



**HAL**  
open science

# Etude des effets combinés de l'uranium et du cadmium chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

Adrien Margerit

► **To cite this version:**

Adrien Margerit. Etude des effets combinés de l'uranium et du cadmium chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ingénierie de l'environnement. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT3509 . tel-01330901

**HAL Id: tel-01330901**

**<https://theses.hal.science/tel-01330901>**

Submitted on 13 Jun 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale **477 – SIBAGHE**  
Et de l'unité de recherche **UMR Hydrosociétés**

Spécialité : **Eaux Continentales et Société**

Présentée par **Adrien Margerit**

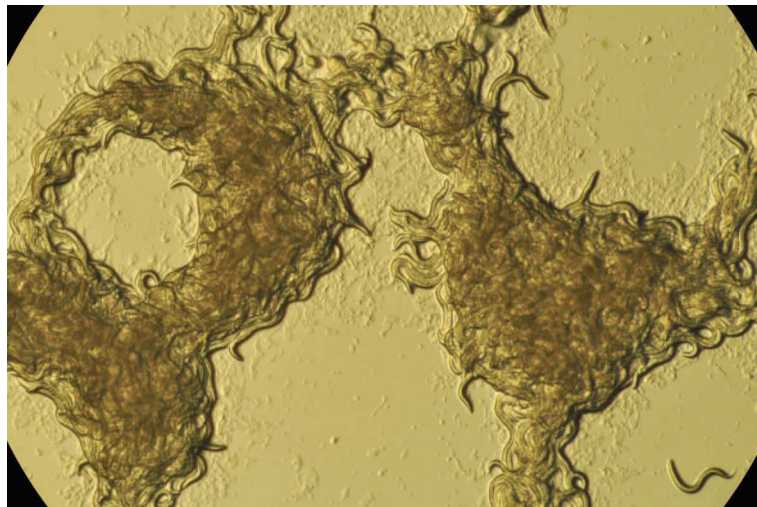
**Étude des effets combinés de l'uranium  
et du cadmium chez le nématode  
*Caenorhabditis elegans***

Soutenue le lundi 22 juin 2015 à Cadarache, devant le jury composé de :

M.	<b>Alexandre PÉRY</b>	Directeur de l'école doctorale ABIES, AgroParisTech	Président
Mme	<b>Jeanne GARRIC</b>	Directrice de recherche, IRSTEA, Villeurbanne	Rapporteur
Mme	<b>Vera I. SLAVEYKOVA</b>	Directrice de l'Institut F.-A. Forel, Université de Genève	Rapporteur
Mme	<b>Françoise ELBAZ- POULICHET</b>	Directrice de recherche, CNRS/Université de Montpellier/IRD	Examinatrice
Mme	<b>Elena GOMEZ</b>	Professeur, Université de Montpellier	Codirectrice
M.	<b>Rodolphe GILBIN</b>	Directeur du L2BT, IRSN, Cadarache	Codirecteur







(Plusieurs milliers de nématodes *Caenorhabditis elegans* au premier stade larvaire après éclosion)



Ces travaux de recherche ont été réalisés dans le cadre du réseau européen d'excellence en radioécologie STAR (*a Strategy for Allied Radioecology*), et ont été financés par le septième programme cadre EC-EURATOM (Fission-2010-3.5.1-269672) et l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN).



# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le réseau européen STAR ainsi que l'IRSN, et plus particulièrement le SERIS, sous la direction de Jacqueline Garnier Laplace, pour avoir financé mes travaux de doctorat et pour m'avoir permis d'assister à différents séminaires et formations scientifiques.

J'adresse mes remerciements à Jeanne Garric et Vera Slaveykova d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse ainsi qu'à Françoise Elbaz-Poulichet et Alexandre Péry pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance. Je remercie Elena Gomez et Rodolphe Gilbin d'avoir codirigé ce projet de doctorat ; Elena, merci pour les discussions intéressantes que nous avons eues et qui m'ont permis de prendre du recul sur mes travaux. Merci également pour ton assistance dans les démarches universitaires lorsque j'ai dû les réaliser à distance. Rodolphe, je souhaite te remercier pour la confiance que tu m'as accordée, ta patience, tes nombreux conseils forts utiles, pour le temps que tu m'as alloué lorsque j'en avais le plus besoin (notamment durant les phases expérimentales intenses, débordant parfois sur les fins de semaines, et durant mes phases de découragement !), pour ta grande sympathie et pour tant de choses encore.

Merci à Françoise Elbaz-Poulichet, Hélène Fenet et Alexandre Péry d'avoir accepté de participer aux comités de pilotage et de m'avoir conseillé tout au long du projet de thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Alexandre Péry, Rémy Beaudoin et Benoît Goussen pour les échanges sur la modélisation que nous avons eus de vive voix à l'INERIS, par courriel ou encore, par téléphone, et qui m'ont été d'une grande utilité. Merci à Simon Galas et Aymeric Baily pour vos réponses à mes questionnements expérimentaux sur *C. elegans*. Merci également à Catherine Brutesco et Hélène Javot du CEA de cadarache pour m'avoir gentiment dépanné (sonication et auto-clave).

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres (internes et invités) du réseau STAR pour leur gentillesse, leur accueil chaleureux, et les échanges intéressants que nous avons eus durant les ateliers organisés. Je remercie tout particulièrement Dave Spurgeon et William Tyne pour m'avoir accueilli au CEH le temps d'une expérimentation avec *C. elegans* mais aussi Turid Hertel-Aas, pour avoir partagé cette expérience avec moi. Un grand merci à Claus Svendsen et Nina Cedergreen pour m'avoir fait profiter de votre expérience sur la problématique des mélanges en écotoxicologie, pour vos remarques enrichissantes et pour l'intérêt que vous avez porté à mon projet. Merci également à Jan Baas, Tjalling Jager et Elke Zimmer pour les discussions DEBtox que nous avons eues.

---

J'adresse de manière générale un grand merci à toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer à l'IRSN durant ces trois années pour les bons moments passés en votre compagnie.

Tout d'abord, je tiens à remercier Marie et toute l'équipe du LM2E : Christophe, Hugo, Jean-Michel, Karine, Marc-André, Moustapha, Patrick, Séverine, Valérie, Véronique, pour m'avoir accueilli et offert la possibilité de travailler au calme durant la rédaction du manuscrit. J'ai apprécié les occasions de vous connaître un peu mieux autour d'un café ou d'un repas le midi. Marie, Valérie et Moustapha, je vous remercie pour vos conseils et vos réponses à mes interrogations sur la modélisation. Claire, merci pour tes conseils de statistiques et pour ta gentillesse.

Nico, je te remercie pour ton assistance pour les calculs de dose pour l'expérience d'irradiation et les moments de détente partagés. Nadine, je te remercie pour ton dynamisme à toute épreuve, ton assistance dans la gestion des déchets mais aussi pour m'avoir évité de manger seul une paire de fois. Merci à toi Christelle pour avoir accepté de me donner ton avis sur le manuscrit et pour les discussions scientifiques que nous avons eues. Merci à Virginie, pour les dosages d'ICP-AES réalisés mais aussi pour ton énergie. Magalie, nous n'avons finalement pas beaucoup interagi ensemble mais je te remercie pour les essais MET que tu as réalisés pour moi, pour l'intérêt que tu as porté à mon projet et pour ta gentillesse. Fred (A.), merci d'avoir partagé tes connaissances DEBtox avec moi et pour tes conseils qui m'ont bien servi. Laurent, ex-voisin de Mirabeau, je te remercie pour ta sympathie, pour toutes les interactions que nous avons eues au sujet des statistiques et de la modélisation, pour tes conseils sur les choses à voir ou à déguster dans la région (merci particulièrement pour m'avoir fait découvrir le guitariste argentin au Courant d'art Café !). Fred (C.), merci pour ton humour, ton dynamisme, tes conseils et ta pédagogie. Daniel (et Nadine), merci de m'avoir accueilli au labo du 153 et de m'avoir dépanné à plusieurs reprises ; un grand merci également pour les kilos de l'excellent miel de lavande dont j'ai pu profiter grâce à toi. Olivier, merci pour tes précieux conseils, que ce soit dans le domaine de l'écotoxicologie ou de la mécanique automobile ; merci d'avoir relu avec attention mon manuscrit et d'y avoir apporté un regard externe, contribuant à son amélioration. Claudine, je tiens à te remercier chaleureusement pour ta grande gentillesse, ton humour et pour toute l'assistance que tu as su m'apporter (y compris durant les moments de panique, quelques jours avant de partir en mission !), Merci également à Clara qui a désormais repris le flambeau ainsi qu'à Stéphane pour le super travail que tu as fait et pour les conversations sympas que nous avons eues en attendant le bus. Laureline, je tiens à te remercier pour tes conseils, pour avoir patiemment répondu à mes questions sur la spéciation ou les bactéries mais aussi pour ton humour et pour avoir eu pitié de moi, attendant désespérément le bus dans le froid le matin, et m'avoir pris en stop. J'adresse toute ma reconnaissance à Sandrine et Cathy avec qui j'ai eu la chance d'interagir fréquemment durant mes travaux. Sandrine, je te remercie pour l'intérêt que tu as pu porter à mon projet, pour les dosages ICP-MS de mes échantillons, pour tes nombreux conseils ainsi que pour ta franchise et ta gentillesse. Merci à toi Cathy pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée lors des grosses journées d'expérimentations, pour tes nombreux conseils sur les nématodes et autre, ainsi que pour tes encouragements et ta gen-

---

tillesse ; ça a été un plaisir pour moi d'apprendre à mieux te connaître au cours de nos discussions de bino, durant les repiquages ou comptages laborieux de nématodes et d'œufs ! Arnaud, Béatrice, Isabelle, Jean-François, Jean-Marc, Julien, Pascale, Pierre et Sylvie, j'ai eu peut être un peu moins d'occasions de vous côtoyer, mais je vous remercie pour votre accueil, votre sympathie et les discussions agréables que nous avons eues également durant ces trois années !

J'adresse un grand merci à tous les étudiants, anciens et actuels, que j'ai eu le plaisir de connaître à l'IRSN, qui ont maintenu une ambiance chaleureuse et avec qui j'ai pu partager de très bons moments : Antoine (T.), Félix, Morgan, Sandrine, Iris, Audrey, Starrlight, Nico, Guillaume, Adeline et Benoît, Delphine et Vincent, Florian, Antoine (L.), Kewin, Loïc, Marie (B.), Candy, Amel, Tristan, Hugo, Moustapha, Shin, Amine et Rym, Yvan, Laure, Florence, Cécile, Sébastien, Magalie, Ingrid, Mira, Marie (T.) et Lucie. Antoine (T.), Starrlight et Benoît, merci pour vos conseils sur Latex et/ou le DEBtox. Guigui, ce fut un plaisir de partager le bureau avec toi, merci pour tes conseils et ta sympathie. Delphine et Vincent, merci de votre gentillesse et de vos encouragements. Adeline, je te remercie de m'avoir initié au nématode, de l'aide que tu m'as apportée durant mes expériences, d'avoir supporté mes maniaqueries au labo ainsi que pour ta bonne humeur et ton énergie ! Un grand merci à Antoine et Kewin pour votre implication dans le dynamisme du « groupe de jeunes », pour les parties de tennis, de pétanque, de cartes, etc., mais aussi pour vos aides ponctuelles au labo et les discussions scientifiques. Cécile, merci pour ton aide au labo et ta bonne humeur. Florian, même si tu n'as pas le temps de lire mes remerciements, merci pour les conversations sérieuses et moins sérieuses que nous avons eues ainsi que pour les compétitions de lancers de mouton (tricheur !). Loïc, j'ai été content d'apprendre à mieux te connaître durant les trajets Aix/Cadarache, je te remercie pour les dosages ICP-MS de mes échantillons.

Pour terminer, un grand merci à toi Anaëlle pour avoir relu avec attention tout mon manuscrit et pour toutes tes remarques amusantes et bien utiles. Merci aussi à mes proches et à Mallika de m'avoir écouté et soutenu dans les moments de découragement.





# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>1 Synthèse bibliographique</b>	<b>5</b>
1.1 Étude des effets de substances en mélanges . . . . .	6
1.1.1 Contexte de l'étude des mélanges en écotoxicologie . . . . .	6
1.1.1.1 Réalité et complexité des mélanges de polluants dans l'environnement . . . . .	6
1.1.1.2 Les mélanges dans la réglementation et l'évaluation des risques . . . . .	8
1.1.1.3 Stratégies d'étude de l'effet des mélanges . . . . .	9
1.1.1.4 Interaction de substances en mélange et toxicité . . . . .	10
1.1.2 Deux modèles d'additivité de référence pour l'identification des in- teractions . . . . .	12
1.1.2.1 Notions pour l'étude des effets des mélanges . . . . .	12
1.1.2.2 Le modèle d'addition des concentrations (CA) . . . . .	16
1.1.2.3 Le modèle d'addition des réponses (RA) . . . . .	17
1.1.2.4 Comparaison de l'addition des concentrations et de l'ad- dition des réponses . . . . .	17
1.1.3 Applications des modèles d'additivité de référence pour l'étude des effets combinés . . . . .	20
1.1.3.1 Les approches descriptives . . . . .	20
1.1.3.2 Les approches mécanistes . . . . .	24
1.1.4 Synthèse . . . . .	31
1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> comme organisme modèle . . . . .	33
1.2.1 Phylogénie . . . . .	33

1.2.2	Écologie . . . . .	33
1.2.3	Anatomie et physiologie . . . . .	34
1.2.4	Intérêts et utilisations pour la recherche en biologie . . . . .	36
1.2.5	Utilisation en (éco)toxicologie . . . . .	37
1.2.6	Modélisation DEBtox associée à <i>C. elegans</i> . . . . .	39
1.2.7	Synthèse . . . . .	41
1.3	Contaminants et mélanges considérés dans cette étude . . . . .	42
1.3.1	Uranium (U) . . . . .	42
1.3.1.1	Propriétés physicochimiques . . . . .	42
1.3.1.2	Propriétés radioactives . . . . .	42
1.3.1.3	Sources et occurrence dans l'environnement . . . . .	43
1.3.1.4	Spéciation dans les matrices environnementales . . . . .	44
1.3.1.5	Biodisponibilité et bioaccumulation . . . . .	45
1.3.1.6	Absorption, distribution et excrétion . . . . .	47
1.3.1.7	Toxicité sur les organismes et valeurs de protection envi- ronnementale . . . . .	48
1.3.1.8	Mécanisme de toxicité . . . . .	50
1.3.2	Cadmium (Cd) . . . . .	53
1.3.2.1	Propriétés physicochimiques . . . . .	53
1.3.2.2	Sources et occurrence dans l'environnement . . . . .	53
1.3.2.3	Spéciation dans les matrices environnementales . . . . .	54
1.3.2.4	Biodisponibilité et bioaccumulation . . . . .	55
1.3.2.5	Absorption, distribution et excrétion . . . . .	56
1.3.2.6	Toxicité sur les organismes et valeurs de protection envi- ronnementale . . . . .	58
1.3.2.7	Mécanisme de toxicité . . . . .	59
1.3.3	Mélanges U/Cd . . . . .	62
1.3.3.1	Cooccurrence de l'U et du Cd dans l'environnement . . . . .	62
1.3.3.2	Toxicité de l'U et du Cd en mélange . . . . .	64
1.3.4	Synthèse . . . . .	65
<b>2</b>	<b>Choix stratégiques, hypothèses et objectifs</b>	<b>67</b>
2.1	Objectifs et choix pour le déroulement de l'étude . . . . .	68
2.2	Choix de l'organisme d'étude . . . . .	69
2.3	Choix pour la modélisation des effets combinés . . . . .	70

