 indiquent une altération de l'ADN des adultes dès 2 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$.

L'amorce OPB10 révèle une variation du nombre de sites d'hybridation significative à 50 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ à l'éclosion de la ponte 5 dans la génération F0 (Tableau 14) et à 2 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ à l'éclosion de la ponte 1 dans la génération F1. Les néonates issus de cette ponte présentent également une réduction significative du nombre de sites d'hybridations à partir de 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$. L'analyse des T_m montre de même des différences significatives pour les néonates éclos des pontes 1 et 5 à partir de 9,9 $\mu\text{g.U.L}^{-1}$ dans la génération F1 (Tableau 16). L'amorce OPB10 révèle moins de différences significatives entre les témoins et les individus exposés que l'amorce OPA9.

Tableau 15 : Exposition continue. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

Adultes	P					F0					F1														
	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$														
Intervalles de températures ($^{\circ}\text{C}$)	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50					
I1: [74-78[0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0,5	0	0	0,25	0	0,25
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0	0,25	0,75	0	0,75	0,75	0,5	0,25	0	0,25	1	1	0,75	0,5	0,5	0	0,5	1	1	1
I3: [80-81[0	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0,5	0,25	0	0	0,5	0	0	0,25	0	0,25	0	0	1	0*	0*	0*	0*
I4: [81-82[1	1	0*	0*	0*	0,5	1	0,75	0,25	0	1	1	0,25	1	1	0,75	0,75	0,5	1	0,25	0	1*	1*	1*	1*
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0,5	0	0	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0,5	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	1	0,75	0*	0*	0*	0,75	0	0	0,75	0,75	0	0	0,75	0,5	0
I8: [85-86[0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0,5	0,25	0	0,5
I9: [86-87[1	1	0,75	1	0*	0,75	1	1	1	1	1	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	1	1	0,75	0,75	1	0,5	0,5	0,75	0*
I10: [87-88[0	0	0,25	0	1*	0,25	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0	0	0,25	0	0	0,5	0,25	0,25	1*
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Néonates	F0					F1					F2														
	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$														
Intervalles de températures ($^{\circ}\text{C}$)	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50					
I1: [74-78[0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0,33	0	0,25	0	0	0	0,5	0	1	0	0	0,25	0	0	0	0
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0	0	1	0,25	0*	1	0*	0,25	1	0	0,5	0	0,5	0,75	1	0,67	1
I3: [80-81[0	0	0	0	0	0	0	0,75	0,75	0,67	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0,5	0,75	0	0	0	0
I4: [81-82[1	1	0*	0*	0*	1	1	0,25	0,25	0,33	1	1	1	1	1	0,5	1	1	0,75	0,5	0,25	1	1	1	1
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0,75	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0,5	0	0	0,25	0	0,5	0,25	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0	0,25	1*	0,67	0
I8: [85-86[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,67	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0,67
I9: [86-87[1	1	0,33	0,5	0,25	0,5	1	1	0,25	1	0,5	0	1	1	0,25	1	1	1	0,25	1	1	0*	0*	0*	0*
I10: [87-88[0	0	0,67	0,5	0,75	0,5	0	0	0,75	0	0,5	1	0	0	0,75	0	0	0	0,5	0	0	1*	1*	1*	1*
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 16 : Exposition continue. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

Intervalles de températures (°C)	Adultes					P										F0										F1									
	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$														
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50										
I1: [74-78[0,5	0,5	0,5	0,25	0,75	0,75	0	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0	1	0,25	0*	0,25	0,5	0,75	1	0	0,25	0										
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0,25	1	0,25	0,5	1	0,5	0,75	1	0,25	0	0	0,25	1*	0,75	0,5	0,25	0	0,5	0,75	0,75										
I3: [80-81[0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	0	0										
I4: [81-82[0,75	0	1	0	1	1	1	0,5	0,75	0,75	1	0,75	1	0,25	0,5	0,75	0,5	1	1	0,5	0,75	0	0,75	1	0,75										
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0										
I8: [85-86[1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,25	1	1	0,75	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	0,75	1	1										
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
I10: [87-88[1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,75	1	0*										
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	1*										
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										

Intervalles de températures (°C)	Néonates					F0					F1					F2									
	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$									
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50					
I1: [74-78[0	0,25	0,33	0,75	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,67	0	0,25	0,25	0	0,75	0	0	1*	0,75	1*	0,75	0,25	0	0,33	1
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0,25	0,33	1	0,75	0,75	0*	0,25	0,75	1	0	0	0	0,25	0,75	1	0,67	0,67
I3: [80-81[0	0	0	0,25	0	0	0	0,25	0,25	0	0	0,25	0,25	0	0	0	0,25	0,5	0	0,5	1	0,75	0*	0*	0*
I4: [81-82[0,5	0,25	0,67	0,5	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	1	1	0,75	0,25	1	1	0	0,75	0,5	1*	0,5	0	0	1*	1*	1*
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I8: [85-86[1	1	1	1	1	0,75	1	0,5	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I10: [87-88[1	1	1	1	1	0,75	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,75	1	0	0,67
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0,25	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0,67	0,33
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2. Exposition à partir de l'éclosion de daphnies à l'uranium appauvri

2.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs

La quantité d'uranium accumulée dans les daphnies augmente au cours du temps dans une même génération (Figure 30). En effet, dans la génération F0, la quantité d'uranium augmente de 50% de la ponte 1 à la ponte 5 à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

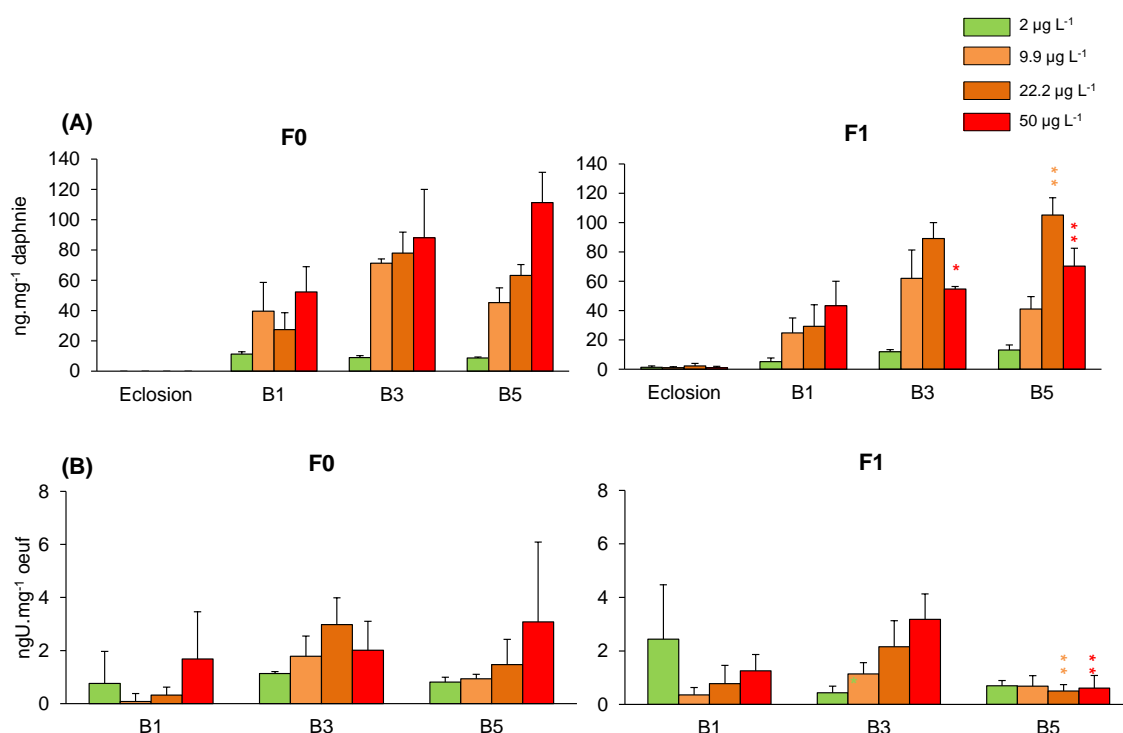


Figure 30 : Exposition post-éclosion. Bioaccumulation de l'uranium (ng.mg⁻¹ de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium au cours de générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne ± Ecart-type, n=5. Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage.**

La quantité d'uranium accumulée dans les œufs représente moins de 10% de la valeur observée dans les femelles au moment de la ponte, quelle que soit la condition considérée (Figure 30). Ainsi, si un transfert à lieu des daphnies à leurs œufs, celui-ci demeure relativement faible. La bioaccumulation observée dans les œufs fraîchement déposés peut également provenir d'une cinétique d'accumulation rapide de l'uranium présent dans la poche incubatrice des femelles.

2.2. Survie

La mortalité des daphnies reste inférieure à 5% dans la génération F0 quelle que soit la concentration considérée et augmente de 12% dans la génération F1 exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 31).

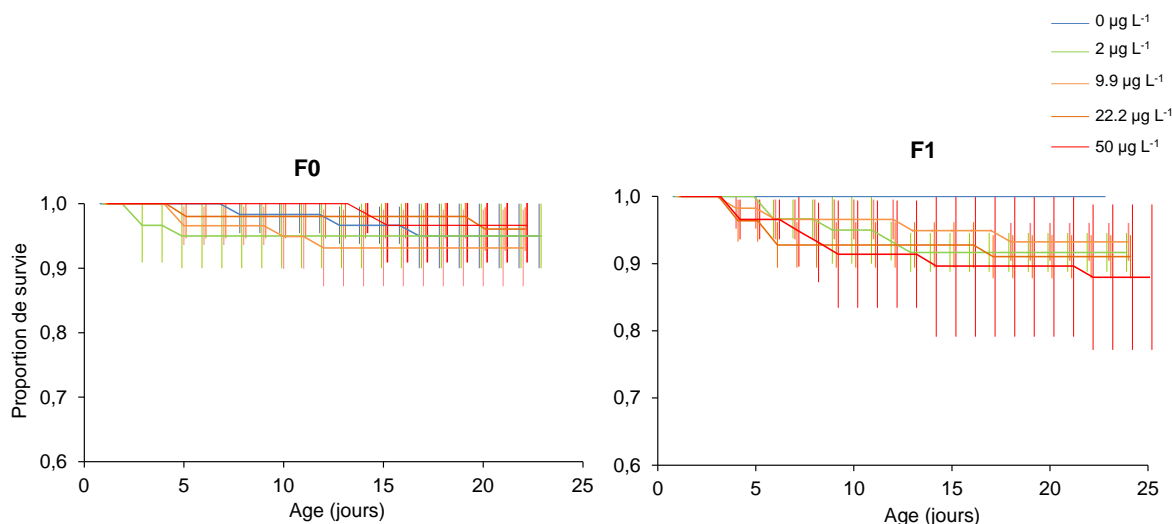


Figure 31 : Exposition post-éclosion. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1).

2.3. Croissance somatique en taille

Les effets sur la taille augmentent au fil des générations (Tableau 17 et Figure 32). Les individus exposés présentent une réduction de la taille de 8 et 13% à la ponte 3, respectivement à $22,2$ et $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans la génération F0 (Figure 32). Une aggravation des effets au cours des générations est observée seulement à la plus forte concentration ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) avec une croissance réduite de 13 et 20% à la ponte 3 par rapport au témoin, respectivement dans les générations F0 et F1. Les ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy indiquent une réduction significative de L_m de 3% à $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans la génération F1 et une réduction de 20% du taux de croissance r_B dès $9,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans la génération F0 (Tableau 17).

Tableau 17: Exposition post-éclosion. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Génération	[U] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Taille				Masse sèche des adultes		Masse sèche des œufs		
		L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (j^{-1})	p	δ ($\mu\text{g.mm}^{-3}$)	p	B ($\mu\text{g.mm}^{-1}$)	ω (μg)	p
F0	0	1,003	3,910	0,235		4,926		3,906	-5,092	
	2	1,011	3,864	0,219		5,623		4,750	-7,792	
	9,9	1,005	3,874	0,187	***	4,798		5,890	-11,561	
	22,2	1,004	3,561	0,256	***	4,966		6,075	-11,409	
	50	1,012	3,564	0,237	***	4,772		2,359	-1,059	
F1	0	1,038	3,879	0,232		4,661		5,094	-9,094	
	2	1,024	3,886	0,224		4,860		6,310	-13,025	
	9,9	1,010	3,896	0,226		4,251		6,999	-15,860	
	22,2	1,018	3,774	0,190	***	4,743		6,454	-13,337	
	50	0,997	3,061	0,424	***	5,696		1,331	3,099	

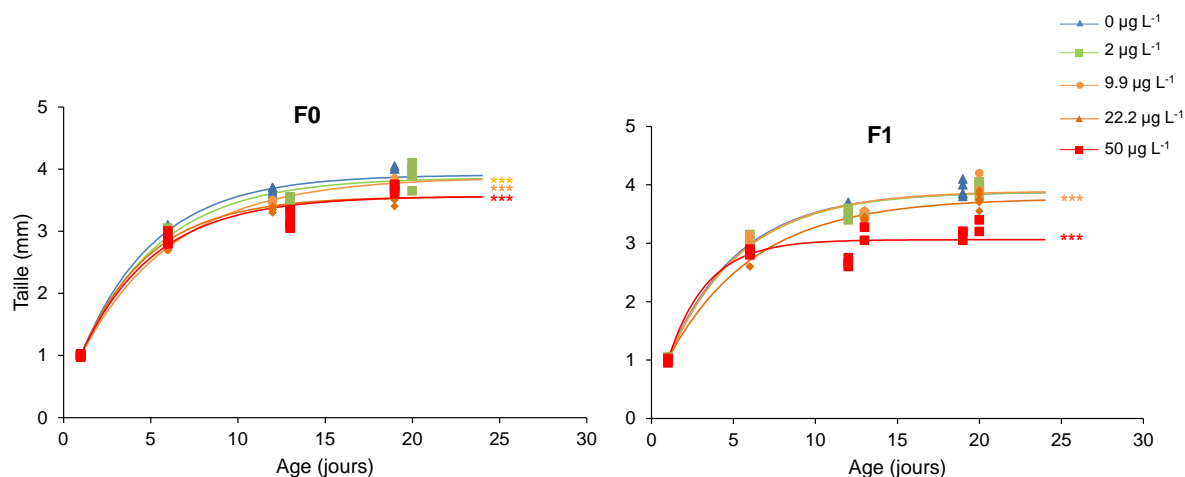


Figure 32 : Exposition post-éclosion. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.4. Masse somatique

L'uranium appauvri n'affecte pas significativement la masse somatique des individus, bien qu'une masse légèrement plus élevée que le témoin à taille égale soit observée à 50 $\mu\text{g U.L}^{-1}$ (Figure 33).

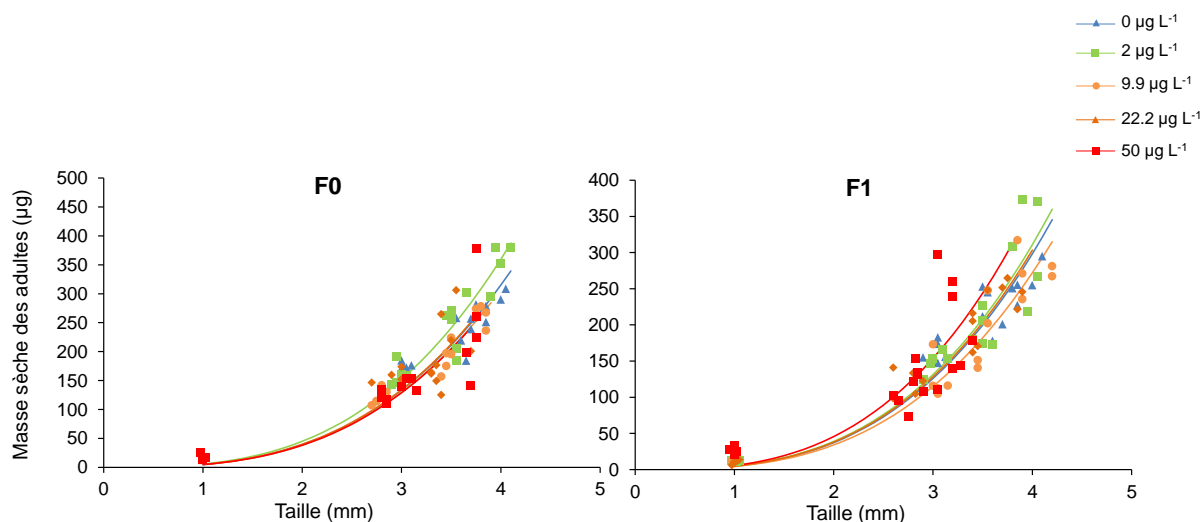


Figure 33 : Exposition post-éclosion. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse (n=5) et les lignes aux ajustements. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.5. Reproduction

L'uranium induit une diminution de la fécondité avec la concentration d'exposition. Ces effets augmentent entre les générations F0 et F1. Dans la génération F0, la fécondité n'est pas significativement réduite par rapport au témoin. Il faut tout de même noter la forte variabilité associée à cette observation à $50 \mu\text{g.U.L}^{-1}$. Le nombre de néonates est significativement réduit à $50 \mu\text{g.U.L}^{-1}$ et de façon croissante au cours de la génération F1 avec une réduction de 30% dès l'éclosion de la ponte 2 et 55% à l'éclosion de la ponte 5. Aux autres concentrations, la fécondité n'est pas significativement affectée par rapport au témoin (Figure 34).

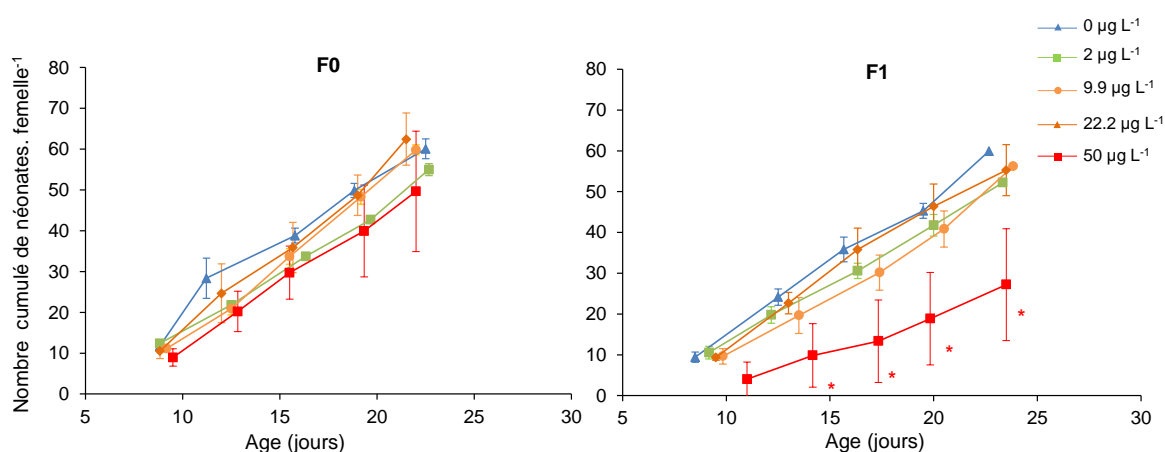


Figure 34: Exposition post-éclosion. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; n=3. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

La masse sèche des œufs est également réduite à $50 \mu\text{g.U.L}^{-1}$ mais la différence n'est pas significative par rapport au témoin, dû à la grande variabilité individuelle (Figure 35).

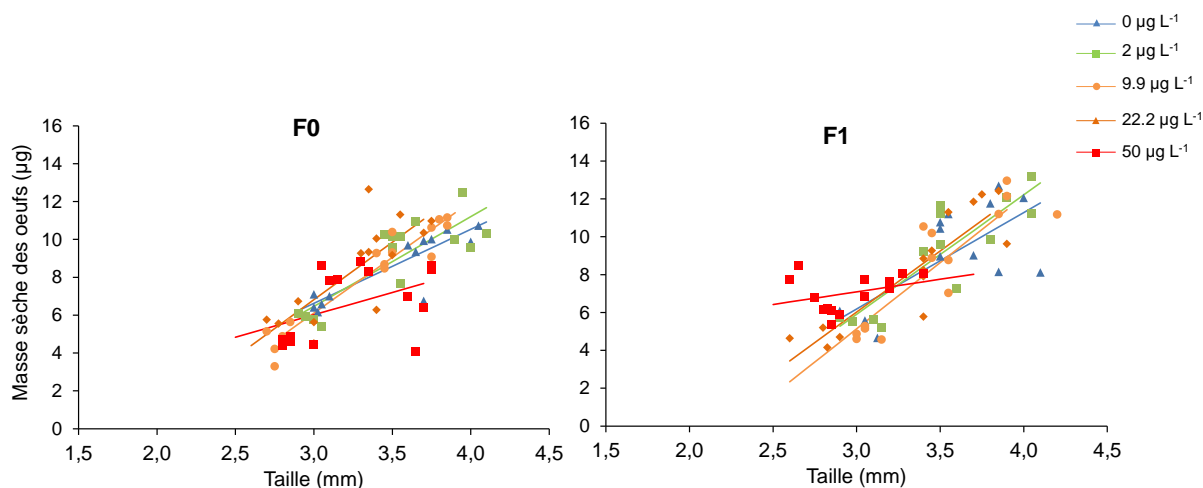


Figure 35 : Exposition post-éclosion. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche (n=5) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

2.6. Altérations de l'ADN

Des altérations significatives de l'ADN sont observées à des concentrations plus faibles en F1 qu'en F0, reflétant l'aggravation des dommages moléculaires au fil des générations, mais cette augmentation n'est pas aussi sévère que lors d'un scénario d'exposition continue.

En considérant à la fois le nombre de sites d'hybridation et les températures de fusion, avec l'amorce OPA9, les résultats indiquent des altérations significatives de l'ADN des femelles dès l'éclosion ponte 1 à 22,2 µgU.L⁻¹ dans la génération F0 (Tableau 18 et 20). Dans cette génération, l'ADN des femelles apparaît également altéré à 22,2 µgU.L⁻¹ à l'éclosion de la ponte 5 et des dommages sont présents chez les néonates issus de cette ponte constituant la génération F1. Dans la génération F1, les dommages à l'ADN s'aggravent avec des effets significatifs dès 9,9 µgU.L⁻¹ à l'éclosion de la ponte 1 et dès 2 µgU.L⁻¹ chez les néonates qui en sont issus.

Tableau 18 : Exposition post-éclosion. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne ± Erreur-standard (multipliée par 10⁻² pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P	F0		F1		F1		F1		
0 µg.L ⁻¹		(15,45 ± 2,93)	(18,68 ± 6,04)	(4,02 ± 1,12)	(1,45 ± 0,38)					
2 µg.L ⁻¹		(17,86 ± 3,87)	(6,74 ± 0,92)	(19,40 ± 4,96)	(2,98 ± 0,69)					
9,9 µg.L ⁻¹		(19,53 ± 4,32)	(7,99 ± 3,76)	(0,82 ± 0,19) *	(2,56 ± 0,70)					
22,2 µg.L ⁻¹		(6,90 ± 0,61) *	(2,28 ± 1,73) *	(8,51 ± 0,96) *	(14,51 ± 2,46) *					
50 µg.L ⁻¹		(18,86 ± 6,11)	(3,93 ± 1,40) *	(3,25 ± 2,27)	(40,00 ± 4,50)					
Néonates	F0	F1		F2		F2		F2		
0 µg.L ⁻¹	(23,84 ± 9,63)	(18,70 ± 4,31)	(6,74 ± 0,92)	(8,06 ± 4,72)	(0,82 ± 0,42)					
2 µg.L ⁻¹		(8,17 ± 1,00)	(34,42 ± 14,76)	(0,29 ± 0,09) *	(3,30 ± 0,75) *					
9,9 µg.L ⁻¹		(4,88 ± 1,97)	(7,34 ± 3,07)	(1,11 ± 0,77)	(3,65 ± 1,76)					
22,2 µg.L ⁻¹		(2,96 ± 1,29)	(2,49 ± 1,13) *	(3,86 ± 1,05)	(13,76 ± 2,69) *					
50 µg.L ⁻¹		(2,97 ± 1,37)	(1,71 ± 0,49) *	(1,42 ± 0,65)	(0,16 ± 0,03)					

Les résultats obtenus avec l'amorce OPB10 suivent la même tendance qu'avec OPA9. En effet les dommages induits par l'uranium sur l'ADN des daphnies augmentent au cours des générations. Cependant, cette amorce révèle un effet significatif seulement à partir de l'éclosion des néonates de la génération F1 (Tableau 19 et 21).

Tableau 19 : Exposition post-éclosion. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P		F0		F1		F1		F1	
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(9,78 \pm 2,30)	(6,28 \pm 1,93)	(1,60 \pm 0,58)	(0,89 \pm 0,63)				
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(11,68 \pm 4,05)	(4,17 \pm 1,55)	(4,86 \pm 2,34)	(1,41 \pm 0,21)				
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(10,03 \pm 2,43)	(3,19 \pm 0,62)	(1,40 \pm 0,41)	(5,27 \pm 1,67) *				
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(6,54 \pm 1,10)	(4,70 \pm 1,72)	(8,25 \pm 2,64) *	(7,99 \pm 2,06) *				
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(9,05 \pm 2,08)	(2,20 \pm 0,49)	(3,02 \pm 1,02)	(0,12 \pm 0,06)				
Néonates	F0		F1		F1		F2		F2	
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(5,07 \pm 1,05)	(8,21 \pm 2,31)	(3,52 \pm 0,73)	(1,37 \pm 0,27)	(0,59 \pm 0,16)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(8,17 \pm 1,00)	(3,41 \pm 0,63)	(0,26 \pm 0,08) *	(5,19 \pm 3,08) *				
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(3,28 \pm 1,07)	(1,03 \pm 0,41) *	(1,25 \pm 0,90)	(3,56 \pm 0,68) *				
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(2,05 \pm 0,12)	(0,81 \pm 0,12) *	(2,90 \pm 0,38)	(3,79 \pm 0,89) *				
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$			(2,91 \pm 1,24)	(1,52 \pm 0,30)	(0,18 \pm 0)	(0,16 \pm 0,03) *				

Tableau 20 : Exposition post-éclosion. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n = 4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience

		B5					B1					B5					B1					B5							
Adultes		P					F0					F1																	
Intervalles de températures (°C)	[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹								
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2
I1: [74-78[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	0	0	0	0				
I2: [78-80[0,25	1	1	1	0,75	0,25	0	0,75	0,5	0,75	0,5	0,5	0,5	1	0	0,75	0	0	0	0				
I3: [80-81[0	0	0	0	0,5	0	0	0	0,75	0,25	0,25	0,25	0	0,25	1	0	0	1*	0	0,25				
I4: [81-82[0,5	0	0	1	0,25	1	1	1	0	0,75	0,75	0,25	1	0,25	0	1	1	0*	0*	0,25				
I5: [82-83[0	0,75	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0,5	0	0,25	0	0	0	0	0	0				
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
I7: [84-85[0	0	0	0	0,25	0,5	0,25	1	0,5	1	1	1	1	0,5	1	1	1	0,75	0*	0*				
I8: [85-86[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75				
I9: [86-87[1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,75	1	1	0*	1	1	1	1	0,75	1	0*				
I10: [87-88[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0	1*	0	0	0	0	0,25	0	0,25				
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Néonates		F0					F1					F2																	
Intervalles de températures (°C)	[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹													
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2
I1: [74-78[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,25	0,5	0	0	0	0	0				
I2: [78-80[0	0,75	0,5	1*	0,25	0	0,75	0,75	1*	0,75	0,75	0	0,25	0,25	0	0	0	0,25	0	0				
I3: [80-81[0	0,25	0,5	0	0,75	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0	1*	0	0	0	0,25	0				
I4: [81-82[1	0,25	0,5	1	0*	1	1	1	0,75	1	1	0,5	1	0*	0*	1	1	0,25	0*	1				
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25				
I7: [84-85[0	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	1	0,25	1	0,75	0,25	1	1	0,67	0,25	0*	0,75				
I8: [85-86[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0				
I9: [86-87[1	1	1	1	0,75	1	1	1	0,5	0	0,5	0	0	1	1	0,25	0,67	0,5	1	0				
I10: [87-88[0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1	0,5	1	1	0	0	0,75	0,33	0,25	0	1				
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				

Tableau 21 : Exposition post-éclosion. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience. Zone grisée : analyses RAPD non réalisées car les parents P de F0 ne sont pas exposés au début de l'expérience

		B5					B1					B5					B1					B5									
Adultes		P					F0					F1					F1														
Intervalles de températures (°C)	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$															
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50						
I1: [74-78[0,75	0	0,75	1	0,75	1	1	1	0,5	0,75	1	0,75	1	0,75	1	1	0,5	0,75	1	0	0	0				
I2: [78-80[0	1*	0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0,25	0	0	0,5	0,25	0	0	0	0,5	0,25	0	1	0,5	0,5	0,5	
I3: [80-81[0	0	0,75	0,25	0	0	0,25	0	0,25	0	0,5	0,25	0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0	0	0,5	0	0	
I4: [81-82[0,5	0,25	0	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0	1	0,5	0,25	1	1	1	1	1	0*	0*	0,25	0,25	0	0	0,5	0	0,25
I5: [82-83[0	0,75	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0,75
I8: [85-86[0,25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0*	0*	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
I9: [86-87[0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I10: [87-88[1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Néonates		F0					F1					F2																			
Intervalles de températures (°C)	[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$															
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50						
I1: [74-78[0						0,25	0,25	0,75	1	0,75	1	1	0,5	0,5	1	0,75	0,75	0,75	0,25	1	1	0,3333	0*	0*	0*					
I2: [78-80[1						0,25	0,25	0	0	0	0,25	0	0,5	0,5	0	0,25	0,25	0,25	0,5	0	0	0,3333	0,5	0,75	1	0	0,3333	0,5	0,75	1
I3: [80-81[0,5						0	0,5	0,25	0,25	0	0	0	0,5	0,75	0	0,25	0	0,25	0	0	0	0,6667	0	0,75	0	0	0,6667	0	0,75	0
I4: [81-82[0,5						0,5	0,25	1	1	0,5	0,75	1	0,5	0,25	1	0,25	1	0,75	1	1	1	0*	0*	0*	1	0	0*	0*	0*	1
I5: [82-83[0						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I6: [83-84[0						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0						0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	1*	0	0
I8: [85-86[0						1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	0,75	1	0,75	1	1	0,75	1	0	0	0	0,75	1	0	0	1
I9: [86-87[0						0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I10: [87-88[1						1	1	1	0,75	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1
I11: [88-89[0						0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I12: [89-92[0						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3. Exposition pendant le stade embryonnaire de daphnies à l'uranium appauvri

3.1. Bioaccumulation de l'uranium dans les daphnies et les œufs

Les néonates fraîchement éclos présentent une quantité d'uranium plus importante dans la génération F1 (par exemple $66,09 \pm 20,03 \text{ ng.mg}^{-1}$ à $50 \mu\text{g.U.L}^{-1}$) que dans la génération F0 ($4,05 \pm 1,08 \text{ ng.mg}^{-1}$ à la même concentration). Dans ce scénario d'exposition, les concentrations en uranium diminuent fortement après le retour des daphnies en milieu non contaminé ($0,95 \pm 0,50 \text{ ng.mg}^{-1}$ au moment du dépôt de la ponte 1 à $50 \mu\text{g.U.L}^{-1}$), probablement due à l'excrétion et/ou à la dilution par la croissance somatique (Figure 36).