---

2.4	Choix dans l'approche expérimentale . . . . .	71
<b>3</b>	<b>Matériels et méthodes généraux</b>	<b>73</b>
3.1	Produits chimiques . . . . .	74
3.2	Culture de <i>C. elegans</i> . . . . .	74
3.2.1	Souche et conditions de culture . . . . .	74
3.2.2	Source de nourriture . . . . .	75
3.2.3	Préparation des boîtes . . . . .	75
3.2.4	Obtention de <i>C. elegans</i> synchronisés . . . . .	76
3.2.4.1	Synchronisation grossière des individus par « bleaching »	76
3.2.4.2	Synchronisation fine des individus par dépôt d'adultes . .	76
3.3	Exposition des nématodes aux contaminants . . . . .	77
3.4	Mesure des critères d'effet . . . . .	77
3.5	Analyses chimiques . . . . .	78
3.5.1	Minéralisation . . . . .	78
3.5.2	Analyses chimiques . . . . .	79
3.6	Modélisation et traitement statistique des données . . . . .	80
3.6.1	Analyse dose-réponse . . . . .	80
3.6.2	MixTox, une approche descriptive d'analyse des effets combinés . .	80
3.6.2.1	Dose-réponse des substances seules . . . . .	81
3.6.2.2	Addition des concentrations (CA) . . . . .	81
3.6.2.3	Addition des réponses (RA) . . . . .	81
3.6.2.4	Déviations simples (S/A) . . . . .	82
3.6.2.5	Déviations dépendantes des ratios (DR) . . . . .	82
3.6.2.6	Déviations dépendantes du niveau de dose (DL) . . . . .	83
3.6.2.7	Ajustement et procédure statistique . . . . .	85
3.6.2.8	Transcription du code de Excel <sup>®</sup> vers MATLAB <sup>®</sup> . . . . .	85
3.6.2.9	Estimation des intervalles de confiance . . . . .	86
3.6.3	DEBtox, une approche mécaniste d'analyse des effets combinés . .	86
3.6.3.1	Le modèle DEBtox utilisé . . . . .	86
3.6.3.2	Croissance et reproduction non affectées . . . . .	87
3.6.3.3	Croissance et/ou reproduction affectée(s) . . . . .	87
3.6.3.4	Méthode d'ajustement . . . . .	89
3.6.3.5	Estimation des intervalles de confiance . . . . .	90

<b>4</b>	<b>Analyse descriptive des effets de l'U et du Cd (concentrations dans la gélose)</b>	<b>93</b>
4.1	Introduction . . . . .	94
4.2	Matériels et méthodes spécifiques . . . . .	94
4.2.1	Exposition des nématodes . . . . .	94
4.2.2	Plan expérimental . . . . .	95
4.3	Résultats et discussions . . . . .	95
4.3.1	Vérification des concentrations d'U et de Cd dans la gélose . . . . .	95
4.3.2	Effets de l'U et du Cd seuls . . . . .	96
4.3.3	Effets combinés de l'U et du Cd . . . . .	98
4.4	Conclusion . . . . .	103
<b>5</b>	<b>Effet d'une interaction U/Cd sur la bioaccumulation du Cd par <i>C. elegans</i></b>	<b>105</b>
5.1	Introduction . . . . .	106
5.2	Matériels et méthodes spécifiques . . . . .	107
5.2.1	Élevage de <i>C. elegans</i> en culture liquide . . . . .	107
5.2.2	Exposition des larves L1 <i>C. elegans</i> . . . . .	107
5.2.3	Préparation des échantillons et dosages . . . . .	108
5.2.4	Analyse des données . . . . .	108
5.3	Résultats et discussion . . . . .	109
5.3.1	Internalisation de l'U . . . . .	109
5.3.2	Internalisation du Cd, comparaison avec celle de l'U . . . . .	110
5.3.3	L'U affecte l'internalisation du Cd . . . . .	112
5.4	Conclusion . . . . .	112
<b>6</b>	<b>Origine de l'interaction U/Cd dans le milieu d'exposition</b>	<b>113</b>
6.1	Introduction . . . . .	114
6.2	Matériels et méthodes spécifiques . . . . .	115
6.2.1	Préparation des boîtes . . . . .	115
6.2.2	Récolte, préparation et analyse des échantillons bactériens . . . . .	115
6.2.3	Modélisation de la spéciation chimique dans la gélose . . . . .	116
6.3	Résultats . . . . .	116
6.3.1	Transferts de l'U et du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien . . . . .	116
6.3.2	Spéciation de l'U et du Cd dans la gélose (milieu NGM) . . . . .	116
6.4	Discussion . . . . .	120
6.4.1	Un transfert gélose-tapis bactérien triphasique pour l'U ? . . . . .	120

6.4.2	Différents niveaux de transfert gélose-tapis bactérien pour l'U et le Cd . . . . .	121
6.4.3	L'uranium réduit le transfert gélose-tapis bactérien du cadmium . . .	121
6.5	Conclusion . . . . .	123
<b>7</b>	<b>Réanalyse descriptive des effets de l'U et du Cd (concentrations dans le tapis bactérien)</b>	<b>125</b>
7.1	Introduction . . . . .	126
7.2	Matériels et méthodes spécifiques . . . . .	126
7.2.1	Estimation des concentrations U/Cd dans le tapis bactérien . . . . .	126
7.2.2	Mesure des critères d'effet au cours du temps . . . . .	127
7.3	Résultats . . . . .	127
7.3.1	Effets de l'U et du Cd seuls . . . . .	127
7.3.2	Effets combinés de l'U et du Cd . . . . .	129
7.4	Discussion . . . . .	134
7.4.1	Une partie importante de l'antagonisme expliquée par l'interaction dans le milieu d'exposition . . . . .	134
7.4.2	CA versus RA : des conclusions contrastées pour les effets combinés de l'U et du Cd . . . . .	135
7.4.3	Évolution des effets combinés au cours du temps . . . . .	136
7.5	Conclusion . . . . .	137
<b>8</b>	<b>Modélisation mécaniste des effets de l'U et du Cd, comparaison avec l'approche MixTox</b>	<b>139</b>
8.1	Introduction . . . . .	140
8.2	Méthodes spécifiques . . . . .	142
8.2.1	Mesure et analyse des critères d'effet additionnels de cette étude . . .	142
8.2.2	Procédure d'ajustement du modèle DEBtox . . . . .	143
8.2.3	Modifications du modèle DEBtox . . . . .	144
8.3	Résultats . . . . .	145
8.3.1	Effets de l'U ou du Cd sur la $L_p$ et le volume des œufs . . . . .	145
8.3.2	Ajustements du modèle DEBtox pour les individus non exposés . . .	146
8.3.3	Ajustements du modèle DEBtox pour les individus exposés à l'U ou au Cd . . . . .	146
8.3.4	Effets combinés de l'U et du Cd sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	153

8.3.5	Effets combinés de l'U et du Cd sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	155
8.4	Discussion . . . . .	156
8.4.1	Effets de l'U et du Cd : des hypothèses du modèle DEBtox non vérifiées ? . . . . .	156
8.4.2	Ajustement des individus non exposés : comparaison avec la littérature	159
8.4.3	Ajustement des individus exposés à l'U ou au Cd : comparaison avec la littérature . . . . .	160
8.4.4	Effets combinés U/Cd : confirmation de l'interaction U/Cd dans le tapis bactérien . . . . .	161
8.4.5	Effets combinés U/Cd : une seconde interaction ? . . . . .	162
8.5	Conclusion . . . . .	167
<b>9</b>	<b>Conclusion : synthèse, discussions et perspectives</b>	<b>169</b>
9.1	Synthèse de l'étude des effets combinés de l'U et du Cd . . . . .	170
9.1.1	Bilan des principaux résultats . . . . .	170
9.1.2	Influence de la variabilité expérimentale pour l'identification des interactions U/Cd au niveau des individus . . . . .	173
9.1.3	Conclusion sur la nature des effets combinés U/Cd au niveau des individus . . . . .	175
9.2	Modèles descriptifs et modèles mécanistes pour l'étude des mélanges . . . . .	176
9.3	Modèles d'additivité de référence et interactions . . . . .	179
9.4	La biodisponibilité dans l'étude de la toxicité des mélanges sur les organismes du sol . . . . .	181
9.5	Perspectives générales . . . . .	183
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>187</b>
	<b>Déroulement du projet de thèse</b>	<b>215</b>
	<b>Support au chapitre 4</b>	<b>223</b>
	<b>Support au chapitre 6</b>	<b>227</b>
	<b>Support 1 au chapitre 7</b>	<b>229</b>
	<b>Support 2 au chapitre 7</b>	<b>235</b>

<b>Support au chapitre 8</b>	<b>241</b>
<b>Communications scientifiques et formations suivies</b>	<b>253</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>257</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>263</b>
<b>Glossaire</b>	<b>267</b>





# Introduction générale

En raison de l'accroissement de la population humaine mondiale et de l'augmentation des activités anthropiques associées (production industrielle, agricole, etc.) les écosystèmes se retrouvent exposés à de multiples contaminants dont la nature et la concentration varient considérablement. Suite à la mise en place du règlement REACH en 2007 (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques), les autorités européennes ont rapporté le préenregistrement de plus 140 000 produits chimiques. Paradoxalement, malgré la grande diversité des contaminants émis de manière directe ou indirecte dans l'environnement, les réglementations pour l'évaluation du risque écotoxicologique restent encore largement focalisées sur une approche d'évaluation de la toxicité par substance (*e.g.* en Europe, avec la directive cadre sur l'eau ou le règlement REACH ; [Backhaus \*et al.\*, 2010](#)). Évaluer la toxicité de tous les mélanges possibles représenterait un effort considérable et est probablement impossible. Celle-ci est donc prise en compte de manière implicite par l'utilisation de facteurs de sécurité arbitraires dans les démarches actuelles d'évaluation des risques.

Depuis quelques années cependant, la problématique de la toxicité des mélanges commence à être intégrée aux démarches d'évaluation des risques. Deux types d'approches sont couramment suivies. La première consiste à étudier la toxicité d'un mélange complexe sans forcément chercher à caractériser ses constituants, en le considérant comme une entité à part entière. Cette approche est adaptée à l'analyse directe des effets d'effluents ou de matrices environnementales contaminées, pour un scénario d'exposition spécifique (*e.g.* rejet d'un site industriel). Les résultats obtenus sont donc peu généralisables à d'autres situations. La seconde approche consiste à étudier la toxicité de mélanges souvent relativement simples, dont tous les constituants sont connus. Elle repose sur l'estimation de la toxicité du mélange à partir des connaissances acquises sur la toxicité des substances seules et au moyen d'un modèle « d'additivité ». Lorsque la toxicité du mélange correspond à la toxicité estimée, l'effet combiné des substances en mélange est dit additif ([Kortenkamp, 2011](#) ; [Ragas \*et al.\*, 2011](#)). Cette approche est utilisée dans les démarches d'évaluation des risques pour prédire la toxicité des mélanges de contaminants.

Deux modèles d'additivité de référence sont classiquement utilisés pour la prédiction des effets combinés de substances qui n'interagissent pas. L'addition des concentrations (CA) s'emploie pour des substances supposées partager le même mode d'action tandis que l'addition des réponses (RA) s'emploie pour des substances supposées disposer de modes d'action strictement indépendants (Greco *et al.*, 1995). Les substances en mélange peuvent toutefois interagir entre elles et produire un effet combiné inattendu, supérieur ou inférieur à l'effet additif. Au cours des études réalisées, différents mécanismes d'interaction ont pu être observés. Certaines interactions se produisent dans les matrices environnementales et aboutissent à une modulation des fractions biodisponibles des substances en mélange. D'autres s'opèrent au niveau des organismes même, et modulent les processus d'internalisation et de dépuración des substances (*i.e.* durant la phase toxicocinétique) ou leurs interférences avec les cibles biologiques et/ou la cascade d'évènements conduisant à l'effet toxique (*i.e.* durant la phase toxicodynamique) (Cedergreen, 2014 ; Spurgeon *et al.*, 2010a). Même si les recherches menées sur la toxicité des mélanges depuis plusieurs dizaines d'années tendent à montrer que les interactions de forte amplitude sont peu fréquentes (Kortenkamp *et al.*, 2009), leur caractère imprévisible et les difficultés pour les identifier en font un véritable défi pour l'évaluation du risque écotoxicologique.

La radioécologie, domaine d'étude du comportement des radionucléides et de leurs effets sur les écosystèmes et l'homme, ne fait pas exception au manque d'intégration des mélanges aux démarches d'évaluation du risque écotoxicologique (Howard *et al.*, 2010 ; Larsson, 2008). Pourtant, dans le cadre du fonctionnement des industries du cycle du combustible nucléaire (ICCN), les scénarios d'émissions normales ou accidentelles où les radionucléides se retrouvent associés à divers contaminants sont la norme plutôt que l'exception (Vanhoudt *et al.*, 2012 ; Tab. 1.1<sup>1</sup>). C'est dans ce contexte qu'a été initié le *work package 4* (WP4) du réseau européen d'excellence en radioécologie *STrategy for Allied Radioecology* (Hinton *et al.*, 2013)<sup>2</sup>. Ce dernier a pour objectif de faire une revue des outils disponibles pour l'étude de la toxicité des mélanges et de les mettre en pratique sur quelques exemples « simples ». L'objectif est à terme de déterminer si les critères de protection environnementaux fixés pour les radionucléides et le stress radio-induit sont suffisamment robustes dans le cas de contaminations multiples. Une démarche multi-phylum, incluant des invertébrés du sol et aquatiques, un vertébré aquatique et une plante, a été adoptée. L'uranium (U) et l'irradiation- $\gamma$  externe ont été sélectionnés comme contaminants et stressseurs radioactifs modèles et le cadmium (Cd) et le fluoranthène ont été sélectionnés comme contaminants

---

1. p. 7.

2. star-radioecology.org.