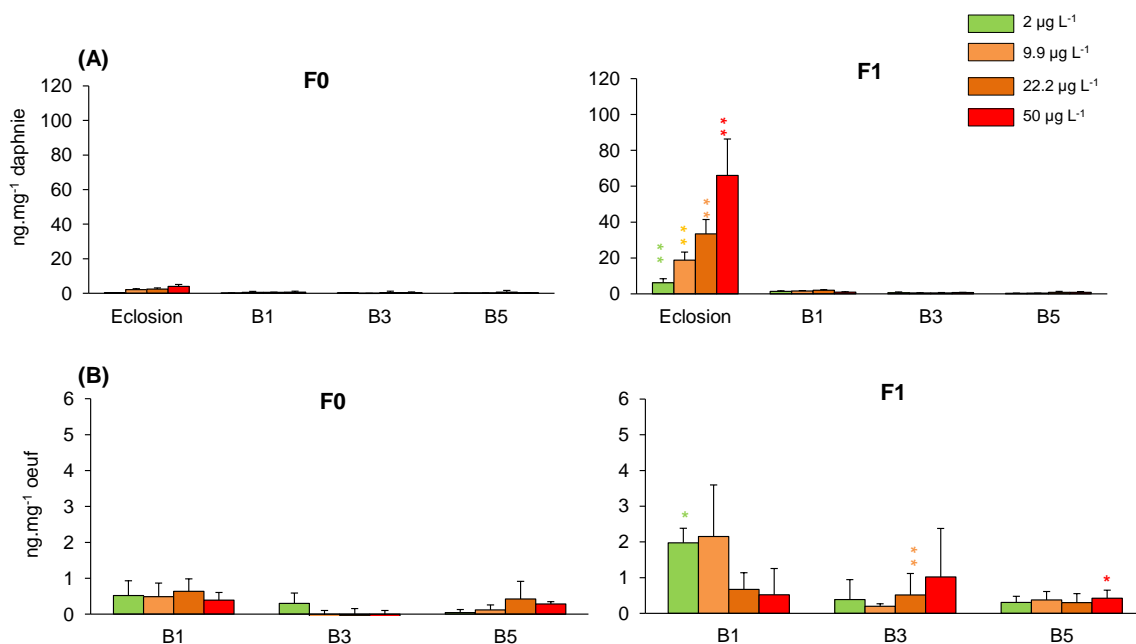


Figure 36 : Exposition embryonnaire. Bioaccumulation de l'uranium (ng.mg^{-1} de masse sèche) dans les daphnies (A) et les œufs (B) à l'éclosion et aux pontes 1, 3 et 5 (B1, B3 et B5) et à différentes concentrations d'uranium dans 2 générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type, $n=5$. Statistiques: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, différences entre les générations F0 et F1 à une même concentration et à un même temps d'échantillonnage.**

Le transfert d'uranium aux œufs fraîchement déposés dans la poche incubatrice est très faible et la bioaccumulation ne diffère pas entre les concentrations d'exposition (en dessous de $2,0 \pm 0,4 \text{ ng.mg}^{-1}$ indépendamment de la concentration) (Figure 36).

3.2. Survie

Une mortalité de 10% après 22 jours est observée dans la génération F0 dans toutes les conditions. Il faut tout de même noter la forte variabilité des données associées à cette observation (Figure 37).

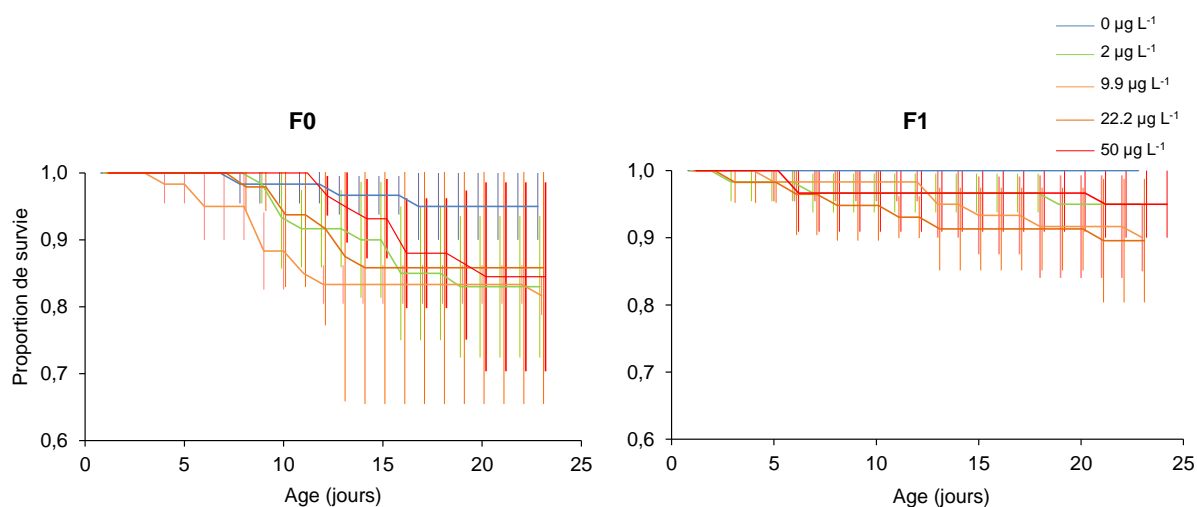


Figure 37: Exposition embryonnaire. Proportion de survie des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1).

3.3. Croissance somatique en taille

Les effets sur la taille n'augmentent pas au cours des générations. Les individus exposés présentent une réduction significative de la taille de 5, 5 et 7% à la ponte 5, respectivement à 9,9 ; 22,2 et 50 $\mu\text{gU.L}^{-1}$, à la fois dans F0 et F1 (Figure 38). Ces effets sont associés à une réduction de la taille maximale (L_m) dans la génération F0 et du taux de croissance de Von Bertalanffy (r_B) dans la génération F1 (Tableau 22).

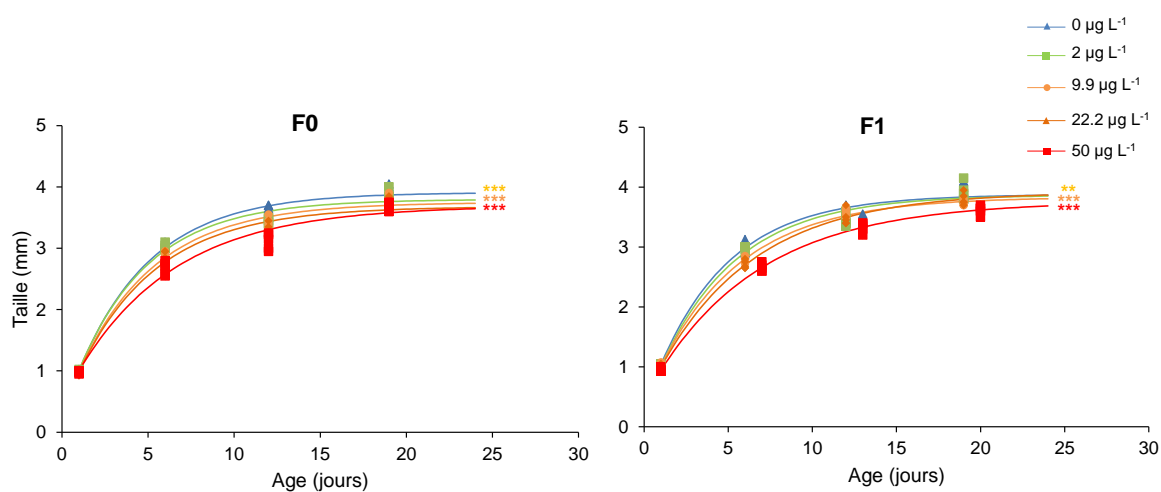


Figure 38 : Exposition embryonnaire. Taille (mm) des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la taille (n=5) et les lignes aux ajustements réalisés avec le modèle de Von Bertalanffy. Statistiques : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tableau 22: Exposition embryonnaire. Paramètres de taille et de masse ajustés pour des daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium dans deux générations successives (F0 et F1). Statistiques: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Génération	[U] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taille				Masse sèche des adultes		Masse sèche des œufs		
		L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (j^{-1})	p	δ ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$)	p	β ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$)	ω (μg)	p
F0	0	1,003	3,910	0,235		4,926		3,906	-5,092	
	2	1,014	3,797	0,242		4,439		4,529	-7,927	
	9,9	0,988	3,748	0,224	***	4,713		4,279	-6,120	
	22,2	0,985	3,679	0,219	***	4,148		4,320	-6,550	
	50	1,006	3,692	0,175	***	4,852		4,056	-5,420	
F1	0	1,038	3,879	0,232		4,661		5,094	-9,094	
	2	1,008	3,871	0,218		4,041		4,220	-5,863	
	9,9	1,012	3,836	0,201	**	4,407		4,985	-8,708	
	22,2	0,996	3,923	0,175	***	4,546		4,303	-6,162	
	50	0,945	3,765	0,156	***	4,774		5,691	-10,073	

3.4. Masse somatique

L'uranium appauvri n'affecte pas significativement la masse somatique des individus (Figure 39).

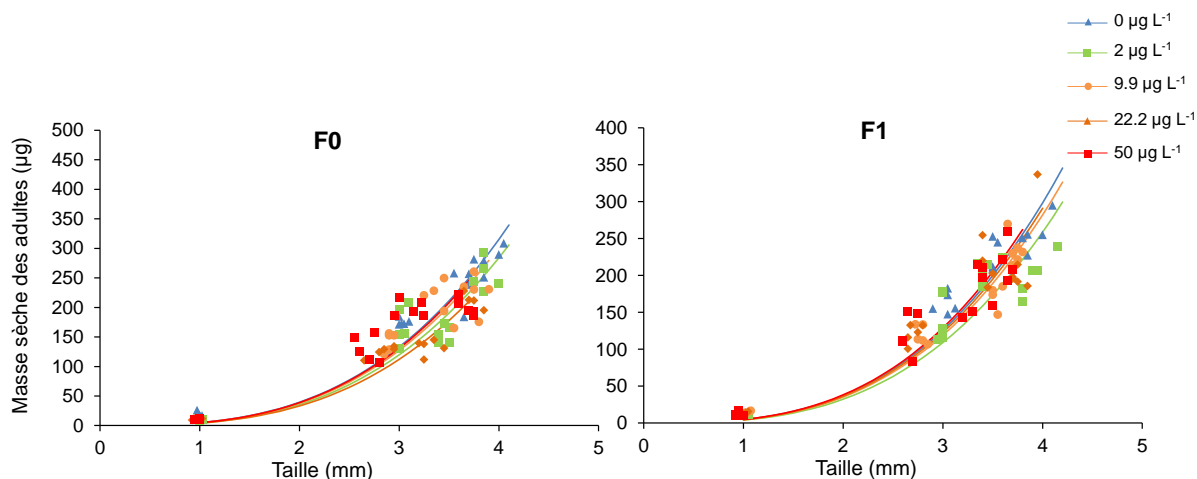


Figure 39 : Exposition embryonnaire. Masse sèche (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse ($n=5$) et les lignes aux ajustements. Statistiques : * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

3.5. Reproduction

Les effets sur la reproduction n'augmentent pas en sévérité au cours des générations. Dans la génération F0, la fécondité est significativement réduite de 40% par rapport au témoin dès l'éclosion de la ponte 1 à 22,2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$. Dans la génération F1, les effets sont significatifs dès la ponte 4 à 9,9 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ (20%) (Figure 40).

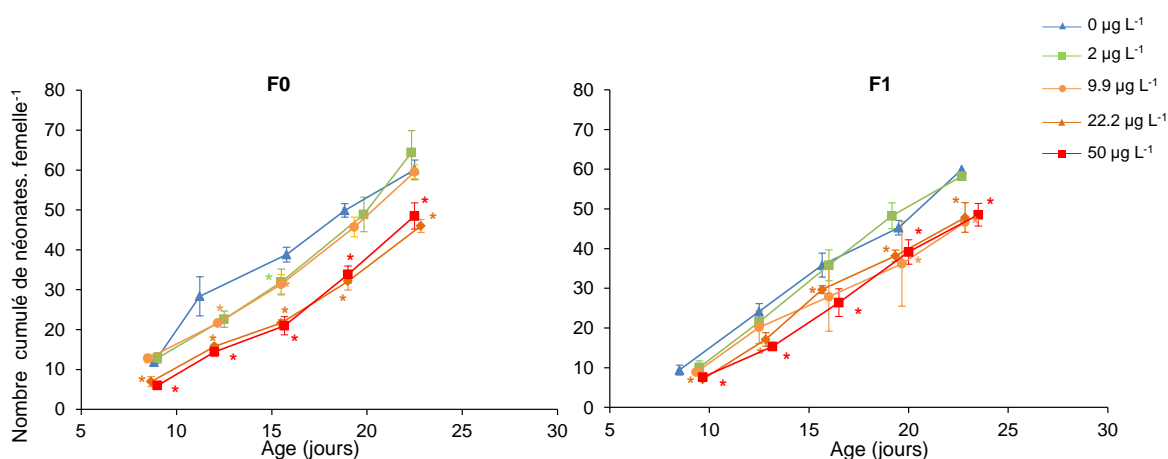


Figure 40: Exposition embryonnaire. Nombre cumulé de néonates produits par daphnie exposée à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Résultats : Moyenne \pm Ecart-type ; $n=3$. Statistiques : * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

La masse sèche des œufs n'est pas affectée dans ce scénario d'exposition (Figure 41).

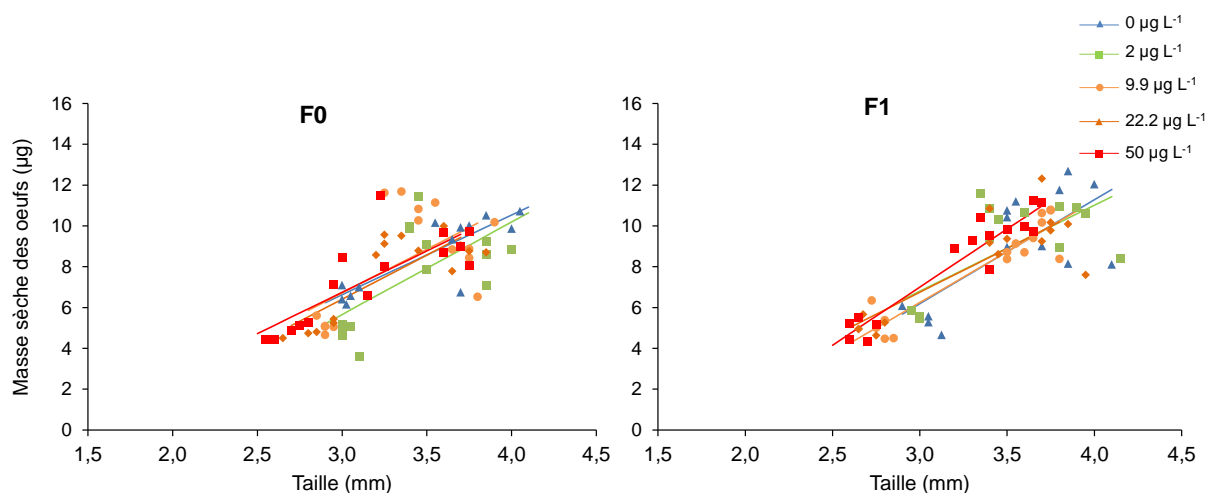


Figure 41 : Exposition embryonnaire. Masse sèche des œufs (μg) en relation avec la taille (mm) de daphnies exposées à différentes concentrations en uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1). Les points correspondent aux mesures individuelles de la masse sèche ($n=5$) et les lignes aux régressions linéaires. Statistiques : * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$.**

3.6. Altérations de l'ADN

Lorsque l'exposition est limitée au stade embryonnaire, les dommages à l'ADN diminuent au cours des générations.

L'étude parallèle du nombre de sites d'hybridation et des courbes de fusion obtenus avec l'amorce OPA9, montre des altérations de l'ADN significatives dès $2 \mu\text{gU.L}^{-1}$ à l'éclosion des néonates de F0 (Tableau 23 et 25). Chez les néonates de la génération F1, au moment de l'éclosion de la ponte 1, soit 10 jours après le retour des daphnies en milieu non contaminé, les effets sont détectés à $2 \mu\text{gU.L}^{-1}$ tandis qu'au moment de la ponte 5 les altérations sont observées à $9,9 \mu\text{gU.L}^{-1}$. Les dommages à l'ADN ne sont pas observés plus longtemps dans les adultes de la génération F1, et sont détectés dans la génération F2 seulement dans les néonates éclos à la ponte 1.

Les résultats obtenus avec l'amorce OPB10 confirment des résultats similaires (Tableau 24 et 26).

Tableau 23 : Exposition embryonnaire. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P		F0		F1					
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(23,79 \pm 6,34)	(15,45 \pm 2,93)	(18,68 \pm 6,04)	(4,02 \pm 1,12)	(1,45 \pm 0,38)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,14 \pm 0,04) *	(70,80 \pm 26,25)	(4,24 \pm 0,41) *	(8,42 \pm 2,05)	(0,48 \pm 0,19) *					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,05 \pm 0,01) *	(0,15 \pm 0,08) *	(7,95 \pm 1,51)	(8,04 \pm 2,64)	(1,22 \pm 0,44)					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,10 \pm 0,05) *	(1,09 \pm 0,99) *	(7,77 \pm 2,15)	(2,18 \pm 1,27)	(3,51 \pm 1,32)					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(16,00 \pm 1,60)	(5,00 \pm 1,49) *	(0,75 \pm 0,16) *	(7,00 \pm 2,92)	(2,13 \pm 0,46)					
Néonates	F0		F1		F2					
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(23,84 \pm 9,63)	(18,70 \pm 4,31)	(6,74 \pm 0,92)	(1,37 \pm 0,27)	(0,82 \pm 0,42)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,33 \pm 0,16) *	(3,00 \pm 2,94) *	(6,18 \pm 0,77)	(0,25 \pm 0,17)	(1,60 \pm 1,15)					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,03 \pm 0,01) *	(0,05 \pm 0,01) *	(2,95 \pm 0,33) *	(0,39 \pm 0,12) *	(1,05 \pm 0,37)					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,40 \pm 3,37)	(0,67 \pm 0,27) *	(7,72 \pm 1,91)	(3,96 \pm 2,24)	(1,57 \pm 0,28)					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(63,12 \pm 15,30)	(2,93 \pm 0,53) *	(0,34 \pm 0,09) *	(0,77 \pm 0,31)	(6,44 \pm 3,82)					

Tableau 24 : Exposition embryonnaire. Nombre de sites d'hybridation après une RAPD-PCR avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Résultats : Moyenne \pm Erreur-standard (multipliée par 10^{-2} pour faciliter la lecture), n=4. Statistiques: *p<0,05. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

	B5		B1		B5		B1		B5	
Adultes	P		F0		F1					
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,20 \pm 0,21)	(9,78 \pm 2,30)	(6,28 \pm 1,93)	(1,60 \pm 0,58)	(0,89 \pm 0,63)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(0,17 \pm 0,07) *	(5,34 \pm 3,01)	(3,24 \pm 0,71)	(2,15 \pm 0,13)	(4,29 \pm 2,64)					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(10,80 \pm 3,15)	(0,01 \pm 0) *	(3,77 \pm 1,95)	(1,61 \pm 0,64)	(2,50 \pm 0,49) *					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(13,44 \pm 1,60)	(1,28 \pm 0,14) *	(2,26 \pm 0,24)	(2,12 \pm 0,65)	(3,32 \pm 1,32) *					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(7,20 \pm 0,21) *	(2,75 \pm 0,71) *	(1,91 \pm 0,48)	(1,02 \pm 0,55)	(3,66 \pm 0,96) *					
Néonates	F0		F1		F2					
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(5,07 \pm 1,05)	(8,21 \pm 2,31)	(3,52 \pm 0,73)	(1,37 \pm 0,27)	(0,59 \pm 0,16)					
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(4,73 \pm 2,50)	(0,01 \pm 0,0001) *	(0,82 \pm 0,26)	(0,25 \pm 0,17)	(1,17 \pm 0,62)					
9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(3,42 \pm 0,51)	(0,27 \pm 0,20) *	(1,47 \pm 0,49)	(0,39 \pm 0,12) *	(1,49 \pm 0,16)					
22,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(10,51 \pm 0,16) *	(1,61 \pm 0,56) *	(1,63 \pm 0,17)	(3,96 \pm 2,24)	(2,84 \pm 0,64)					
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(6,18 \pm 4,11)	(2,83 \pm 1,58) *	(0,63 \pm 0,05) *	(0,77 \pm 0,31)	(4,30 \pm 0,81)					

Tableau 25 : Exposition embryonnaire. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPA9 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

		B5					B1					B5					B1					B5									
Adultes		P					F0					F1																			
Intervalles de températures (°C)		[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$									
		0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50
11: [74-78[0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,25	0	0	0
12: [78-80[0	0	0	0	0	0,25	0	0,25	0	0	0,25	0	0,5	1	0	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,25	0,75	0,25	0	0,75	0,25	0,75	0,25	0
13: [80-81[0	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0	0	0,5	0,5	1*	0,25	0,25	0	0,25	0,75	0,25	0,25	0	0	0,75	0,25	0,25	0	0	0,75
14: [81-82[1	1	0,5	0*	0*	0,5	0	1	1	0,5	1	1	0,25	0,25	0*	0,75	0,75	1	0,5	0	0,75	0,75	1	1	0,25	0,75	0,75	1	1	0,25
15: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16: [83-84[0	0	0	0	0	0	0,5	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17: [84-85[0	1*	1*	0	0	0	0	0,75	0,75	0	0,5	0	0,25	0	0,75	1	1	0,75	0,75	0,5	1	1	0,75	0,5	0,25	1	1	0,75	0,5	0,25
18: [85-86[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0,25	0	0
19: [86-87[1	0*	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	0,25	1	1	1	1	0,25	0,75	1	1	1	0,25	0,75
110: [87-88[0	1*	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	0	0	0,75	0,25	0	0	0	0,75	0,25	0
111: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Néonates		F0					F1					F2																			
Intervalles de températures (°C)		[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g.L}^{-1}$														
		0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50					
11: [74-78[0	0	0,5	0	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12: [78-80[0	0	0,25	0	0	0	0	0,25	0	0,25	0	0,75	0,25	0,25	0,25	0,75	0,5	0,5	0,75	0	0	0,5	0	0,75	0,25	0	0,5	0	0,75	0,25
13: [80-81[0	0	0,25	0	0	0	1*	0	0	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,25
14: [81-82[1	1	0,75	0*	0*	1	0*	1	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16: [83-84[0	0	0	0	0	0	0,75	0,25	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17: [84-85[0	0,67	1*	0	0	0	0,25	0,75	1*	0	0,5	0,25	0,75	0,25	1	0,25	1	0,75	1	0,5	1	0,75	1	0,5	0,5	1	0,75	1	0,5	0,5
18: [85-86[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19: [86-87[1	0*	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0*	0,5	1	0	1	1	0,25	1	0	0,75	0	0,25	1	0	0,75	0
110: [87-88[0	1*	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0,5	0	1	0	0	0,75	0	1	0,25	1	0,75	0	1	0,25	1
111: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 26 : Exposition embryonnaire. Fréquence d'apparition des produits de PCR en relation avec leur température de fusion T_m (organisée par classes de températures) avec l'amorce OPB10 sur l'ADN génomique de daphnies exposées à différentes concentrations d'uranium au cours de deux générations successives (F0 et F1) sur des adultes et des néonates à la libération des pontes 1 et 5 (B1 et B5). Statistiques: * $p < 0,05$, $n=4$. P correspond aux parents de F0 exposés pendant la période d'incubation des œufs au début de l'expérience.

		B5					B1					B5					B1					B5				
Adultes		P					F0					F1														
Intervalles de températures (°C)	[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	
I1: [74-78[0	0,25	0,25	0,25	0,5	0,75	0,25	0,25	1	0,5	1	0,75	1	0,75	0*	1	0,75	1	0*	1	0,75	0,25	0,5	0,25	0,75	
I2: [78-80[0	0,75	0	0,25	0	0	0,5	1*	0	0	0	0,25	0	0,25	1*	0,25	0	0	1	0	0,25	1	0,25	0,75	0	
I3: [80-81[0	0	0	1*	0,25	0	0,25	0	0	0	0	0,25	0,25	0,25	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I4: [81-82[0	1*	0	0	0,25	0,5	0,5	1	0,25	0	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	0,5	1	1	1	0,5	0,75	0,75	
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I8: [85-86[0	0,75	1*	1*	1*	0,25	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I10: [87-88[1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Néonates		F0					F1					F2													
Intervalles de températures (°C)	[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹					[U] µg.L ⁻¹									
	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50	0	2	9,9	22,2	50
I1: [74-78[0	0	0	0	0,5	0,25	0,5	0,5	0,75	1	1	0,75	0,25	0*	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	1	0*	0,25	1	0,25
I2: [78-80[1	0,33	0*	0*	0,5	0,25	1	0,75	0	0	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0	0	0,25	0	0	1	0,75	0	0,75
I3: [80-81[0,5	0	0,00	0,67	0,5	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0,25	0,25	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0
I4: [81-82[0,5	0,33	0	0	0,25	0,5	1	1	0,25	0	0,75	1	0,5	0,25	1	0,25	1	0,25	1	1	1	1	1	0*	0*
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I8: [85-86[0	1*	1*	1*	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	0,75	1	1	1	0,25
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
I10: [87-88[1	1	1	1	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	1	1	0,25
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Chapitre 7 :

Résultats de modélisation

Le modèle DEBtox est utilisé pour tenter d'élucider le ou les modes d'action mis en jeu lors d'une exposition de *Daphnia magna* à l'uranium appauvri. Conformément aux hypothèses émises (Chapitre 5), deux facteurs de stress sont étudiés simultanément : celui corrélé à la concentration d'uranium externe ou interne (mode d'action 1 correspondant à la réduction de l'assimilation) et celui corrélé au niveau de dommages (mode d'action 2). Ce modèle est ajusté simultanément aux données des expériences multigénérationnelles de cette thèse (Chapitre 6) et à celles des travaux de thèse de **Massarin (2010)**.

Dans le temps imparti à la réalisation de cette thèse, les ajustements obtenus n'ont pas permis de bien décrire l'ensemble des observations. Les résultats et interprétations présentés dans ce chapitre demeurent à relativiser dans l'attente d'une paramétrisation définitive et satisfaisante du modèle.

1. Ajustement des paramètres physiologiques

Les paramètres estimés à partir des données de croissance et de reproduction issus des individus témoins de chaque expérience conduite dans ce travail de thèse (expériences 1 à 3) et dans l'étude de **Massarin (2010)** (expériences 4 à 6) sont présentés dans les Tableaux 27 et 28. Comme observé précédemment par **Massarin et al. (2011)**, les paramètres liés à la reproduction (L_p et R_m) présentent une plus grande variabilité d'une génération à l'autre que les autres paramètres, justifiant l'ajustement d'un jeu de paramètres par expérience et par génération. Cette variabilité est peut être imputable à la qualité fluctuante des apports alimentaires, difficile à contrôler expérimentalement. Celle-ci ne remet toutefois pas en cause la validité des résultats expérimentaux obtenus (critère OCDE d'au moins 60 néonates produits sur 21 jours respecté).

Tableau 27 : Paramètres témoin estimés pour chaque expérience et chaque génération à partir des données de ce travail de thèse.

Expériences	Génération	Paramètres					
		g	L _b (mm)	L _p (mm)	L _m (mm)	r _B (j ⁻¹)	R _m
Expérience 1	F0	1	0,958	0,639	4,137	0,145	82,126
	F1	1	1,014	0,535	4,290	0,155	91,511
Expérience 2	F0	1	1,002	0,614	3,890	0,208	56,420
	F1	1	1,030	0,648	3,862	0,204	45,327
Expérience 3	F0	1	1,002	0,614	3,890	0,208	56,420
	F1	1	1,030	0,648	3,862	0,204	45,327

Tableau 28 : Paramètres témoin estimés pour chaque expérience et chaque génération à partir des données issues de la thèse de Massarin (2010)

Expériences	Génération	Paramètres					
		g	L _b (mm)	L _p (mm)	L _m (mm)	r _B (j ⁻¹)	R _m
Expérience 4	F0	1	1,002	0,570	4,353	0,145	77,182
	F1	1	1,078	0,656	4,246	0,135	75,684
	F2	1	1,024	0,520	4,352	0,127	100,895
Expérience 5	F0	1	1,002	0,570	4,353	0,145	77,182
	F1'	1	1,076	0,656	4,246	0,135	75,662
Expérience 6	F0	1	1,002	0,570	4,353	0,145	77,182
	F1	1	1,078	0,656	4,246	0,135	75,684
	F2'	1	1,024	0,520	4,352	0,127	100,895

2. Comparaison des ajustements

Les hypothèses impliquant un second mode d'action direct sur la reproduction (*Modèle des Coûts* et *Modèle Hasard*) sont écartées, les résultats expérimentaux confirmant que l'aggravation des effets observée au fil des générations touche à la fois la croissance et la reproduction. Seuls les modes d'action indirects (*Modèle de Croissance*, *Modèle d'Assimilation* et *Modèle de Maintenance*) sont effectivement testés.

Les valeurs résultant des critères de moindre carré pondérés (SSQ) correspondant aux différentes hypothèses sont reportées dans le Tableau 29. La qualité des ajustements diffère entre les hypothèses selon la façon dont est décrite la reproduction tandis que la croissance est dans tous les cas bien ajustée, comme en témoigne les valeurs de SSQ plus variables pour la reproduction que pour la croissance.

Dans trois des quatre hypothèses de réversibilité considérées, les valeurs de SSQ suggèrent une augmentation des coûts de croissance et de maturation comme second mode d'action corrélé aux dommages avec le stress sur l'assimilation corrélé à la concentration externe C_e (voir les valeurs grisées dans le Tableau 29). Dans l'hypothèse où la réduction d'assimilation est considérée irréversible et les dommages réversibles, le second mode d'action pointé est une augmentation des coûts de maintenance avec un effet sur l'assimilation corrélé à la concentration interne (C_i). Cette hypothèse implique toutefois l'utilisation d'un paramètre cinétique additionnel (k_e), ce qui est contraire au principe de parcimonie, tout en délivrant une valeur de SSQ sensiblement identique à celle obtenue en corrélant l'effet à la concentration externe.

Quand l'effet sur l'assimilation est considéré réversible, le modèle tend à sous-estimer les effets observés dans la génération F0 après un retour en milieu non contaminé suite à l'exposition embryonnaire (Figure 42). Enfin, quand le second mode d'action est irréversible, le modèle décrit une augmentation du niveau de dommages entre les générations F0 et F1 suite à l'exposition embryonnaire, ce qui est contraire aux résultats des analyses ADN.

Tableau 29 : Critères des moindres carrés obtenus avec différentes hypothèses cinétiques à partir des données de ce travail de thèse et celui de Massarin (2010). C_e : concentration externe ; C_i : concentration interne.

Facteur de stress Assimilation				
		C_e		C_i
Hypothèse	SSQ_{croissance}	SSQ_{reproduction}	SSQ_{croissance}	SSQ_{reproduction}
Réduction d'assimilation et dommages réversibles				
A-C	27646	6915	27654	7013
A-A	27671	7257	27676	7634
A-M	27836	8110	27709	7082
Réduction d'assimilation réversible et dommages irréversibles				
A-C	27651	6455	27664	6900
A-A	27667	7272	27684	7245
A-M	27855	8109	27712	7688
Réduction d'assimilation irréversible et des dommages réversibles				
A-C	27646	6915	27638	7238
A-A	27671	7257	27657	7137
A-M	27836	8110	27652	6798
Réduction d'assimilation et dommages irréversibles				
A-C	27651	6455	27644	6736
A-A	27667	7272	27663	7492
A-M	27855	8109	27649	6490

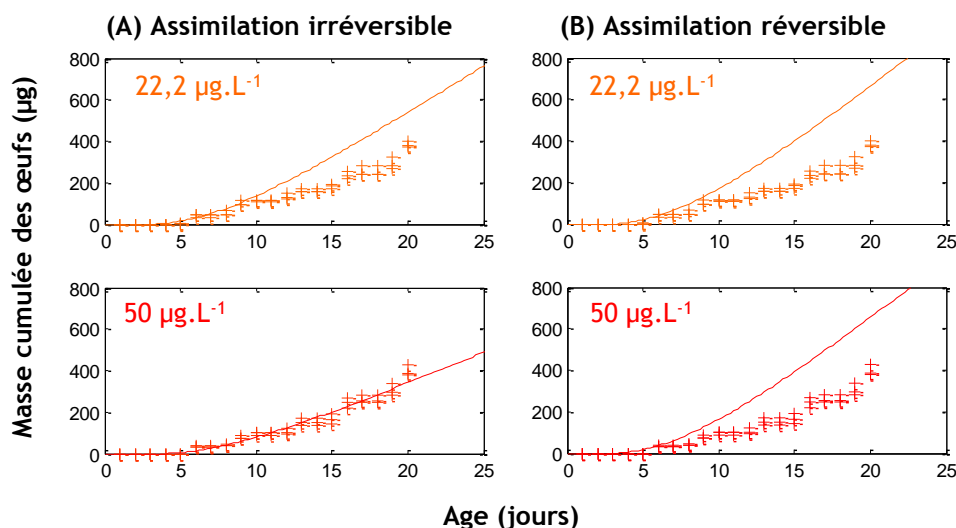


Figure 42 : Ajustement des données de masse cumulée d'œufs par femelle, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance dans la génération F0 dans le cas de dommages réversibles. Points: données observées, Ligne: prédictions du modèle

3. Courbes de croissance et de reproduction

Pour illustrer la capacité du modèle à décrire les observations effectuées dans les différentes situations d'exposition, on choisit de représenter graphiquement la croissance et la reproduction et les fonctions de stress, dans l'hypothèse la plus conforme aux observations expérimentales, à savoir :

- un niveau de dommages héréditaires d'une génération à l'autre et réversible lors d'un retour en milieu non contaminé ;
- une réduction d'assimilation corrélée à la concentration externe (par souci de parcimonie), non transmissible (car liée aux altérations du tube digestif) et irréversible pour mieux prendre en compte les effets observés après un retour en milieu non contaminé ;
- une augmentation des coûts de croissance et de maturation comme second mode d'action.