---

stables. Ils ont notamment été choisis pour leur susceptibilité à se retrouver en mélange dans l'environnement ainsi que pour la non-spécificité de leur toxicité vis-à-vis d'une espèce particulière. Rattachée au WP4, la présente étude s'est principalement intéressée aux effets combinés de l'U et du Cd sur le nématode du sol, *Caenorhabditis elegans*.

L'U et le Cd sont des éléments traces métalliques (ETM) qui sont naturellement présents dans l'environnement et dont les concentrations peuvent être augmentées par les activités anthropiques. En raison de leur cooccurrence dans certains minerais, des concentrations non négligeables d'U et de Cd peuvent être trouvées en mélange à proximité de mines d'U ou dans des sols agricoles soumis à une application intensive d'amendements phosphatés (Hinck *et al.*, 2013 ; Schipper *et al.*, 2011 ; Smidt *et al.*, 2012). Cependant, la nature de leurs effets combinés sur les organismes reste méconnue.

Dans la littérature, les études menées jusqu'à présent sur les mélanges de contaminants ont permis de montrer que, pour un même mélange, différents types d'effets combinés et d'interactions peuvent être identifiés en fonction : (i) du choix du modèle d'additivité de référence (CA ou RA, Jonker *et al.*, 2005 ; Kortenkamp *et al.*, 2009), (ii) du critère d'effet retenu et du temps d'exposition considéré (Baas *et al.*, 2007 ; Cedergreen *et al.*, 2005 ; Marr *et al.*, 1998 ; Van Gestel *et al.*, 1997), (iii) des combinaisons de concentrations testées en mélange (Martin *et al.*, 2009 ; Sharma *et al.*, 1999). En écotoxicologie, les connaissances généralement insuffisantes sur les modes d'action des substances ne permettent pas de postuler de manière fiable sur leur (dis)similarité. Faire un choix entre les modèles d'additivité de référence CA et RA n'est donc pas évident. Différentes approches ont été proposées afin d'appréhender au mieux la toxicité des mélanges. Par exemple, Jonker *et al.* (2005) ont proposé une approche descriptive d'analyse des données (MixTox) dans laquelle les modèles d'additivité CA et RA sont utilisés en parallèle. Celle-ci permet également d'analyser, en même temps, différentes combinaisons de concentrations de substances en mélange afin d'identifier des interactions qui seraient, par exemple, fonction du ratio de concentrations entre les substances. Mais les approches descriptives, sans réelles considérations biologiques, font de plus en plus l'objet de critiques (Jager, 2011). Alternativement, des approches mécanistes (*e.g.* DEBtox ; Jager *et al.*, 2010 ; Kooijman *et al.*, 1996), cherchant à mieux prendre en compte la dynamique de l'effet des substances sur les processus biologiques, ont été proposées pour l'analyse de la toxicité des mélanges. Ces dernières permettent notamment d'intégrer le développement des effets toxiques au cours du temps, sur plusieurs critères d'effet à la fois (*e.g.* croissance et reproduction). À l'inverse du modèle MixTox, et plus généralement des approches descriptives, les modèles mécanistes n'ont été mis en application pour l'étude des mélanges que dans un nombre limité de situations. Ils

doivent donc encore être éprouvés.

Au regard de ces éléments, nous avons fait le choix pour ce projet d'étudier la toxicité du mélange U/Cd en utilisant différentes combinaisons de concentration afin de couvrir une large gamme d'effets, en considérant plusieurs critères d'effet sublétaux au cours du temps, et en utilisant en parallèle l'approche descriptive MixTox et mécaniste DEBtox. Dans cette optique, *C. elegans*, fréquemment utilisé en écotoxicologie, a été choisi en raison de ses caractéristiques biologiques (*e.g.* cycle et durée de vie rapide, hermaphrodisme), permettant une utilisation aisée en laboratoire, et de la caractérisation préalable de la toxicité de l'U et du Cd seuls sur cet organisme (*e.g.* Dutilleul *et al.*, 2013 ; Swain *et al.*, 2010).

Le présent manuscrit rassemble les travaux bibliographiques, expérimentaux et de modélisation, effectués au cours de ce projet, pour l'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur *C. elegans*. En annexe, des résultats d'études (partielles) concernant d'autres mélanges de stressseurs, obtenus en lien avec les objectifs du WP4 du réseau STAR, sont décrits brièvement à travers la présentation du déroulement du projet de thèse<sup>1</sup>.

Dans le corps du manuscrit, est présenté en premier lieu un « état de l'art » concernant (i) les approches et outils pour l'étude des effets combinés de substances sur les organismes, (ii) le nématode *Caenorhabditis elegans* et son utilisation en laboratoire et (iii) les connaissances générales et toxicologiques sur l'uranium et le cadmium, seuls et en mélange. Puis, les objectifs spécifiques de l'étude ainsi que les choix stratégiques réalisés pour la conduite du projet sont énoncés.

En second lieu, le travail expérimental et de modélisation est détaillé. Un chapitre regroupe les détails techniques généraux concernant les expérimentations et le traitement des données. Puis les étapes (i) de l'analyse des effets combinés de l'U et du Cd sur *C. elegans*, à partir de l'approche descriptive MixTox, et (ii) de l'étude des interactions, par la caractérisation de la bioaccumulation de l'U et du Cd par *C. elegans* et de la répartition de ces ETM dans le milieu d'exposition, sont présentées dans une succession de chapitres. Enfin, la mise en œuvre de l'approche mécaniste DEBtox pour l'étude de la toxicité du mélange U/Cd est proposée. Chacun des ces chapitres comporte les détails expérimentaux et d'analyse qui leur sont propres, les résultats obtenus ainsi que les discussions spécifiques. Des figures et tableaux additionnels ont été placés en annexe, en support des différents chapitres.

En dernier lieu, un chapitre dresse le bilan des résultats obtenus puis propose une discussion transversale afin de mettre en relation les différents points clefs identifiés pour l'étude du mélange U/Cd, mais aussi des mélanges en général. Il se termine sur une série de perspectives du projet d'étude.

---

1. Voir annexe *Déroulement du projet de thèse* (p. 215).

# Synthèse bibliographique

## 1.1 Étude des effets de substances en mélanges

Cette section a pour but de présenter l'intérêt et le rôle de l'étude des effets des mélanges de contaminants en écotoxicologie ainsi que les différents outils pour y parvenir. Seront présentées, à la fois les approches (descriptives) communément utilisées, mais également des approches (mécanistes) plus récentes, prometteuses, mais moins documentées.

### 1.1.1 Contexte de l'étude des mélanges en écotoxicologie

#### 1.1.1.1 Réalité et complexité des mélanges de polluants dans l'environnement

Depuis 1990, la production annuelle de l'industrie chimique mondiale s'élève à plus de 1000 milliards de dollars US (Massey *et Jacobs*, 2013). Une estimation récente porte à plus de 140000, le nombre de produits chimiques sur le marché en Union Européenne et à plusieurs centaines, le nombre de nouvelles substances introduites chaque année (Backhaus *et al.*, 2010).

Les produits chimiques sont présents à tous les niveaux de la vie moderne. Cependant, en condition normale ou en situation accidentelle, leur utilisation aboutit inexorablement à leur dissémination dans l'environnement, de façon directe ou sous forme d'effluents (Backhaus *et al.*, 2010). Chaque activité anthropique se caractérise par les types de mélanges de substances rejetées, les cinétiques de rejets ainsi que les compartiments environnementaux impactés. Un compartiment peut quant à lui être affecté par plusieurs types d'activités anthropiques. Par exemple, une rivière peut à la fois être impactée par des activités agricoles (*e.g.* pesticides), des activités industrielles (*e.g.* métaux) et par des rejets urbains (*e.g.* surfactants). L'ensemble des substances rejetées d'origine anthropique vient s'ajouter aux nombreuses substances naturellement présentes dans les écosystèmes, et forment des mélanges complexes. Dans un compartiment, la complexité de l'étude de la toxicité d'un mélange provient non seulement de la grande diversité des substances qui le composent, mais aussi du fait que (i) les rejets de substances peuvent être ponctuels ou continus, (ii) chaque substance est plus ou moins persistante, (iii) chaque substance est plus ou moins disponible et toxique pour les organismes biologiques, et (iv) le mélange des substances peut modifier la persistance, la disponibilité et la toxicité de chacune d'entre elles.

Les rejets des industries du cycle du combustible nucléaire (NFCF) illustrent la complexité des mélanges de substances pouvant être émises par les activités anthropiques. Le tableau 1.1 détaille les principaux constituants des effluents de cinq centrales nucléaires françaises en 2008. L'éventail des substances se compose de 13 radionucléides, 12 sub-

**Tableau 1.1** Principales caractéristiques des rejets de substances chimiques et radioactives de plusieurs centrales nucléaires françaises au cours de l'exercice 2008 (EDF, 2009).

	<b>Bugey</b> (4 x 900 MW)	<b>Gravelines</b> (6 x 900 MW)	<b>Chinon</b> (4 x 900 MW)	<b>Cruas</b> (4 x 900 MW)	<b>Paluel</b> (4 x 1300 MW)
<b>Substances radioactives</b>					
<b>(Bq an<sup>-1</sup>)</b>					
<sup>110m</sup> Ag	9,51 × 10 <sup>8</sup>	1,61 × 10 <sup>8</sup>	4,50 × 10 <sup>7</sup>	3,03 × 10 <sup>8</sup>	7,70 × 10 <sup>7</sup>
<sup>14</sup> C	4,50 × 10 <sup>10</sup>	6,75 × 10 <sup>10</sup>	4,40 × 10 <sup>10</sup>	4,12 × 10 <sup>10</sup>	6,65 × 10 <sup>10</sup>
<sup>58</sup> Co	3,10 × 10 <sup>8</sup>	1,63 × 10 <sup>8</sup>	7,00 × 10 <sup>7</sup>	3,43 × 10 <sup>8</sup>	5,94 × 10 <sup>8</sup>
<sup>60</sup> Co	1,40 × 10 <sup>8</sup>	4,84 × 10 <sup>8</sup>	8,00 × 10 <sup>7</sup>	3,14 × 10 <sup>8</sup>	3,09 × 10 <sup>8</sup>
<sup>134</sup> Cs	1,50 × 10 <sup>7</sup>	2,00 × 10 <sup>7</sup>	1,20 × 10 <sup>7</sup>	4,40 × 10 <sup>7</sup>	4,60 × 10 <sup>7</sup>
<sup>137</sup> Cs	3,40 × 10 <sup>7</sup>	6,60 × 10 <sup>7</sup>	1,40 × 10 <sup>7</sup>	5,30 × 10 <sup>7</sup>	6,40 × 10 <sup>7</sup>
<sup>3</sup> H	4,73 × 10 <sup>13</sup>	5,99 × 10 <sup>13</sup>	3,17 × 10 <sup>13</sup>	5,12 × 10 <sup>13</sup>	1,18 × 10 <sup>14</sup>
<sup>131</sup> I	3,10 × 10 <sup>7</sup>	1,80 × 10 <sup>7</sup>	1,10 × 10 <sup>7</sup>	3,30 × 10 <sup>7</sup>	3,40 × 10 <sup>7</sup>
<sup>54</sup> Mn	2,00 × 10 <sup>7</sup>	2,70 × 10 <sup>7</sup>	1,30 × 10 <sup>7</sup>	5,00 × 10 <sup>7</sup>	5,30 × 10 <sup>7</sup>
<sup>63</sup> Ni	1,33 × 10 <sup>8</sup>	2,01 × 10 <sup>8</sup>	2,80 × 10 <sup>7</sup>	3,36 × 10 <sup>8</sup>	3,24 × 10 <sup>8</sup>
<sup>124</sup> Sb	2,50 × 10 <sup>7</sup>	3,20 × 10 <sup>7</sup>	1,20 × 10 <sup>7</sup>	4,80 × 10 <sup>7</sup>	8,30 × 10 <sup>7</sup>
<sup>125</sup> Sb	6,50 × 10 <sup>7</sup>	8,30 × 10 <sup>7</sup>	3,60 × 10 <sup>7</sup>	9,60 × 10 <sup>7</sup>	1,21 × 10 <sup>8</sup>
<sup>123m</sup> Te	2,40 × 10 <sup>7</sup>	1,40 × 10 <sup>7</sup>	1,10 × 10 <sup>7</sup>	3,50 × 10 <sup>7</sup>	1,75 × 10 <sup>8</sup>
<b>Substances chimiques</b>					
<b>(kg an<sup>-1</sup>)</b>					
Ammonium (NH <sub>4</sub> )	3,50 × 10 <sup>3</sup>	5,33 × 10 <sup>3</sup>	1,80 × 10 <sup>3</sup>	4,31 × 10 <sup>2</sup>	4,80 × 10 <sup>3</sup>
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	9,20 × 10 <sup>3</sup>	5,89 × 10 <sup>3</sup>	8,02 × 10 <sup>3</sup>	8,15 × 10 <sup>3</sup>	7,44 × 10 <sup>3</sup>
Bromoforme (CHBr <sub>3</sub> )	—	—	—	—	4,10 × 10 <sup>4</sup>
Chlorure (Cl)	6,42 × 10 <sup>4</sup>	—	4,30 × 10 <sup>5</sup>	—	—
Cuivre (Cu)	—	—	1,64 × 10 <sup>4</sup>	1,15 × 10 <sup>4</sup>	—
Hydrazine (N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	9,30 × 10 <sup>1</sup>	1,28 × 10 <sup>1</sup>	2,30	3,18 × 10 <sup>1</sup>	9,7
Hydrocarbure	—	5,20 × 10 <sup>1</sup>	—	—	8,40 × 10 <sup>3</sup>
Lithine (LiOH)	0,5	3	3,2	1,3	—
Morpholine (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO)	4,90 × 10 <sup>2</sup>	1,30 × 10 <sup>3</sup>	2,60 × 10 <sup>2</sup>	1,72 × 10 <sup>2</sup>	—
Nitrite (NO <sub>2</sub> )	1,33 × 10 <sup>2</sup>	—	1,10 × 10 <sup>4</sup>	—	—
Nitrate (NO <sub>3</sub> )	5,87 × 10 <sup>4</sup>	—	3,66 × 10 <sup>5</sup>	—	—
Phosphate (PO <sub>4</sub> )	1,10 × 10 <sup>3</sup>	2,74 × 10 <sup>2</sup>	4,60 × 10 <sup>2</sup>	2,70 × 10 <sup>1</sup>	1,69 × 10 <sup>3</sup>
Sodium (Na)	4,16 × 10 <sup>4</sup>	—	—	—	—
Sulfate (SO <sub>4</sub> )	—	3,16 × 10 <sup>5</sup>	1,28 × 10 <sup>5</sup>	1,00 × 10 <sup>5</sup>	1,24 × 10 <sup>5</sup>
Zinc (Zn)	—	—	6,21 × 10 <sup>3</sup>	6,00 × 10 <sup>3</sup>	—



stances inorganiques et trois substances organiques (EDF, 2009).

### 1.1.1.2 Les mélanges dans la réglementation et l'évaluation des risques

Dans l'Union Européenne (UE), la réglementation autour des produits chimiques est mise en place à travers plusieurs directives ou règlements majeurs : le règlement REACH<sup>1</sup>, la directive cadre sur l'eau (DCE)<sup>2</sup>, le règlement concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques<sup>3</sup>, etc. Dans le contexte de REACH, certains mélanges particuliers (*e.g.* le pétrole, les préparations industrielles) sont pris en compte. Cependant, les substances et produits sont, de manière générale, considérés comme s'ils étaient seuls présents dans l'environnement. La prise en compte des effets combinés de contaminants en mélange par l'utilisation de facteurs de sécurité, clairement mentionnée dans les versions initiales, n'a pas été conservée dans la version finale des lignes directrices. Dans le cadre de la DCE, les normes de qualité environnementales (NQE) produites jusqu'à présent ne concernent que les substances seules. Les mélanges ne sont cependant pas totalement absents de la réglementation. Par exemple, le guide technique associée à la DCE propose une méthode de calcul de NQE pour des mélanges dont la composition (qualitative et quantitative) est clairement identifiée (EC, 2011). De plus, pour la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, les lignes directrices mentionnent distinctement la prise en compte des effets combinés de ces substances ainsi que les potentielles interactions synergiques, bien que celle-ci ne s'applique qu'à la santé humaine (Backhaus *et al.*, 2010 ; Ragas *et al.*, 2011).

Dans le cadre d'une évaluation des risques pour des effluents ou des matrices environnementales, les lignes directrices prennent généralement en compte les effets combinés de substances. La caractérisation du risque est réalisée au moyen d'approches classiques<sup>4</sup> permettant de prédire les effets additifs (*i.e.* en l'absence d'interaction) de substances en mélange selon la ressemblance ou la dissemblance de leur mode d'action (Backhaus *et al.*, 2010 ; Ragas *et al.*, 2011). Elles ne permettent cependant pas de prédire les interactions éventuelles. En toxicologie humaine, l'*United States agency of toxic substances and disease registry* (US-ATSDR) a développé l'approche *binary weight-of-evidence* pour la prédiction des interactions. Celle-ci permet de prédire les niveaux d'interaction pour différentes paires de substances qui peuvent ensuite être utilisés pour prédire la toxicité d'un mélange complexe (Pohl *et al.*, 2009). Mais, comme toute méthode prédictive, elle nécessite une base de

---

1. 1907/2006/CE, JO L 136, 29/05/2007.

2. 2455/2001/EC, JO L 348/84, 24/12/2008.

3. 1107/2009/EC, JO L 309, 24/11/2009.

4. Voir sections 1.1.2.2 (p. 16) et 1.1.2.3 (p. 17).

données expérimentales solide et représentative des mélanges étudiés (afin de travailler par comparaison pour les substances non étudiées) ainsi que le jugement d'experts.

Probablement en raison de la complexité de la problématique des contaminants en mélange dans l'environnement ainsi que du manque de connaissances des mécanismes associés, celle-ci est encore relativement peu intégrée dans les textes réglementaires. Même si les effets combinés de substances peuvent être pris en compte pour la réalisation d'une évaluation des risques, une incertitude persiste en ce qui concerne les interactions, ce qui nécessite l'utilisation de facteurs de sécurité arbitraires.

### 1.1.1.3 Stratégies d'étude de l'effet des mélanges

Plusieurs types d'approches peuvent être envisagées pour aborder l'étude de l'effet des mélanges de contaminants (Backhaus *et al.*, 2010 ; Jonker *et al.*, 2011) :

L'approche la plus simple, *whole mixture approach*, consiste à considérer un mélange, souvent un échantillon de matrice environnementale ou d'effluents, comme un composé à part entière et à tester sa toxicité sur un organisme modèle. Il s'agit souvent de mélanges avec un grand nombre de constituants qui ne sont pas, ou pas tous, identifiés. Cette méthode de diagnostic est largement utilisée en évaluation du risque écotoxicologique. Elle reste cependant limitée car elle ne permet pas de faire le lien entre les substances en mélanges et les effets combinés observés ni de généraliser les résultats à d'autres mélanges en raison de la spécificité de l'échantillon (*e.g.* site de prélèvement). Ce type d'étude peut être affiné par des approches dites de *toxicity identification evaluation* où il s'agit d'extraire du mélange initial, un certain groupe de constituants (définis par la méthode d'extraction) ou d'inhiber l'effet biologique induit par les composés de ce groupe (*e.g.* emploi d'agents complexants spécifiques au groupe), afin de tester son importance dans la toxicité globale du mélange.

En alternative, l'approche *component-based* a un objectif de pronostic ; elle se focalise sur l'étude des effets combinés d'un nombre plus restreint de substances (souvent 2 ou 3), clairement identifiées, à partir des connaissances sur la toxicité des substances seules. Cette méthode permet une investigation fine des effets combinés ainsi que des mécanismes d'interaction éventuellement en jeu. Elle nécessite en contrepartie plus d'efforts expérimentaux (*e.g.* tester l'effet de différentes concentrations de substances seules et de plusieurs combinaisons de concentrations de substances en mélange).

#### 1.1.1.4 Interaction de substances en mélange et toxicité

Dans cette section nous présentons les interactions qui peuvent entrer en jeu dans les mécanismes de toxicité des substances en mélange. Elle ne vise pas à établir une liste exhaustive mais plutôt à illustrer la diversité et la complexité des interactions pouvant survenir lorsqu'un organisme est exposé à un mélange toxique. Quelques exemples d'identification expérimentale d'interactions entre substances sont également présentés.

##### *Des interactions à différents niveaux.*

Les effets toxiques d'une substance chimique sur un organisme sont la résultante de la succession de trois phases : la phase d'exposition dans le milieu extérieur, la phase toxicocinétique (impliquant l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion de la substance) et la phase toxicodynamique (impliquant l'interaction de la substance ou ses métabolites avec une ou des cible(s) biologique(s) ainsi que la chaîne d'évènements biochimiques et biophysiques qui s'ensuit et aboutit à l'effet toxique observé). Dans le cas de mélanges, les différentes phases du mécanisme de toxicité d'une substance A peuvent être affectées par la présence des autres substances (B, C, ...) du mélange, modulant ainsi sa toxicité (Cedergreen, 2014 ; Spurgeon *et al.*, 2010a). On parle alors d'interaction entre substances.

Pour la phase d'exposition, une interaction peut, par exemple, se produire au niveau de la spéciation chimique d'une substance inorganique, de la disponibilité ou des processus de transformations biochimiques d'une substance organique. Concernant la phase toxicocinétique, d'autres types d'interaction entrent en jeu. Il peut s'agir, par exemple, d'une compétition pour des sites biologiques d'internalisation (passifs ou actifs) ; d'une perturbation de l'intégrité membranaire des cellules causée par certaines substances et favorisant la diffusion d'autres substances dans l'organisme ; d'une modulation de l'expression de transporteurs d'efflux ou d'enzymes de détoxification induit par certains composés, réduisant la fraction toxique d'autres composés. Un dernier niveau d'interaction peut s'opérer durant la phase de toxicodynamique par une compétition entre molécules affectant la même cible biologique (relation récepteur-ligands) ou encore par une modulation de l'activité des systèmes de défense cellulaires (*e.g.* mécanismes de réparation de l'ADN, mécanismes de lutte contre le stress oxydant).

##### *Exemple d'interaction dans le milieu d'exposition.*

Les travaux de Trenfield *et al.* (2011a,b) ont porté sur l'effet d'un acide fluviq (FA) sur la spéciation de l'uranium (U) et sa toxicité sur trois espèces tropicales d'eau douce.

Les auteurs montrent que la toxicité de l'U en présence de FA est réduite pour les trois espèces, et ce, jusqu'à un facteur 20 à  $20 \text{ mg}_{\text{FA}} \text{ L}^{-1}$ . Les auteurs ont également pu montrer par modélisation (HARPHRQ<sup>1</sup>) et par dosage chimique qu'une partie de l' $\text{UO}_2^{2+}$ , forme de l'U supposée disponible et toxique pour les organismes<sup>2</sup>, se complexe au FA et devient non assimilable. Ainsi la toxicité du mélange FA/U est inférieure à celle de l'U seul (le FA n'étant pas toxique aux concentrations testées) en raison d'une interaction entre ces substances au niveau de la matrice d'exposition.

Capasso *et al.* (2004) ont étudié l'adsorption du Cu, Zn et Cr(III), seuls et en mélange, sur la polymérine, un simili d'acide humique, en milieu liquide. Ils ont pu montrer que la présence de Zn et/ou de Cr(III) peut réduire l'adsorption du Cu jusqu'à un facteur 2. L'adsorption du Zn a été quant à elle réduite d'un facteur 4 par le Cu et le Cr(III). La désorption des éléments traces métalliques (ETM) des acides humiques peut augmenter leur biodisponibilité. En conséquence, les compétitions entre ETM en mélange pour l'adsorption sur les acides humiques pourraient moduler significativement la toxicité globale du mélange. Dans cet exemple, la toxicité engendrée par le Cu ou le Zn sur un organisme vivant dans le milieu serait augmentée.

### *Exemple d'interaction au niveau de la phase toxicocinétique.*

Les modèles du ligand biotique (BLM) sont utilisés en écotoxicologie pour prédire la biodisponibilité et l'affinité des ETM pour un ligand biotique théorique, responsable de leur accumulation dans l'organisme. Le ligand biotique constitue une simplification des mécanismes d'internalisation. La modélisation s'appuie sur des calculs de spéciation chimique ainsi que sur des données de bioaccumulation ou de toxicité sur un organisme biologique. Elle permet notamment d'émettre des hypothèses concernant d'éventuelles interactions entre composés (Niyogi *et Wood*, 2004).

L'étude de Clifford *et McGeer* (2010) porte sur le développement d'un BLM pour la toxicité aiguë du cadmium. Les auteurs ont testé l'influence de plusieurs paramètres chimiques (de la concentration de plusieurs cations, du  $\text{Cl}^-$ , du pH, etc.). Ils ont pu montrer qu'une augmentation dans le milieu de la concentration en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou, dans une plus faible mesure, du magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) réduit la toxicité du Cd. Les auteurs concluent ainsi à une compétition entre ces cations pour le ligand biotique. Plusieurs autres études avaient montré au préalable un effet protecteur de certains cations (*e.g.*  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) sur la toxicité ou l'internalisation du Cd (*e.g.* Abboud *et Wilkinson*, 2013 ; Groten *et al.*, 1991 ; Guven *et al.*, 1995 ; Slaveykova *et al.*, 2009 ; Tan *et Wang*, 2008).

---

1. Voir section 1.3.1.4 (p. 44).

2. *idem*.

### *Exemple d'interaction au niveau de la phase toxicodynamique.*

L'exemple qui suit concerne l'étude des effets combinés du Cd avec un rayonnement ionisant (UV), sur l'apparition de lésions à l'ADN chez une lignée cellulaire humaine immortalisée. Il a été montré que les différentes concentrations de Cd testées ne modifient pas le nombre de photo-lésions induites par les UVC. En revanche, le taux de réparation de ces lésions est réduit et retardé par la présence de Cd (Schwerdtle *et al.*, 2010). L'étude révèle par ailleurs une diminution du niveau de protéines du système de réparation par excision de nucléotides dans le noyau ainsi qu'un désassemblage des complexes de réparation, en lien avec une altération conformationnelle des protéines impliquées. Ces résultats font écho à plusieurs autres études démontrant les capacités du Cd à inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN (*e.g.* Hartwig *et Beyersmann*, 1989 ; Mukherjee *et al.*, 2004). Le Cd serait ainsi capable d'amplifier indirectement l'effet de composés génotoxiques (*e.g.* les rayonnements ionisants ou les métabolites bioactivés des hydrocarbures aromatiques polycycliques), par une interaction toxicodynamique.

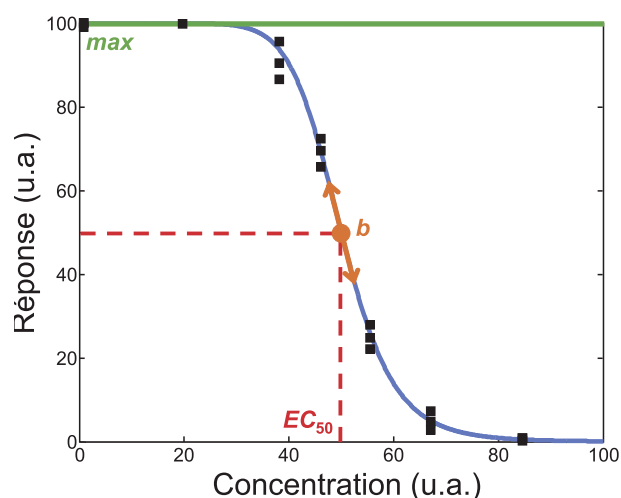
### **1.1.2 Deux modèles d'additivité de référence pour l'identification des interactions**

Les études des effets de mélanges dont toutes les substances sont clairement identifiées (*component-based*) ont pour but de mettre en évidence les éventuelles interactions entre substances affectant la toxicité globale du mélange. Afin d'identifier ces interactions, il est nécessaire de déterminer, à partir des effets des substances prises séparément, l'« effet attendu » du mélange si les substances n'interagissaient pas (*i.e.* l'effet additif). Deux modèles d'additivité de référence sont classiquement utilisés. Nous présentons ci-dessous (i) comment, à partir de ces deux modèles, les effets additifs de substances en mélange sont estimés ; (ii) comment les déviations des effets additifs (*i.e.* les interactions) sont identifiées et (iii) les points de différence entre ces deux modèles de référence. Au préalable, quelques notions nécessaires pour la compréhension des études des effets des mélanges sont présentées.

#### **1.1.2.1 Notions pour l'étude des effets des mélanges**

##### *Courbes dose-réponse.*

En écotoxicologie, la description de la toxicité d'une substance est généralement réalisée par la modélisation de sa courbe dose-réponse. Il s'agit de relier différentes concentrations de la substance aux effets toxiques qu'elles produisent sur un organisme, à l'aide d'une ré-



**FIGURE 1.1** Exemple d'un modèle de courbe dose-réponse logistique à 3 paramètres ajusté sur des données expérimentales. *max* : niveau de réponse des individus non exposés (asymptote horizontale) ; *EC<sub>50</sub>* : concentration de la substance produisant 50 % d'effet chez les individus exposés ; *b* : pente de la courbe lorsque  $c = EC_{50}$  ; *Courbe bleue* : relation dose-réponse prédite par le modèle ; ■ : données expérimentales à partir desquelles le modèle est ajusté.

gression mathématique. La courbe dose-réponse est caractéristique de la substance étudiée, de l'organisme exposé, du critère d'effet considéré (*e.g.* survie, reproduction), ainsi que de la durée et matrice d'exposition (*e.g.* eau, sol).