D'un point de vue graphique, le modèle décrit bien la croissance et la reproduction observées, à l'exception 1) de la concentration la plus forte ($75 \mu\text{g.U.L}^{-1}$) où l'effet est surestimé dans la génération F0 et sous-estimé dans la génération F1, quels que soient les scénarios d'exposition et les générations considérés (Figures 46 à 48) et 2) de la concentration de $25 \mu\text{g.U.L}^{-1}$ où l'effet est sous-estimé dans la génération F2. On note aussi une légère surestimation de la reproduction dans la génération F0 aux faibles concentrations des expériences 1 à 3 (Figures 43, 44 et 45), ce qui est imputable à la qualité de l'ajustement des paramètres physiologiques (voir condition témoin).

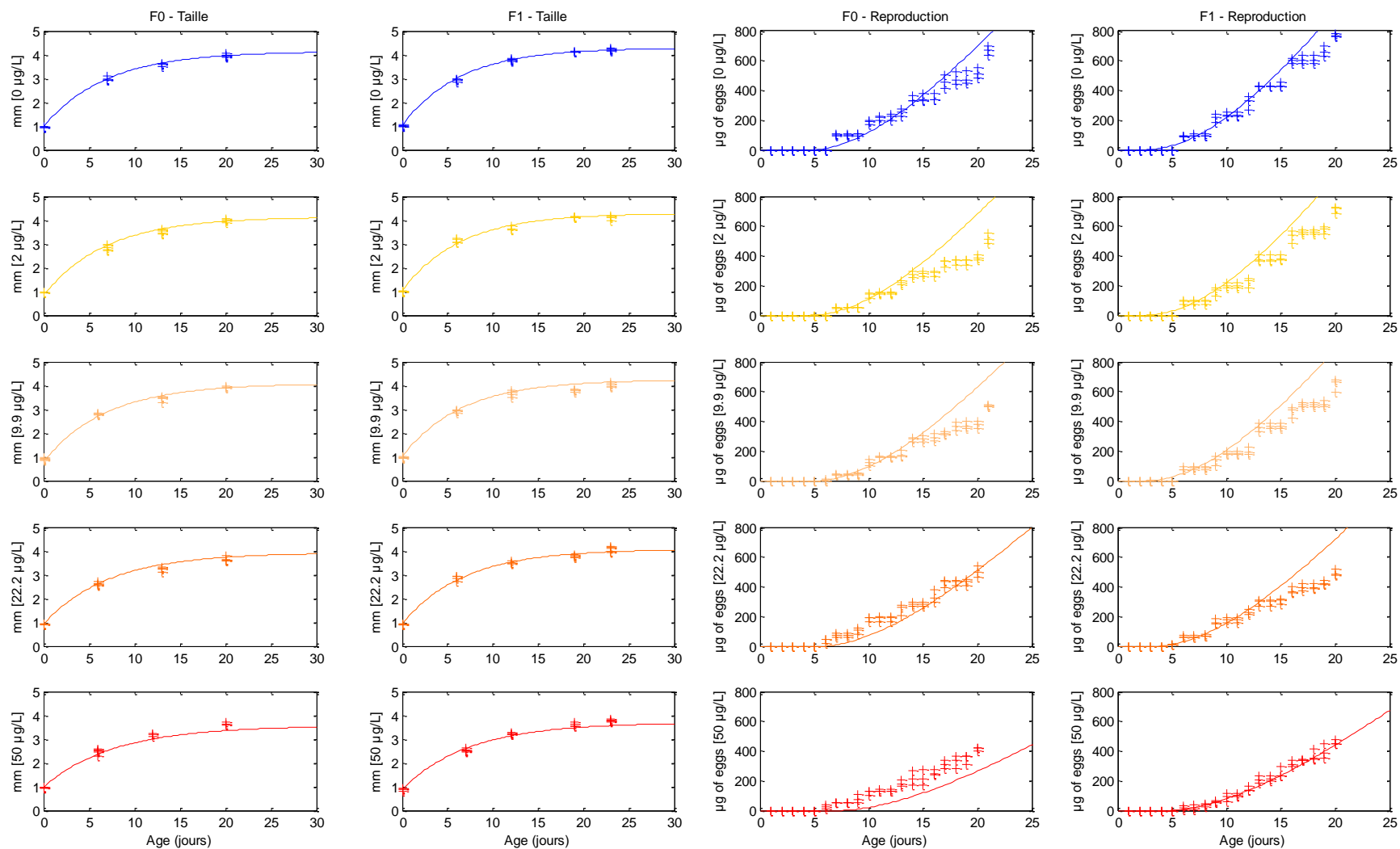


Figure 43 : Exposition continue. Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points: données observées, Ligne: prédictions du modèle

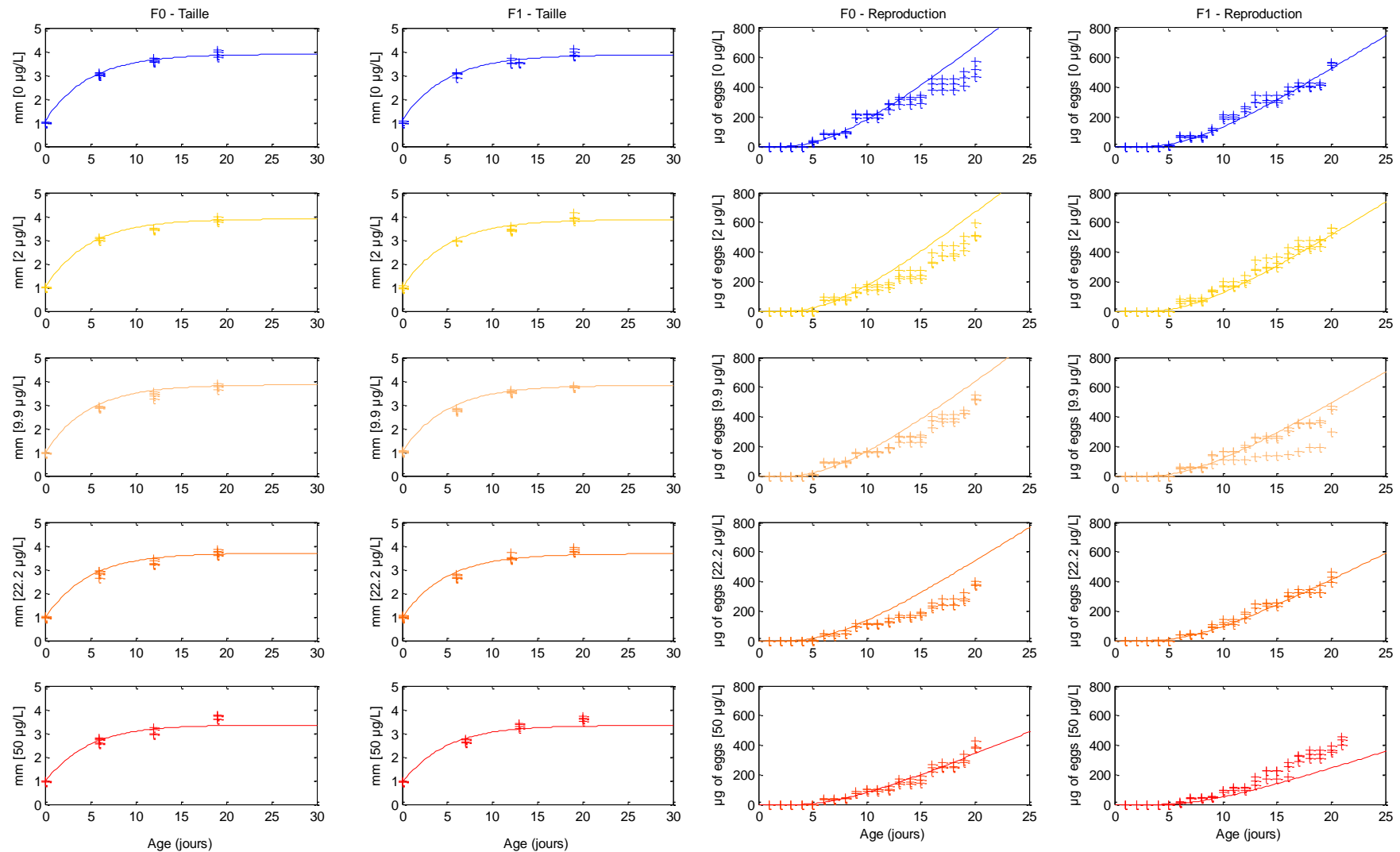


Figure 44 : Exposition embryonnaire. Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle

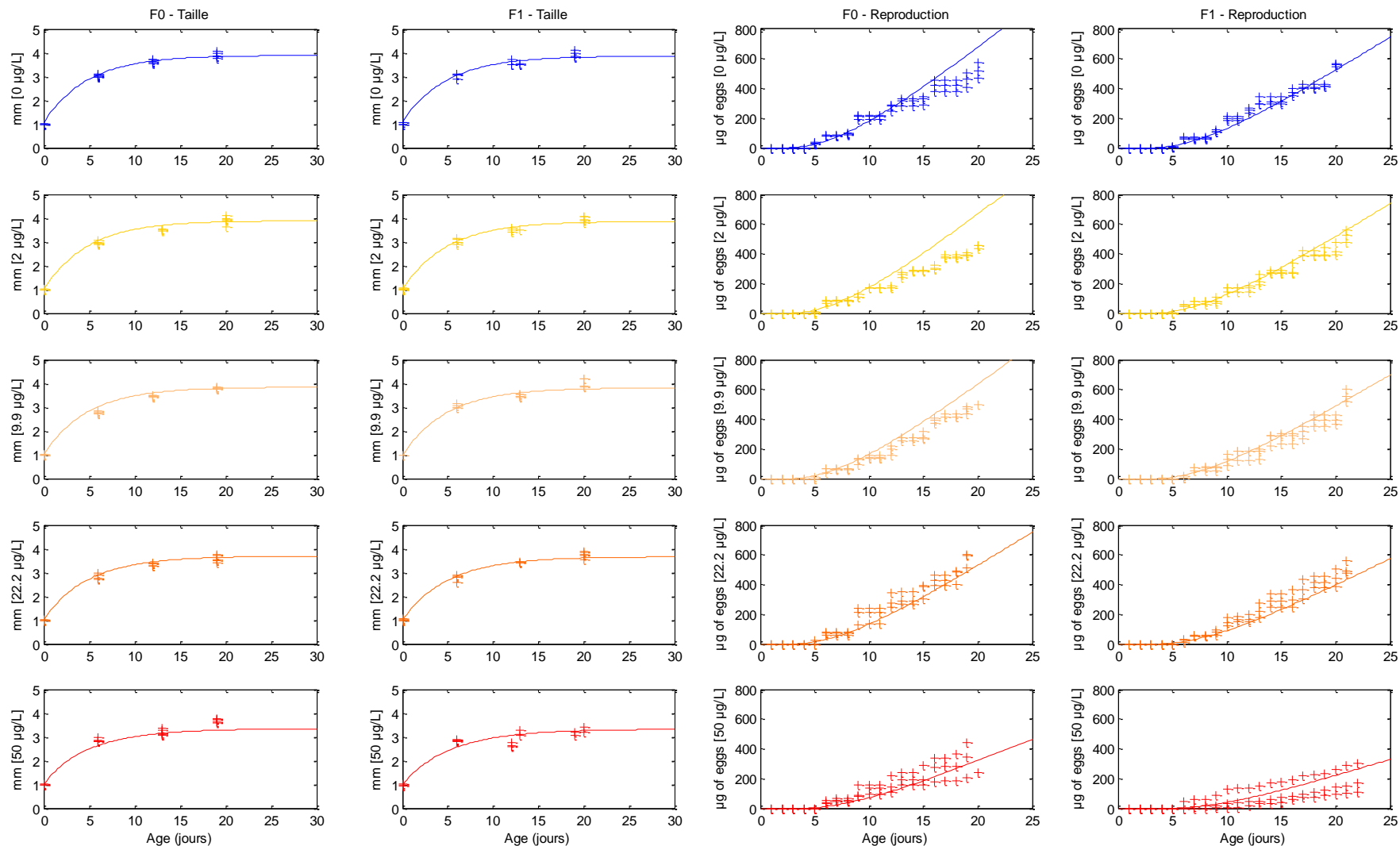


Figure 45 : Exposition post-éclosion. Ajustement des données de taille et masse cumulée d’œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l’uranium chez *Daphnia magna* sur l’assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle

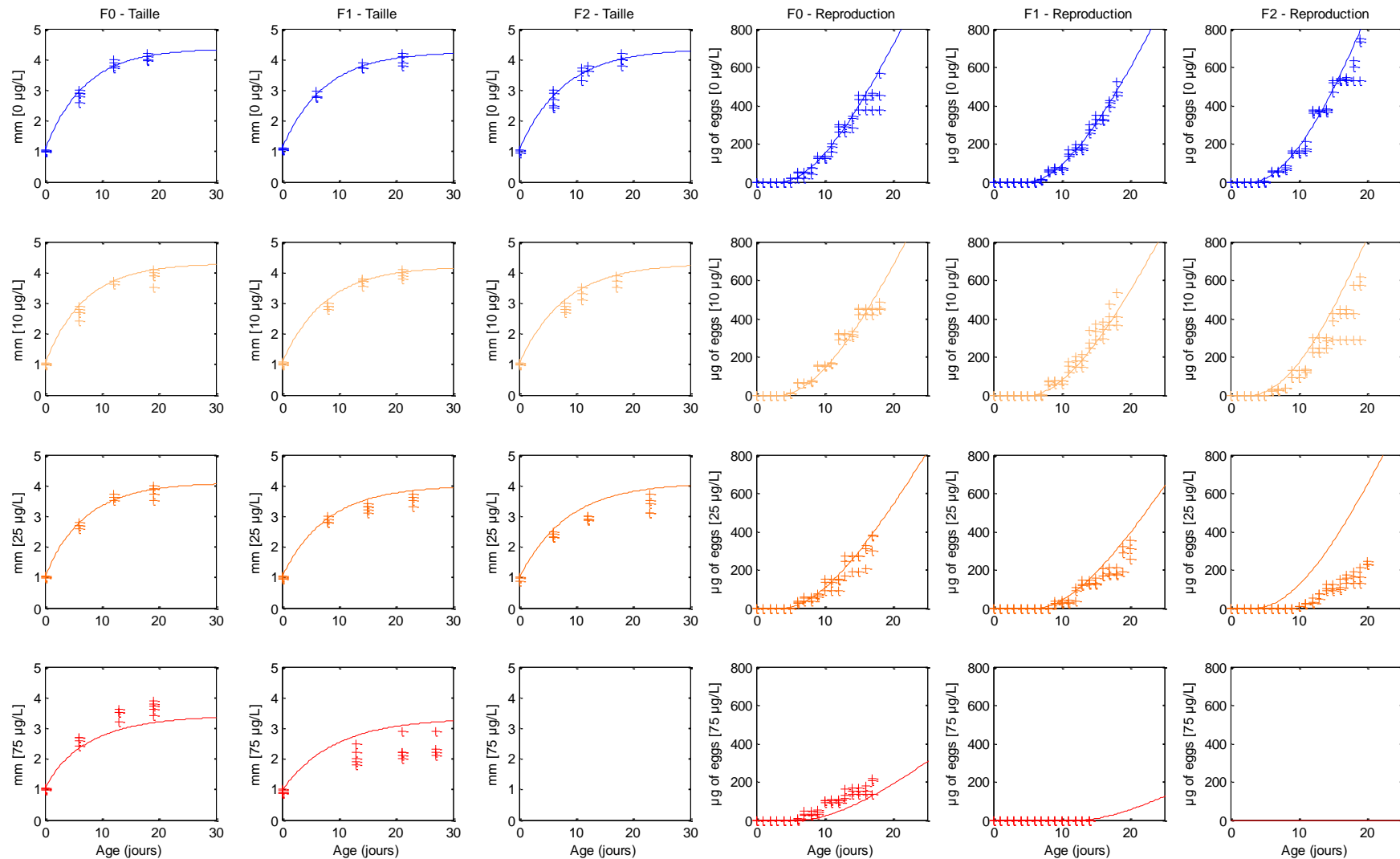


Figure 46 : Exposition continue pendant 3 générations successives (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle

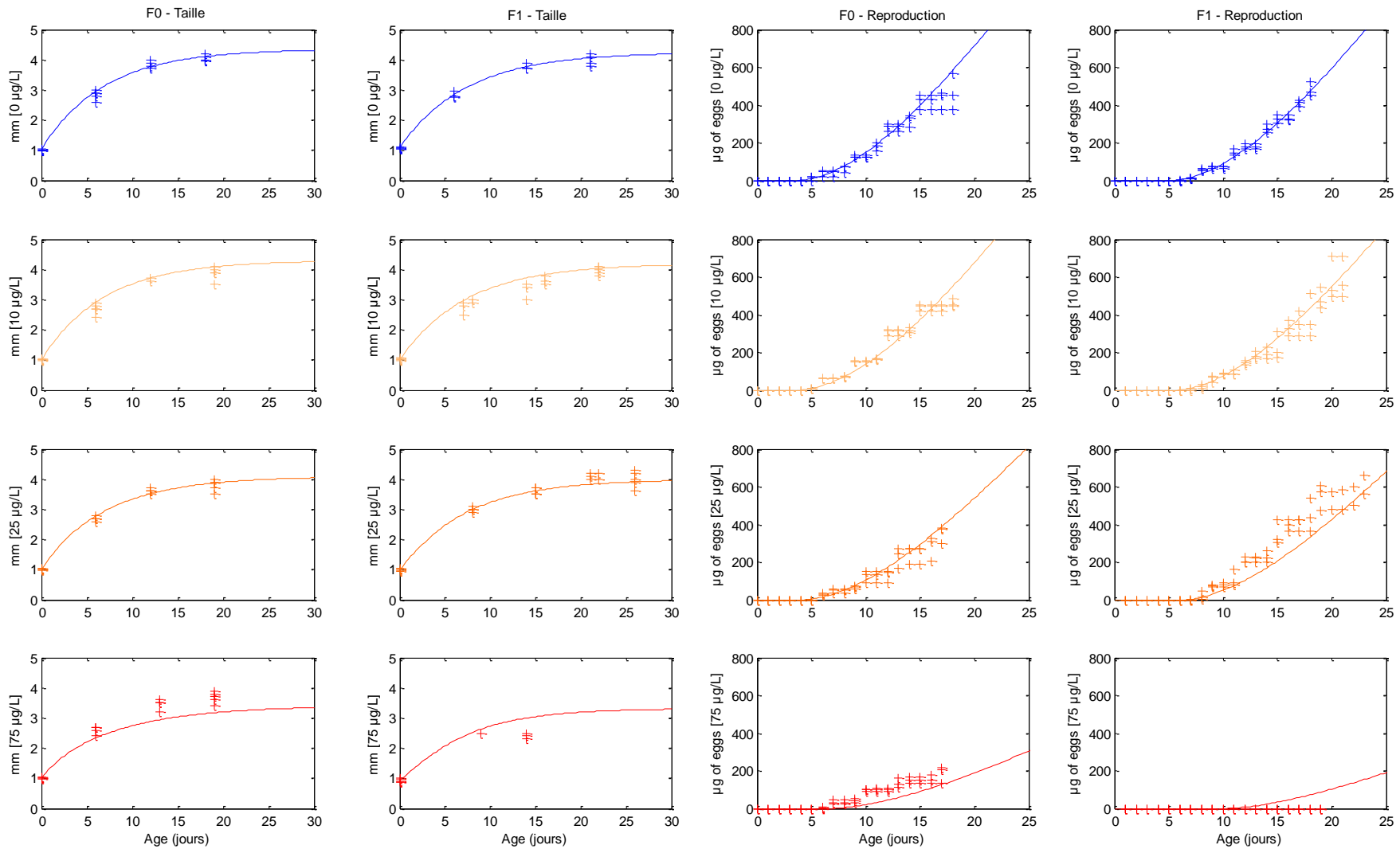


Figure 47 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F1 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle

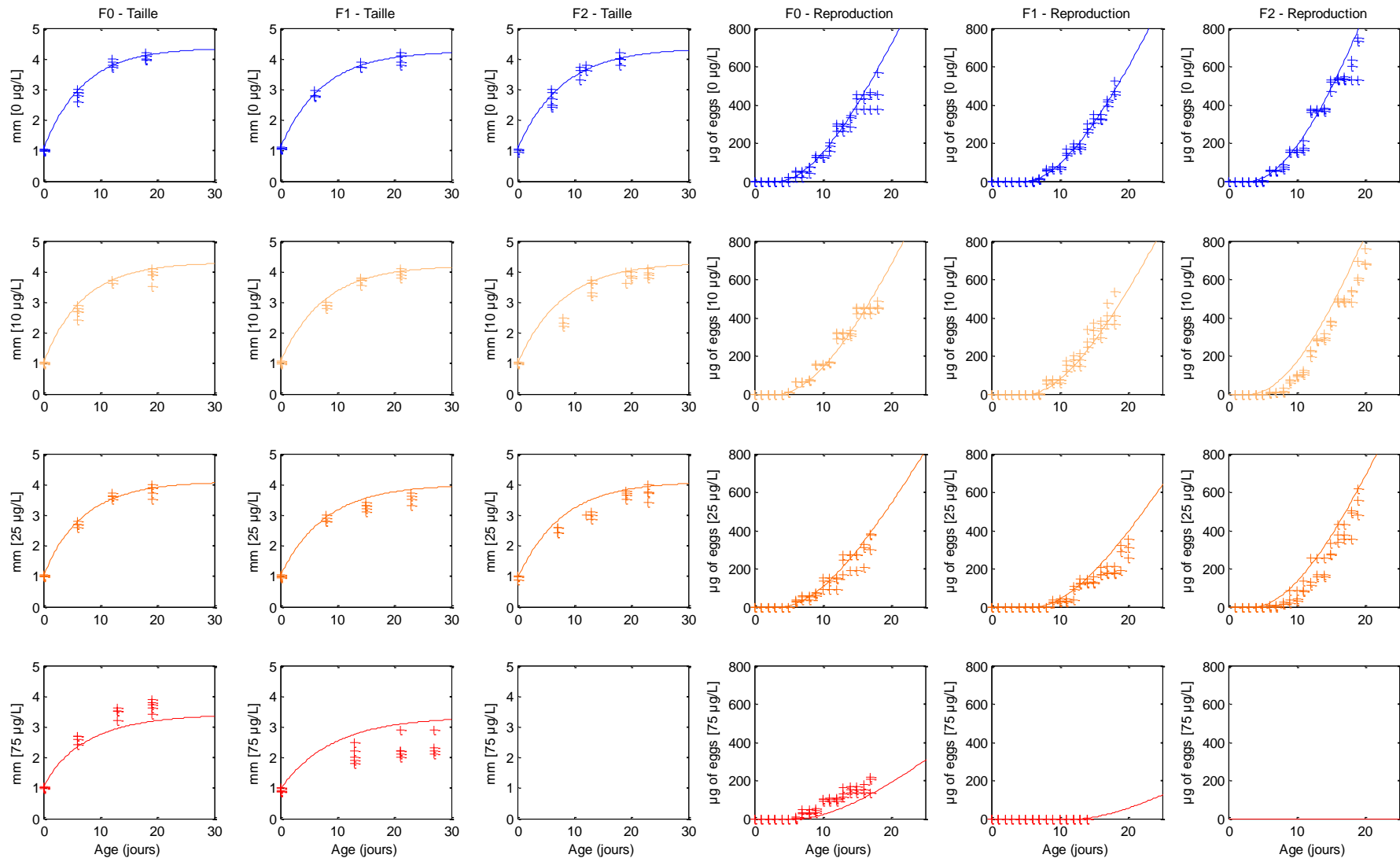


Figure 48 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F2 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Ajustement des données de taille et masse cumulée d'œufs par femelles, respectivement avec les modèles de croissance et de reproduction, avec des effets de l'uranium chez *Daphnia magna* sur l'assimilation et les coûts de croissance. Points : données observées, Ligne : prédictions du modèle

4. Facteurs de stress

Les cinétiques des facteurs de stress associés à l'assimilation et aux coûts de croissance (concentration en uranium et niveau de dommages) sont représentées dans les Figures 49 à 54.

Dans tous les scénarios d'exposition, la fonction de stress correspondant à la réduction d'assimilation reflète une atteinte immédiate de l'intensité maximale du stress dès le début de la contamination. L'hypothèse d'irréversibilité induit un stress maintenu malgré les retours en milieu non contaminé. Aucune différence n'est suggérée pour la réduction d'assimilation entre les générations.

La cinétique associée au second mode d'action indique une apparition progressive des dommages qui atteignent un niveau maximal approximativement au 10^{ème} jour d'exposition de la génération F0. Dès lors, le stress transmis à la génération suivante est à sa valeur maximale et y demeure lors des expositions continues (Figures 49 et 52). La seule différence entre les générations F0 et F1 réside dans le stress moins important subi durant les premiers jours de F0. Cette différence est suffisante pour expliquer l'aggravation des effets au cours des deux générations. Cependant, le modèle ainsi paramétré ne prédit aucune différence d'intensité du stress entre F1 et F2, avec comme conséquence la sous-estimation des effets observés dans la génération F2 (Figure 54). La réversibilité du dommage aboutit à un niveau d'effet identique entre F0 et F1 suite aux expositions embryonnaires (Figure 50) et à un niveau de dommages nul après quelques jours dans le milieu non contaminé, en accord avec les observations expérimentales (Figures 50, 53 et 54).

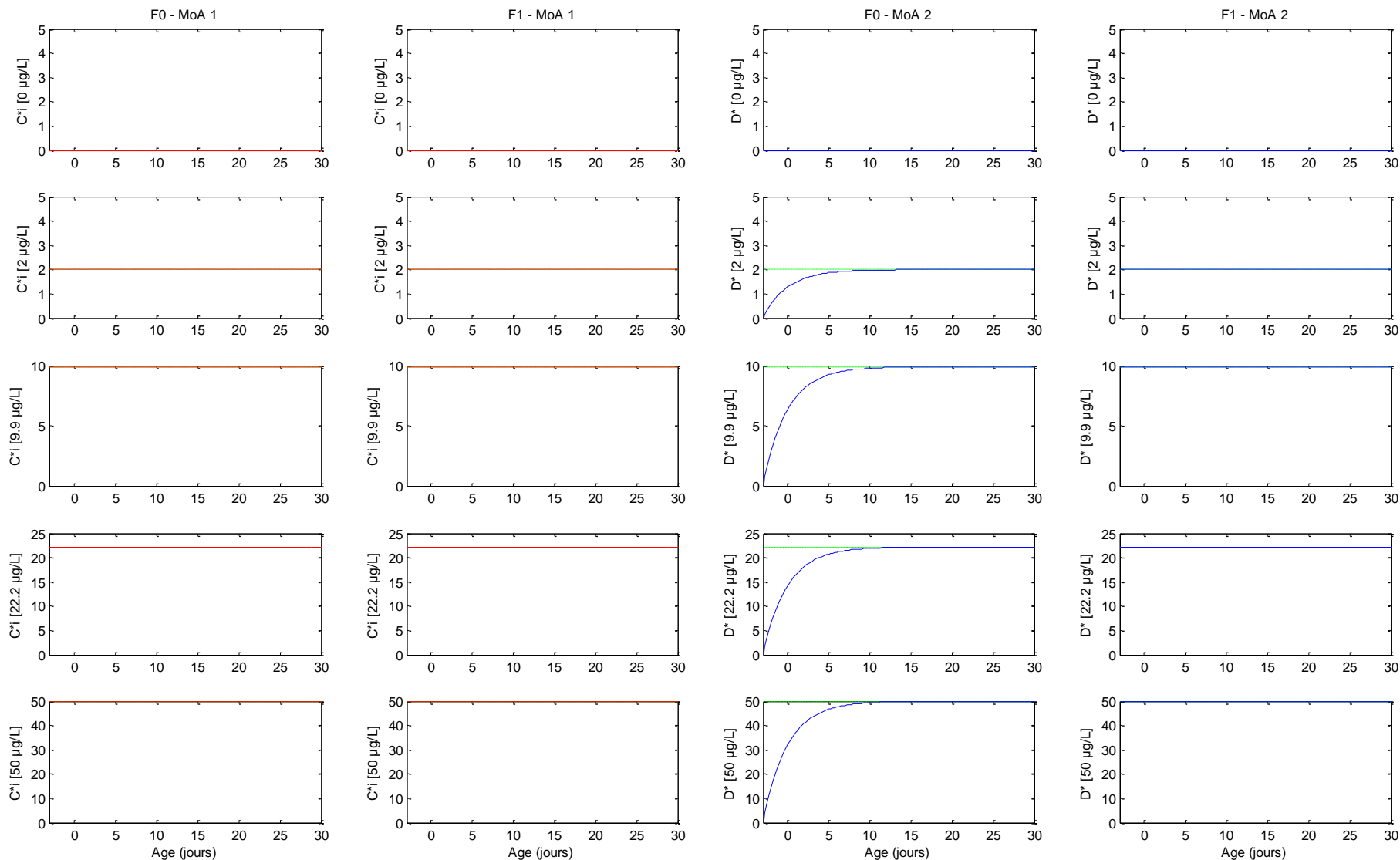


Figure 49 : Exposition continue. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

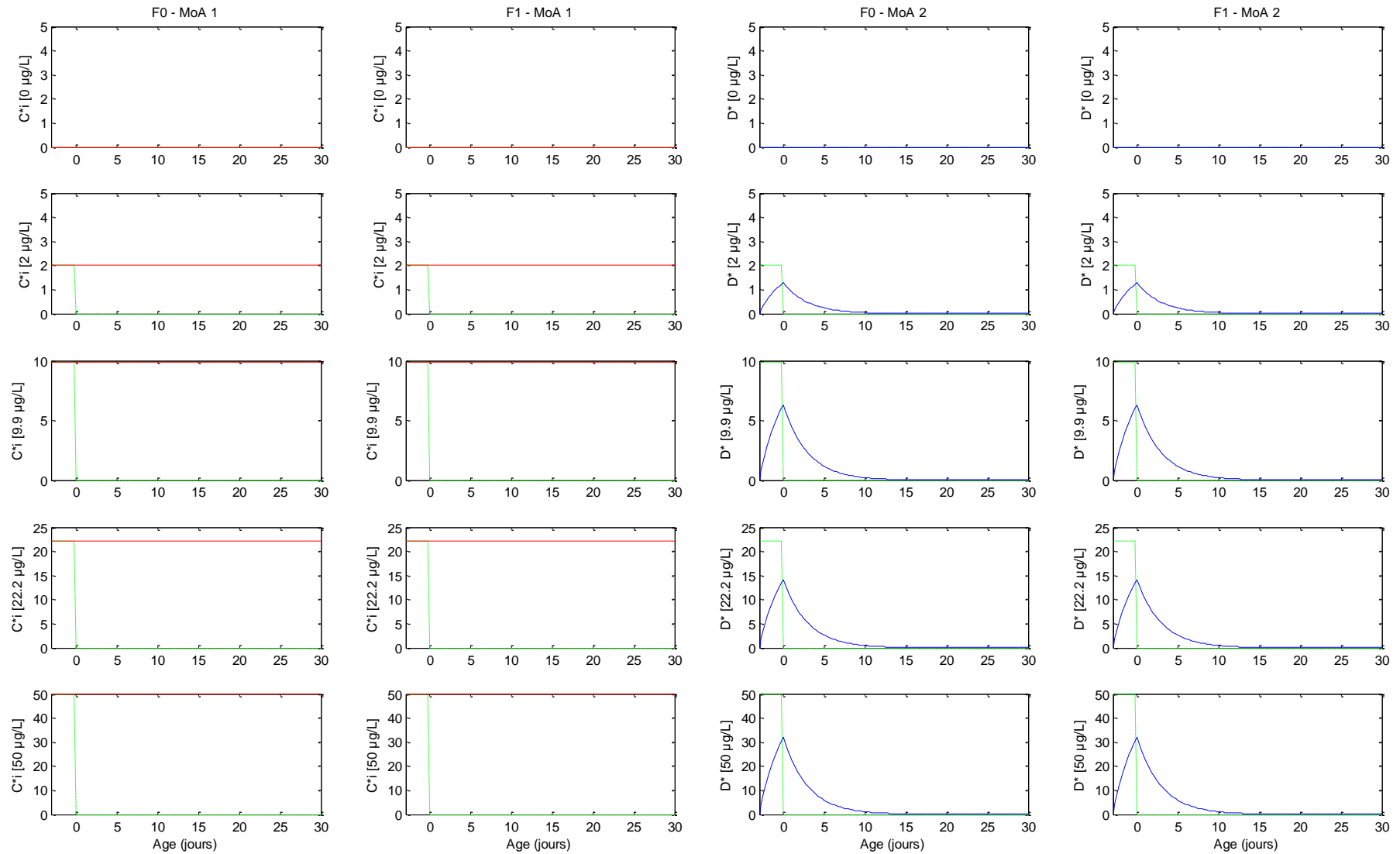


Figure 50: Exposition embryonnaire. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