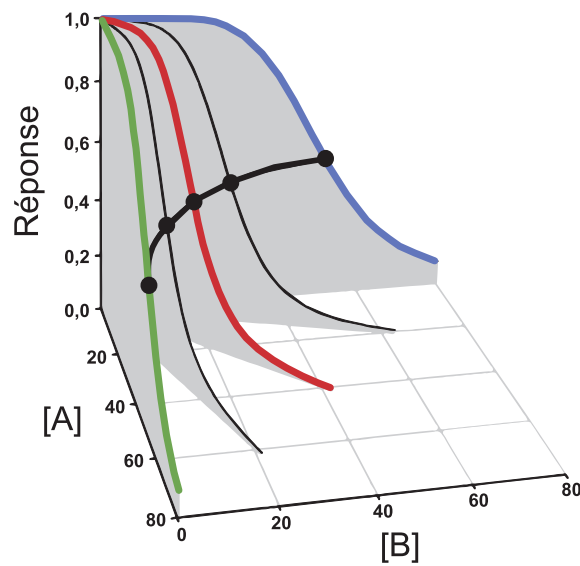
Les modèles de régression couramment utilisés sont des modèles de régression non linéaire à fonction sigmoïde (*e.g.* modèle logistique, modèle de Weibull) (Ritz, 2010). Une fois les paramètres du modèle ajustés sur les données expérimentales, celui-ci permet de prédire les concentrations produisant  $x\%$  d'effet ( $EC_x$ ). Dans le cas du modèle logistique à 3 paramètres (modèle simple), l'équation de régression peut être formulée comme suit :

$$y = \frac{max}{\left(1 + \left(\frac{c}{EC_{50}}\right)^b\right)} \quad (1.1)$$

avec  $y$  : le niveau de réponse du critère d'effet ;  $c$  : la concentration de la substance ; *max* : le niveau non affecté du critère d'effet (celui des individus contrôles) ;  $EC_{50}$  : la concentration produisant 50 % d'effet ;  $b$  : la pente de la courbe lorsque  $c = EC_{50}$  (Fig. 1.1).

#### *Surfaces de réponse.*

Dans le cas de mélanges binaires, la notion de courbe dose-réponse peut être étendue à la notion de surface de réponse. Il s'agit d'un graphe à trois dimensions où les abscisses et les ordonnées correspondent aux concentrations des deux substances en mélange et la

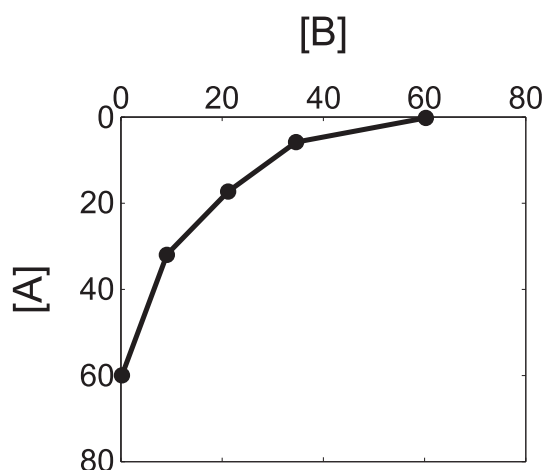


**FIGURE 1.2** Exemple de surface de réponse pour le mélange des substances A et B. Les concentrations sont en u.a. *Courbes verticales* : délimitation de la surface de réponse aux mélanges à différentes proportions de A et de B ; *Courbe verte* : courbe dose-réponse de la substance A ; *Courbe bleue* : celle de la substance B ; *Courbe rouge* : celle du mélange A/B à un ratio 1 : 1 ; ● :  $EC_{50}$  des mélanges à différents ratios de concentration. (Illustration adaptée de [Cedergreen et al., 2007](#)).

cote représente le niveau de réponse du critère d'effet (Fig. 1.2). La section de la surface en suivant un ratio fixe entre les substances en mélange correspond ainsi à la courbe dose-réponse du mélange à ce ratio. Par exemple, sur la figure 1.2, la section verte correspond à la courbe dose-réponse de la substance A seule, la section bleue correspond à celle de la substance B seule et la section rouge correspond à la courbe dose-réponse du mélange A/B à un ratio 1 : 1.

#### *Isoboles et isobologrammes.*

Une autre manière de représenter les effets d'un mélange binaire est d'utiliser un isobogramme. Il s'agit d'un graphe à deux dimensions où chaque axe correspond à la concentration d'une substance et sur lequel sont tracées des courbes d'iso-effet, c'est-à-dire, des courbes reliant les concentrations des deux substances en mélange qui produisent  $x\%$  d'effet. Ces courbes sont appelées des isoboles ([Jonker et al., 2011](#)). Il s'agit d'une coupe parallèle au plan XY de la surface de réponse, pour un niveau de réponse  $z$ , correspondant à  $x\%$  d'effet. La figure 1.3 représente l'isobole 50 % de la surface de réponse de la figure 1.2 (section noire).



**FIGURE 1.3** Exemple d'isobole 50 % d'effet pour un mélange arbitraire de deux substances dont les  $EC_{50}$  valent 60 u.a. ● : mélanges à différentes proportions de A et B produisant 50 % d'effet.

#### *Additivité et interaction.*

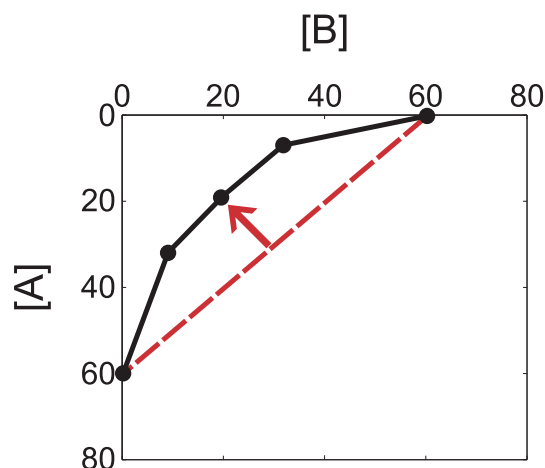
D'un point de vue empirique, une interaction est mise en évidence lorsque l'effet « attendu » d'un mélange sur la base des toxicités des substances seules (l'effet additif) est (significativement) différent de celui observé expérimentalement. Si l'effet observé est inférieur à celui attendu, on parle d'interaction antagoniste (antagonisme) ; dans le cas contraire, on parle d'interaction synergique (synergie) (Greco *et al.*, 1995). Dans un contexte « pharmacologique », l'interaction antagoniste est dans certains cas retenue uniquement lorsque l'effet du mélange est moins important que celui de la substance la plus toxique du mélange.

Graphiquement, un antagonisme est représenté par une isobole qui s'écarte de l'isobole attendue en s'éloignant de l'origine du graphe (*i.e.* il faut des concentrations de substances plus importantes dans le mélange pour obtenir le même niveau d'effet) ; une synergie est représentée par une isobole qui s'écarte de l'isobole attendue en se rapprochant de l'origine du graphe (*i.e.* il faut des concentrations de substances moins importantes dans le mélange pour obtenir le même niveau d'effet). Ainsi, la figure 1.4 illustre une interaction synergique entre les substances.

D'autres types d'interaction peuvent être définis dans la littérature scientifique. Par exemple, le terme inhibition s'emploie lorsque l'effet observé d'une substance est atténué par la présence d'une substance non toxique<sup>1</sup> tandis que le terme potentialisation s'emploie dans le cas contraire (US-EPA, 2000).

1. Voir exemples, section 1.1.1.4 (p. 10).





**FIGURE 1.4** Exemple d'isobole 50 % d'un mélange de substances A et B où les effets observés sont supérieurs à ceux attendus (synergie). Les concentrations sont en u.a. *Trait perlé noir* : l'isobole 50 % observée expérimentalement ; *Tirets rouges* : l'isobole 50 % « attendue » du mélange A/B sur la base des effets des substances seules.

### 1.1.2.2 Le modèle d'addition des concentrations (CA)

Le modèle d'addition des concentrations (CA) est un modèle de référence pour estimer les effets additifs de substances possédant théoriquement le même mode d'action toxique (même cible biologique). Il a été proposé pour la première fois par [Loewe et Muischnek \(1926\)](#). Il repose sur l'addition des unités toxiques (TU) de chaque substance présente dans le mélange, c'est à dire, leurs concentrations normalisées par leurs potentiels toxiques. Le modèle CA peut être mathématiquement exprimé par l'équation suivante :

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = M \quad (1.2)$$

avec  $n$  : le nombre de substances en mélange ;  $c_i$  : la concentration du composé  $i$  du mélange ;  $EC_{x_i}$  : la concentration du composé  $i$  seul, provoquant  $x\%$  d'effet ([Backhaus et al., 2000](#)).

Si, pour un mélange de substances produisant  $x\%$  d'effet, la somme des unités toxiques vaut 1 ( $M = 1$ ), alors les effets combinés des substances en mélange suivent l'additivité CA : aucune interaction n'intervient. Par contre, si  $M \neq 1$ , les substances interagissent entres-elles et produisent un effet général antagoniste ( $M > 1$ ) ou synergique ( $M < 1$ ).

Le modèle suppose implicitement que les composés du mélange peuvent être remplacés par d'autres, de même mode d'action, sans en modifier la toxicité globale du moment que les unités toxiques sont respectées ([Jonker et al., 2011](#)). Il est également intéressant de constater qu'avec le modèle CA, toutes les substances contribuent à la toxicité globale du mélange, y

compris celles qui sont présentes à des concentrations inférieures à leurs seuils de toxicité (Backhaus *et al.*, 2010).

Cette approche est notamment utilisée pour prédire la toxicité de mélanges de dioxines ou d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, groupes de molécules très semblables entre-elles mais ayant des potentiels toxiques différents, dans le cadre de démarches d'évaluation des risques (Jonker *et al.*, 2011 ; Nisbet *et LaGoy*, 1992).

### 1.1.2.3 Le modèle d'addition des réponses (RA)

Un second modèle de référence pour estimer les effets additifs de substances, appelé modèle d'addition des réponses (RA), ou encore des actions indépendantes, a été proposé par Bliss (1939). À la différence du CA, ce modèle s'applique théoriquement à des substances ayant des modes d'action toxiques différents et totalement indépendants. Il est construit sur le concept statistique des événements aléatoires indépendants (Jonker *et al.*, 2011). Le modèle est mathématiquement exprimé par l'équation :

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad (1.3)$$

avec  $n$  : le nombre de substances en mélange ;  $E(c_i)$  : la fraction d'effet provoquée par le composé  $i$  seul à la concentration  $c_i$  ;  $E(c_{mix})$  : la fraction d'effet provoquée par le mélange (Backhaus *et al.*, 2000).

Par exemple, dans le cas d'un mélange de deux substances à l'EC<sub>50</sub>,  $E(c_{mix}) = 1 - 0,5 \times 0,5 = 0,75$ . Le modèle d'additivité RA prédit un effet de 75 % pour le mélange.

Dans le cadre du modèle RA, une interaction est identifiée lorsque l' $E(c_{mix})$  calculée est (significativement) différente de l' $E(c_{mix})$  observée expérimentalement ; inférieure pour un antagonisme et supérieure pour une synergie.

À l'inverse du modèle CA, seules les substances présentes à des concentrations supérieures à leurs seuils de toxicité contribuent à la toxicité globale du mélange (Backhaus *et al.*, 2010).

### 1.1.2.4 Comparaison de l'addition des concentrations et de l'addition des réponses

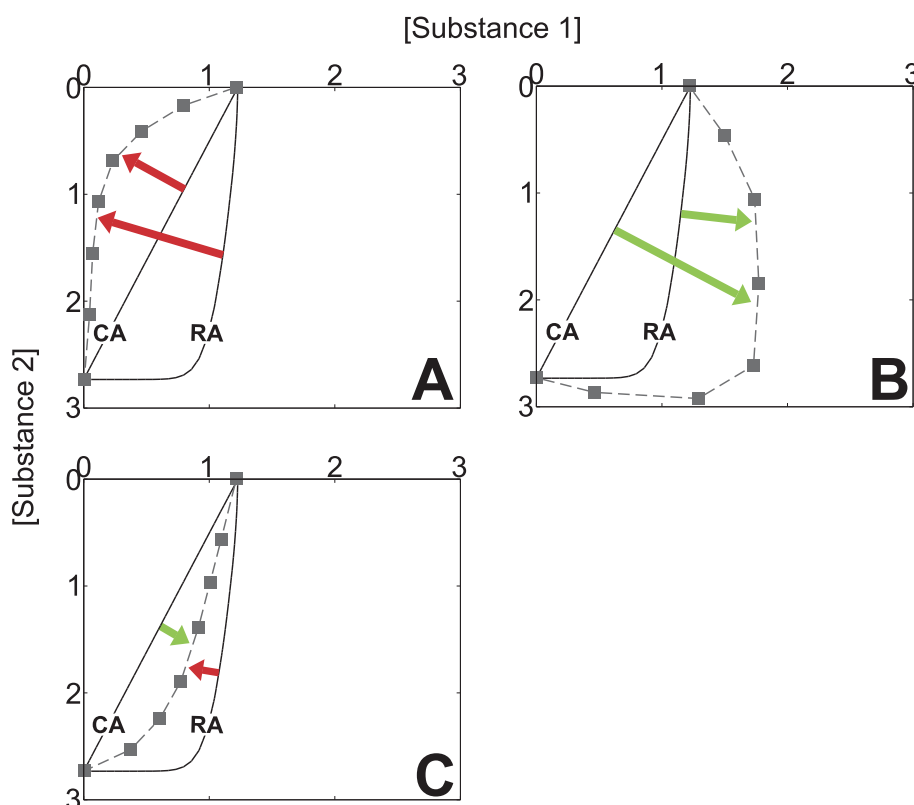
Pour les concepts d'additivité CA et RA, aucune hypothèse n'est réalisée sur les cibles biologiques affectées par les substances ni sur les propriétés des substances en mélange autres que pharmacologiques. Il s'agit de modèles descriptifs, sans réel fondement biologique.

CA et RA sont des modèles conceptuellement différents, ils représentent tous deux des

situations extrêmes de mélanges avec des substances qui, pour l'un, ont strictement le même mode d'action mais avec une efficacité toxique différente, et pour l'autre, ont des modes d'action strictement dissemblables et indépendants. Dans la pratique, il est souvent impossible de déterminer précisément à quel modèle d'additivité se référer ; les mécanismes d'action exacts des substances sont rarement connus en écotoxicologie. Par ailleurs, l'additivité théorique réelle pourrait se situer quelque part, dans une situation intermédiaire entre l'additivité CA et RA (Kortenkamp *et al.*, 2009). En conséquence, certains auteurs suggèrent de considérer équitablement les approches CA et RA pour l'étude d'un mélange, tout en gardant en mémoire leurs différences conceptuelles (Jonker *et al.*, 2005).