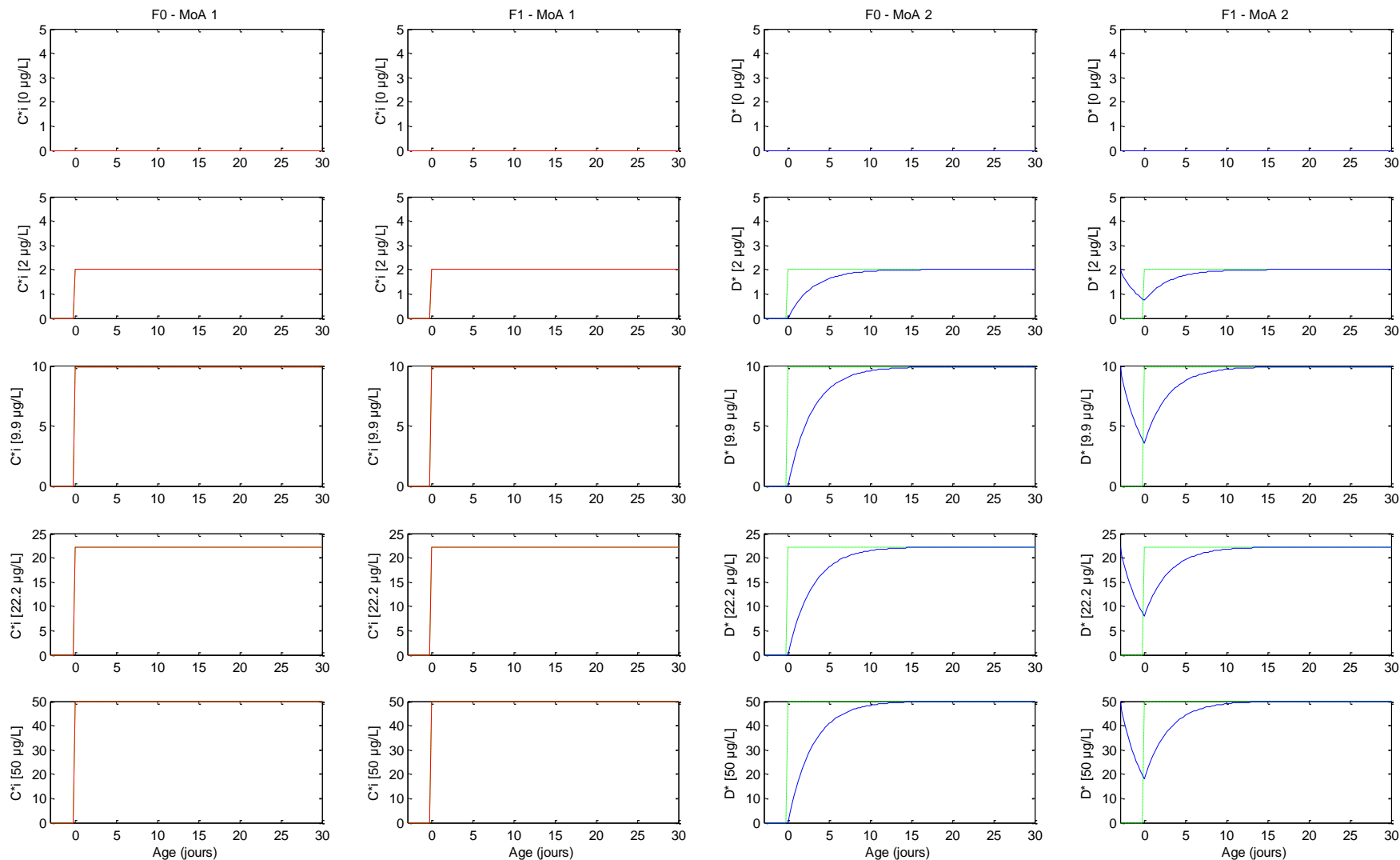


Figure 51 : Exposition post-éclosion. Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

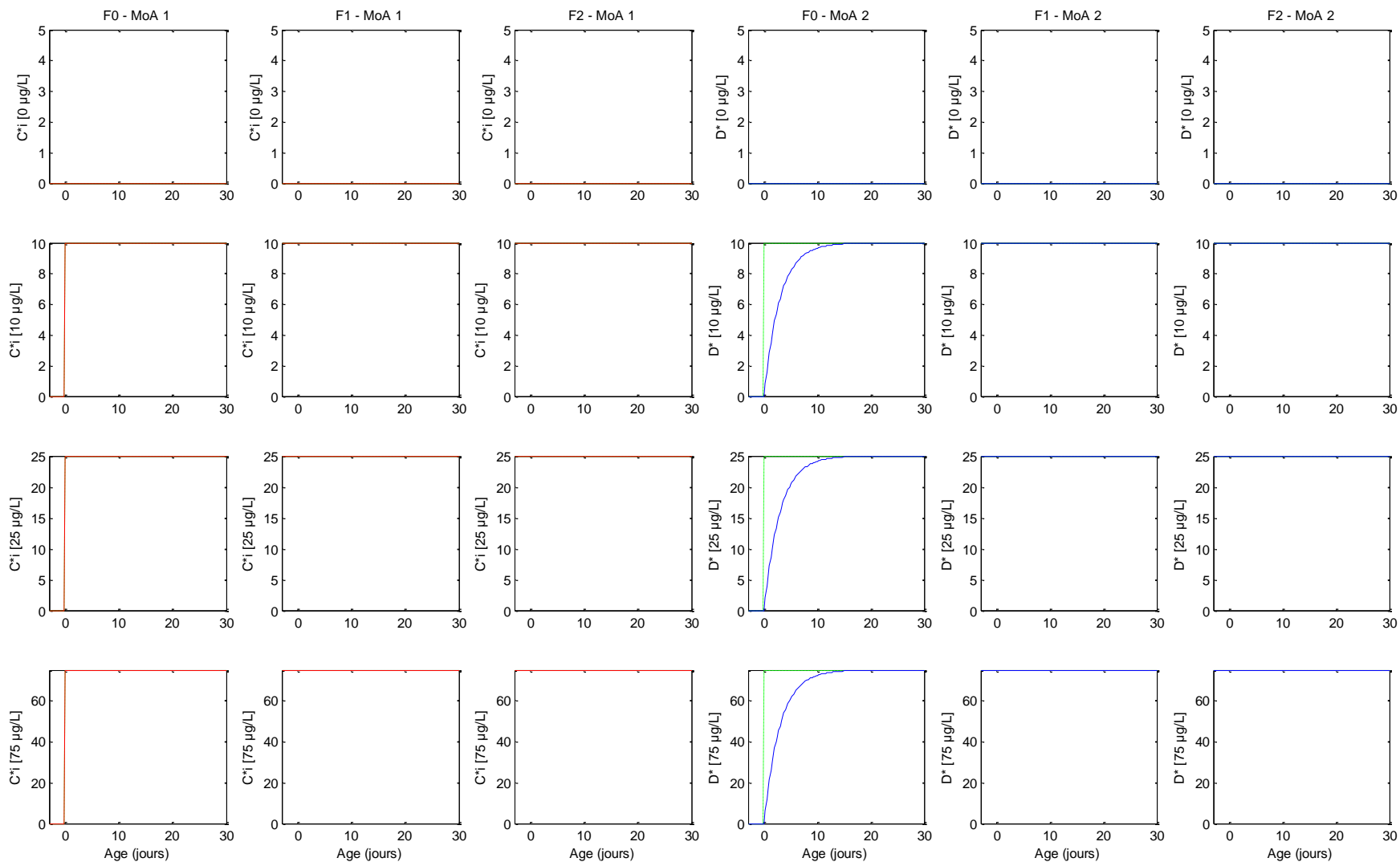


Figure 52 : Exposition continue pendant 3 générations (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

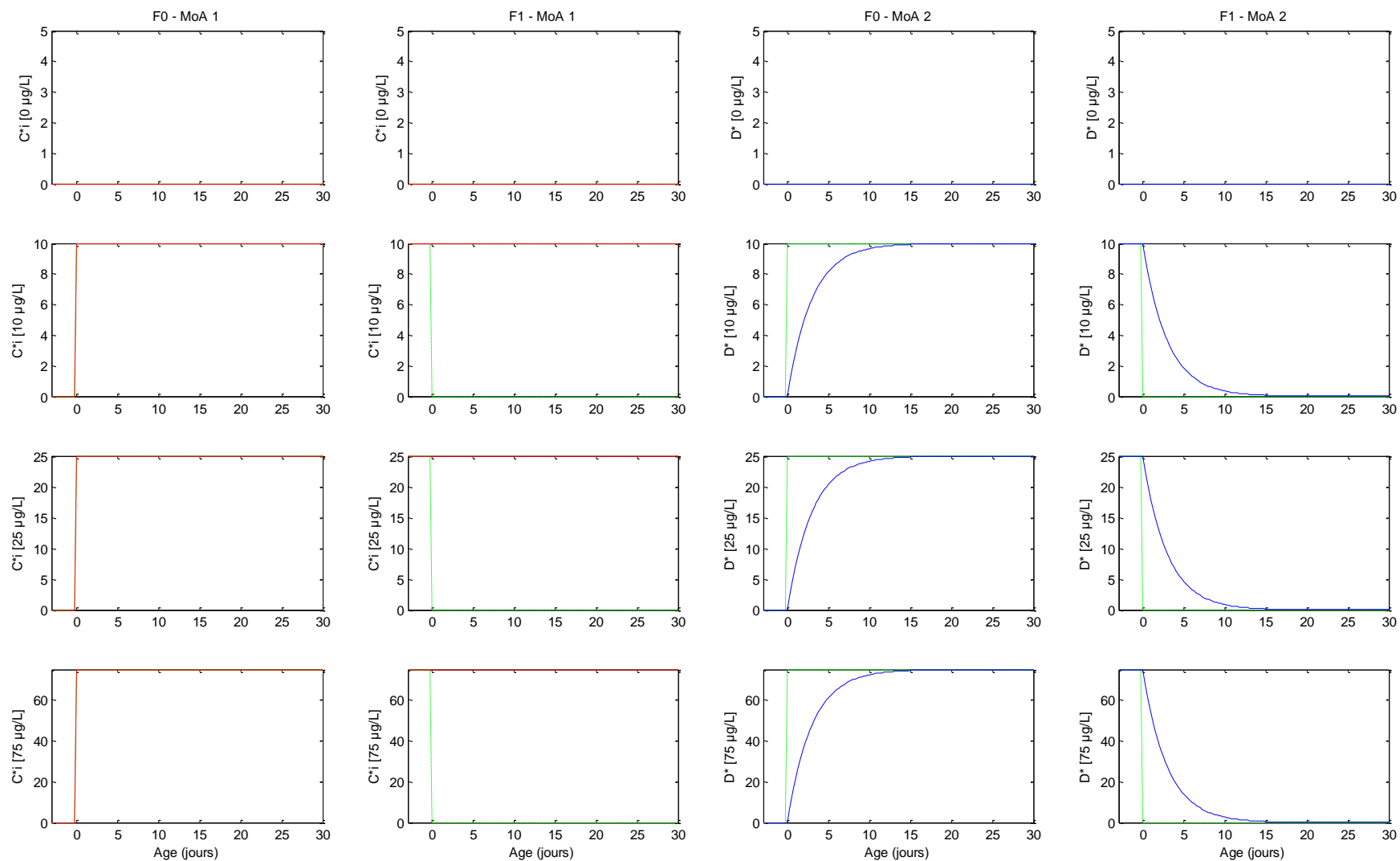


Figure 53 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F1 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

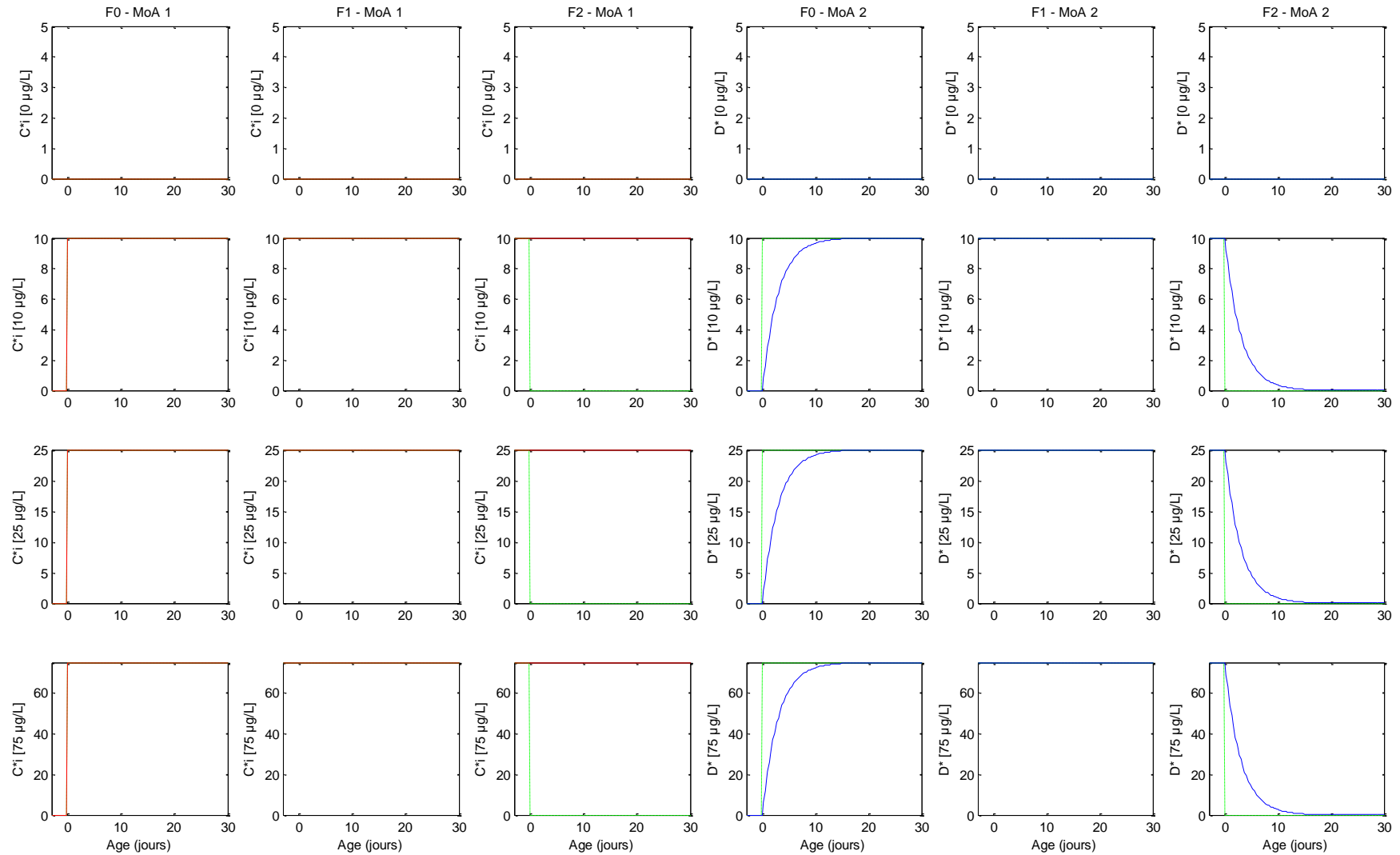


Figure 54 : Exposition jusqu'à l'éclosion de la F2 (données provenant de l'étude de Massarin (2010)). Cinétique des facteurs de stress associés aux modes d'action (MoA1 : Réduction d'assimilation ; MoA2 : Coûts de croissance) de l'uranium chez *Daphnia magna*. Les tirets verts correspondent à la concentration externe en uranium

5. Paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques et implications

Les paramètres toxico-cinétiques, aboutissant aux valeurs de SSQ les plus faibles pour chaque hypothèse cinétique conforme aux observations, sont présentés dans le Tableaux 30. La concentration sans effet sur l'assimilation (NEC_1) suggère que l'uranium ne serait toxique qu'au-dessus de $3,4 \mu\text{g.U.L}^{-1}$. Le niveau de dommages sans effet sur les coûts de croissance et de maturation (NEC_2) suggère qu'une aggravation des effets n'interviendrait qu'au-dessus de $5,9 \mu\text{g.U.L}^{-1}$. Ces valeurs peuvent varier (à la hausse) selon l'hypothèse cinétique retenue. Elles demeurent à confirmer à la lumière d'un ajustement prenant mieux en compte l'aggravation des effets dans la génération F2. Une augmentation des dommages entre la fin de la génération F1 (50 jours d'exposition) et la génération F2 impliquerait une valeur de k_r d'environ un ordre de grandeur inférieure à celle estimée dans nos ajustements.

Tableau 30 : Paramètres de toxicité estimés à partir des données de ce travail de thèse et des données issues de la thèse de Massarin (2010).

Modèle	NEC_1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	b_1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	k_e (j^{-1})	NEC_2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	b_2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	k_r (j^{-1})
Réduction d'assimilation irréversible corrélée à C_e et dommages réversibles						
A-C	6,223	0,003	-	5,879	0,010	0,338
Réduction d'assimilation irréversible corrélée à C_i et dommages réversibles						
A-M	3,443	0,004	0,334	13,820	$4,444 \times 10^{-8}$	0,250

Chapitre 8 :

Discussion générale

1. Etude des effets de l'uranium sur l'ADN et les traits d'histoire de vie

1.1. Accumulation et transmission des dommages à l'ADN au cours des générations

Un objectif majeur de cette étude est de tester si des dommages à l'ADN sont induits et transmis des femelles à leurs œufs au cours des générations.

Cette hypothèse est confirmée par 2 des 3 scénarios d'expositions réalisés dans ce travail de thèse. Lorsque les daphnies sont exposées continuellement ou après l'éclosion, les analyses RAPD mettent en évidence une accumulation et une transmission des dommages à l'ADN au cours des générations. Ces dommages à l'ADN apparaissent :

- à 9,9 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ dans F0 et dès 2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ dans F1 et F2 lors de l'exposition continue ;
- à 22,2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ dans F1 et 2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ dans F2 lors d'une exposition après l'éclosion.

Ces observations indiquent deux points importants. Tout d'abord, dans la génération F0, les dommages à l'ADN observés dans les néonates fraîchement éclos ne peuvent être que le résultat d'une exposition directe des œufs à l'uranium dans la poche incubatrice des femelles pendant l'incubation. En pratique, les œufs sont exposés après leur dépôt dans la poche incubatrice des femelles, donc les altérations de l'ADN observées ne peuvent pas être transmises à partir des parents de la première génération (F0). Cette observation confirme que les œufs dans la poche incubatrice sont perméables aux polluants environnementaux due à des échanges actifs avec le milieu contaminé, assurés par les daphnies pour subvenir aux besoins en oxygène des œufs (Kobayashi *et al.*, 1987; Abe *et al.*, 2001). Deuxièmement, le fait que les dommages à l'ADN au moment de l'éclosion apparaissent à des concentrations plus faibles dans les générations F1 et F2 que dans la génération F0 suggère que les dommages moléculaires observés au moment de l'éclosion résultent à la fois de l'exposition directe des œufs et de la transmission des dommages ADN touchant les cellules germinales dans les générations F0 et F1.

Le fait que les altérations de l'ADN soient détectées à des concentrations plus faibles dans les néonates issus de ponte 5 que ceux de ponte 1 lors d'une exposition continue, supporte également l'hypothèse que les dommages à l'ADN pourraient augmenter progressivement dans les

femelles exposées et avoir besoin de temps pour s'accumuler avant d'être transférés à la descendance. Une observation similaire, en utilisant la technique du test comète, est démontrée chez le poisson zèbre *Danio rerio* où les altérations de l'ADN augmentent entre les jours 5 et 20 pendant une exposition à l'uranium (Barillet *et al.*, 2011). Cependant, il est important de noter que les processus de mutations peuvent différer entre la reproduction parthénogénétique des daphnies produisant des clones et la reproduction sexuée des poissons. Une transmission des dommages à l'ADN des parents à la descendance est démontrée lors d'une exposition de *Daphnia magna* à du benzo(a)pyrene (Atienzar et Jha, 2004). La transmission des modifications du matériel génétique pourrait inclure des mutations, des réarrangements de l'ADN ou encore des méthylations d'ADN (modification de l'expression des gènes par rapport à leur environnement). Les auteurs démontrent également qu'une fraction des changements des profils RAPD chez les parents n'est pas visible chez les descendants. Cette observation suggère que les modifications de l'ADN parental correspondent à des événements génotoxiques ne pouvant être hérités, comme des altérations de l'ADN, se produisant dans les cellules somatiques, ou encore des adduits (liaisons covalentes entre la molécule d'ADN et le toxique).

Les dommages à l'ADN diminuent lentement au cours des générations quand l'exposition est limitée au stade embryonnaire, suggérant un degré de réparation qui semble se mettre en place après un retour des daphnies en eau non contaminée. Des conclusions similaires sur la capacité des daphnies à réparer leur ADN après une exposition à du benzo(a)pyrène et une dépuración sont observées dans les travaux d'Atienzar et Jha (2004).

1.2. Augmentation des effets sur les traits d'histoire de vie au cours des générations et influence de l'exposition des œufs

Un autre point important dans cette étude est d'examiner le rôle et la sensibilité de stades de vies spécifiques (en particulier le stade embryonnaire) dans l'augmentation de la sévérité des effets au cours des générations. Nous avons testé plusieurs hypothèses : (1) les effets de l'uranium sur les traits d'histoire de vie varient-ils en sévérité entre les générations en raison seulement de la différence d'exposition du stade embryonnaire ? (2) les effets augmentent-ils toujours entre les générations F0 et F1, comme reporté dans Massarin *et al.* (2010), quand les deux générations sont exposées pendant les mêmes stades de vie (incluant ou excluant le stade embryonnaire) ?

Ces hypothèses sont étudiées de deux façons.

Premièrement, en étudiant la croissance et la reproduction des daphnies quand seul le stade embryonnaire est exposé. Les résultats démontrent que les effets restent visibles lorsque les néonates éclos retournent dans un milieu non contaminé. Cependant, l'augmentation de la sévérité des effets au cours des générations n'est plus observée ou reste très faible.

Deuxièmement, en comparant l'intensité des effets quand les daphnies sont exposées en continu ou après éclosion c'est-à-dire, stade embryonnaire inclus ou exclus. Cette comparaison montre que les réductions de la croissance et de la reproduction augmentent significativement au

cours des générations dans ces deux scénarios d'exposition. De plus, les résultats suggèrent que les effets sont plus forts quand le stade embryonnaire est exposé que quand il ne l'est pas. Cette observation implique que l'augmentation de la sévérité des effets dans l'étude de **Massarin et al. (2010)** ne peut pas être seulement dû à la différence d'exposition entre les générations F0 et F1. En outre, la réduction de fécondité observée dans la génération F0 exposée après l'éclosion, est visible (mais pas statistiquement significative) à une concentration de $22,2 \mu\text{gU.L}^{-1}$ ce qui est en accord avec la valeur de $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$ reporté dans **Zeman et al. (2008)** et **Massarin et al. (2010)**. Finalement, la sensibilité des daphnies à l'uranium est plus importante lorsqu'elles sont exposées pendant leur stade embryonnaire, en accord avec la conclusion précédente que l'exposition directe des œufs induit des dommages à l'ADN significatifs chez les néonates fraîchement éclos.

Concernant les effets létaux de l'uranium, la survie des daphnies dans cette étude est seulement affectée dans la génération F1 à $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$ alors qu'aucune réduction significative n'est détectée dans la génération F0. Ces résultats sont similaires avec ceux reportés par **Massarin et al. (2010)** où la mortalité augmente seulement dans la génération F1 à des concentrations supérieures ou égales à $25 \mu\text{gU.L}^{-1}$. La comparaison entre ces études suggère que l'exposition de la génération F0 pendant le stade embryonnaire pourrait n'avoir que de faibles conséquences sur la survie, des effets létaux ne survenant que lorsque l'uranium s'est accumulé dans l'organisme, un processus pouvant prendre plusieurs générations.

1.3. Lien entre les dommages à l'ADN et la toxicité au niveau de l'organisme

Le troisième objectif majeur de cette étude est de déterminer la concentration à partir de laquelle les effets deviennent significatifs aux niveaux moléculaire et individuel.

L'étude récente de **Massarin et al. (2011)** indique que la concentration sans effets (*NEC*) pour l'uranium chez *Daphnia magna* est inférieure à $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$, avec la possibilité d'une valeur non différente de zéro (c'est-à-dire que toute concentration d'uranium, aussi faible soit-elle, pourrait induire un effet toxique). Cependant, les tests expérimentaux sur lesquels les analyses DEBtox sont réalisées, n'inclut pas de concentrations inférieures à $10 \mu\text{gU.L}^{-1}$. La présente étude montre que la concentration d'uranium à partir de laquelle les effets deviennent significatifs aux niveaux moléculaire et individuel diffère selon le scénario d'exposition considéré. La sensibilité à l'uranium est forte quand les daphnies sont continuellement exposées avec des effets significatifs dès $2 \mu\text{gU.L}^{-1}$.

Dans tous les scénarios d'exposition, les effets de l'uranium deviennent significatifs à des concentrations plus faibles et à des durées d'exposition plus courtes pour les dommages à l'ADN que les effets sur la croissance ou la reproduction. A la question de savoir si les marqueurs moléculaires peuvent refléter les effets sur les traits d'histoire de vie, nos résultats répondent que les dommages à l'ADN (comme ceux détectés avec la RAPD à l'éclosion des daphnies) pourraient être des

indicateurs d'effets futurs sur la croissance et la reproduction (sur le nombre de néonates produits 15 jours après). De façon plus évidente, la transmission des dommages observés au cours des générations (exposition continue et post-éclosion) intervient en parallèle d'une augmentation de la sévérité des effets sur les traits d'histoire de vie. Lorsque les dommages ADN sont réparés (exposition embryonnaire), les effets sur les traits d'histoire de vie demeurent visibles mais ne s'aggravent pas entre les générations. D'autres auteurs reportent que la mesure des dommages à l'ADN est un critère d'effet plus sensible que la croissance et la reproduction. Lors d'expositions à du benzo(a)pyrene et à du cuivre chez *Daphnia magna*, les auteurs démontrent que la stabilité génomique est plus sensible que les paramètres de croissance (**Atienzar et al., 1999; Atienzar et al., 2001**). Les travaux de **Theodorakis et al. (1997)** permettent de mettre en évidence une relation entre les dommages à l'ADN (cassures) et les paramètres de reproductions (fécondité et anomalies embryogéniques) chez un poisson, *Gambusia affinis*, naturellement exposés à des radionucléides (¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr,...) et à des contaminants chimiques.

Notre étude montre, dans la génération F1 exposée pendant le stade embryonnaire, que les altérations de l'ADN peuvent être observées dans les néonates mais pas chez leur parent. Chez des daphnies exposées à du benzo(a)pyrène, une instabilité génomique est reportée par RAPD chez les néonates mais pas chez leur parent (**Atienzar et Jha, 2004**). Dans une autre étude (**David et al., 2011**), l'exposition des daphnies aux stades néonates (<24h) et adultes (7 jours) à un mélange de deux polluants, le dichromate de sodium et le benzo(a)pyrene, met en évidence une plus forte capacité des adultes à induire des gènes de transcription permettant la réparation de l'ADN par rapport aux néonates.

Dans notre expérience, nous avons observé que l'ADN peut apparaître significativement altéré à de faibles concentrations mais pas aux fortes concentrations d'uranium (par exemple, lors de l'exposition embryonnaire, les adultes F1 au moment de la ponte 5 présentent des altérations de l'ADN à 2 µgU.L⁻¹ mais pas aux plus fortes concentrations). Cette absence d'effets aux niveaux d'exposition plus élevés pourrait être le résultat de l'induction de mécanismes de réparation de l'ADN plus efficaces seulement à partir d'un certain niveau d'altérations de l'ADN. Cette hypothèse est également proposée par **De Coen et al. (2006)** pour expliquer les altérations de l'ADN plus importantes chez des daphnies provenant de stations moins polluées que chez celles provenant d'une station soumise à une contamination par des effluents métallurgiques. La différence d'efficacité de réparations de l'ADN selon le niveau d'exposition ou selon le stade de vie rend difficile la corrélation des altérations de l'ADN à un niveau de stress toxique chez les organismes exposés. Cependant, cette absence d'effets apparents sur l'ADN résultant de la mise en place de mécanismes de réparation, n'implique pas que le stress métabolique soit entièrement éliminé. Chaque processus compensatoire, induit pour lutter contre la toxicité, entraîne des coûts additionnels en énergie. Ces coûts interviennent au dépens des autres processus nécessitant de l'énergie et ont des conséquences pour la survie, la croissance somatiques et la reproduction (**Calow et Sibly, 1990**).

L'étude des profils RAPD est un outil puissant pour tester qualitativement la présence d'altérations d'ADN entre des organismes témoins et exposés. Nos résultats soulignent le fait que la méthode requiert la combinaison de l'analyse des cycles seuils (C_t) et des courbes de températures (T_m). En effet, dans certains cas, l'absence d'effet sur le nombre de sites d'hybridations ne signifie pas qu'il n'y a pas d'effet du polluant sur l'ADN. Ce type d'observation suggère une compensation par création et perte de sites d'hybridation. Dans notre étude, lors de l'exposition continue, l'absence d'effets sur les C_t à l'éclosion dans la génération F0 exposée à $9,9 \mu\text{gU.L}^{-1}$ est contredite par l'observation de changements de la composition des produits de PCR suggérés par les courbes de température de fusion. Cette compensation est également observée dans d'autres études. Lors d'une exposition de poissons zèbre à plusieurs métaux, les altérations de l'ADN au jour 7 de la contamination sont masquées alors qu'elles apparaissent aux jours 3 et 14. L'étude des températures de fusion indique une différence significative de la fréquence d'apparition des produits PCR entre les poissons exposés et témoins au jour 7. Les auteurs soulignent ainsi l'importance d'étudier les courbes de fusion en complément de la quantification des sites d'hybridations (Orioux *et al.*, 2011).

1.4. Mode d'action possible induisant une augmentation de la sévérité des effets

Examiner comment les effets sub-létaux sur la croissance et la reproduction varient au cours des générations est un point important qui peut permettre d'identifier le mécanisme métabolique responsable de l'augmentation de la sévérité des effets.

Lors de précédentes expériences sur la toxicité de l'uranium chez *Daphnia magna*, une réduction de la taille maximale (L_m) avec une augmentation des conditions d'exposition est observée, reflétant soit une réduction de l'assimilation (entrée d'énergie réduite dans l'organisme), soit une augmentation du coût de la maintenance. La diminution du taux d'assimilation du carbone, l'apparition de dommages histologiques au niveau du tube digestif et l'absence d'effet de l'uranium sur le taux respiratoire permettent aux auteurs de conclure que le mode d'action primaire de l'uranium est une réduction d'assimilation (Zeman *et al.*, 2008; Massarin *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2011). Cependant, la raison pour laquelle celle-ci augmente en sévérité au cours des générations reste inexpliquée. Les résultats de notre expérience confirment la réduction de la taille maximale (L_m) et suggèrent que le taux de croissance de Von Bertalanffy (r_B) pourrait aussi être affecté dans la seconde génération lorsque le stade embryonnaire est exposé à $50 \mu\text{gU.L}^{-1}$. Cette observation supporte l'hypothèse que l'augmentation de la toxicité au cours des générations pourrait être associée à une augmentation des coûts de croissance et de maturation, en tant que second mode d'action de l'uranium chez *D. magna*. L'intensité avec laquelle ce second mode d'action serait impliqué est à comparer au niveau des dommages à l'ADN qui s'accumulent et se transmettent lentement d'une génération à la suivante, comme le suggèrent les résultats de RAPD. Les résultats obtenus à $2 \mu\text{gU.L}^{-1}$ suggèrent également que l'uranium pourrait induire un effet direct

sur la reproduction dans la génération F1, étant donné que la fécondité est légèrement réduite alors que la taille n'est pas affectée significativement.