La valeur des paramètres de pente des courbes dose-réponse des substances détermine le niveau de différence entre l'additivité CA et RA, dans la prédiction des effets combinés. Il a été démontré que pour un mélange de  $n$  substances ayant des pentes de courbe dose-réponse infiniment grandes, l'écart de prédiction de l' $EC_{50}$  avec les modèles d'additivité CA et RA est d'au maximum un facteur  $n$ . Étant donné que (i) les pentes des courbes dose-réponse sont en réalité plus modérées et que (ii) de nombreuses études se focalisent sur des mélanges à deux ou trois substances, les écarts de prédiction possibles entre les deux modèles restent faibles.

Cependant, dans les cas où le mélange étudié ne suit pas strictement l'additivité (CA ou RA), les deux concepts peuvent aboutir à l'identification d'interactions différentes. La figure 1.5 illustre cette notion avec une représentation des isoboles de l' $EC_x$  selon les modèles d'additivité CA ou RA, pour un mélange binaire théorique. Lorsque les pentes des courbes dose-réponse sont élevées (*i.e.*  $> 1,3$ ), l'additivité RA prédit moins de toxicité que l'additivité CA (Fig. 1.5). Avec des valeurs plus faibles de pentes, l'additivité RA peut prédire une toxicité similaire ou supérieure à celle de l'additivité CA. Dans la figure 1.5, les isoboles CA et RA ne sont pas superposées. Si les données expérimentales dévient largement de l'additivité, de part et d'autre des isoboles d'additivité CA ou RA, les deux modèles conduisent aux mêmes conclusions concernant l'interaction des substances (*i.e.* synergie ou antagonisme, Fig. 1.5, A et B). Par contre, dans le cas d'une déviation plus modérée, les données expérimentales peuvent se situer entre les isoboles d'additivité CA et RA. Les deux modèles conduisent alors à l'identification d'interactions différentes. Ainsi, dans l'exemple C de la figure 1.5, lorsque l'on résonne en toxicité relative des substances (CA), un antagonisme est identifié mais si l'on résonne en termes de probabilité de réponse (RA), c'est une synergie qui est identifiée. Dans ce cas-là, une solution consiste à utiliser le modèle d'additivité de référence décrivant le mieux les données pour l'interprétation des interactions (*e.g.* Jonker *et al.*, 2005 ; Loureiro *et al.*, 2010). Une autre solution consiste à considérer que



**FIGURE 1.5** Exemple d'interprétations contrastées possibles des effets d'un mélange binaire sur la base des modèles additifs de référence : l'addition des concentrations (CA) et l'addition des réponses (RA). *Traits pleins* (isoboles) : ensemble des combinaisons de concentration des substances 1 et 2 en mélange qui sont supposées produire  $x\%$  selon l'additivité CA ou du RA. La position de l'isobole RA par rapport à l'isobole CA est déterminée par les valeurs des pentes des courbes dose-réponse des substances ; dans cet exemple, ces valeurs sont élevées ( $> 1,3$ ) et rendent les isoboles CA et RA non superposables. **A-B.** Les concentrations des substances 1 et 2 qui produisent expérimentalement  $x\%$  d'effet (—■—) sont situées à droite ou à gauche des isoboles CA et RA ; une synergie (→) ou un antagonisme (→) est identifié(e) à partir des deux modèles d'additivité de référence. **C.** Les concentrations des substances 1 et 2 qui produisent expérimentalement  $x\%$  d'effet sont situées entre les isoboles CA et RA ; un antagonisme est identifié à partir de l'additivité CA tandis qu'une synergie est identifiée à partir de l'additivité RA.

les additivités CA et RA encadrent une « fenêtre de prédiction de l'additivité » et que les données expérimentales situées dans cette fenêtre suivent l'additivité (e.g. [Altenburger et al., 2003](#) ; [Walter et al., 2002](#)), au risque de ne pas identifier une interaction (de niveau modéré) ayant réellement lieu dans le mélange.

### 1.1.3 Applications des modèles d'additivité de référence pour l'étude des effets combinés

Comme nous venons de le voir, les deux types de modèles, CA et RA, peuvent être utilisés pour calculer l'effet additif d'un mélange de substances, à partir des toxicités des substances prises séparément, et vérifier ainsi s'il est conforme (additivité) ou non (interaction) à l'effet observé. Les modèles d'additivité CA et RA peuvent être mis en œuvre à travers des approches descriptives plus ou moins élaborées, allant de l'analyse ponctuelle (*i.e.* une seule combinaison de substances) à l'analyse d'une surface de réponse complète (plusieurs combinaisons de substances produisant de 0 à 100 % d'effet). Ils peuvent également être intégrés à des approches mécanistes, cherchant à mieux prendre en compte la dynamique de l'effet des substances sur les processus biologiques.

#### 1.1.3.1 Les approches descriptives

##### *Approches ponctuelles.*

L'approche ponctuelle est la plus minimaliste pour l'étude des effets des mélanges. Elle consiste à tester l'effet d'une seule combinaison de substances et de le comparer aux effets des substances seules. Les modèles CA et RA peuvent tous les deux être utilisés pour étudier l'hypothèse d'additivité des substances bien que l'utilisation du modèle CA nécessite la connaissance des courbes dose-réponse complètes de chaque substance. Avec une telle méthode, l'identification d'interaction manque souvent de fiabilité en raison de la variabilité expérimentale. C'est particulièrement le cas lorsque les substances ont une pente de courbe dose-réponse élevée (Jonker *et al.*, 2011).

Un cas d'application intéressant est celui pour lequel l'expérimentateur veut tester l'effet d'un mélange dont toutes les substances sont à des concentrations inférieures ou égales à leurs seuils de toxicité (*e.g.* la NOEC ou *No Observed Effect Concentration*, l'EC<sub>1</sub>) (Faust *et al.*, 2003 ; Silva *et al.*, 2002). Silva *et al.* (2002) ont par exemple testé l'effet d'un mélange de huit composés œstrogéniques présents chacun à une concentration ne produisant pas d'effet significatif lors du test d'œstrogénicité sur levures recombinantes. L'effet résultant du mélange s'est avéré significatif et en accord avec les prédictions de l'additivité CA, mais pas avec celles de l'additivité RA.

##### *Approches du type : substance A en présence de B.*

Avec cette approche, l'expérimentateur cherche à comparer les courbes dose-réponse d'une substance A, en présence et en absence d'une substance B (Jonker *et al.*, 2011).

Comme pour l'approche ponctuelle, les modèles d'additivité CA et RA peuvent être appliqués, sous réserve pour le modèle CA, de l'obtention de la courbe dose-réponse pour la substance B. Une déviation de l'additivité peut être mise en évidence en utilisant les incertitudes (l'intervalle de confiance 95 %, CI<sub>95</sub>) associées au calcul des EC<sub>x</sub>.

#### *Approches par les isoboles.*

Cette méthode consiste à comparer une isobole  $x$  % théorique (CA ou RA) avec l'isobole obtenue expérimentalement (Kortenkamp *et Altenburger*, 1998 ; Syberg *et al.*, 2008). L'avantage de cette approche, par rapport aux précédentes, est qu'elle permet d'étudier d'éventuelles interactions dépendantes des ratios de concentrations des substances, c'est-à-dire, des interactions pour lesquelles la nature (synergie ou antagonisme) et/ou l'amplitude varient en fonction du ratio entre les substances en mélange. Par contre, elle nécessite l'exploration de différentes courbes dose-réponse de mélange<sup>1</sup> afin de déterminer les points de l'isobole expérimentale. Si l'expérimentateur se focalise sur une seule isobole (*e.g.* 50 %), cela revient à générer les données expérimentales d'une étude de surface de réponse mais en limitant l'analyse à une seule section de cette surface (Jonker *et al.*, 2011).

Deux méthodes d'identification des déviations de l'additivité ont été utilisées avec l'approche par les isoboles. L'une consiste à déterminer graphiquement si les points de l'isobole expérimentale, affectés de leurs CI<sub>95</sub>, s'éloignent de l'isobole théorique (Cedergreen *et Streibig*, 2005). L'autre consiste à ajouter un ou plusieurs paramètres d'interaction aux équations des isoboles. Par exemple, le modèle CA de Hewlett (1969) utilise un seul paramètre d'interaction  $\lambda$  ; l'isobole est formulée :

$$\sum_{i=1}^n \left( \frac{c_i}{EC_{x_i}} \right)^{1/\lambda} = 1 \quad (1.4)$$

avec  $n$  : le nombre de substances en mélange ;  $c_i$  : la concentration du composé  $i$  du mélange ;  $EC_{x_i}$  : la concentration du composé  $i$  provoquant  $x$  % d'effet lorsque appliquée seule. L'isobole d'additivité correspond au cas où  $\lambda = 1$ .

Le paramètre  $\lambda$  est ajusté à l'aide des données expérimentales puis un test statistique de Fisher est utilisé pour déterminer si l'isobole ainsi obtenue est significativement différente d'une ligne droite (*i.e.*  $\lambda \neq 1$ ), c'est à dire, si une interaction significative est détectée. Dans le cas où  $\lambda < 1$ , il s'agit d'un antagonisme ; dans le cas où  $\lambda > 1$ , il s'agit d'une synergie. D'autres équations d'isoboles, comportant plusieurs paramètres d'interaction, ont été formulées afin que celles-ci soient asymétriques et rendent ainsi compte d'interactions dé-

1. Voir § *Approches par les courbes dose-réponse de mélange* (p. 22).

pendantes des ratios des concentrations des substances en mélange (Hewlett, 1969 ; Sørensen *et al.*, 2010).

### *Approches par les courbes dose-réponse de mélange.*

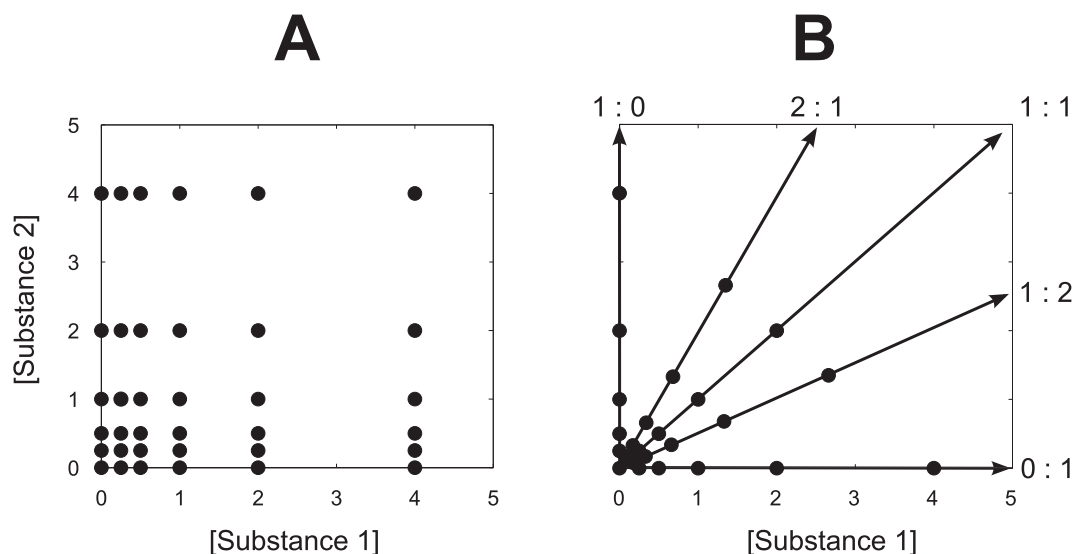
Avec cette approche, il s'agit d'étudier les effets combinés de substances en faisant varier leurs concentrations tout en gardant leurs proportions en mélange (ratios) fixes. Les plans expérimentaux utilisés pour cette approche sont appelés plans expérimentaux de raies ou de ratios fixes (Fig. 1.6, B). Des courbes dose-réponse sont ajustées aux données d'exposition aux substances seules ainsi qu'aux combinaisons de substances à ratio fixe afin d'estimer les  $EC_x$  et leurs  $CI_{95}$ . Les  $EC_x$  des mélanges sont ensuite comparées aux prédictions des modèles CA ou RA à partir des  $EC_x$  des substances seules (Chou *et Talalay*, 1983 ; Van Der Geest *et al.*, 2000). Les  $CI_{95}$  permettent d'évaluer le degré de significativité d'une déviation de l'addition (Posthuma *et al.*, 1997).

Cette approche a été plutôt utilisée lors d'un cas particulier d'application du modèle d'additivité CA, pour lequel les substances en mélange ont une pente de courbe dose-réponse identique. Dans ce cas-là, en ajustant une courbe dose-réponse aux données de mélange, dont les concentrations sont transformées en TU, l' $EC_{50}$  obtenue doit être égale à 1. Si le  $CI_{95}$  de l' $EC_{50}$  exclut cette valeur, une interaction significative est détectée (Van Gestel *et Hensbergen*, 1997).

Certains auteurs ont étendu ce type d'approche afin de détecter d'éventuelles interactions dépendantes du niveau de dose, c'est-à-dire, des interactions pour lesquelles la nature (synergie ou antagonisme) et/ou l'amplitude varient en fonction du niveau d'effet produit par le mélange (Gennings *et al.*, 2002 ; Van Der Geest *et al.*, 2000). Par contre, se focalisant sur des mélanges à ratio fixes, elles ne permettent pas directement d'étudier d'éventuelles interactions dépendantes des ratios entre les substances (Jonker *et al.*, 2011).

### *Approches par régression linéaire multiple généralisée.*

L'approche statistique de la régression linéaire multiple généralisée peut être appliquée à l'étude des effets combinés de composés toxiques moyennant l'utilisation de fonctions de lien (*e.g.* la fonction *logit* pour une régression logistique). Cette méthode est proche du modèle d'additivité CA et l'introduction de termes d'interaction dans la régression permet de tester la significativité d'une interaction. Elle a l'avantage de pouvoir prédire entièrement la surface de réponse en mélange à partir des courbes dose-réponse des substances individuelles (Gennings, 1995 ; Iwasaki *et Brinkman*, 2015 ; Narotsky *et al.*, 1995). Les



**FIGURE 1.6** Exemples de plans expérimentaux pour l'étude de la toxicité de mélanges binaires. **A** : Plan expérimental factoriel complet, toutes les combinaisons de concentration entre les substances 1 et 2 (●) sont testées. **B** : Plan expérimental de raies ou de ratios fixes. Les flèches représentent les raies pour lesquelles toutes les conditions testées ont un ratio de concentrations identique entre les substances 1 et 2 (0 : 1, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, et 1 : 0).

plans expérimentaux de type factoriel (partiel) (Fig. 1.6, A) sont particulièrement intéressants avec cette méthode d'analyse car ils permettent de couvrir la surface de réponse de façon homogène.

La régression multiple présente cependant quelques désavantages pour l'étude des mélanges. Étant par définition liée au modèle d'CA, cette approche ne peut pas être utilisée avec le modèle RA. De plus, elle ne permet pas d'identifier des interactions dépendantes du niveau de dose et n'est pas conçue pour détecter directement des interactions dépendantes du ratio entre les substances (Jonker *et al.*, 2011).

#### *Approches par surface de réponse non linéaire.*

Dans ce type d'approche, les équations des relations dose-réponse des substances seules sont intégrées aux modèles d'additivité CA et RA afin de prédire n'importe quel point de la surface de réponse. L'ajustement des modèles est réalisé sur l'ensemble des données expérimentales (substances seules et mélanges). Le fait d'utiliser la régression non linéaire permet à ces approches de prendre en compte les différences de formes des courbes dose-réponse des composés en mélange (Jonker *et al.*, 2011). De même que pour la régression multiple, les plans expérimentaux factoriels (partiels) ou couvrant équitablement l'ensemble de la surface de réponse, permettent une modélisation optimale avec les approches par surface de réponse non linéaire.



De nombreuses mises en œuvre ont été faites dans la littérature par l'intermédiaire de formulations différentes. Certaines proposent de calculer une surface de non-interaction et de construire un intervalle de prédiction à partir des incertitudes sur les paramètres des courbes dose-réponse (*e.g.* Goldoni *et* Johansson, 2007). D'autres proposent d'intégrer des fonctions de déviation aux modèles pour rendre compte de différents types d'interactions (*e.g.* interactions simples, dépendantes des ratios de substances ou encore dépendantes du niveau de dose). La structure emboîtée de ces dernières (du modèle additif vers un modèle d'interaction complexe) permet de tester, à chaque étape, si l'ajout de paramètres d'interaction améliore significativement l'ajustement des données ou non (test du rapport de vraisemblance) (Greco *et al.*, 1995 ; Haas *et al.*, 1997 ; Jonker *et al.*, 2005).

Étant donné que les méthodes de statistiques non linéaires font encore l'objet de recherches, des améliorations pourraient encore y être apportées, notamment au niveau de certaines approximations réalisées dans les procédures statistiques (Jonker *et al.*, 2011).

### 1.1.3.2 Les approches mécanistes

#### *Les modèles Toxicocinétiques/Toxicodynamiques.*

Historiquement, les études menées dans le cadre de l'évaluation du risque écotoxicologique se sont plutôt focalisées sur la description de l'effet de substances à partir de leurs concentrations d'exposition externe, pour un temps d'exposition fixe ; les voies d'exposition et les processus internes à l'organisme étant considérés comme une « boîte noire » et les effets observés étant reliés aux concentrations d'exposition externe (Svendsen *et al.*, 2011). Ce type d'études permet de définir des valeurs écotoxicologiques de référence telles que la NOEC ou les  $EC_x$  qui sont ensuite utilisées pour la caractérisation du risque écotoxicologique. L'usage de ces valeurs de référence est cependant de plus en plus souvent remis en question car leur détermination est fortement dépendante des facteurs expérimentaux : la NOEC est dépendante des concentrations testées et du niveau de significativité choisi ; NOEC et  $EC_x$  sont dépendantes de l'organisme, du critère d'effet étudié (et notamment de sa variabilité), de la durée d'exposition, etc. Ces dépendances rendent ces valeurs peu fiables (NOEC), peu représentatives des processus dynamiques environnementaux et restreignent leur domaine d'application (Chapman *et al.*, 1996 ; Jager, 2011, 2012 ; Warne *et* Van Dam, 2008). Par exemple, l'évaluateur pourra difficilement s'appuyer sur de telles données lorsque pour un scénario d'exposition, les concentrations du ou des contaminants dans le milieu varient au cours du temps (*pulse exposure*) (Svendsen *et al.*, 2011). Dans le cadre de l'étude des mélanges, la compréhension de la cinétique d'apparition des effets des substances et des interconnexions entre critères d'effets pourrait permettre une meilleure

caractérisation des interactions pouvant avoir lieu.

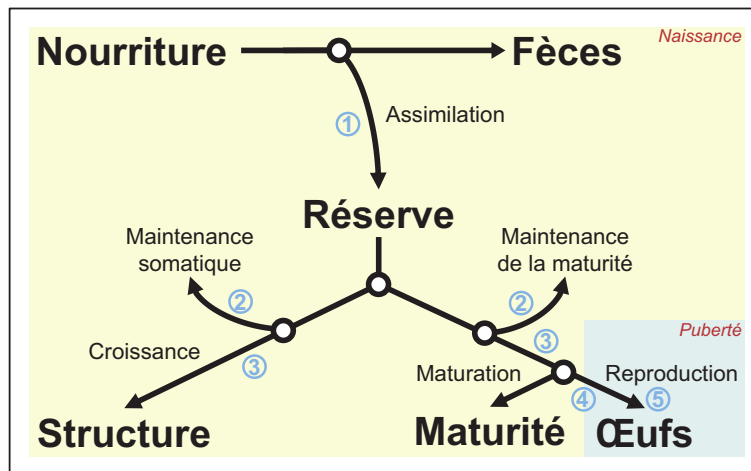
Avec l'avènement du calcul assisté par informatique, des modèles dynamiques ont été mis au point, d'abord en toxicologie humaine puis en écotoxicologie, afin de décrire les cinétiques d'internalisation et d'induction des effets des substances, par intégration d'équations mathématiques. Parmi ces modèles, deux grands niveaux de complexité peuvent être distingués. D'un côté, se trouvent des modèles simples, descriptifs des données expérimentales, pour lesquels la phase d'apprentissage (*i.e.* l'estimation des valeurs des paramètres) est réalisée à partir de ces données (Svendsen *et al.*, 2011). Un exemple de modèle simple, largement utilisé pour décrire la toxicocinétique d'une substance, est le modèle de diffusion à un compartiment. Dans ce type de modèle, l'organisme est considéré comme un seul compartiment et une cinétique simple (loi de diffusion de Fick) est utilisée pour décrire l'internalisation et l'excrétion de la substance (*e.g.* Kooijman *et Bedaux*, 1996). D'un autre côté, se trouvent des modèles plus complexes qui mettent en jeu un nombre plus important de paramètres. Ces paramètres sont généralement mesurés ou estimés à partir de données d'expériences dédiées et indépendantes. La qualité des prédictions est ensuite éprouvée sur un jeu de données test (*e.g.* Péry *et al.*, 2011). En toxicologie humaine, des modèles toxicocinétiques complexes sont couramment utilisés. Ils comportent différents compartiments de tissus ou organes interconnectés par un système circulatoire.

### *Du modèle DEB pour l'écologie ...*

La théorie du budget énergétique dynamique (DEB) a été mise au point par S. A. L. M. Kooijman et est développée en écologie depuis une trentaine d'années (Kooijman, 1986, 2010).

Celle-ci se base sur le principe de conservation de l'énergie pour décrire, de manière simplifiée, les processus complexes d'acquisition et d'utilisation de l'énergie dans un organisme, dans le but de décrire sa physiologie (*e.g.* croissance, reproduction, etc.) au cours du temps et en fonction des paramètres extérieurs (*e.g.* disponibilité de nourriture, température). L'énergie assimilée à partir de la nourriture est convertie en réserve. De cette réserve, une partie est utilisée pour assurer la maintenance somatique et la croissance tandis qu'une autre partie est allouée à la maturation/reproduction ainsi qu'à la maintenance de la maturité (Fig. 1.7, Kooijman, 2010).

Le modèle DEB est un modèle mécaniste dans la mesure où la description des différents flux par des équations mathématiques se veut réaliste par rapport aux observations biologiques. La construction d'un modèle DEB nécessite un grand nombre de paramètres physiologiques. Une partie de ces paramètres est déterminée expérimentalement (*e.g.* expérience



**FIGURE 1.7** Schématisation des flux d'énergie considérés dans le modèle DEB standard et modes d'actions du modèle DEBtox simplifié.  $\longrightarrow$  : flux d'énergie. Le flux d'énergie investi dans la reproduction débute à la puberté de l'organisme. Ces flux peuvent être impactés par des contaminants selon différents modes d'action proposés dans le modèle DEBtox simplifié. ① : réduction de l'assimilation de la nourriture ; ② : augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité ; ③ : augmentation des coûts de maturation/reproduction et de fabrication d'unités de structure ; ④ : augmentation des coûts de production des œufs ; ⑤ : mortalité durant l'oogenèse. (Illustration inspirée de Kooijman, 2010).

de mesure des effets d'une restriction calorique, de la température), les autres peuvent être estimés à partir du jeu de données (Augustine *et al.*, 2011 ; Kooijman, 2010).

Par l'intermédiaire de la description de processus physiologiques au sein d'un organisme, le pouvoir prédictif du modèle DEB peut aussi être étendu au niveau des populations d'individus, voire à des échelles supérieures (Kooijman, 2010).

Les effets de contaminants peuvent également être pris en compte dans le cadre de la théorie DEB. Les effets toxiques sont dans ce cas considérés comme une charge métabolique supplémentaire nécessitant de l'énergie pour la gestion du composé internalisé, son élimination ainsi que la réparation des cibles biologiques endommagées. L'investissement de cette énergie est réalisée au détriment du métabolisme basal. En outre, des dommages directs, n'affectant pas les flux d'énergie, peuvent aussi être intégrés au modèle (*e.g.* effet direct sur la reproduction) (Kooijman, 2010).

... au modèle DEBtox standard pour l'écotoxicologie.

Le modèle DEBtox standard, proposé pour la première fois par Kooijman *et Bedaux* (1996), est un modèle toxicocinétique/toxicodynamique (TKTD) fondé sur une version simplifiée du modèle DEB. Il a été mis au point tout d'abord chez la Daphnie, puis adapté à d'autres organismes, et a déjà été appliqué avec succès pour décrire l'effet de composés

inorganiques et organiques (*e.g.* Ducrot *et al.*, 2007 ; Jager *et al.*, 2007 ; Péry *et al.*, 2003). Le modèle DEBtox standard s'appuie sur les hypothèses ci-dessous, venant s'ajouter aux hypothèses du modèle DEB standard (Jager *et Zimmer*, 2012).

- Le ratio entre le niveau de structure et de maturité est constant pour les embryons et les juvéniles. Ceci implique que la taille des individus à la puberté est constante, y compris en situation de stress.
- Le coût de production d'un œuf est constant, sauf dans le cas d'un effet direct d'un contaminant.
- La quantité de réserve est toujours à l'état d'équilibre avec le niveau de nourriture.

Ce modèle TKTD simplifié permet de faire le lien entre la concentration d'exposition au toxique, la fraction internalisée et les effets sur la croissance, la reproduction et la survie au cours du temps, à partir de jeux de données moins conséquents que ceux nécessaires à l'utilisation des modèles DEBtox complets. Une mesure de la croissance, de la reproduction et de la survie au cours du temps est suffisante pour l'estimation des paramètres nécessaires aux modules TK et TD (Jager *et Zimmer*, 2012).

Le module TK du DEBtox permet de prédire l'internalisation d'une substance au cours du temps par un organisme à partir de la concentration de cette substance dans le milieu d'exposition. Il est construit sur un modèle de diffusion simple, à un compartiment, mais avec la particularité que la taille du compartiment peut évoluer au cours du temps (*i.e.* dilution de la concentration interne de la substance toxique par la croissance de l'organisme, Kooijman *et Bedaux*, 1996) :

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{k_e}{l} (C_e - c_i) - c_i \frac{3}{l} \frac{dl}{dt} \quad (1.5)$$

avec  $C_e$  : la concentration externe du composé toxique ;  $c_i$  : la concentration interne  $C_i$  du composé toxique normalisée par son BCF ;  $k_e$  : le taux d'élimination ;  $l$  : la longueur de l'organisme normalisée par la longueur maximale.

Ce module simplifié, pour lequel la concentration interne de la substance est normalisée par le facteur de bioconcentration (BCF), permet l'estimation du paramètre  $k_e$  uniquement à partir des données expérimentales d'effets, c'est-à-dire, sans données expérimentales de bioaccumulation. Une version non simplifiée du module peut également être utilisée mais nécessite l'acquisition de données expérimentales sur la cinétique d'internalisation des substances en plus du suivi des effets toxiques (*e.g.* Ashauer *et al.*, 2007).

Dans le module TD du DEBtox, les effets toxiques d'une substance sont supposés débuter à partir d'une concentration seuil, la concentration sans effet (NEC), et être proportionnels à la concentration interne de la substance au-delà de la NEC. Ainsi, le niveau stress se calcule à partir de l'équation (Billoir *et al.*, 2008b) :

$$s = b_T \max(c_i - c_0) \quad (1.6)$$

avec  $s$  : le niveau de stress ;  $b_T$  : le paramètre déterminant la pente de la droite de stress ;  $c_0$  : la NEC ;  $\max(x)$  : la fonction retournant le maximum entre  $x$  et 0.

Une fois calculée, cette fonction de stress est utilisée pour affecter les paramètres physiologiques du DEB selon cinq modes d'action différents, au choix (Fig. 1.7). Trois affectent à la fois la croissance et la reproduction, deux affectent uniquement la reproduction (Jager *et Zimmer*, 2012) :

- Réduction de l'assimilation de la nourriture ①
- Augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité ②
- Augmentation des coûts maturation/reproduction et de fabrication d'unités de structure ③
- Augmentation des coûts de production des œufs ④
- Mortalité durant l'oogenèse ⑤

Dans le cadre des modes d'actions ①, ② et ③, les substances affectent à la fois la croissance et la reproduction. Dans le cadre du mode d'action ③, les substances diminuent la cinétique de croissance mais n'affectent pas la longueur maximale. Ainsi, après une période suffisante, les organismes exposés atteignent la même longueur finale que les organismes non exposés. Ce n'est pas le cas avec les modes d'action ① et ②. Dans le cadre des modes d'action ④ et ⑤, seule la reproduction est affectée.

Pour la survie, une fonction de stress supplémentaire, similaire à celle présentée ci-dessus (Eqn. 1.6) est nécessaire. La probabilité qu'un individu meure est calculée à partir de cette fonction de stress et s'ajoute à la probabilité qu'un individu meure dû à son vieillissement (Jager *et Zimmer*, 2012).