2. Analyse des processus métaboliques impactés par l'uranium à l'aide d'un modèle DEBtox

L'identification du mode d'action d'un toxique permet de développer des biomarqueurs d'intérêt, prédire les effets sur les organismes et extrapoler les conséquences à l'échelle populationnelle. Plusieurs méthodes analytiques permettent de déterminer le mode d'action d'un polluant, notamment les mesures physiologiques et biochimiques. L'approche par la modélisation, en utilisant un modèle mécanistique de type DEBtox est proposée comme une alternative aux mesures expérimentales.

2.1. Les modes d'action de l'uranium

Le premier objectif de ce travail est de déterminer quels modes d'action sont impliqués lors d'une exposition de daphnies à l'uranium appauvri, afin d'expliquer l'aggravation des effets observés au cours des générations.

L'approche DEBtox assume initialement que le mode d'action métabolique d'un polluant est indépendant de l'espèce contaminée bien que l'intensité de l'effet puisse être différente selon les caractères physiologiques de l'espèce considérée (Kooijman et Bedaux, 1996). Jusqu'à présent, la plupart des études se sont concentrées sur l'étude d'un seul mode d'action pour un polluant. Chez le petit arthropode *Folsomia candida*, une exposition à du cadmium induit un effet sur l'assimilation tandis qu'une exposition à du triphényltn induit une augmentation des coûts de maintenance (Jager *et al.*, 2004). Billoir *et al.* (2008a) démontrent un effet sur les coûts de croissance lors d'une exposition à du cuivre chez *Daphnia magna*. Dans le cas d'une contamination à du zinc, ces mêmes auteurs n'ont pas pu choisir entre 2 modes d'action : diminution de l'assimilation et coûts de maintenance supplémentaires. Chez le même organisme, une augmentation des coûts de production des œufs est mise en évidence lors d'une exposition à du fluoranthène (Jager et Zimmer, 2012).

Chez la daphnie, l'étude de Massarin *et al.* (2011) teste une réduction de l'assimilation ou une augmentation des coûts de maintenance comme mode d'action unique de l'uranium. Le choix de ces modes d'action possibles repose sur l'observation expérimentale d'une réduction de la taille maximale et du taux d'assimilation (Massarin *et al.*, 2010). Dans notre étude, le modèle utilisé combine deux stress toxiques : un lié à la concentration d'uranium et le second lié à un niveau de dommages accumulé. Les ajustements réalisés suggèrent que le second mode d'action impliqué dans l'aggravation des effets serait soit une augmentation des coûts de croissance et de maturation,

ou soit une augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité. Les variations mesurées du taux de respiration, pouvant refléter l'implication de ces modes d'action métaboliques, sont considérées non significatives par **Massarin et al. (2010)**. Les auteurs en concluent que le mode d'action de l'uranium ne peut être qu'une réduction de l'assimilation. Cependant, il faut noter que les mesures physiologiques sont soumises à une forte variabilité expérimentale, qui ne permet pas d'exclure complètement ces modes d'action, même si elles confirment pleinement la réduction du taux d'assimilation (**Massarin et al., 2010**). Les valeurs mesurées suggèrent également que cette réduction d'assimilation s'aggrave entre la génération F0 et F1, mais pas entre la génération F1 et F2. Ainsi, l'aggravation des effets pourrait être le fruit d'une augmentation simultanée des deux stress toxiques. En conclusion, notre étude suggère que l'uranium affecte deux processus métaboliques différents, la nature du second mode d'action variable avec l'hypothèse cinétique envisagée, demeurant à confirmer à l'aide d'analyses métaboliques ou physiologiques complémentaires.

D'autres études mettent en évidence qu'un polluant peut avoir plusieurs modes d'action au sein d'une même espèce. Les analyses DEBtox chez *Folsomia candida* concluent à la présence de deux modes d'action selon la durée et la dose d'exposition des organismes, lors d'une exposition à du chlorpyrifos. En effet, dans le cas d'une exposition courte (45 jours), le mode d'action toxique est un effet sur la production des œufs quelle que soit la dose considérée. Dans le cas d'une exposition longue (120 jours), un effet sur la maintenance est observé pour les faibles doses et un effet sur le coût de la production des œufs pour les fortes doses (**Jager et al., 2007**). Chez *Danio rerio*, **Augustine et al. (2012)** décrivent deux modes d'action différents de l'uranium selon le stade de vie exposé, une augmentation des coûts de croissance lors d'une exposition des stades embryonnaires et juvéniles et une augmentation des coûts de maintenance lors d'une exposition des stades adultes. Dans ces deux exemples, l'implication de plusieurs modes d'action dépend de la durée et du niveau d'exposition, du stade de vie exposé et du statut physiologique et trophique des organismes.

2.2. Comparaison des concentrations sans effet de l'uranium et des autres paramètres du modèle

L'estimation à partir de la condition témoin des paramètres pour la croissance reste très similaire au cours des générations tandis que les paramètres de reproduction (l_p et R_m) présentent une plus grande variabilité comme observé dans l'étude de **Massarin et al. (2011)**. Dans cette étude, les auteurs soulignent que les intervalles de confiance pour ces paramètres sont larges. L'étude de **Biron et al. (2012)** indique que les paramètres non toxiques ne diffèrent pas significativement d'une génération à l'autre, excepté le taux de croissance r_B qui est significativement plus élevé dans la génération F0 ($0,14 \text{ j}^{-1}$ [0,13 ; 0,16]) que dans les générations F1 ($0,10 \text{ j}^{-1}$ [0,089 ; 0,11]) et F2 ($0,12 \text{ j}^{-1}$ [0,10 ; 0,13]). Cette diminution de r_B , rapportée sur la base d'un ajustement du modèle d'assimilation sur l'ensemble des données (témoin et exposés), est un

argument en faveur de l'augmentation des coûts de croissance et de maturation proposée dans notre étude, l'inférence bayésienne ayant détecté l'effet de ce mode d'action dans les données de **Massarin et al. (2010)**.

Le modèle DEBtox utilise le concept de concentration sans effet (*NEC*), impliquant qu'au-delà d'un certain seuil, un polluant à un impact négatif sur la biologie de l'organisme. De façon implicite, toutes les méthodes utilisées pour évaluer la toxicité d'un polluant utilisent ce concept de concentration sans effet (**Jager et Kooijman, 2007**). Une approche classique en écotoxicologie consiste soit à prédire une *NOEC* (No Observed Effect Concentration) ou soit à déterminer une *EC_x* (*x*% Effect Concentration) en interpolant des courbes dose-réponse. Cependant, ces paramètres sont dépendant des caractéristiques des expériences (critères d'effets mesurés et temps d'exposition). Il n'est donc pas facile d'extrapoler ou de comparer ces seuils entre espèces ou entre contaminants (**Billoir et al., 2008b**). Le paramètre *NEC* présente divers avantages : il est indépendant du temps contrairement aux paramètres standards (*NOEC*, *LC₅₀* ou *EC₅₀*) et est commun à plusieurs critères d'effet mesurés (croissance et reproduction) (**Kooijman et Bedaux, 1996; Jager et Kooijman, 2007; Billoir et al., 2008b**). Dans l'étude de **Massarin et al. (2011)**, la *NEC* redevient dépendante des conditions expérimentales, puisque les valeurs ajustées diminuent au fil des générations, 10,01, 5,75 et 2,03 $\mu\text{gU.L}^{-1}$ respectivement pour F0, F1 et F2. Cette démarche soulève la question de la valeur que la *NEC* pourrait prendre dans les générations suivantes. Dans le modèle développé dans ce travail de thèse, l'ajustement est réalisé pour toutes les générations successives et en proposant un mécanisme expliquant l'aggravation des effets, permet des prédictions dans les générations suivantes, non étudiées expérimentalement. Contrairement à la démarche utilisée par **Massarin et al. (2011)**, dans laquelle un minimum de deux paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques (*NEC* et *b*) est nécessaire pour chaque génération (impliquant 6 paramètres pour les générations F0 à F2), l'ajustement simultané des scénarios d'expositions et des générations dans notre travail, permet d'espérer une plus grande parcimonie (5 paramètres dans les ajustements réalisés) dans l'analyse d'une plus grande diversité de situations d'exposition. Les valeurs de *NEC* obtenues varient selon les hypothèses cinétiques et les combinaisons de modes d'action testés pour la *NEC₁* (entre 3,44 et 6,22 $\mu\text{gU.L}^{-1}$) et la *NEC₂* (entre 5,88 et 13,82 $\mu\text{gU.L}^{-1}$). Les données expérimentales indiquent des altérations de l'ADN dès 2 $\mu\text{gU.L}^{-1}$, valeur inférieure à la *NEC* estimée. Ces résultats suggèrent qu'il existe un niveau de dommages à l'ADN en-deçà duquel l'uranium n'induit pas de conséquences au niveau individuel, l'étude couplée des effets d'un toxique aux niveaux moléculaire et individuel étant indispensable à la définition d'un biomarqueur. De telles *NEC*, assorties de leur intervalle d'incertitude, seront valables sous réserve de l'apparition de processus adaptatifs dans les générations suivantes. Des phénomènes d'adaptation à l'uranium appauvri sont en effet décrits chez la larve de *Chironomus riparius* après 8 générations et chez *Caenorhabditis elegans* après 22 générations (**Dias, 2010; Dutilleul et al., 2013**). Les processus adaptatifs seront toutefois différents chez un organisme monoclonal comme *Daphnia magna*.

2.3. Améliorations du modèle

Nos conclusions sont à nuancer dans la mesure où la paramétrisation du modèle présentée dans ce travail de thèse mérite d'être améliorée. Un meilleur ajustement du modèle est nécessaire pour mieux décrire l'augmentation des effets observés entre les générations F1 et F2. Plusieurs pistes peuvent être considérées. Tout d'abord, les paramètres physiologiques méritent d'être mieux ajustés aux données témoin afin de garantir un bon ajustement du modèle toxico-cinétique et toxico-dynamique aux concentrations faibles d'uranium. Un autre point d'amélioration consisterait à contraindre les valeurs de la constante de réparation k_r afin de garantir l'apparition lente des effets et la prise en compte de l'aggravation au-delà de la génération F1. Pour ce faire, une approche statistique alternative, à savoir l'inférence bayésienne, pourrait permettre de fournir des valeurs a priori des paramètres (Biron *et al.*, 2012). Enfin, une utilisation moins ambitieuse du modèle pourrait consister à n'ajuster le modèle qu'aux données issues d'expositions continues (sous l'hypothèse que les daphnies adoptent un comportement différent après un retour en milieu non contaminé) et à utiliser les prédictions pour inférer le degré de réversibilité des différents modes d'action lors des expositions limitées au stade embryonnaire.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail doctoral était d'explorer les altérations de l'ADN et leurs conséquences potentielles pour la survie, la croissance et la reproduction d'un invertébré aquatique, *Daphnia magna*, exposé à de l'uranium appauvri. La démarche a tout d'abord consisté à mettre en place expérimentalement, différents scénarios d'exposition. La deuxième étape de ce travail a consisté à développer un modèle de dynamique de budget énergétique (DEBtox) à deux facteurs de stress afin d'évaluer les processus métaboliques impactés par l'uranium.

1. Conclusion générale

1.1. Etude du lien de toxicité entre les niveaux moléculaire et individuel chez *Daphnia magna* exposée à de l'uranium appauvri

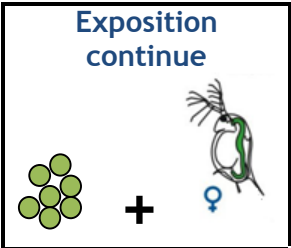

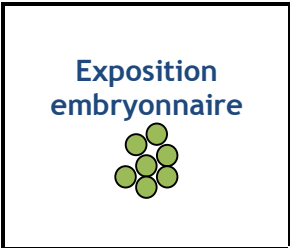
Les résultats expérimentaux mettent en évidence une réponse des organismes à l'uranium aux niveaux moléculaire et individuel différente selon le scénario d'exposition considéré (Tableau 31).

Les expositions, continue et post-éclosion des daphnies, révèlent une accumulation et une transmission des dommages à l'ADN au fil des générations en parallèle d'une augmentation de la sévérité des effets sur la croissance et la reproduction.

Au niveau individuel, les effets de l'uranium sont plus forts lorsque le stade embryonnaire est exposé, suggérant que ce stade de vie précoce est sensible à l'uranium et a une influence sur l'intensité des effets. De plus, l'augmentation transgénérationnelle des effets est observée malgré l'exposition identique des générations F0 et F1. Cela indique que cette aggravation n'est pas seulement provoquée par la différence d'exposition embryonnaire.

Au niveau moléculaire, l'uranium induit une accumulation et une transmission des dommages au fil des générations. Les effets sur l'ADN apparaissent de façon précoce (éclosion des néonates) suite à l'exposition directe des embryons dans la poche incubatrice des femelles. De plus, les effets sur l'ADN sont significatifs à des concentrations de plus en plus faibles au fil des pontes et des générations. L'apparition progressive des dommages s'explique par une combinaison de l'exposition directe et de la transmission des altérations de l'ADN de la mère à la descendance.

Tableau 31 : Synthèse des principaux effets observés lors d'une exposition de daphnies à de l'uranium appauvri au cours de 2 générations successives

	Exposition continue 	Exposition post-éclosion 	Exposition embryonnaire 	Conclusion
Aggravation de la sévérité des effets des traits d'histoire de vie	+++	+	Pas d'aggravation mais rémanence	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Stade embryonnaire : joue un rôle dans la sévérité des effets ✓ Aggravation : pas seulement provoquée par l'exposition embryonnaire ✓ Rémanence des effets lorsque les individus sont remis en milieu non contaminé
Accumulation et transmission des dommages à l'ADN	+++	+	Réversibilité des dommages	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Altérations chez les néonates F0 résultent de l'exposition directe des embryons dans la poche incubatrice des femelles ✓ Transmission des altérations de l'ADN de la mère à la descendance ✓ Augmentation progressive des altérations de l'ADN dans les femelles exposées ✓ Mécanismes de réparations de l'ADN lorsque les individus sont remis en milieu non contaminé

L'exposition embryonnaire met en évidence une capacité des individus à récupérer suite à un retour en milieu non contaminé à l'éclosion, en-deçà d'une certaine concentration. Les effets sur la croissance et la reproduction restent visibles au-delà de $9,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ sans pour autant augmenter d'une génération à la suivante. Les analyses moléculaires indiquent une atténuation des dommages au cours des générations qui ne sont plus détectés à l'éclosion des néonates de la génération F2. Cette observation pourrait être le résultat de la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN.

Concernant le lien de toxicité entre les niveaux moléculaire et individuel, les altérations de l'ADN se déclenchent à des concentrations plus faibles et pour des durées d'exposition plus courtes que les effets observés sur la croissance et la reproduction. Cela permet de proposer les analyses moléculaires comme indicateurs précoces d'effets sur les traits d'histoire de vie.

1.2. Analyse des processus métaboliques impactés par l'uranium

Les résultats de la modélisation, à revoir à la lumière d'ajustements améliorés, suggèrent que l'uranium agit sur deux processus métaboliques différents, le premier étant une réduction de l'assimilation corrélée à la concentration d'uranium, le second (potentiellement une augmentation des coûts de croissance et de maturation ou des coûts de maintenance) corrélée aux dommages accumulés au cours de l'exposition, transmis d'une génération à l'autre et réversibles. Le modèle présenté dans ce travail teste deux cinétiques différentes - une cinétique d'apparition immédiate ou plus lente pour la réduction d'assimilation et une cinétique lente pour le mode d'action lié aux dommages transmissibles - pour lesquelles la nature du second mode d'action diverge.

2. Perspectives de recherche

Dans ce travail, l'analyse moléculaire a permis de quantifier les dommages à l'ADN, qu'il serait intéressant de compléter par l'étude de l'expression de gènes spécifiques permettant d'établir un lien direct entre les effets observés aux niveaux individuel, métabolique et moléculaire. La nature du second mode d'action de l'uranium pourrait ainsi être précisée à l'aide de données expérimentales supplémentaires, telles que l'expression de protéines impliquées dans la croissance ou la maintenance.

Ce travail de thèse suggère la présence de mécanismes de réparations de l'ADN, sans que la croissance et la reproduction ne retrouvent le niveau mesuré chez le témoin, lors d'un retour en milieu non contaminé des individus. Les mécanismes de réparations de l'ADN pourraient être étudiés et leur coût énergétique évalué pour établir le lien avec le budget énergétique et ses conséquences sur l'histoire de vie.

Le stress oxydant est une réponse cellulaire lors de la production d'espèces réactives à l'oxygène. Il peut endommager d'importantes biomolécules comme l'ADN et les protéines, des tissus,... Les altérations de l'ADN observées pourraient être liées à un stress oxydatif des cellules de daphnies lors d'une exposition à l'uranium. L'étude du stress oxydatif à l'aide de la mesure d'enzyme antioxydantes comme le glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase ou encore la catalase, pourrait permettre d'apporter des données expérimentales complémentaires concernant l'apparition des dommages, dont la cinétique demeure à préciser à l'issue de notre étude.

L'inférence bayésienne pourrait être utilisée pour estimer les paramètres du DEBtox et leur incertitude. Une valeur plus robuste des *NEC* est indispensable pour définir la concentration au-delà de laquelle l'uranium a un effet chez *Daphnia magna* et au-delà de laquelle cet effet s'aggrave au fil des générations. La définition d'un niveau de dommages sans effet est une étape clé dans le développement d'un biomarqueur moléculaire.

Cette étude est réalisée en conditions *ad libitum* (nourriture abondante, température et luminosité optimales,...). L'effet de l'uranium dans différentes conditions nutritionnelles pourrait être exploré pour augmenter le réalisme par rapport au milieu naturel, où les conditions environnementales sont soumises aux variations saisonnières. L'acquisition de données de croissance et de reproduction à d'autres niveaux de nourriture est intéressante pour un polluant reconnu pour son effet sur un processus clé de la nutrition et permettrait de mieux cerner les modes d'action à l'aide d'une analyse DEBtox.

Enfin, le modèle DEBtox est un bon outil dont les prédictions, intégrées aux matrices de Leslie, permettent l'extrapolation de la réponse biologique au niveau de la population, plus pertinent d'un point de vue écologique.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Plaire D., Bourdineaud J.-P., Alonzo A., Camilleri V., Garcia-Sanchez L., Adam-Guillermin C. and Alonzo F. (2013) Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **158** (4) 231-243.

COMMUNICATIONS ORALES AVEC COMITE DE SELECTION

Plaire D., Bourdineaud J.P., Garcia-Sanchez L., Poggiale J.C. and Alonzo F. (2013) *Linking DNA damage and effects on life history in a multigenerational exposure of Daphnia magna to uranium*. SETAC Europe 23rd Annual Meeting (Glasgow, Ecosse).

COMMUNICATIONS AFFICHEES AVEC COMITE DE SELECTION

Plaire D., Alonzo F., Gilbin R. and Poggiale J.C. (2011) *Effects of radionuclides on sexual reproduction in Daphnia magna: consequences on energy budget and population dynamics*. DEB Symposium (Lisbonne, Portugal).

COMMUNICATIONS DIVERSES

Journées des thèses IRSN - Croisic (Oral - 2012), Presqu'île de Giens (Oral - 2013)

Congrès EDSE - Marseille (Oral - 2012)

Journées des doctorants de Cadarache - CEA Cadarache (Poster - 2011)

Références

A

Aas E., Baussant T., Balk L., Liewenborg B. et Andersen O. K. (2000) PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, **51** (2) 241-258.

Abe T., Saito H., Niikura Y., Shigeoka T. et Nakano Y. (2001) Embryonic development assay with *Daphnia magna*: Application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, **45** (4-5) 487-495.

Adam C., Larno V., Giraud M., Barillet S., Gania Y., Bony S. et Devaux A. (2006) Effets génotoxiques des radionucléides chez les organismes aquatiques. *ARET Actualités*

Aigueperse J., Bouvier C., Chambrette V., Chazel V., Cossonnet C., Donnadiou-Claraz M., Frank D., Gourmelon P., Houpert P., Jourdan J.-R., Lorthior S., Paquet F., Rannou A., Telle Lambert M. et Tirmarche M. (2001) Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Fontenay aux Roses, Institut de Protection et de Sécurité Nucléaires, 25.

Al Kaddissi S., Legeay A., Gonzalez P., Floriani M., Camilleri V., Gilbin R. et Simon O. (2011) Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74** (7) 1800-1807.

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. *Aquatic Toxicology*, **87** (3) 146-156.

Amiard J.-C. et Amiard-Triquet C. (2008) Les biomarqueurs de dommages. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 95-109.

Antunes S., Pereira R. et Gonçalves F. (2007) Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **53** (2) 207-213.

Atienzar F., Evenden A., Jha A., Savva D. et Depledge M. (2000a) Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques*, **28** (1) 52-54.

Atienzar F. A., Billingham Z. et Depledge M. H. (2002) 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environmental Pollution*, **120** (3) 735-738.

Atienzar F. A., Cheung V. V., Jha A. N. et Depledge M. H. (2001) Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences*, **59** (2) 241-250.

Atienzar F. A., Conradi M., Evenden A. J., Jha A. N. et Depledge M. H. (1999) Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18** (10) 2275-2282.

Atienzar F. A., Cordi B., Donkin M. E., Evenden A. J., Jha A. N. et Depledge M. H. (2000b) Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology*, **50** (1-2) 1-12.

Atienzar F. A. et Jha A. N. (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **613** (2-3) 76-102.

Atienzar F. A. et Jha A. N. (2004) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **552** (1-2) 125-140.

Augustine S. (2012) Metabolic programming of zebrafish, *Danio rerio* uncovered. Physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget Theory and life-cycle consequences of uranium induced perturbations. Thèse IRSN. Université Aix-Marseille et Vrije Universiteit.

Augustine S., Gagnaire B., Adam-Guillermin C. et Kooijman S. A. (2012) Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, **118** 9-26.

Barata C., Baird D. J. et Markich S. J. (1998) Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquatic Toxicology*, **42** (2) 115-137.

B

Barillet S. (2007) Toxicocinétique, Toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse IRSN. Université Paul Verlaine de Metz.

Barillet S., Adam-Guillermin C., Palluel O., Porcher J. M. et Devaux A. (2011) Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution*, **159** (2) 495-502.

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

Barillet S., Buet A., Adam C. et Devaux A. (2005) Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection*, **40** S175-S181.

Belfiore N. M. et Anderson S. L. (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **489** (2-3) 97-122.

Bem H. et Bou-Rabee F. (2004) Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment International*, **30** (1) 123-134.

Bergman Filho T. U., Soares A. M. V. M. et Loureiro S. (2010) Energy budget in *Daphnia magna* exposed to natural stressors. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8.

Bickham J. W. et Smolen M. J. (1994) Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, **102** (SUPPL. 12) 25-28.

Billoir E., Delignette-Muller M. L., Péry A. R. R. et Charles S. (2008a) A Bayesian Approach to Analyzing Ecotoxicological Data. *Environmental Science & Technology*, **42** (23) 8978-8984.

Billoir E., Laure Delignette-Muller M., Péry A. R. R., Geffard O. et Charles S. (2008b) Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of Theoretical Biology*, **254** (1) 55-64.

Biron P. A., Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L., Charles S. et Billoir E. (2012) Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, **46** (2) 1136-1143.

Bleise A., Danesi P. R. et Burkart W. (2003) Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, **64** (2-3) 93-112.

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

Bodar C. W. M., Zee A. v. d., Voogt P. A., Wynne H. et Zandee D. I. (1989) Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **17** (3) 333-338.

Bonin B. et Blanc P.-L. (2001) L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine.

Bourrachot S. (2009) Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Thèse IRSN. N° ISRN/IRSN-2009/119. Université de Provence, Aix marseille I.

Brewer M. C. (1998) Mating behaviours of *Daphnia pulex*, a cyclic parthenogen: Comparisons with copepods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353** (1369) 805-815.

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

C

Cachot J. et Dégremont C. (2009) La génotoxicité: Quel risque pour les espèces aquatiques. *Fascicule Seine-Aval*, **2** (2) 36.

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

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

Cambier S., Gonzalez P., Durrieu G. et Bourdineaud J.-P. (2010) Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73** (3) 312-319.

Canli M. (2005) Dietary and water-borne Zn exposures affect energy reserves and subsequent Zn tolerance of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **141** (1) 110-116.

Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., Adam C. et Baudin J.-P. (2001) Comportement de l'uranium dans l'environnement. L'Uranium de l'environnement à l'homme 187-211.

Cooley H. M., Evans R. E. et Klaverkamp J. F. (2000) Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, **48** (4) 495-515.

D

Dallas L. J., Keith-Roach M., Lyons B. P. et Jha A. N. (2012) Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: A critical review. *Radiation Research*, **177** (5) 693-716.

Dao T. S., Do-Hong L.-C. et Wiegand C. (2010) Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon*, **55** (7) 1244-1254.

David R. M., Dakic V., Williams T. D., Winter M. J. et Chipman J. K. (2011) Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquatic Toxicology*, **104** (3-4) 192-204.

De Coen W., Robbens J. et Janssen C. (2006) Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. *Environmental Pollution*, **141** (2) 283-294.

De Coen W. M. et Janssen C. R. (2003) The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22** (7) 1632-1641.

De Coen W. M. et Janssen C. R. (1997) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, **6** (1) 43-55.

de Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P. et Chan H. (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*, **50** (1) 51-71.

De Wolf H., Blust R. et Backeljau T. (2004a) The population genetic structure of *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along a pollution gradient in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. *Science of the Total Environment*, **325** (1) 59-69.

De Wolf H., Blust R. et Backeljau T. (2004b) The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **566** (3) 249-262.

Den Besten P. J. et Tuk C. W. (2000) Relation between responses in the neutral red retention test and the comet assay and life history parameters of *Daphnia magna*. *Marine Environmental Research*, **50** (1-5) 513-516.

Depledge M. et Fossi M. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, **3** (3) 161-172.

Dias V. (2010) Étude des réponses adaptatives d'une population d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) soumise à une exposition métallique chronique : le cas de l'uranium. Thèse IRSN. Université de Provence, Aix marseille I.

Dietrich S., Ploessl F., Bracher F. et Laforsch C. (2010) Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. *Chemosphere*, **79** (1) 60-66.

Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J. et Pery A. (2008) Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 273-294.

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

E

Ebert (2005) Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in *Daphnia*.

Elendt B. P. et Bias W. R. (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, **24** (9) 1157-1167.

Enserink E., Kerkhofs M., Baltus C. et Koeman J. (1995) Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; evidence for a trade-off mechanism. *Functional Ecology*, 175-185.

Enserink L., Luttmer W. et Maas-Diepeveen H. (1990) Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 17 (1) 15-25.

Environnement Canada (2003) Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain), Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999). Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation.

F

Favier A. (2003) Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Felsenfeld G. et Groudine M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, 421 (6921) 448-453.

G

Garnier-Laplace J., Colle C. et Morello M. (2001) Fiche radionucléide, Uranium naturel et environnement.

Geffroy B., Ladhar C., Cambier S., Treguer-Delapierre M., Brèthes D. et Bourdineaud J.-P. (2012) Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: The role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 6 (2) 144-160.

Gilbin R., Alonzo F. et Garnier-Laplace J. (2008) Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99 (1) 134-145.

Glazier D. S. et Calow P. (1992) Energy allocation rules in *Daphnia magna*: clonal and age differences in the effects of food limitation. *Oecologia*, 90 (4) 540-549.

Guan R. et Wang W. X. (2006a) Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquatic Toxicology*, 76 (3-4) 217-229.

Guan R. et Wang W. X. (2006b) Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 141 (2) 343-352.

Gudkov D. I. et Kipnis L. S. (1996) Long-Term Effect of Tritiated Water on the Biological Indicators of *Daphnia magna*. *Hydrobiological Journal*, 32 (5-6) 1-21.

H

Harrigan J. A., Vezina C. M., McGarrigle B. P., Ersing N., Box H. C., Maccubbin A. E. et Olson J. R. (2004) DNA Adduct Formation in Precision-Cut Rat Liver and Lung Slices Exposed to Benzo[a]pyrene. *Toxicological Sciences*, 77 (2) 307-314.

Harris E. (1989) The Chlamydomonas Sourcebook. - A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press. *Journal of Plant Physiology*, 139 (6) 768.

Henderson R., Hobbie J., Landrigan P., Mattisoti D., Perera F., Pfttaer E., Silbergeld E. et Wogan G. (1987) Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 7 3-9.

Holm S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*, 6 65-70.

I

Ikuno E., Matsumoto T., Okubo T., Itoi S. et Sugita H. (2008) Difference in the sensitivity to chemical compounds between female and male neonates of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, 23 (5) 570-575.

Innes D. J. (1997) Sexual reproduction of *Daphnia pulex* in a temporary habitat. *Oecologia*, 111 (1) 53-60.

J

Jager T., Crommentuijn T., van Gestel C. A. et Kooijman S. A. (2007) Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 145 (2) 452-458.

Jager T., Crommentuijn T., Van Gestel C. A. M. et Kooijman S. A. L. M. (2004) Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. *Environmental Science and Technology*, 38 (10) 2894-2900.

Jager T. et Klok C. (2010) Extrapolating toxic effects on individuals to the population level: The role of dynamic energy budgets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365 (1557) 3531-3540.

Jager T. et Kooijman B. (2007) Background Document Biology-Based Methods. Dept. Theoretical Biology, Fac. Earth and Life Science; Vrije Universiteit, 46.

Jager T. et Zimmer E. I. (2012) Simplified Dynamic Energy Budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling*, 225 74-81.

Jha A. N. (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3) 207-221.

Jha A. N. (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552 (1-2) 1-17.

K

Kawasaki T., Sakata M. et Namiki H. (2004) Elemental characterization of *Daphnia* resting eggs by X-ray analytical microscopy. *Zoological Science*, 21 (10) 1019-1023.

Kim H., Lee M., Yu S. et Kim S. (2012) The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology*, 21 (4) 993-1002.

Kim J., Kim S., An K. W., Choi C. Y., Lee S. et Choi K. (2010) Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152 (3) 263-269.

Kim J., Park Y. et Choi K. (2009) Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquatic Toxicology*, **91** (1) 87-94.

Knops M., Altenburger R. et Segner H. (2001) Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxicology*, **53** (2) 79-90.

Kobayashi M., Hayakawa F. et Ninomiya M. (1987) Hatchability and hemoglobin of *Daphnia magna* embryo. *Physiological Zoology*, 507-512.

Kooijman S. et Metz J. (1984) On the dynamics of chemically stressed populations: the deduction of population consequences from effects on individuals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **8** (3) 254-274.

Kooijman S. A. L. M. (2010) Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation. 3rd edition, 508.

Kooijman S. A. L. M. et Bedaux J. J. M. (1996) Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Research*, **30** (7) 1711-1723.

Kuhne W. W., Caldwell C. A., Gould W. R., Fresquez P. R. et Finger S. (2002) Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21** (10) 2198-2203.

L

Labrot F., Narbonne J. F., Ville P., Saint Denis M. et Ribera D. (1999) Acute Toxicity, Toxicokinetics, and Tissue Target of Lead and Uranium in the Clam *Corbicula fluminea* and the Worm *Eisenia fetida*: Comparison with the Fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36** (2) 167-178.

Labrot F., Ribera D., Denis M. S. et Narbonne J. F. (1996) In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, **1** (1) 21-28.

Lance E., Alonzo F., Garcia-Sanchez L., Beaugelin-Seiller K. et Garnier-Laplace J. (2012) Modelling population-level consequences of chronic external gamma irradiation in aquatic invertebrates under laboratory conditions. *Science of the Total Environment*, **429** 206-214.

LeBlanc G. A. (1982) Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological*, **27** (4) 309-322.

Lee S. W., Kim S. M. et Choi J. (2009) Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **28** (1) 86-91.

Lerebours A. (2009) Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Mécanismes de stress, neurotoxicité et métabolisme mitochondrial. Thèse IRSN. Université de Provence, Aix-Marseille I.

Lerebours A., Bourdineaud J.-P., Ven K., Vandebrouck T., Gonzalez P., Camilleri V., Floriani M., Garnier-Laplace J. et Adam-Guillermin C. (2010) Sublethal Effects of Waterborne Uranium Exposures on the Zebrafish Brain: Transcriptional Responses and Alterations of the Olfactory Bulb Ultrastructure. *Environmental Science & Technology*, **44** (4) 1438-1443.

Lerebours A., Cambier S., Hislop L., Adam-Guillermin C. et Bourdineaud J. P. (2013) Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, doi:pii: S1383-5718(13)00145-9. 10.1016/j.mrgentox.2013.05.012. [Epub ahead of print].

Lerebours A., Gonzalez P., Adam C., Camilleri V., Bourdineaud J.-P. et Garnier-Laplace J. (2009) Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28** (6) 1271-1278.

Lika K. et Nisbet R. M. (2000) A dynamic energy budget model based on partitioning of net production. *Journal of Mathematical Biology*, **41** (4) 361-386.

Lourenço J., Castro B., Machado R., Nunes B., Mendo S., Gonçalves F. et Pereira R. (2010) Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **58** (4) 1023-1031.

Lourenço J., Pereira R., Pinto F., Caetano T., Silva A., Carvalheiro T., Guimarães A., Gonçalves F., Paiva A. et Mendo S. (2013) Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicology*, **305** (0) 89-98.

Lourenço J., Pereira R., Silva A., Carvalho F., Oliveira J., Malta M., Paiva A., Gonçalves F. et Mendo S. (2012) Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity endpoints in earthworms exposed *in situ* to uranium mining wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **75** 46-54.

M

Madic C. et Genet M. (2001) Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. 43-91.

Markich S. J. (2002) Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal [electronic resource]*, **2** 707-729.

Massarin S. (2010) Etude de l'effet de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse IRSN. N° ISRN/IRSN-2011/145. Université d'Aix-Marseille II, Université de la Méditerranée.

Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L., Gilbin R., Garnier-Laplace J. et Poggiale J. C. (2010) Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, **99** (3) 309-319.

Massarin S., Beaudouin R., Zeman F., Floriani M., Gilbin R., Alonzo F. et Pery A. R. R. (2011) Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environmental Science and Technology*, **45** (9) 4151-4158.

Miller A. C., Stewart M., Brooks K., Shi L. et Page N. (2002) Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **91** (1) 246-252.

Muysen B. T. A. et Janssen C. R. (2004) Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution*, **130** (3) 309-316.

N

Nieboer E. et Richardson D. H. S. (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B: Chemical and Physical*, 1 (1) 3-26.

Nisbet R. M., Muller E. B., Lika K. et Kooijman S. A. L. M. (2000) From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *Journal of Animal Ecology*, 69 (6) 913-926.

Noonburg E., Nisbet R., McCauley E., Gurney W., Murdoch W. et De Roos A. (1998) Experimental testing of dynamic energy budget models. *Functional Ecology*, 12 (2) 211-222.

O

OECD (2004) *Daphnia*, acute immobilisation test, 202.

OECD (2008) OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.

Ohta T., Tokishita S.-i., Shiga Y., Hanazato T. et Yamagata H. (1998) An Assay System for Detecting Environmental Toxicants with Cultured Cladoceran Eggs< i> in Vitro</i>: Malformations Induced by Ethylenethiourea. *Environmental Research*, 77 (1) 43-48.

Orieux N., Cambier S., Gonzalez P., Morin B., Adam C., Garnier-Laplace J. et Bourdineaud J. P. (2011) Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (4) 974-983.

Orsière T., Sari-Minodier I., Decome L., Botta C., Iarmarcovai G. et Botta A. (2005) De la génotoxicité à la biosurveillance: 28ème journées nationales de santé au travail dans le BTP. *Cancérogènes et BTP*, 25-28.

P

Palma P., Palma V. L., Fernandes R. M., Soares A. M. V. M. et Barbosa I. R. (2009) Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2) 344-350.

Pane E. F., McGeer J. C. et Wood C. M. (2004) Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (4) 1051-1056.

Park S. Y. et Choi J. (2009) Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol a exposure in aquatic biomonitoring species: Freshwater crustacean, *daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83 (4) 463-468.

Pereira S., Bourrachot S., Cavalie I., Plaire D., Dutilleul M., Gilbin R. et Adam-Guillermin C. (2011) Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (12) 2831-2837.

Pereira S., Camilleri V., Floriani M., Cavalie I., Garnier-Laplace J. et Adam-Guillermin C. (2012) Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquatic Toxicology*, 109 11-16.

Periyakaruppan A., Kumar F., Sarkar S., Sharma C. S. et Ramesh G. T. (2007) Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 81 (6) 389-395.

Pickett J. B., Specht W. L. et Keyes J. L. (1993) Acute and chronic toxicity of uranium compounds to Ceriodaphnia-Daphnia dubia. Other Information: PBD: 31 Mar 1993, Medium: ED; Size: 403 p.

Pietrzak B., Bednarska A. et Grzesiuk M. (2010) Longevity of Daphnia magna males and females. *Hydrobiologia*, 643 (1) 71-75.

Poston T. M., Hanf Jr R. W. et Simmons M. A. (1984) Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22 (3) 289-298.

Poynton H. C., Lazorchak J. M., Impellitteri C. A., Blalock B. J., Rogers K., Allen H. J., Loguinov A., Heckman J. L. et Govindasmaway S. (2012) Toxicogenomic responses of nanotoxicity in Daphnia magna exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 46 (11) 6288-6296.

Pradines C. (2004) Stress oxydant: état de l'art et techniques d'analyse. Examen critique de l'application au cas des radionucléides. . Service d'études sur le comportement des radionucléides dans les écosystèmes, 52.

R

R Development Core Team (2012) R: A language and environmental for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for statistical computing. 3-900051-07-0.

Ragnarsdottir K. V. et Charlet L. (2000) Uranium behaviour in natural environments.

Raikow D. F., Reid D. F., Blatchley lii E. R., Jacobs G. et Landrum P. F. (2007) Effects of proposed physical ballast tank treatments on aquatic invertebrate resting eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (4) 717-725.

Randerath E., Miller R. H., Mittal D., Avitts T. A., Dunsford H. A. et Randerath K. (1989) Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by ³²P-postlabeling assay. *Journal of the National Cancer Institute*, 81 (5) 341-347.

Randerath K., Reddy M. V. et Gupta R. C. (1981) ³²P-postlabeling for DNA damage *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 6126-6129.

Ribera D., Labrot F., Tisnerat G. et Narbonne J. F. (1996) Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 146 53-89.

Roméo M. et Giambérini L. (2008) Historique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 17-54.

S

Salminen R. (2005) Geochemical atlas of Europe. Part I: Background Information, Methodology and Maps. Espoo: Geological Survey of Finland.

Sanchez M., Ferrando M., Sancho E. et Andreu E. (1999) Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124 (3) 247-252.

Sánchez M., Ferrando M. D., Sancho E. et Andreu E. (2000) Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* straus exposed to diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46 (1) 87-94.

Semaan M., Holdway D. A. et Van Dam R. A. (2001) Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environmental Toxicology*, **16** (5) 365-376.

Sheppard S. C., Sheppard M. I., Gallerand M. O. et Sanipelli B. (2005) Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, **79** (1) 55-83.

Shugart L. et Theodorakis C. (1998) New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*, **11** (2) 119-127.

Shugart L. R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, **9** (5) 329-340.

Simon O., Floriani M., Cavalie I., Camilleri V., Adam C., Gilbin R. et Garnier-Laplace J. (2011) Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Environmental Radioactivity*, **102** (8) 766-773.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. et Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175** (1) 184-191.

Smolders R., Baillieux M. et Blust R. (2005) Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, **73** (2) 155-170.

Sobral O., Chastinet C., Nogueira A., Soares A. M. V. M., Gonçalves F. et Ribeiro R. (2001) In vitro development of parthenogenetic eggs: A fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **50** (3) 174-179.

Stark J. D., Banks J. E. et Vargas R. (2004) How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (3) 732-736.

Stearns D. M., Yazzie M., Bradley A. S., Coryell V. H., Shelley J. T., Ashby A., Asplund C. S. et Lantz R. C. (2005) Uranyl acetate induces *hprt* mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis*, **20** (6) 417-423.

Swain S., Wren J. F., Stürzenbaum S. R., Kille P., Morgan A. J., Jager T., Jonker M. J., Hankard P. K., Svendsen C., Owen J., Hedley B. A., Blaxter M. et Spurgeon D. J. (2010) Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Systems Biology*, **4** 1-19.

T

Theodorakis C. W., Blaylock B. G. et Shugart L. R. (1997) Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, **6** (4) 205-218.

Theodorakis C. W. et Shugart L. R. (1997) Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, **6** (6) 335-354.

Thiébaud C., Carrière M., Milgram S., Simon A., Avoscan L. et Gouget B. (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicological Sciences*, **98** (2) 479-487.

Ton S.-S., Chang S.-H., Hsu L.-Y., Wang M.-H. et Wang K.-S. (2012) Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environmental Pollution*, **168** 54-61.

V

van der Oost R., Beyer J. et Vermeulen N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13** (2) 57-149.

Vandeghechuchte M. B. et Janssen C. R. (2011) Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology*, **20** (3) 607-624.

Vandeghechuchte M. B., Lemièrre F. et Janssen C. R. (2009) Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **150** (3) 343-348.

Vandeghechuchte M. B., Lemièrre F., Vanhaecke L., Vanden Berghe W. et Janssen C. R. (2010) Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **151** (3) 278-285.

Vasseur P., Cossu-Leguille C., Atienzar F., Rodius F. et Lemièrre S. (2008) Marqueurs de génotoxicité et effets in situ, individuels et populationnels. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques,

Villarroel M. J., Ferrando M. D., Sancho E. et Andreu E. (2000) Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquatic Toxicology*, **49** (1-2) 39-47.

W

Ward T. J. et Robinson W. E. (2005) Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24** (9) 2341-2349.

WHO (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, **155** World Health Organization, Geneva.

WHO (2001) Depleted Uranium. Sources, Exposure and Health Effects. *WHO/SDE/PHE/01.*, 1.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. et Tingey S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18** (22) 6531-6535.

Wren J. F., Kille P., Spurgeon D. J., Swain S., Sturzenbaum S. R. et Jager T. (2011) Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicology*, **20** (2) 397-408.

X

Xie F., Koziar S. A., Lampi M. A., Dixon D. G., Norwood W. P., Borgmann U., Huang X. D. et Greenberg B. M. (2006) Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25** (2) 613-622.

Y

Yazzie M., Gamble S. L., Civitello E. R. et Stearns D. M. (2003) Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical Research in Toxicology*, **16** (4) 524-530.

Z

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

Zeman F. A., Gilbin R., Alonzo F., Lecomte-Pradines C., Garnier-Laplace J. et Aliaume C. (2008) Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **86** (3) 370-378.

Zhiyi R. et Haowen Y. (2004) A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58** (1) 96-103.

Annexes

ANNEXE 1 : PREPARATION DU MILIEU D'ELEVAGE

Les daphnies se développent dans le milieu M4 (Elendt et Bias, 1990). Ce milieu est préparé à partir de divers sels dilués dans de l'eau UHQ (Tableau 32, 33 et 34). Une fois le mélange réalisé, un bullage est mis en place dans chaque milieu pendant 24h dans un incubateur à 20°C, où ils sont ensuite conservés. Deux types de milieu M4 sont préparés au laboratoire : celui à pH7 et celui à pH8 (Tableau 32). Avant utilisation, une solution de vitamines (Tableau 34), conservée dans des eppendorfs à -20°C, est ajoutée dans le milieu M4.

Tableau 32 : Préparation du milieu M4

Solutions stocks	Concentration (mg.L ⁻¹)	Pour préparer 1L de milieu M4-pH7 (mL)	Pour préparer 1L de milieu M4-pH8 (mL)
Solution mère I (voir Tableau 33)		50	50
Chlorure de calcium CaCl ₂ , 2H ₂ O	293800	1,0	1,0
Chlorure de sodium NaCl	42050	1,0	0,0
Sulfate de magnésium MgSO ₄ , 7H ₂ O	246600	0,5	0,5
Chlorure de potassium KCl	58000	0,1	0,1
Hydrogencarbonate de sodium NaHCO ₃	64800	0,067	1,0
Sodium métasilicate Na ₂ SiO ₃ , 5H ₂ O	50000	0,2	0,2
Nitrate de sodium NaNO ₃	2740	0,1	0,1
Potassium dihydrogénophosphate KH ₂ PO ₄	1430	0,1	0,1
Di-potassium Hydrogénéphosphate K ₂ HPO ₄	1840	0,1	0,1
Solution mère de vitamines (voir Tableau 34)		0,1	0,1

Tableau 33 : Préparation de la solution mère

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

* les solutions Na₂EDTA et FeSO₄ sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises à l'étuve à 120 °C pendant 30 min, ce qui donne

Solution Fe-EDTA		20
------------------	--	----

Tableau 34 : Préparation de la solution de vitamine

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

ANNEXE 2 : PREPARATION DE LA CULTURE D'ALGUES

Une culture de *Chlamydomonas* de souche 11/32 B (CCAP, Royaume-Uni) est maintenue en permanence au laboratoire afin de nourrir les daphnies. Une fois par semaine, une nouvelle culture d'algues est lancée. Pour cela, les algues sont mises dans un milieu HSM (High Salt Medium) dans des conditions stériles. Ce milieu HSM est préparé au préalable dans des erlenmeyers de 2 L (Tableau 35), autoclavés puis conservés dans une chambre froide à 4°C. Le jour où l'on souhaite réaliser une nouvelle culture d'algues, un erlen est placé dans un incubateur à 24°C, où l'éclairage et l'agitation (100 rpm) sont constants. Une fois le milieu HSM à 24°C (environ 2 heures), des cellules d'algues provenant d'une culture d'algues d'environ 5-6 jours sont introduites dans des conditions stériles. Puis l'erlen est replacé dans l'incubateur où un bullage est mis en place. Ces algues sont ensuite utilisées pendant leur croissance exponentielle pour nourrir les daphnies, soit environ 5 jours après le repiquage.

Le milieu HSM est préparé grâce à 3 solutions stock (Tableau 35), composées de divers sels (Tableau 36).

Tableau 35 : Solutions stocks utilisées pour réaliser le milieu HSM

Solutions stock	ml.L ⁻¹
Beijerinck	5
Phosphate	25
AAP	1

Tableau 36 : Composition et proportion des solutions stock utilisées pour réaliser le milieu HSM

Solutions	Quantités
Beijerinck	g.L⁻¹
NH ₄ Cl	100
MgSO ₄ , 7H ₂ O	4
CaCl ₂	2
Phosphate	g.L⁻¹
KH ₂ PO ₄	29,6
K ₂ HPO ₄	57,6
AAP	mg.L⁻¹
H ₃ BO ₃	186
MnCl ₂ , 4H ₂ O (10 g.L ⁻¹)	115
ZnCl ₂	3,5
FeCl ₃ , 6H ₂ O	160
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	300
CoCl ₂ , 6H ₂ O (1 g.L ⁻¹)	0,64
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	3,63
CuCl ₂ , 2H ₂ O	8,79

ANNEXE 3 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium

Delphine Plaire^a, Jean-Paul Bourdineaud^b, Antoine Alonzo^a, Virginie Camilleri^a,
Laurent Garcia-Sanchez^c, Christelle Adam-Guillermin^a and Frédéric Alonzo^a

^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN),
PRP-ENV, SERIS, LECO, Cadarache, France

^b University of Bordeaux, UMR 5805 EPOC,
33120 Arcachon Cedex, France

^c Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN),
PRP-ENV, SERIS, L2BT, Cadarache, France

Published in Comparative Biochemistry and physiology, Part C 158 (2013) 231-243



Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium



Delphine Plaire^a, Jean-Paul Bourdineaud^b, Antoine Alonzo^a, Virginie Camilleri^a, Laurent Garcia-Sanchez^c, Christelle Adam-Guillermin^a, Frédéric Alonzo^{a,*}

^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, LECO, Cadarache, France

^b University of Bordeaux, UMR 5805 EPOC, 33120 Arcachon Cedex, France

^c Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, L2BT, Cadarache, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2013

Received in revised form 3 September 2013

Accepted 3 September 2013

Available online 10 September 2013

Keywords:

Daphnia magna

Uranium

Transgenerational effects

DNA damage

ABSTRACT

This study aimed to examine the mechanisms involved in the transgenerational increase in *Daphnia magna* sensitivity to waterborne depleted uranium (DU) under controlled laboratory conditions. Daphnids were exposed to concentrations ranging from 2 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ over two successive generations. Genotoxic effects were assessed using random amplified polymorphic DNA and real time PCR (RAPD-PCR). Effects on life history (survival, fecundity and somatic growth) were monitored from hatching to release of brood 5. Different exposure regimes were tested to investigate the specific sensitivity of various life stages to DU. When daphnids were exposed continuously or from hatching to deposition of brood 5, results demonstrated that DNA damage accumulated in females and were transmitted to offspring in parallel with an increase in severity of effects on life history across generations. When daphnids were exposed during the embryo stage only, DU exposure induced transient DNA damage which was repaired after neonates were returned to a clean medium. Effects on life history remained visible after hatching and did not significantly increase in severity across generations. The present results suggest that DNA damage might be an early indicator of future effects on life history.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Understanding how toxicants affect wildlife species at various levels of biological organisation (sub-cellular, histological, physiological, organism, population levels) is a major research goal in both ecotoxicology and radioecology. Recent studies in the nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to various toxicants illustrated how coupling mechanistic modelling and analyses of molecular markers might help in understanding the links between metabolic perturbations underlying effects on growth and reproduction, and specific profiles of gene expression (Swain et al., 2010; Wren et al., 2011). However, time scales at which such links are established are rarely relevant for natural populations in a broader ecological context. On the one hand, toxic effects are studied based on experimental exposures which are often limited to a single generation or one specific life stage. On the other hand, exposure to toxicants in the environment can occur over durations of months to years, which largely exceed individual longevity. In this situation, chronic effects examined over one life cycle are not relevant for predicting the population response, if biological effects vary from a generation to the next during a multigenerational exposure. Several studies in the cladoceran crustacean *Daphnia magna* showed that responses of exposed organism might change following different scenarios (appearance of a

tolerance, increase in sensitivity...) depending on the tested toxicant (LeBlanc, 1982; Bodar et al., 1990; Sánchez et al., 2000; Muysen and Janssen, 2004; Pane et al., 2004; Guan and Wang, 2006; Alonzo et al., 2008; Dietrich et al., 2010; Massarin et al., 2010; Kim et al., 2012). Daphnids are freshwater microinvertebrates living in ponds which are widely used in ecotoxicology due to their small size, parthenogenetic reproduction and short life cycle (Ebert, 2005), making the species particularly suitable for evaluating pollutants toxicity over several generations.

A multigenerational investigation of toxic effects was recently conducted in *Daphnia magna* exposed to depleted uranium (DU) (Massarin et al., 2010). Uranium is a radionuclide from the actinide series, naturally present in all compartments of the environment and occurring in freshwaters at concentrations ranging from 0.01 to 11.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and increasing to 2 mg L^{-1} in the vicinity of uraniumiferous sites (WHO, 2001; Salminen, 2005). Various anthropogenic activities associated with the nuclear fuel cycle or military purposes cause local increases in concentrations. These increases, which largely exceed background concentrations, raise concerns for natural ecosystems due to DU chemical toxicity rather than radiological toxicity (WHO, 2001; Bleise et al., 2003; Stearns et al., 2005; Bourrachot et al., 2008). In *D. magna*, results showed that effects from uranium exposure increased in severity across three successively exposed generations (F0, F1 and F2). A mechanistic analysis of reductions in somatic growth and reproduction using the Dynamic Energy Budget theory applied to toxicology suggested that uranium primarily affects assimilation, a metabolic mode of action

* Corresponding author. Fax: +33 42 19 91 51.

E-mail address: frederic.alonzo@irsn.fr (F. Alonzo).

confirmed through measured reduction in carbon assimilation and observed alterations of the digestive epithelium (Massarin et al., 2010; Massarin et al., 2011). However, the mechanism involved in the transgenerational increase in toxicity was not clearly understood. One may hypothesize that this observation was a mere result of a difference in exposure conditions between F0 and subsequent generations. In fact, uranium exposures in Massarin et al. (2010) were started with freshly hatched neonates in F0 whereas the embryo stage was exposed in F1 and F2. This hypothesis, which points the embryo stage as a potentially sensitive life stage, remains to be examined.

Besides a possible influence of embryo exposure, DU-induced aberrations in DNA might be transmitted from exposed daphnids to their eggs and involved in the increase in effect severity over generations. This hypothesis needs to be investigated when all generations are exposed in the exact same life stages (i.e. including during the embryo stage). Genotoxicity of uranium was reported in several terrestrial and aquatic invertebrates and vertebrates (Barillet et al., 2005; Thiébaud et al., 2007; Lourenço et al., 2010; Simon et al., 2011; Pereira et al., 2012) but was never investigated in a multigenerational context. In aquatic species, DNA damage was detected at concentrations of 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 100 mg L^{-1} , respectively in the bivalve *Corbicula fluminea*, in the zebrafish *Danio rerio* and in the goldfish *Carassius auratus*. Studies showed that DU caused different possible lesions on the DNA molecule through DNA adducts, strand breaks or oxidative stress (Yazzie et al., 2003; Stearns et al., 2005; Barillet et al., 2007; Periyakaruppan et al., 2007). In previous studies, genetic alterations were successfully studied in *D. magna* exposed to benzo[*a*]pyrene using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method (Atienzar et al., 1999; Atienzar et al., 2000). This technique has the potential to detect a large variety of DNA damage and mutations at the whole genome level. The RAPD technique was recently improved using relative quantitative PCR instead of agarose gel electrophoresis (Cambier et al., 2010) making the methodology useful in field studies and more sensitive than the Comet assay (Orioux et al., 2011). A last improvement allowed quantifying the number of hybridization sites of a RAPD probe (Geffroy et al., 2012; Lerebours et al., 2013).

In this study, we applied the RAPD technique to *D. magna* exposed to DU over two successive generations in order to test whether DNA alterations were accumulated and transmitted from daphnids to offspring with a special emphasis on linking toxicity between the molecular and organismal levels. Molecular markers are sensitive endpoints responding at lower dose and after shorter exposure durations than life history endpoints (Atienzar and Jha, 2006; Jha, 2008; Dallas et al., 2012). Thus, we used DNA damage to investigate uranium toxicity below 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, the lowest tested DU concentration in previous studies (Massarin et al., 2010), at concentrations where slight effects are difficult to significantly detect at higher levels of biological organisation. Daphnids were exposed following different exposure regimes in order to investigate the role and sensitivity of specific life stages (in particular the embryo stages in F0 and F1) in the accumulation of DNA damage and increase in effect severity across generations.

2. Materials and methods

2.1. *Daphnia magna* maintenance

A culture of *Daphnia magna* (clone A, INERIS, France) was maintained in parthenogenetic reproduction in laboratory conditions for several years. Daphnids were maintained at a density of one individual per 50 mL, at 20 °C under a 16:8 h light:dark photoperiod and a light intensity of 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ following the guideline 211 of OECD (2008). Organisms were cultivated in a modified artificial freshwater medium M4 at pH7 (Appendices Table 1) in order to increase uranium bioavailability during experiments with depleted uranium (Elendt and Bias, 1990; Zeman et al., 2008). Daphnids were fed daily with fresh cultures of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* grown in axenic conditions at

24 °C in High Salt Medium (Harris, 1989). Exponentially growing cultures were centrifuged and resuspended in M4-pH7 at a cell density of 80 000 cells mL^{-1} equivalent to a daily ration of 100 μgC per daphnid.

2.2. Exposure conditions

Uranium was obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) as uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in 0.2% nitric acid solution (1 g L^{-1}). Four nominal uranium concentrations in M4-pH7 (2, 9.9, 22.2 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) and an unexposed control were prepared. In all exposure conditions including the control, NaNO_3 concentration was adjusted to 3.2 μM to eliminate differences in NO_3^- concentration caused by uranium addition. Exposed and control media were renewed every day before food addition.

Concentrations of U, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} and Na^+ were monitored during daphnid exposure. To do so, samples of freshly renewed medium (before food addition) and samples of medium after 24 h-exposure were collected every day and 3 times a week respectively. Samples were acidified with 2% (v/v) of HNO_3 69% (trace metal analysis grade) and quantified by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) using an Optima 4300DV (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) for the uranium concentration of 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (with a detection limit of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) and by inductively coupled plasma-mass emission spectrometry (ICP-MS) using a 7500Cx (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) for lower uranium concentrations (with a detection limit of 0.11 ng L^{-1}).

Concentration of uranium in freshly renewed medium remained within 8% of nominal concentrations. Organisms were exposed in 1-L polycarbonate bottles. Bottles were pre-exposed with uranium solution at each exposure concentration for a week. This procedure reduces uranium loss due to adsorption on bottle walls (15% loss after 24 h in this study, against 30% in Massarin et al., 2010). Relative loss in uranium after 24 h increased with decreasing concentration, with uranium reduction ranging from 23% (at 2 $\mu\text{g L}^{-1}$) to 5% (at 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) of initial concentration.

2.3. Experimental design

Two successive generations (F0 and F1) were exposed in each exposure condition. Neonates produced by F1 were referred to as F2. Each generation was composed of nine 1-L bottles containing 20 daphnids each. Three bottles were used to monitor daily survival and neonate production. Three bottles were used to measure body size, dry mass and uranium bioaccumulation upon deposition of broods 1, 3 and 5. Three bottles were used to collect samples for DNA extractions and RAPD analyses in neonates and adults upon release of broods 1 and 5. All generations were initiated with freshly deposited eggs (<24 h) from brood 5. Three exposure regimes were performed as below (Fig. 1):

- (A) Continuous exposure: Embryo stages were exposed, while broods were incubated in their mother brood chambers, implying that a generation P (parent of F0) was exposed for 3 days from deposition to hatching of brood 5 at the start of experiment. Freshly hatched neonates were collected, exposed at the same concentration as their mothers and monitored for 21 days, until release of brood 5.
- (B) Post-hatching exposure: Uranium exposure was achieved from hatching of neonates to deposition of brood 5 while F0 and F1 embryo stages were not exposed (females incubating brood 5 were kept in a clean medium).
- (C) Embryo exposure: Uranium exposure was limited to embryo stage while F0 and F1 daphnids were returned to a clean medium upon hatching (females incubating brood 5 were maintained in a contaminated medium).

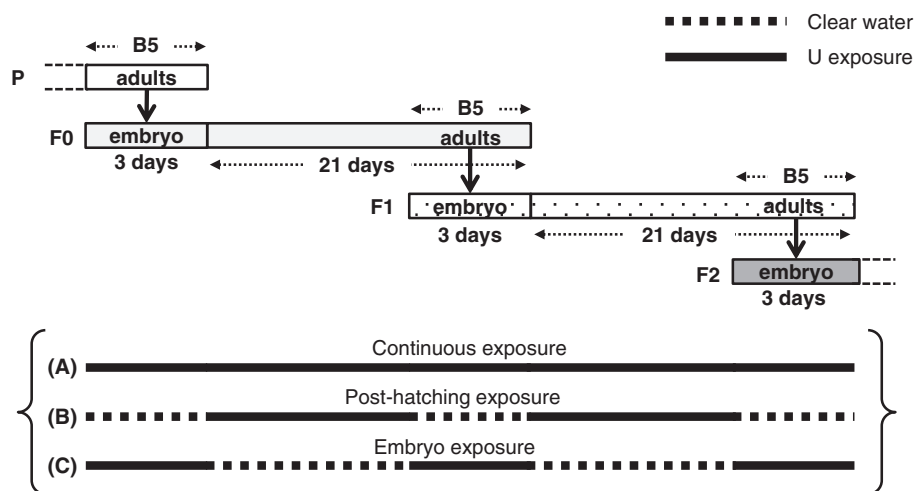


Fig. 1. Experimental designs.

2.4. Body length and dry mass

For each condition, body length and dry mass were measured in neonates (<24 h) at the beginning of each generation and upon deposition of broods 1, 3, and 5. Body length was measured under a binocular microscope with a micrometer, from apex of the helmet to the base of the apical spine. Eggs were carefully separated from females with tweezers and counted. Neonates, daphnids and eggs (entire brood) were rinsed with ultra-pure water and transferred into separated pre-weighed aluminium pans. Samples were dried for 48 h at 60 °C, cooled in a desiccator and weighed with an ultra-microbalance SE2 Sartorius (Gottingen, Germany) at a precision of 0.1 µg. Each measurement was repeated in five replicates, each composed of 5 neonates or individual adult daphnids or broods.

2.5. Bioaccumulation

Uranium bioaccumulation in daphnids and eggs was analysed using samples of daphnids, eggs and neonates, previously used for body length and dry mass. Dry samples were mineralized in 1 mL of HNO₃ (69%) and 1 mL of H₂O₂ (30%) successively. After each addition, samples were heated on a sand bath (90 °C) until evaporated. Mineralised samples were dissolved in 5 mL of HNO₃ 2% (v/v) in UHQ water and analysed by ICP-MS. Internal uranium concentration was expressed per dry mass (µg).

2.6. DNA isolation

Daphnid DNA was extracted using a phenol/chloroform based method (Atienzar et al., 1999). Four replicate samples (each composed of 4 adult daphnids or 150–200 neonates) were extracted per time and per condition. Samples were homogenized in 400 µL of lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH8, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS and 2% β-mercaptoethanol) followed by RNase treatment (40 µg, 60 °C for 1 h). The DNA was extracted after addition of 400 µL of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:25:1). Each sample was shaken on a vortex and centrifuged (5 min, 20 °C at maximum speed). The aqueous phase, containing DNA, was collected. DNA was precipitated by two volumes of ethanol in the presence of 0.27 M sodium acetate, incubated at –80 °C for 30 min and centrifuged (15 min, 4 °C at maximum speed). After supernatant was removed, precipitated DNA was stored in 1 mL of 70% ethanol. Samples were kept at –20 °C until RAPD analyses. Before PCR analysis, samples were centrifuged (4 °C, 10 min at maximum

speed). Ethanol was removed and DNA pellets were dried before addition of Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM and EDTA 1 mM). DNA quality was checked by chromatography on 1% agarose gel confirming DNA samples of high molecular mass.

2.7. Selection of discriminative PCR probes

A preliminary RAPD analysis was performed on two genomic DNA pools extracted from control neonate and adult samples. This analysis aimed to test two dilutions (10- and 20-fold) and to select 2 decamer oligonucleotides out of 7, including OPA9 (5'-GGTAACGCC-3'), OPB5 (5'-TGCGCCCTC-3'), OPB6 (5'-TGTCTGCCC-3'), OPB7 (5'-GGTGACGCA G-3'), OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3'), OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3') and OPB12 (5'-CCTTGACGCA-3'), to be used as primers in future RAPD analyses. Oligonucleotides were obtained from Sigma-Proligo (Missouri, USA). This preliminary test permitted exclusion of the OPB5, OPB6 and OPB12 primers with which DNA was not sufficiently amplified or excessively amplified (Appendices Table 2). Among the potentially useful primers, we selected OPA9 and OPB10 as RAPD-PCR probes. A twenty-fold dilution was also preferred to avoid a too elevated DNA quantity and salt bias.

2.8. Quantitative PCR and melting temperature curve analysis

Real time quantitative PCR-RAPD was used to quantify the threshold cycle (C_t), namely the mean number of PCR cycles which was necessary to enter into exponential phase of DNA amplification. The value of C_t decreases with increasing number of hybridization sites. The amount and composition of PCR products depend both on the number of hybridization sites and on their relative location in the amplified DNA. Each PCR product can be characterized by its melting temperature (T_m). The analysis of melting temperature curves and changes in C_t values reflect the occurrence of DNA damage (resulting in either losses or creations of hybridization sites).

Real time RAPD-PCR was performed using a Roche LightCycler apparatus (Meylan, France). PCRs were achieved in capillaries filled with 16 µL of PCR mix (1 µL of a Roche solution containing dNTPs, DNA polymerase and SyberGreen fluorescent dye, 3.2 µL of 25 mM MgCl₂ and 11.8 µL of PCR-grade water), 2 µL of genomic DNA and 2 µL of primers (6 µM). Thermal cycles included the following sequence: a warming step of 10 min at 95 °C to denature DNA, 50 amplification cycles of 5 s at 95 °C, 5 s at 50 °C and 30 s at 72 °C. Dissociation curves were obtained by monitoring the decrease in SyberGreen fluorescence during

Table 1

Equations and parameters for daphnid somatic growth (body length) and associated changes in egg dry mass (Massarin et al., 2010).

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

a gradual heating sequence from 65 to 95 °C (0.05 °C/s). A cooling step was finally achieved to lower temperature to 40 °C.

Dissociation curves were analysed using the Roche LightCycler software 3.5. To do so, melting temperatures (T_m) of all PCR peaks were listed in 12 temperature classes ranging from 74 to 92 °C. The frequency of occurrence of melting peaks in each temperature class was calculated and compared between control and exposed daphnids.

A reference PCR was performed with each genomic DNA sample in order to quantify the number of hybridization sites per genome unit of a RAPD probe. Reference PCR were achieved using the oligonucleotides ENO5 (5'-CTCATCAGCACTGCCATCG-3') and ENO3 (5'-CAAGTAGGTA GCCGGTCAG-3') as specific probes of the enolase gene, each probe matching 2 introns flanking an exon (accession number to Genbank: JN994253). Dissociation curves indicated that two PCR products were obtained with ENO3 and ENO5. Therefore, the number of hybridization sites was calculated using the formula $2^{(Ct_{ENO} - Ct_{probe} + 3)}$ where Ct_{ENO}

and Ct_{probe} are threshold cycles observed with the primers of the enolase gene and a PCR probe (OPA9 or OPB10), respectively.

2.9. Statistical analyses

Effects of uranium on body length and egg dry mass were tested after accounting for the coincident influence of time and/or body length, using relationships reported in Table 1. Statistical analyses were performed with the R software (R. Development Core Team, 2012). Linear and non-linear models were adjusted using the *lm* and *glm* routines. Curves associated to different uranium concentrations were simultaneously compared to control with the Fisher test in case of normality, and with the Wilcoxon test otherwise, by applying the Holm sequential procedure.

Concerning DNA damage, threshold cycles were compared with Wilcoxon tests. On melting temperature curves, the association between number of peaks and uranium concentration in each temperature class was tested with contingency table tests. Due to small sample size ($n < 5$), the test statistic was simulated by Monte Carlo instead of the classical chi-square.

3. Results

3.1. Uranium bioaccumulation in daphnids and eggs

Uranium burdens in daphnids and eggs (Fig. 2) increased significantly with increasing uranium concentration (from a max of $6.6 \pm 1.3 \text{ ng mg}^{-1}$ at the concentration of $2 \mu g \text{ L}^{-1}$ to a max of $111.2 \pm 20.1 \text{ ng mg}^{-1}$ at the concentration of $50 \mu g \text{ L}^{-1}$).

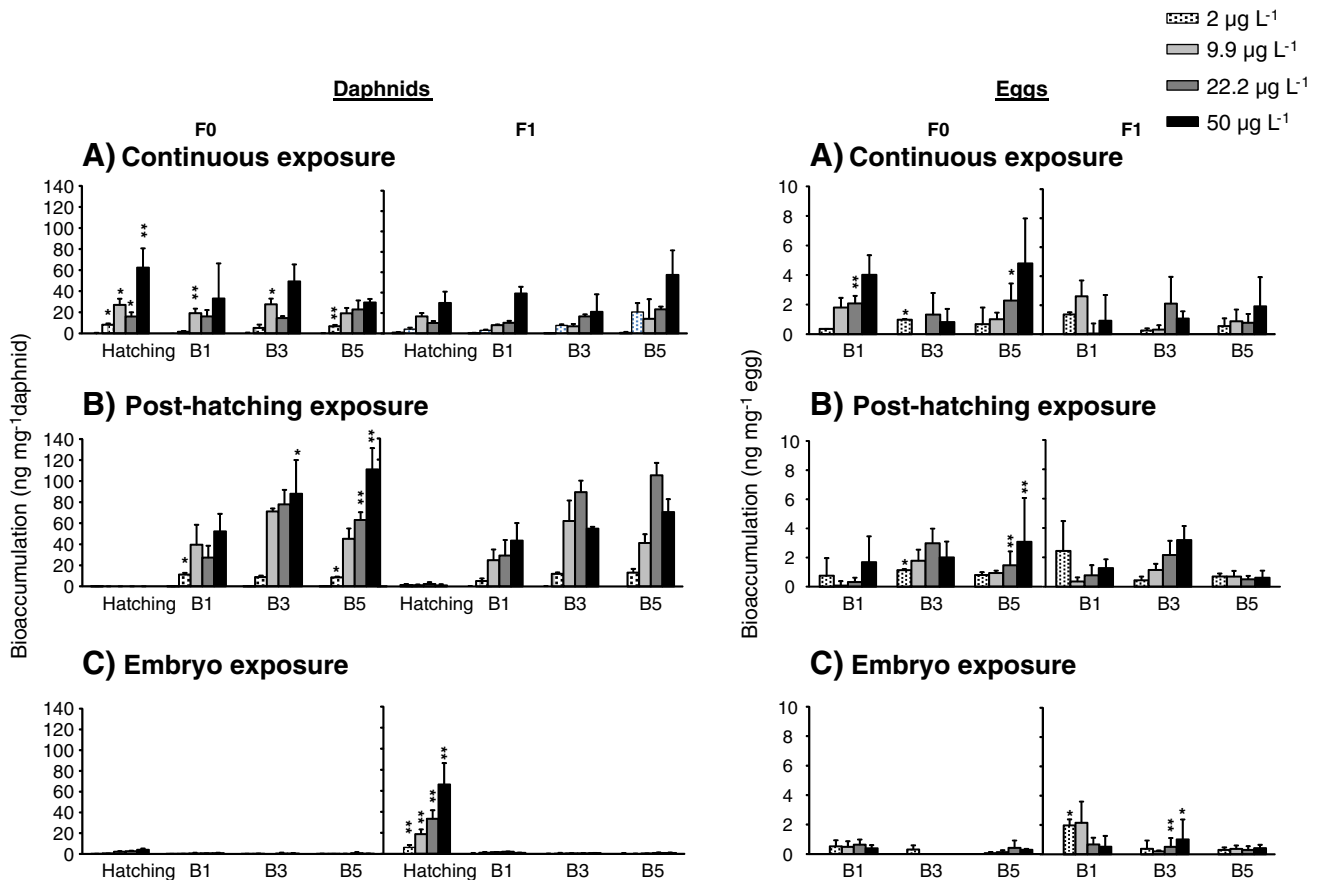


Fig. 2. Uranium bioaccumulation (ng mg^{-1} dry mass) in daphnids and their eggs at hatching and release of broods 1, 3 and 5 (B1, B3 and B5) and at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1). Results are mean \pm SD ($n = 5$). Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, differences between generations F0 and F1 at a same concentration and sampling time.

(A and B) *Continuous and post-hatching exposures*

Variations in uranium bioaccumulation in daphnids did not show any simple coherent trend with exposure time. Significant differences between generations F0 and F1 (as compared pairwise at hatching and depositions of broods 1, 3 and 5) did not support the assumption that body burden was greater in generation F1 than in generation F0. The observation of uranium in eggs suggested that a transfer of uranium might occur from daphnids to their eggs or that the kinetics of uranium accumulation was rapid in freshly deposited eggs.

During continuous exposure, uranium bioaccumulation in freshly deposited B5 eggs (for example $4.8 \pm 3.0 \text{ ng mg}^{-1}$ at $50 \mu\text{g L}^{-1}$) continued increasing till hatching ($29.4 \pm 3.3 \text{ ng mg}^{-1}$ at the same concentration) whereas it strongly decreased until hatching when egg-carrying daphnids were returned to a clean medium (from 3.0 to $1.0 \pm 1.0 \text{ ng mg}^{-1}$ at the same concentration). This suggested that the detection of uranium in freshly hatched neonates was strongly dependent on uranium exposure during embryo development. This hypothesis was further supported by the observation that neonates released in F1 contained smaller concentrations of uranium during post-hatching exposure than during embryo exposure ($66.0 \pm 20.3 \text{ ng mg}^{-1}$ at $50 \mu\text{g L}^{-1}$).

(C) *Embryo exposure*

A greater uranium bioaccumulation was observed in freshly hatched neonates in generation F1 than in generation F0 (for example respectively 66.1 ± 20.0 and $4.1 \pm 1.1 \text{ ng mg}^{-1}$ at the concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$). In this experiment, uranium concentrations strongly decreased after daphnids were returned to a clean medium ($1.0 \pm 0.5 \text{ ng mg}^{-1}$ at deposition of brood 1 at $50 \mu\text{g L}^{-1}$), likely due to excretion and/or dilution by somatic growth.

Uranium transfer to freshly deposited eggs was very slight and bioaccumulation did not significantly differ among exposure concentrations (below $2.0 \pm 0.4 \text{ ng mg}^{-1}$ independent of the concentration).

3.2. *Survival*

Mortality of daphnids in generation F0 was very low, never exceeding 10% and did not significantly increase with uranium concentration (Appendices Fig. 1). In generation F1, a slight increase in mortality was observed during continuous and post-hatching exposures (with a maximum of 14% and 12% on day 23 at $50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and was not statistically significant.

3.3. *Effects on somatic growth and reproduction*

Our results confirmed that body length decreased with increasing uranium concentration with stronger consequences for reproduction during continuous exposure (A) and slighter consequences for reproduction in other exposure regimes (B and C). Effects increased across generations during continuous and post-hatching exposures (A and B), but not during embryo exposure (C). No delay in neonate release was induced in any exposure regime at the tested DU concentrations.

(A) *Continuous exposure*

Effect on body length increased across generations (Table 2A, Fig. 3A) and were associated with significant reductions in maximum body length (L_m) at concentrations $\geq 22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ in F0 (10% reduction) and $\geq 9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1 (9% reduction), length at birth (L_b) at $\geq 9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1 and in Von Bertalanffy growth rate (r_B) at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1. Effect on reproduction included reductions in both fecundity and dry mass per egg (Figs. 4A and 5A). Fecundity was significantly reduced as early as brood 1 in

Table 2

Parameters for daphnid somatic growth (body length) and cumulated fecundity (broods 1 to 5) measured at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1) during experiments (A) continuous exposure, (B) post-hatching exposure and (C) embryo exposure only. Statistics: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Generation	[U] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Body length				Cumulated fecundity		Egg dry mass			
		L_b (mm)	L_m (mm)	r_B (j^{-1})	p	Mean	p	β ($\mu\text{g mm}^{-1}$)	ω (μg)	p	
A	F0	0	0.960	4.061	0.172	65.321		4.909	-7.483		
		2	0.956	4.144	0.146	64.977		2.482	-0.527	**	
		9.9	0.926	3.957	0.180	54.701	*	3.293	-2.725	*	
		22.2	0.949	3.678	0.176	58.526	*	1.405	3.650	**	
		50	0.955	3.768	0.153	52.344	*	1.715	1.984	*	
	F1	0	1.015	4.209	0.186	79.145		3.248	-2.569		
		2	1.027	4.107	0.214	71.078	*	5.855	-12.268		
		9.9	0.989	3.863	0.224	63.151	*	4.982	-8.515		
		22.2	0.914	3.799	0.224	65.352	*	2.413	-0.938		
		50	0.872	3.902	0.134	55.674	*	3.510	-3.583		
	B	F0	0	1.003	3.910	0.235	60.055		3.906	-5.092	
			2	1.011	3.864	0.219	54.975		4.750	-7.792	
			9.9	1.005	3.874	0.187	59.803	***	5.890	-11.561	
			22.2	1.004	3.561	0.256	62.432	***	6.075	-11.409	
			50	1.012	3.564	0.237	49.661	***	2.359	-1.059	
F1		0	1.038	3.879	0.232	59.916		5.094	-9.094		
		2	1.024	3.886	0.224	52.207		6.310	-13.025		
		9.9	1.010	3.896	0.226	56.215		6.999	-15.860		
		22.2	1.018	3.774	0.190	55.272	***	6.454	-13.337		
		50	0.997	3.061	0.424	27.201	***	1.331	3.099		
C		F0	0	1.003	3.910	0.235	60.055		3.906	-5.092	
			2	1.014	3.797	0.242	64.427		4.529	-7.927	
			9.9	0.988	3.748	0.224	59.536	***	4.279	-6.120	
			22.2	0.985	3.679	0.219	45.989	*	4.320	-6.550	
			50	1.006	3.692	0.175	48.488	*	4.056	-5.420	
	F1	0	1.038	3.879	0.232	59.916		5.094	-9.094		
		2	1.008	3.871	0.218	58.227		4.220	-5.863		
		9.9	1.012	3.836	0.201	46.654	*	4.985	-8.708		
		22.2	0.996	3.923	0.175	47.832	*	4.303	-6.162		
		50	0.945	3.765	0.156	48.518	*	5.691	-10.073		

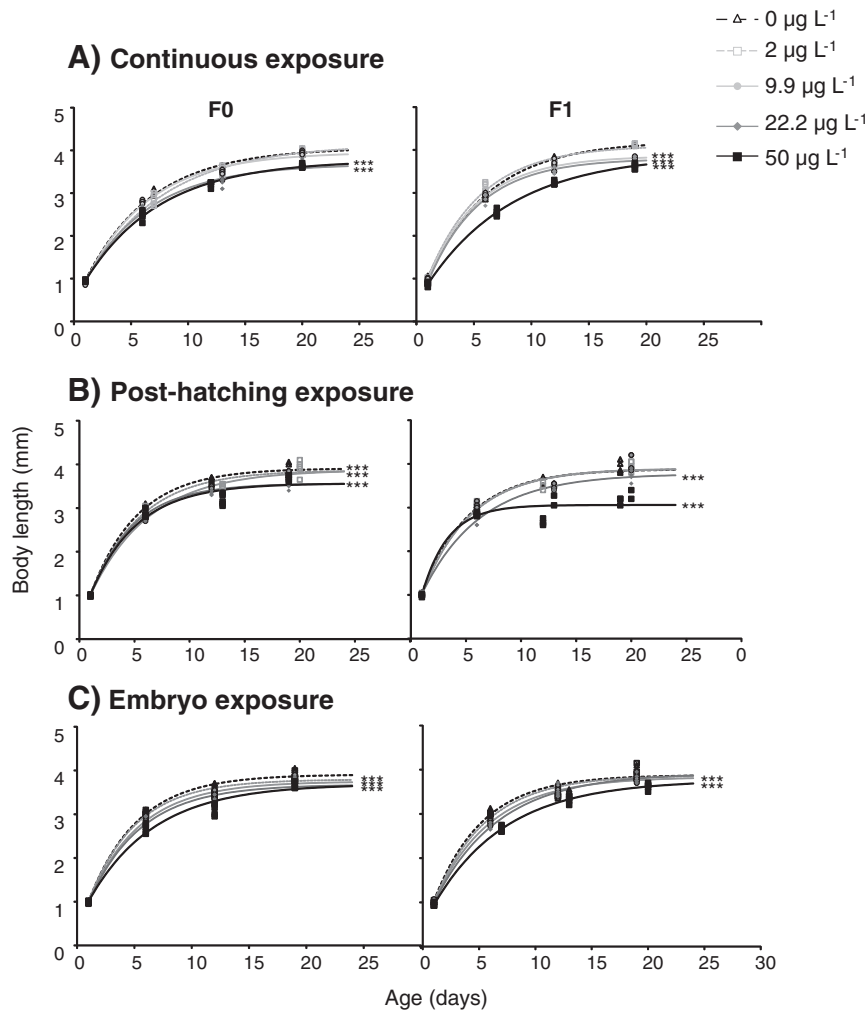


Fig. 3. Body length (mm) in daphnids exposed to different uranium concentrations over two successive generations (F0 and F1). Results are individual body length measurements ($n = 5$) and lines correspond to fits with the von Bertalanffy model. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

generation F0 at $50 \mu\text{g L}^{-1}$. At this concentration, reduction in cumulated fecundity was stronger in generation F1 than in generation F0 (respectively 30% and 20% compared to the control at brood 5). Effects became significant at a lower concentration in generation F1 ($2 \mu\text{g L}^{-1}$ at release of brood 3) than in generation F0 ($9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ at release of brood 2). Dry mass per egg increased linearly with mother body length. As a consequence, reduction in body length resulted in decreasing mass invested per egg with increasing uranium concentration. Thus, continuously exposed daphnids invested a greater mass in reproduction at $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ than at $22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (respectively 405 and 302 μg in generation F0 and 377 and 331 μg in generation F1 cumulated over 5 broods) although fecundity appeared greater at $22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ than at $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$.

(B) Post-hatching exposure

Effect on body length increased across generations when exposure was achieved from hatching to deposition of brood 5 (Table 2B, Fig. 3B). The effect was mainly associated with a reduced maximum body length L_m (9% in generation F0 and 22% in generation F1 at $50 \mu\text{g L}^{-1}$) whereas no effect on length at birth (L_b) and Von Bertalanffy growth rate (r_B) was detected in this exposure regime. Cumulated fecundity was significantly affected (55% compared to the control at brood 5) only at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1 (Fig. 4B). Dry mass per egg was also reduced at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ but the difference was not significant compared to the control, due to a great individual variability (Fig. 5B).

(C) Embryo exposure

When exposure was limited to the embryo stage, effects on body length did not increase across generations (significant effects at $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in both F0 and F1) and were associated with a reduction in maximum body length L_m in generation F0 and in Von Bertalanffy growth rate r_B in generation F1 (Table 2C, Fig. 3C). Reductions in fecundity were significant at a concentration of $22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ in F0 and $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1 (Fig. 4C). However, effects did not increase in severity between F0 and F1 at 22.2 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Dry mass per egg was not affected in this exposure regime (Fig. 5C).

3.4. Genotoxic effects

(A) Continuous exposure

When daphnids were continuously exposed, RAPD-PCR results obtained with the primer OPA9 reflected an increase in DNA alterations over the course of each generation and across generations (Tables 3A and 4A). According to melting temperature curves, significant DNA alterations in generation F0 were detected at a concentration of $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ at time of hatching and in adults on release of brood 5. Numbers of hybridization sites allowed detection of a significant change only at $22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ in adults on release of brood 5. Significant DNA damage was observed at a lower concentration ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) in generation F1 and neonates F2 than in generation F0, according to both

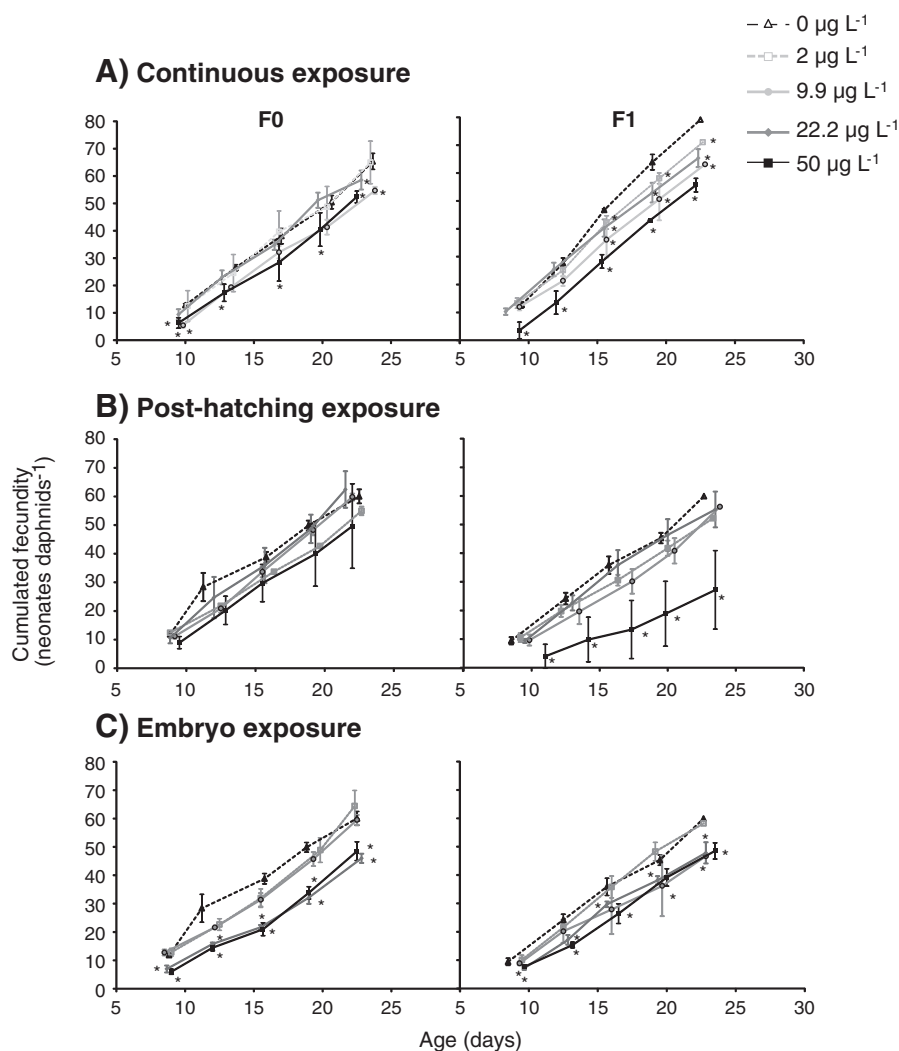


Fig. 4. Cumulated fecundity in daphnids exposed to different uranium concentrations over two successive generations (F0 and F1). Results are (mean \pm SD; $n = 3$). Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

numbers of hybridization sites and melting temperature curves. In generations F1 and F2, neonates showed significant genotoxic effects at a lower concentration in brood 5 ($2 \mu\text{g L}^{-1}$ in both generation) than in brood 1 ($9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in generation F0 only). Similar results were reported with RAPD-PCR performed with OPB10 probe (Appendices Tables 3A and 4A). In generation F0, a significant DNA alteration was detected as late as release of brood 5 and a concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ according to numbers of hybridization sites. Compared to generation F0, significant DNA damage arose earlier (at time of hatching) and at a lower concentration ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) in generation F1 and neonates F2, according to number of hybridization sites. The OPB10 probe revealed fewer significant DNA alterations in daphnids and neonates than the OPA9 probe.

(B) Post-hatching exposure

RAPD-PCR results obtained with OPA9 reflected an increase in DNA alterations over the course of each generation and across generations but this increase was not as strong as during continuous exposure. Considering both numbers of hybridization sites and melting temperature curves, DNA alterations in daphnids exposed from hatching became significant at a higher concentration ($22.2 \mu\text{g L}^{-1}$ in F0 and $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in F1 at release of brood 1) than in continuously exposed daphnids. DNA damage in neonates F2 showed significant changes in C_t at $2 \mu\text{g L}^{-1}$ in this exposure regime (Tables 3B and 4B). In generation F1, damage

were detected at a higher concentration in adults ($9.9 \mu\text{g L}^{-1}$) than in their neonates ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) suggesting a difference in repair efficiency. The OPB10 probe confirmed similar results with an increase in effect severity across generation in this exposure regime (Appendices Tables 3B and 4B) with once again, effects revealed only in neonates F1.

(C) Embryo exposure

DNA damage when exposure was limited to the embryo stage decreased across generations (Tables 3C and 4C). In fact, DNA alterations with OPA9 probe were detected in generation F0 at $2 \mu\text{g L}^{-1}$ as early as hatching and remained significant until release of brood 5. In generation F1, DNA alterations were detected at $2 \mu\text{g L}^{-1}$ in neonates from brood 1 and $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in neonates from brood 5. DNA alterations were not observed any longer in adult F1, and were detected in F2 neonates from brood 1 only. This decrease was reflected through both numbers of hybridization sites and melting temperature curves. The OPB10 probe confirmed similar results (Appendices Tables 3C and 4C).

4. Discussion

4.1. Accumulation and transmission of DNA damage across generations

A major objective of this study was to test whether DNA damage are induced by uranium exposure and transmitted from females to their

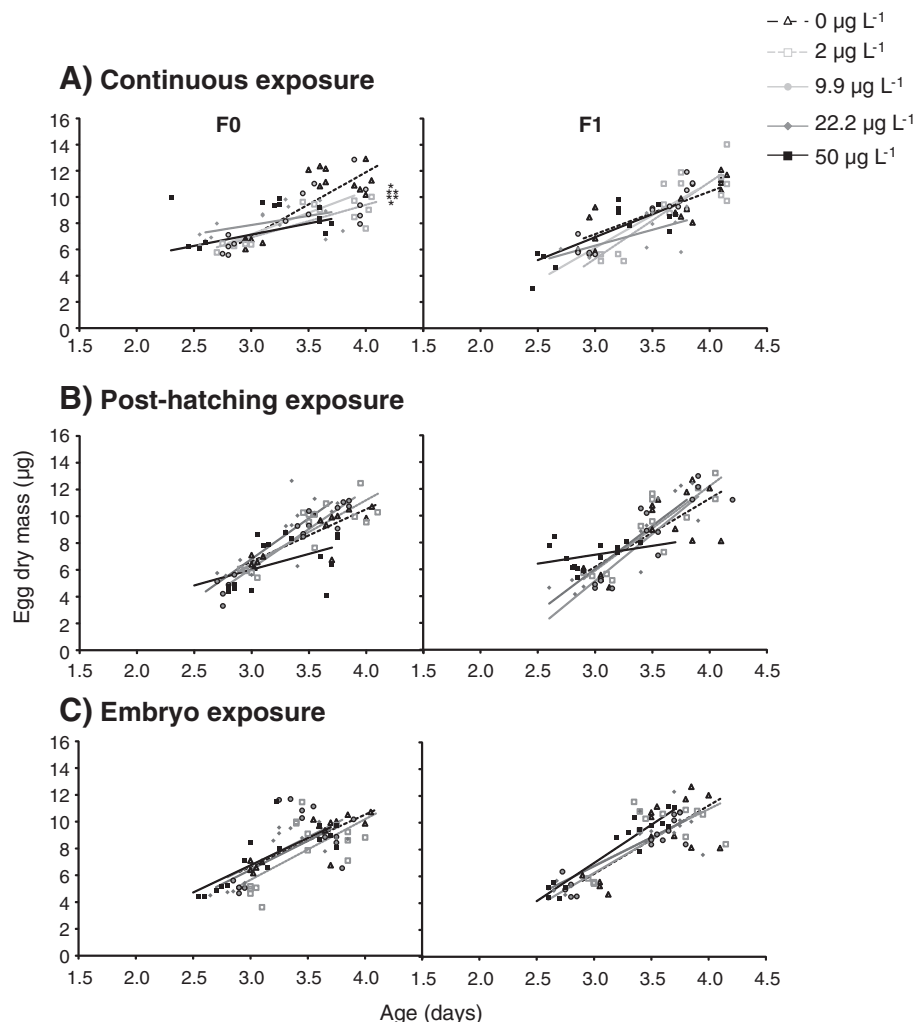


Fig. 5. Dry mass per egg (μg) in relation to body length in daphnids exposed to different uranium concentrations over two successive generations (F0 and F1). Results are individual measurements of egg dry mass ($n = 5$) and lines correspond to linear regressions. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

eggs across generations. This hypothesis was confirmed in two of our three exposure regimes (Table 5). In fact, during continuous or post-hatching exposures, RAPD analyses showed an overall accumulation and transmission of DNA damage across generations. This increase was demonstrated by the lower concentrations at which DNA alterations became significant upon hatching in generation F1 than in F0. In contrast, when exposure was limited to the embryo stage, DNA damage gradually became undetectable over the course of F1.

Observations during continuous and post-hatching exposures indicated two important points. First in generation F0, DNA damage observed in freshly hatched neonates could only result from a direct exposure to uranium in the female brood pouches during incubation. In fact, no DNA damage from females could be transmitted to eggs in the first generation because exposure was started after egg deposition. This observation is a proof that egg membranes in the brood chamber are permeable to environmental pollutants such as uranium due to active exchange of contaminated medium organised by daphnids to support embryonic oxygen demand (Kobayashi et al., 1987; Abe et al., 2001). Second, the fact that DNA alterations were observed at a lower concentration in neonates F1 and F2 than in their parents suggested that molecular damages observed at hatching time resulted from two processes: a direct exposure of embryo stage and the transmission of DNA damage having affected the germinal cells during exposure of females in F0 and F1. The fact that DNA damage were detected at a

lower concentration in neonates from brood 5 than in neonates from in brood 1 during a continuous exposure also supports the assumption that DNA alterations might progressively increase over time in exposed females before being transmitted to the progeny. A similar observation using the comet assay was reported in the zebrafish *Danio rerio* in which DNA alterations were shown to increase between days 5 and 20 of an exposure to uranium (Barillet et al., 2011). However, it is important to note that mutation processes might differ between clonally reproducing daphnids and sexually reproducing fish. A transmission of DNA damage from parents to offspring was demonstrated during an exposure of *Daphnia magna* to benzo(a)pyrene (Atienzar and Jha, 2004). Transmitted modifications of genetic material might include mutations, genomic rearrangements or base methylations. The authors also showed that a fraction of changes in the parental RAPD profile were not visible in offspring. This observation suggested that modifications in parental DNA corresponded to genotoxic events which cannot be inherited, such as DNA alterations occurring in somatic cells or adducts (covalently bonded toxicant molecules to DNA).

DNA damage showed a decrease across generations when exposure was limited to the embryo stage, suggesting that some degree of reparation might occur after daphnids were returned to a clean medium. Similar conclusions on the capacity of daphnids to repair their DNA after an exposure to benzo(a)pyrene and a depuration were previously drawn in Atienzar and Jha (2004).

Table 3

Number of hybridization sites with RAPD probe OPA9 on daphnid genomic DNA sampled from adults and neonates at release of broods 1 and 5 (B1 and B5) and at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1) during experiments (A) continuous exposure, (B) post-hatching exposure and (C) embryo exposure only. Results are mean \pm SEM (multiplied by 10^2 to facilitate reading). Statistics: * $p < 0.05$, $n = 4$. P corresponds to parents of F0, exposed during egg incubation at the beginning of experiments.

A	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(9.59 \pm 3.72)	(11.74 \pm 2.86)	(5.05 \pm 2.10)	(8.94 \pm 2.48)	(21.99 \pm 4.65)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(9.62 \pm 1.97)	(9.13 \pm 1.87)	(4.43 \pm 0.96)	(67.08 \pm 3.74) *	(5.04 \pm 3.38) *
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(21.25 \pm 8.00)	(10.12 \pm 4.67)	(10.33 \pm 1.62)	(19.71 \pm 0.72)	(4.85 \pm 2.64) *
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(8.80 \pm 0.22)	(34.22 \pm 18.64)	(18.92 \pm 5.56) *	(10.46 \pm 5.01)	(8.32 \pm 5.51)
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(11.35 \pm 2.06)	(35.10 \pm 16.10)	(13.25 \pm 4.61)	(1.94 \pm 0.66)	(7.83 \pm 1.88) *
	Neonates	F0	F1	F2		
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(10.35 \pm 1.77)	(8.12 \pm 2.59)	(1.36 \pm 0.21)	(16.02 \pm 3.28)	(30.24 \pm 21.61)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7.41 \pm 1.78)	(8.52 \pm 2.21)	(4.45 \pm 1.35) *	(10.94 \pm 2.09)	(11.64 \pm 0.69) *
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(5.11 \pm 0.37)	(20.46 \pm 8.46) *	(12.44 \pm 4.10) *	(5.81 \pm 0.04)	(4.11 \pm 0.22) *
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(3.99 \pm 1.17)	(2.34 \pm 2.19)	(1.05 \pm 2.10)	(4.02 \pm 0.75)	(1.29 \pm 0.90) *
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(6.02 \pm 0.38)	(2.18 \pm 0.42) *	(6.82 \pm 3.13) *	(7.87 \pm 1.41)	(1.44 \pm 1.15)
B	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$		(15.45 \pm 2.93)	(18.68 \pm 6.04)	(4.02 \pm 1.12)	(1.45 \pm 0.38)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(17.86 \pm 3.87)	(6.74 \pm 0.92)	(19.40 \pm 4.96)	(2.98 \pm 0.69)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$		(19.53 \pm 4.32)	(7.99 \pm 3.76)	(0.82 \pm 0.19) *	(2.56 \pm 0.70)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(6.90 \pm 0.61) *	(2.28 \pm 1.73) *	(8.51 \pm 0.96) *	(14.51 \pm 2.46) *
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$		(18.86 \pm 6.11)	(3.93 \pm 1.40) *	(3.25 \pm 2.27)	(40.00 \pm 4.50)
	Neonates	F0	F1	F2		
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(23.84 \pm 9.63)	(18.70 \pm 4.31)	(6.74 \pm 0.92)	(8.06 \pm 4.72)	(0.82 \pm 0.42)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(8.17 \pm 1.00)	(34.42 \pm 14.76)	(0.29 \pm 0.09) *	(3.30 \pm 0.75) *
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$		(4.88 \pm 1.97)	(7.34 \pm 3.07)	(1.11 \pm 0.77)	(3.65 \pm 1.76)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(2.96 \pm 1.29)	(2.49 \pm 1.13) *	(3.86 \pm 1.05)	(13.76 \pm 2.69) *
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$		(2.97 \pm 1.37)	(1.71 \pm 0.49) *	(1.42 \pm 0.65)	(0.16 \pm 0.03)
C	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(23.79 \pm 6.34)	(15.45 \pm 2.93)	(18.68 \pm 6.04)	(4.02 \pm 1.12)	(1.45 \pm 0.38)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0.14 \pm 0.04) *	(70.80 \pm 26.25)	(4.24 \pm 0.41) *	(8.42 \pm 2.05)	(0.48 \pm 0.19)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0.05 \pm 0.01) *	(0.15 \pm 0.08) *	(7.95 \pm 1.51)	(8.04 \pm 2.64)	(1.22 \pm 0.44)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0.10 \pm 0.05) *	(1.09 \pm 0.99) *	(7.77 \pm 2.15)	(2.18 \pm 1.27)	(3.51 \pm 1.32)
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(16.00 \pm 1.60)	(5.00 \pm 1.49) *	(0.75 \pm 0.16) *	(7.00 \pm 2.92)	(2.13 \pm 0.46)
	Neonates	F0	F1	F2		
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(23.84 \pm 9.63)	(18.70 \pm 4.31)	(6.74 \pm 0.92)	(1.37 \pm 0.27)	(0.82 \pm 0.42)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0.33 \pm 0.16) *	(3.00 \pm 2.94) *	(6.18 \pm 0.77)	(0.25 \pm 0.17)	(1.60 \pm 1.15)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0.03 \pm 0.01) *	(0.05 \pm 0.01) *	(2.95 \pm 0.33) *	(0.39 \pm 0.12) *	(1.05 \pm 0.37)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7.40 \pm 3.37)	(0.67 \pm 0.27) *	(7.72 \pm 1.91)	(3.96 \pm 2.24)	(1.57 \pm 0.28)
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(63.12 \pm 15.30)	(2.93 \pm 0.53) *	(0.34 \pm 0.09) *	(0.77 \pm 0.31)	(6.44 \pm 3.82)

4.2. Transgenerational increase in effects on life history and influence of embryo exposure

Another important issue in our study was to investigate the role and sensitivity of specific life stages (in particular that of the embryo stage) in the increase in effect severity across generations. We tested several hypotheses including (i) whether uranium effects on life history varied in severity between generations only due to differences in embryo exposure and (ii) whether effects still increased from F0 to F1, as reported in Massarin et al. (2010) when both generations were exposed during the same life stages (including or excluding the embryo stage).

These hypotheses were addressed two ways. First, looking at growth and reproduction in daphnids when only embryo stage was exposed demonstrated that effects remained visible in adults returned to a clean medium. However, increase in severity across generations was not observed or remained very slight. Second, comparing reductions in growth and reproduction when daphnids were exposed either continuously including their embryo stage (A) or only after hatching (B) showed that effect intensity significantly increased across generations in both exposure regimes. Furthermore, results suggested that

effects were stronger when embryos were exposed than when they were not. These observations imply that the increase in effect severity reported by Massarin et al. (2010) could not solely be imputable to the difference in embryo exposure between generations F0 and F1. Reduction in fecundity in F0 exposed after hatching was in good agreement among our study, Zeman et al. (2008) and Massarin et al. (2010). Finally, the observation that daphnid sensitivity to uranium was greater when daphnids were exposed during their embryo stage was very consistent with the previous conclusion that direct uranium exposure of eggs during embryogenesis caused significant DNA damage in freshly hatched neonates.

Regarding uranium lethal effects, daphnid survival in the present study was only reduced in the generation F1 at 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ whereas no significant reduction was detected in the generation F0. These results were similar to those reported in Massarin et al. (2010) where mortality increased only in the generation F1 at concentrations $\geq 25 \mu\text{g L}^{-1}$. The comparison between studies suggests that exposure during the embryo stage might have only slight consequences for survival, because uranium needs to accumulate in organisms to induce lethal effects, a process which may take several generations.

Table 4C

Embryo exposure: Frequency of PCR products in relation to melting temperature (per temperature class) with RAPD probe OPA9 on daphnid genomic DNA from adults and neonates at release of broods 1 and 5 (B1 and B5) and at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1). Statistics: * $p < 0.05$, $n = 4$. P corresponds to parents of F0, exposed during egg incubation at the beginning of experiment.

Temperature class (°C)	P					F0					F1										
	B5					B1					B5										
	[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$										
	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	
Adults																					
I1: [74–78]	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0
I2: [78–80]	0	0	0	0	0	0.25	0	0.25	0	0	0.25	0	0.5	1	0	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	
I3: [80–81]	0	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0.5	0.5	1*	0.25	0.25	0	0.25	0.75	
I4: [81–82]	1	1	0.5	0*	0*	0.5	0	1	1	0.5	1	1	0.25	0.25	0*	0.75	0.75	1	0.5	0	
I5: [82–83]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	
I6: [83–84]	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0
I7: [84–85]	0	1*	1*	0	0	0	0	0	0.75	0.75	0	0.5	0	0.25	0	0.75	1	1	0.75	0.5	
I8: [85–86]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I9: [86–87]	1	0*	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.75	1	1	1	1	1	0.25	1	1
I10: [87–88]	0	1*	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.75	0	0
I11: [88–89]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I12: [89–92]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neonates																					
I1: [74–78]	0	0	0.5	0	0	0	0	0.25	0	0	0.25	0	0	0.25	0	0	0	0.25	0	0	
I2: [78–80]	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0.25	0	0.25	0	0.75	0.25	0.25	0.25	0.75	0.5	0.5	0.75	
I3: [80–81]	0	0	0.25	0	0	0	0	1*	0	0	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	
I4: [81–82]	1	1	0.75	0*	0*	1	0*	1	1	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	0.75	0*	
I5: [82–83]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I6: [83–84]	0	0	0	0	0	0	0	0.75	0.25	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	
I7: [84–85]	0	0.67	1*	0	0	0	0	0.25	0.75	1*	0	0.5	0.25	0.75	0.25	1	0.25	1	0.75	1	
I8: [85–86]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	
I9: [86–87]	1	0*	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0*	0.5	1	0	1	1	
I10: [87–88]	0	1*	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0.5	0	1	0	0.75	
I11: [88–89]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I12: [89–92]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

4.3. Linking DNA damage to toxicity at the organism level

The third major objective of the study was to determine the concentration at which uranium effects become significant at the molecular and the organism levels. A recent study (Massarin et al., 2011) indicated that the no effect concentration (NEC) for uranium in *Daphnia magna* was $\leq 10 \mu\text{g L}^{-1}$, with the possibility that the value did not differ from zero

Table 5

Uranium concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) causing significant DNA damage in daphnids and their neonates and effects on growth and fecundity over two successive generations (F0 and F1) in the different exposure regimes. DNA samples were analyzed at hatching and release of broods 1 and 5 (B1 and B5).

Exposure regime	Endpoints	P	F0			F1		
			B5	Hatching	B1	B5	Hatching	B1
Continuous exposure	Daphnid DNA	9.9	9.9	NE	9.9	2	2	2
	Neonates DNA	9.9		9.9	2		NE	2
	Growth Fecundity		22.2			9.9		2
Post-hatching exposure	Daphnid DNA	n.d.	n.d.	22.2	22.2	22.2	9.9	9.9
	Neonates DNA	n.d.		22.2	22.2		2	2
	Growth Fecundity		9.9				22.2	50
Embryo exposure	Daphnid DNA	2	2	9.9	2	9.9	NE	NE
	Neonates DNA	2		2	9.9		9.9	NE
	Growth Fecundity		9.9			9.9		9.9

NE: no effect observed.

n.d.: not determined (because exposure was started at hatching in F0).

(i.e. that any uranium concentration might induce toxic effects). However, experimental tests on which the DEBtox analyses were based on did not include any concentration below $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Massarin et al., 2011). The present work showed that uranium concentration at which effects become significant at the molecular and the organism levels differed depending on exposure regime. Sensitivity to uranium was strongest when daphnids were continuously exposed with significant effects at $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

In all regimes, uranium effects became significant at a lower concentration and shorter exposure duration for DNA damage than for effects on growth and reproduction (Table 5). To the question of whether molecular markers may reflect effects on life history, our results answer that DNA damage (as detected at hatching with RAPD) might be an indicator of future effect on life history (on the number of offspring produced 15 days later). More obviously, the transmission of DNA damage observed across generations (continuous and post-hatching exposures) was reported along with an increase in effect severity on life history. Other authors previously reported that DNA damage was a more sensitive endpoint than growth or reproduction in *D. magna* exposed to benzo(a)pyrene and copper (Atienzar et al., 1999; Atienzar et al., 2001). A reduction in growth correlated with an inhibition of DNA replication in daphnids exposed to copper, suggesting that the level of DNA alterations might be important in the majority of cells (Atienzar et al., 2001). An apparent correlation was found between DNA strand breakage and reproduction endpoints such as fecundity and embryo abnormalities in the mosquitofish *Gambusia affinis* naturally exposed to various radionuclides (^{137}Cs , ^{90}Sr ,...) and chemical contaminants (Theodorakis et al. 1997).

Our study showed that DNA alterations could be observed in neonates but not in their parent daphnids in the generation F1 exposed during the embryo stage. A similar genomic instability was reported in daphnids exposed to benzo(a)pyrene where changes in RAPD profiles occurred in neonates but not in their parents (Atienzar and Jha, 2004).

The observation could possibly be attributable to a higher capacity of adults (7 days) to repair DNA alterations compared to neonates as suggested by the difference in transcription of genes involved in the DNA repair during a mixed exposure to benzo(a)pyrene and sodium dichromate (David et al., 2011).

In our experiment, we observed that DNA might appear significantly altered at lower but not at higher concentrations of uranium (for instances when exposed at the embryo stage, F1 adults at the time of brood 5 presented DNA damage for $2 \mu\text{g L}^{-1}$ but not for higher concentrations). This apparent absence of effects at higher exposure levels could result from more efficient DNA repair mechanisms induced only above a certain level of DNA alteration. This hypothesis was also proposed to explain the observation of stronger DNA alterations in daphnids from less polluted areas than those from a station polluted by metallurgic effluents (De Coen et al., 2006). Differential efficiency in DNA reparation depending on exposure level or among life stages might make it difficult to correlate the levels of DNA alteration and toxic stress in the exposed organisms. However, the apparent absence of DNA impairment (due to repair mechanisms) does not imply that metabolic stress is entirely eliminated. In fact, any compensatory process induced to cope with toxicity necessarily brings additional costs at the expense of other energy dependent processes and has ultimately consequences for survival, somatic growth and reproduction (Calow and Sibly, 1990).

The study of RAPD profiles is a valuable tool for qualitatively testing the occurrence of DNA alterations between exposed and control organisms. Our results underline the fact that the method requires the combined analyses of cycle thresholds and melting temperature curves. Examining changes in threshold cycles C_t alone might not be sufficient to conclude on the absence of DNA damage because some levels of exposure might induce a balanced loss and creation of hybridization sites. During continuous exposure, the apparent absence of effects on C_t at hatching time in generation F0 exposed to $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ was contradicted by the observed changes in composition of PCR products as suggested by melting temperature curves. Orieux et al. (2011) similarly concluded that complementary analyses of cycle thresholds and melting temperature curves were essential in a study of DNA alterations in zebrafish exposed to various metals.

5. Conclusions

This study provides evidence that DNA damage is accumulated and transmitted across two generations exposed to uranium, in parallel of an increase in sensitivity of organisms. DNA alterations and effects on life history are reported as early as the embryo stage and as low as $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Effects on life history are stronger if the embryo stage is exposed than if exposure is started in hatched neonates and remains visible above $9.9 \mu\text{g L}^{-1}$ after neonates are returned to a clean medium. Future perspectives include using DEBtox analyses to explain mechanistically the accumulation of damage and explore the metabolic mode of action involved in the development of the toxic response to depleted uranium over successive generations.

Acknowledgments

This research was supported by IRSN, as part of programme ENVIRHOM-Eco. We would like to thank the two anonymous reviewers who greatly contributed to improve the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.001>.

References

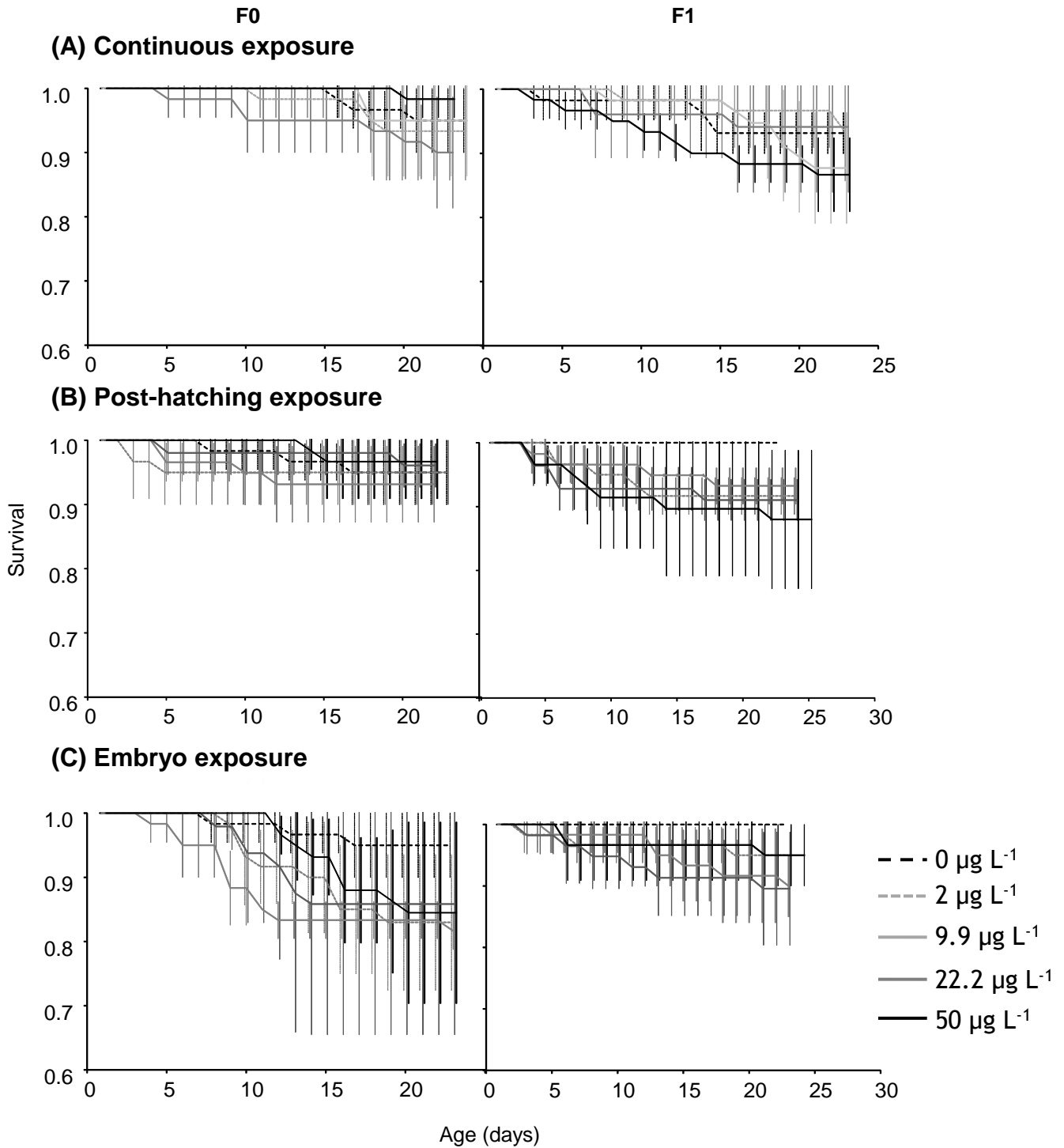
- Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., Nakano, Y., 2001. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere* 45, 487–495.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F.A., Garnier-Laplace, J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 87, 146–156.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 125–140.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 613, 76–102.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2275–2282.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat. Toxicol.* 50, 1–12.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59, 241–250.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40, S175–S181.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 497–505.
- Barillet, S., Adam-Guillermier, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ. Pollut.* 159, 495–502.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Bodar, C.W.M., Van der Sluis, I., Van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 16, 33–40.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 90, 29–36.
- Calow, P., Sibly, R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4, 283–288.
- Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Bourdineaud, J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 312–319.
- Dallas, L.J., Keith-Roach, M., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review. *Radiat. Res.* 177, 693–716.
- David, R.M., Dakic, V., Williams, T.D., Winter, M.J., Chipman, J.K., 2011. Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquat. Toxicol.* 104, 192–204.
- De Coen, W., Robbens, J., Janssen, C., 2006. Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. *Environ. Pollut.* 141, 283–294.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – a multi-generational study. *Chemosphere* 79, 60–66.
- Ebert, 2005. *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia*.
- Elenndt, B.P., Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.* 24, 1157–1167.
- Geffroy, B., Ladhari, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brêthes, D., Bourdineaud, J.-P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6, 144–160.
- Guan, R., Wang, W.X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 141, 343–352.
- Harris, E., 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook – A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Academic Press, J. Plant Physiol. 139, 768.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221.
- Kim, H., Lee, M., Yu, S., Kim, S., 2012. The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology* 21, 993–1002.
- Kobayashi, M., Hayakawa, F., Ninomiya, M., 1987. Hatchability and hemoglobin in *Daphnia magna* embryo. *Physiol. Zool.* 507–512.
- LeBlanc, G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environ. Pollut. A Ecol. Biol.* 27, 309–322.
- Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermier, C., Bourdineaud, J.P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.012> (pii: S1383-5718(13)00145-9, Epub ahead of print).
- Lourenço, J., Castro, B., Machado, R., Nunes, B., Mendo, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2010. Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 1023–1031.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 99, 309–319.

- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., Pery, A.R.R., 2011. Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4151–4158.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environ. Pollut.* 130, 309–316.
- OECD, 2008. OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 974–983.
- Pane, E.F., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2004. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1051–1056.
- Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2012. Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat. Toxicol.* 109, 11–16.
- Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C.S., Ramesh, G.T., 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 81, 389–395.
- R. Development Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.
- Salminen, R., 2005. Geochemical Atlas of Europe. Part I: Background Information, Methodology and Maps. Geological Survey of Finland, Espoo.
- Sánchez, M., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E., 2000. Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* straus exposed to diazinon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 87–94.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *J. Environ. Radioact.* 102, 766–773.
- Stearns, D.M., Yazzie, M., Bradley, A.S., Coryell, V.H., Shelley, J.T., Ashby, A., Asplund, C.S., Lantz, R.C., 2005. Uranyl acetate induces *hprt* mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20, 417–423.
- Swain, S., Wren, J.F., Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., Jager, T., Jonker, M.J., Hankard, P.K., Svendsen, C., Owen, J., Hedley, B.A., Blaxter, M., Spurgeon, D.J., 2010. Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Syst. Biol.* 4, 1–19.
- Theodorakis, C.W., Blaylock, B.G., Shugart, L.R., 1997. Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology* 6, 205–218.
- Thiébaud, C., Carrière, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., Gouget, B., 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol. Sci.* 98, 479–487.
- WHO, 2001. Depleted Uranium. Sources, Exposure and Health Effects. WHO/SDE/PHE/01. 1.
- Wren, J.F., Kille, P., Spurgeon, D.J., Swain, S., Sturzenbaum, S.R., Jager, T., 2011. Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicology* 20, 397–408.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res. Toxicol.* 16, 524–530.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 86, 370–378.

Appendices - Supplementary data

Figure caption. Fig. 1. Survival in daphnids exposed to different uranium concentrations over two successive generations (F0 and F1).

4 suppl. tables



Plaire et al. Figure 1

Table 1. Composition of artificial freshwater medium M4 at pH7

M4 pH7	
Elements	mol L ⁻¹
Ca	0.002
Mg	0.001
Na	0.001
K	3.2.10 ⁶
Cl	0.004
SO4	0.001
NO3	3.2.10 ⁶
PO4	2.1.10 ⁶
EDTA	1.3.10 ⁶
SiO3	3.5.10 ⁶

Table 2. Cycle threshold (C_t) from RAPD-PCR performed on genomic DNA of control daphnids using 7 probes and 2 dilutions.

	OPA9	OPB5	OPB6	OPB7	OPB10	OPB11	OPB12
<i>Dilution x10</i>							
Adults	30.86	40.23	42.09	30.31	31.92	37.7	>c
Neonates	>c	39.85	41.44	27.53	30.59	35.86	>c
<i>Dilution x20</i>							
Adults	31.26	41.67	42.83	30.77	32.74	30.5	>c
Neonates	28.89	39.45	40.58	28.18	30.84	35.8	>c

> c: the observed C_t was above that of the control without DNA

Table 3. Number of hybridization sites with RAPD probe OPB10 on daphnid genomic DNA sampled from adults and neonates at release of broods 1 and 5 (B1 and B5) and at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1) during experiments (A) continuous exposure, (B) post-hatching exposure and (C) embryo exposure only. Results are mean \pm SEM (multiplied by 10^2 to facilitate reading). Statistics: * $p < 0.05$, $n = 4$. P corresponds to parents of F0, exposed during egg incubation at the beginning of experiments.

	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
A	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(2.81 \pm 0.77)	(7,32 \pm 1,63)	(2,96 \pm 0,96)	(6,29 \pm 1,10)	(10,41 \pm 3,66)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7.91 \pm 2.38)	(8,65 \pm 2,81)	(7,56 \pm 4,89)	(26,14 \pm 4,80) *	(2,45 \pm 1,05)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(12.19 \pm 7.69) *	(6,42 \pm 2,55)	(5,94 \pm 2,65)	(14,80 \pm 5,55)	(3,22 \pm 1,11)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(4.15 \pm 0.84)	(7,27 \pm 3,06)	(8,04 \pm 2,09)	(28,36 \pm 19,59)	(3,39 \pm 1,04)
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(15.52 \pm 6.25) *	(21,22 \pm 13,17)	(11,39 \pm 2,06) *	(7,13 \pm 3,01)	(8,54 \pm 3,02)
	Neonates	F0	F1		F2	
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(3,63 \pm 0,21)	(4,03 \pm 2,21)	(0,82 \pm 0,23)	(12,93 \pm 3,19)	(7,88 \pm 3,69)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(8,32 \pm 0,73)	(4,70 \pm 0,72)	(4,45 \pm 0,48) *	(6,83 \pm 1,67)	(0,14 \pm 0,05) *
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(8,46 \pm 4,47)	(6,59 \pm 2,06)	(4,03 \pm 1,3)	(8,21 \pm 2,67)	(0,10 \pm 0,03)
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(3,32 \pm 0,74)	(8,40 \pm 4,70)	(2,93 \pm 0,52)	(3,24 \pm 1,34)	(19,80 \pm 16,47)
50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7,02 \pm 1,35)	(1,98 \pm 1,00)	(4,13 \pm 1,21) *	(5,46 \pm 2,30)	(0,14 \pm 0,06) *	
B	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$		(9,78 \pm 2,30)	(6,28 \pm 1,93)	(1,60 \pm 0,58)	(0,89 \pm 0,63)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(11,68 \pm 4,05)	(4,17 \pm 1,55)	(4,86 \pm 2,34)	(1,41 \pm 0,21)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$		(10,03 \pm 2,43)	(3,19 \pm 0,62)	(1,40 \pm 0,41)	(5,27 \pm 1,67) *
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(6,54 \pm 1,10)	(4,70 \pm 1,72)	(8,25 \pm 2,64) *	(7,99 \pm 2,06) *
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$		(9,05 \pm 2,08)	(2,20 \pm 0,49)	(3,02 \pm 1,02)	(0,12 \pm 0,06)
	Neonates	F0	F1		F2	
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(5,07 \pm 1,05)	(8,21 \pm 2,31)	(3,52 \pm 0,73)	(1,37 \pm 0,27)	(0,59 \pm 0,16)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(8,17 \pm 1,00)	(3,41 \pm 0,63)	(0,26 \pm 0,08) *	(5,19 \pm 3,08) *
9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$		(3,28 \pm 1,07)	(1,03 \pm 0,41) *	(1,25 \pm 0,90)	(3,56 \pm 0,68) *	
22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$		(2,05 \pm 0,12)	(0,81 \pm 0,12) *	(2,90 \pm 0,38)	(3,79 \pm 0,89) *	
50 $\mu\text{g L}^{-1}$		(2,91 \pm 1,24)	(1,52 \pm 0,30)	(0,18 \pm 0)	(0,16 \pm 0,03) *	
C	Adults	P	F0		F1	
		B5	B1	B5	B1	B5
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7,20 \pm 0,21)	(9,78 \pm 2,30)	(6,28 \pm 1,93)	(1,60 \pm 0,58)	(0,89 \pm 0,63)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(0,17 \pm 0,07) *	(5,34 \pm 3,01)	(3,24 \pm 0,71)	(2,15 \pm 0,13)	(4,29 \pm 2,64)
	9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(10,80 \pm 3,15)	(0,01 \pm 0) *	(3,77 \pm 1,95)	(1,61 \pm 0,64)	(2,50 \pm 0,49) *
	22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(13,44 \pm 1,60)	(1,28 \pm 0,14) *	(2,26 \pm 0,24)	(2,12 \pm 0,65)	(3,32 \pm 1,32) *
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(7,20 \pm 0,21) *	(2,75 \pm 0,71) *	(1,91 \pm 0,48)	(1,02 \pm 0,55)	(3,66 \pm 0,96) *
	Neonates	F0	F1		F2	
	0 $\mu\text{g L}^{-1}$	(5,07 \pm 1,05)	(8,21 \pm 2,31)	(3,52 \pm 0,73)	(1,37 \pm 0,27)	(0,59 \pm 0,16)
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(4,73 \pm 2,50)	(0,01 \pm 0,0001) *	(0,82 \pm 0,26)	(0,25 \pm 0,17)	(1,17 \pm 0,62)
9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	(3,42 \pm 0,51)	(0,27 \pm 0,20) *	(1,47 \pm 0,49)	(0,39 \pm 0,12) *	(1,49 \pm 0,16)	
22.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	(10,51 \pm 0,16) *	(1,61 \pm 0,56) *	(1,63 \pm 0,17)	(3,96 \pm 2,24)	(2,84 \pm 0,64)	
50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(6,18 \pm 4,11)	(2,83 \pm 1,58) *	(0,63 \pm 0,05) *	(0,77 \pm 0,31)	(4,30 \pm 0,81)	

Table 4.A. Continuous exposure: Frequency of PCR products in relation to melting temperature (per temperature class) with RAPD probe OPB10 on daphnid genomic DNA from adults and neonates at release of broods 1 and 5 (B1 and B5) and at different uranium concentrations in two successive generations (F0 and F1). Statistics: * $p < 0.05$, $n = 4$. P corresponds to parents of F0, exposed during egg incubation at the beginning of experiment.

Temperature class (°C)	P					F0										F1									
	B5					B1					B5					B1					B5				
	[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$					[U] $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50	0	2	9.9	22.2	50
Adults																									
I1: [74-78[0.5	0.5	0.5	0.25	0.75	0.75	0	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	1	0.25	0*	0.25	0.5	0.75	1	0	0.25	0
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0.25	1	0.25	0.5	1	0.5	0.75	1	0.25	0	0	0.25	1*	0.75	0.5	0.25	0	0.5	0.75	0.75
I3: [80-81[0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.25	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0.75	0	0	0
I4: [81-82[0.75	0	1	0	1	1	1	0.5	0.75	0.75	1	0.75	1	0.25	0.5	0.75	0.5	1	1	0.5	0.75	0	0.75	1	0.75
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0
I8: [85-86[1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0.25	1	1	0.75	1	1	1	1	0.75	1	1	1	1	0.75	1	1
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I10: [87-88[1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.75	1	1	0.75	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0.75	1	0*
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	1*
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neonates																									
	F0					F1										F2									
I1: [74-78[0	0.25	0.33	0.75	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.67	0	0.25	0.25	0	0.75	0	0	1*	0.75	1*	0.75	0.25	0	0.33	1
I2: [78-80[0	0	0	0	0	0	0.5	0.25	0.25	0.33	1	0.75	0.75	0*	0.25	0.75	1	0	0	0	0.25	0.75	1	0.67	0.67
I3: [80-81[0	0	0	0.25	0	0	0	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0	0	0	0.25	0.5	0	0.5	1	0.75	0*	0*	0*
I4: [81-82[0.5	0.25	0.67	0.5	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	1	1	0.75	0.25	1	1	0	0.75	0.5	1*	0.5	0	0	1*	1*	1*
I5: [82-83[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0
I6: [83-84[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I7: [84-85[0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I8: [85-86[1	1	1	1	1	0.75	1	0.5	1	1	1	1	0.75	1	1	1	1	1	1	1	0.75	1	1	1	1
I9: [86-87[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I10: [87-88[1	1	1	1	1	0.75	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.75	0.75	1	0	0.67
I11: [88-89[0	0	0	0	0	0.25	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0.67	0.33
I12: [89-92[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

RESUME

Comprendre comment les polluants affectent les espèces à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur à la fois en écotoxicologie et en radioécologie. Dans le cadre du programme IRSN ENVIRHOM visant à évaluer les risques écologiques liés à la présence de radionucléides dans l'environnement, ce travail de thèse a pour objectif principal d'explorer les altérations de l'ADN et leurs conséquences potentielles pour les traits d'histoire de vie (survie, croissance et reproduction) d'un invertébré aquatique, *Daphnia magna*, exposé à de l'uranium appauvri. Pour répondre à cette problématique, une approche expérimentale et une approche de modélisation sont menées. La démarche expérimentale vise à évaluer l'accumulation et la transmission des altérations de l'ADN suite à une exposition à de l'uranium (0 ; 2 ; 9,9 ; 22,2 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sur deux générations successives (F0 et F1). Différents scénarios d'exposition (exposition continue, post-éclosion et embryonnaire) sont mis en place pour tester la sensibilité spécifique de divers stades de vie. Les effets génotoxiques sont estimés à l'aide d'une technique d'amplification aléatoire de l'ADN couplée à la PCR (PCR-RAPD). Lors d'expositions continue et post-éclosion, les résultats mettent en évidence une accumulation et une transmission des dommages à l'ADN au fil des générations en parallèle de la sévérité des effets. Les altérations de l'ADN sont reportées dès l'éclosion de la génération F1 à une concentration de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les effets sur la croissance et la reproduction sont plus sévères lorsque le stade embryonnaire est exposé et restent visibles à partir de 9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ malgré un retour en milieu non contaminé à l'éclosion. Les résultats suggèrent que les dommages à l'ADN pourraient être des indicateurs précoces de futurs effets sur les traits d'histoire de vie. Une analyse mécanistique des résultats expérimentaux est conduite à l'aide du modèle DEBtox (dynamique de budget énergétique appliquée à la toxicologie) afin de mieux cerner les causes de l'aggravation des effets d'une génération à l'autre. Un modèle à deux facteurs de stress (l'un corrélé à la concentration d'exposition et l'autre à un niveau de dommages) est développé. Les ajustements suggèrent l'implication d'un second mode d'action pour expliquer les effets immédiats de l'uranium sur la nutrition et les conséquences des dommages accumulés au fil des générations. La nature du second mode d'action reste à préciser, les ajustements pointant soit une augmentation des coûts de croissance et de maturation soit une augmentation des coûts de maintenance selon l'hypothèse cinétique considérée.

Mots clés : *Daphnia magna*, uranium, effets transgénérationnels, altérations de l'ADN, traits d'histoire de vie, DEBtox

ABSTRACT

Understanding how toxicants affect species at various levels of biological organization is a major research goal in both ecotoxicology and radioecology. As part of IRSN program ENVIRHOM, which aims to assess environmental risks related to the presence of radionuclides in the environment, this PhD work explored how depleted uranium alters DNA and affects life history traits (survival, growth and reproduction) of an aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. To answer to this problematic, an experimental approach and a modeling approach are conducted. An experimental study is performed to evaluate DNA accumulation and transmission during an uranium exposure (0; 2; 9.9; 22.2 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) over two successive generations (F0 and F1). Different exposures scenarios (continuous, post-hatching and embryo exposure) are achieved to test the specific sensitivity of several life stages to uranium. Genotoxic effects are estimated using random amplified DNA technique combined with PCR (PCR-RAPD). In continuous and post-hatching exposure scenarios, results highlighted an accumulation and a transmission of DNA damage across generations with an increase in effect severity. DNA alterations are reported at hatching of the F1 generation at a concentration as low as 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Effects on growth and reproduction are stronger when the embryo stage is exposed and remain visible at 9.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ despite a return in a clean medium at hatching. Results suggest that DNA damage could be used as early indicators of future effects on life history traits. A mechanistic analysis of experimental results is conducted using a DEBtox model (dynamic energy budget applied to toxicology) to better understand the causes of the increase in effect severity across generations. A model with two stress factors (one correlated to external concentration and another correlated to a damage level) is developed. Results of fits suggest the involvement of one second mode of action to explain immediate effects of uranium on nutrition and consequences of cumulated damage across generations. The nature of the second mode of action remains to precise, DEBtox fits pointing an increase in costs for growth and maturation or an increase in costs for maintenance, depending on the considered kinetic hypothesis.

Keywords: *Daphnia magna*, uranium, transgenerational effects, DNA alterations, life history traits, DEBtox