### *Application du DEBtox aux mélanges de contaminants.*

Dans l'étude de Péry *et al.* (2008), un modèle comparable au modèle DEBtox a été utilisé pour établir les relations dose-réponse du Cu, Zn ou Cd sur la croissance de larves

*Chironomus riparius*. Les auteurs ont pu ensuite prédire correctement la toxicité de mélanges binaires de ces ETM, à partir des prédictions de toxicité pour les ETM seuls et du modèle d'additivité RA classique, définis précédemment (Eqn. 1.3<sup>1</sup>).

Le modèle DEBtox a par la suite été adapté afin de pouvoir intégrer directement les effets combinés de substances. Jager *et al.* (2010) ont par exemple proposé une adaptation des modèles additivités CA et RA, sans interaction, à travers les équations 1.7 et 1.8, respectivement. Il faut cependant noter que ces adaptations « mécanistes » ne produisent pas nécessairement les mêmes niveaux de réponse que les modèles d'additivité CA et RA classiques. Aussi, pour la suite, nous dénommerons CA<sub>Dt</sub> et RA<sub>Dt</sub> les modèles d'additivité CA et RA mis en œuvre dans le DEBtox.

$$c_{i_{mix}} = c_{i_1} + W_2 c_{i_2} + \dots + W_n c_{i_n} \quad (1.7a)$$

$$s_{mix} = b_{T_{mix}} \max(c_{i_{mix}} - c_{0_{mix}}) \quad (1.7b)$$

$$P_s = P_0 (1 - s_{mix}) \quad (1.7c)$$

avec  $c_{i_{mix}}$  : la concentration totale du mélange en équivalent du composé 1 ;  $W_n$  : facteur d'équivalence de concentration de la n-ième substance vis-à-vis de celle du composé 1, établi sur la base du potentiel de toxicité des substances ;  $s_{mix}$ ,  $b_{T_{mix}}$  et  $c_{0_{mix}}$  : les paramètres de la fonction de stress du mélange ;  $P_0$  : un paramètre physiologique DEB des individus non exposés ;  $P_s$  : ce même paramètre est affecté par la fonction de stress du mélange chez les individus exposés.

Dans le cas du CA<sub>Dt</sub>, les substances en mélange sont considérées comme des analogues agissant sur la même cible biologique et selon un même mode d'action DEBtox mais n'ayant pas le même potentiel toxique. Le mélange représente une dilution de ces substances (Eqn. 1.7a). Chacune d'entre elles possède son propre module TK mais elles partagent le même module TD (Eqn. 1.7b et 1.7c, Fig. 1.8). Les concentrations internalisées des substances ( $c_{i_n}$ ), corrigées par leur potentiel toxique ( $W_n$ ), sont ajoutées. La toxicité d'une des substances du mélange sert de référence pour l'estimation du potentiel toxique des autres substances du mélange. Le CA<sub>Dt</sub> permet une analyse des effets de mélanges sans forcément obtenir les courbes dose-réponses complètes des substances seules (Jager *et al.*, 2010).

Dans le cas du RA<sub>Dt</sub>, les substances en mélange sont considérées comme agissant sur des cibles biologiques différentes. Elles ont leurs propres modules TK et TD. Elles peuvent affecter un organisme selon le même mode d'action DEBtox, ou selon des modes d'ac-

1. p. 17.

tions différents (Fig. 1.8). Les différentes fonctions de stress peuvent ainsi être appliquées à un même paramètre physiologique DEBtox (Eqn. 1.8b), ou à des paramètres différents (Eqn. 1.8c) ou encore, selon n'importe quelle situation intermédiaire.

$$s_1 = b_{T_1} \max(c_{i_1} - c_{0_1}) \quad [\dots] \quad s_n = b_{T_n} \max(c_{i_n} - c_{0_n}) \quad (1.8a)$$

$$P_s = P_0 (1 - s_1) \dots (1 - s_n) \quad (1.8b)$$

ou

$$P_{s_1} = P_{0_1} (1 - s_1) \quad [\dots] \quad P_{s_n} = P_{0_n} (1 - s_n) \quad (1.8c)$$

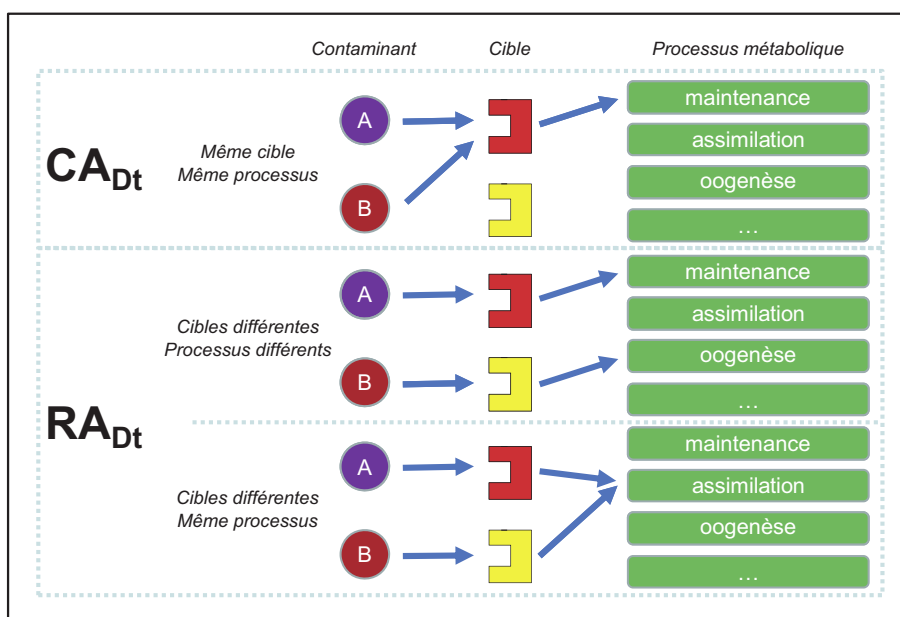
avec  $s_1 \dots s_n$  : les fonctions de stress des composés 1 à  $n$ ;  $P_s$  : un paramètre physiologique DEB affecté par les fonctions de stress de toutes les substances en mélanges;  $P_{s_1} \dots P_{s_n}$  : des paramètres physiologiques DEB affectés chacun par la fonction de stress d'une des substances en mélange.

Le  $CA_{Dt}$  appliqué à la modélisation des effets combinés du fluoranthène et du pyrène, deux hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), a permis de décrire correctement la croissance, la reproduction et la survie du crustacé *Daphnia magna* (Jager *et al.*, 2010). Plus récemment, le  $RA_{Dt}$  a été utilisé pour décrire les effets du Cd et du fluoranthène sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* (Jager *et al.*, 2014). L'approche  $RA_{Dt}$  et l'approche RA classique ont permis toutes deux d'identifier une interaction antagoniste. Néanmoins, avec l'approche DEBtox mélange, des hypothèses sur le mécanisme d'interaction ont pu être testées. La diminution du paramètre lié à l'internalisation du fluoranthène ( $k_e$ ), spécifiquement pour les données d'exposition au mélange, a permis une amélioration significative de l'ajustement global des données par le modèle (test du  $\chi^2$ ). L'hypothèse mise en avant par les auteurs est que le Cd induit une réduction de l'alimentation des nématodes qui, par conséquent, modifie le taux d'internalisation du fluoranthène.

Dans l'étude de Baas *et al.* (2009), des adaptations alternatives du CA ont été utilisées pour modéliser les effets de six mélanges binaires d'ETM<sup>1</sup> sur la survie du collembole *Folsomia candida*. L'addition des concentrations  $CA_{Dt}$  a été substituée par deux modèles : l'un de liaison réversible des substances à la cible biologique (la NEC d'un composé dépend de l'autre composé), l'autre de liaison irréversible (dès l'apparition des effets, la NEC reste fixe). Un paramètre a été introduit pour rendre compte d'éventuelles interactions. Seule une déviation antagoniste de l'additivité a été identifiée pour le mélange Cu/Pb.

---

1. De Cu, Pb, Zn et Cd.



**FIGURE 1.8** Schématisation de l'implémentation des effets combinés de deux substances (A et B) à travers le modèle DEBtox simplifié. Les substances peuvent affecter un ou plusieurs processus métabolique(s) par l'intermédiaire d'une ou plusieurs cible(s) biologique, selon l'addition des concentrations ( $CA_{Dt}$ ) ou l'addition des réponses ( $RA_{Dt}$ ). (Illustration adaptée de Jager, 2013).

### 1.1.4 Synthèse

Pour répondre à la réalité environnementale des mélanges de contaminants, les réglementations et démarches d'évaluation du risque écotoxicologique commencent à intégrer la problématique des mélanges. Deux modèles de référence, l'addition des concentrations et l'addition de réponse, sont classiquement utilisés dans la phase de caractérisation du risque pour la prédiction des effets additifs de substance qui n'interagissent pas. L'additivité CA est généralement utilisée pour les substances agissant selon un même mode d'action tandis que l'additivité RA est généralement utilisée pour des substances ayant des modes d'action strictement indépendants. Ces approches souffrent cependant de sources d'incertitudes non négligeables : d'une part, les mécanismes de toxicité des substances étant encore mal connus en écotoxicologie, le choix entre CA et RA est souvent difficile ; d'autre part, des interactions peuvent s'opérer entre les substances en mélange et aboutir à une toxicité globale supérieure ou inférieure à la toxicité prédite par les modèles d'additivité. Ces incertitudes affectent la qualité des démarches d'évaluation des risques ce qui peut aboutir à des impacts environnementaux, dans le cas d'une sous-évaluation du risque, ou à des surcoûts économiques, dans le cas d'une surestimation du risque.


De nombreux mécanismes peuvent être à l'origine d'interactions entre substances en



mélange, que ce soit dans le milieu d'exposition ou au niveau des organismes, durant les phases toxicocinétiques et toxicodynamiques. La diversité des substances présentes dans l'environnement rend impossible l'évaluation de la toxicité de tous les mélanges potentiels. L'étude des effets de mélanges simples peut cependant permettre d'améliorer nos connaissances sur les interactions pour, à terme, rendre l'évaluation du risque écotoxicologique des mélanges plus robuste.

Différents types d'approches basées sur l'additivité CA et/ou RA, plus ou moins complexes, ont été développés et appliqués pour identifier les interactions entre substances. Les approches descriptives, les plus anciennes, ont été largement éprouvées. Parmi elles, l'approche de [Jonker \*et al.\* \(2005\)](#), qui figure parmi les plus informatives et robustes, consiste à analyser à la fois les effets de substances seules et de mélanges de ces substances en différentes proportions, de manière à couvrir l'ensemble de la surface de réponse. L'analyse est réalisée sur la base de l'additivité CA et RA et au moyen de différents modèles d'interactions. Mais de par leur nature descriptive, les renseignements obtenus sur les effets combinés d'un mélange à partir des approches descriptives peuvent s'avérer limités. Des études comme celles de [Van Gestel \*et Hensbergen\* \(1997\)](#), [Cedergreen \*et Streibig\* \(2005\)](#), [Baas \*et al.\* \(2007\)](#) et [Kamunde \*et MacPhail\* \(2011\)](#) montrent que différents types d'effets combinés et d'interactions peuvent être identifiés en fonction du critère d'effet ou du temps d'exposition considéré. Les approches mécanistes de type TKTD, apparues plus récemment en écotoxicologie, pourraient constituer une alternative plus informative et robuste aux approches descriptives pour la problématique des mélanges. L'approche DEBtox, qui est actuellement la plus aboutie, permet d'intégrer au cours du temps les effets de substances (seules ou en mélanges) sur différents critères d'effet (*e.g.* croissance, reproduction, survie). L'application de ce type d'approche à la problématique des mélanges pourrait, en outre, aider à la compréhension des mécanismes d'interaction entre les substances. Cependant, les exemples d'étude des effets combinés de substances à partir d'approches mécanistes sont encore peu nombreux. Par ailleurs, l'utilisation de ces approches est expérimentalement plus contraignante car elle nécessite de générer des jeux de données plus conséquents, avec le suivi de la cinétique des effets sur plusieurs traits de vie des organismes.

**Tableau 1.2** Classification scientifique du nématode *Caenorhabditis elegans* d'après les travaux de Maupas (1900) et de Dougherty (1955).

<b>Règne</b>	Animalia	
<b>Embranchement</b>	Nematoda	
<b>Classe</b>	Secernentea	
<b>Ordre</b>	Rhabditida	
<b>Famille</b>	Rhabditidae	
<b>Genre</b>	<i>Caenorhabditis</i>	
<b>Espèce</b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	

## 1.2 *Caenorhabditis elegans* comme organisme modèle

Cette section a pour but de présenter le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'organisme d'étude utilisé pour ce projet. Elle cherche à exposer ses différentes caractéristiques biologiques et à mettre en évidence l'intérêt de son utilisation en écotoxicologie.

### 1.2.1 Phylogénie

*Caenorhabditis elegans* est un nématode, ver rond, de la famille des *Rhabditidae* et du genre *Caenorhabditis*. Cet invertébré a été étudié, caractérisé et classifié pour la première fois au cours des travaux du biologiste français É. Maupas vers la fin du XIX<sup>e</sup> siècle (Maupas, 1900). Sa classification fut modifiée pour la dernière fois par E. C. Dougherty en 1955. La classification actuelle est présentée dans le tableau 1.2.

### 1.2.2 Écologie

Bien que *C. elegans* soit largement utilisé dans de nombreux domaines de la recherche biologique comme la biologie moléculaire ou l'écotoxicologie<sup>1</sup>, le mode de vie et l'habitat à l'état naturel de cet organisme restent relativement méconnus. *C. elegans* est présent dans le monde entier mais il a rarement été observé en dehors de zones sous influence anthropique (Barrière et Félix, 2005).

Sans la présence de matière organique, le sol ne constitue pas véritablement l'habitat de *C. elegans*. Les populations se développent de manière exponentielle dans les matières et

1. Voir sections 1.2.4 (p. 36) et 1.2.5 (p. 37).

eaux interstitielles riches en nutriments et microorganismes (probablement dans les zones boisées, au niveau d'éléments en décomposition, où abondent isopodes et gastéropodes) jusqu'à épuisement de la ressource. Le sol, d'autres espèces d'invertébrés (*e.g.* les gastéropodes) ainsi que les eaux de ruissellement, constituent alors un moyen de déplacement des juvéniles et larves de résistance (*dauer*)<sup>1</sup> vers une nouvelle source de nourriture (Barrière et Félix, 2005 ; Kiontke et Sudhaus, 2006).

*C. elegans* est un nématode bactériophage (Kiontke et Sudhaus, 2006). En laboratoire, les cultures de *C. elegans* sont généralement réalisées à l'aide d'*Escherichia coli*, bactérie intestinale, comme source de nourriture. Cependant *E. coli* n'est certainement pas leur source de nourriture naturelle ; les microorganismes dont se nourrissent ces nématodes n'ont pas encore été précisément identifiés (Grewal, 1991 ; Kiontke et Sudhaus, 2006).

### 1.2.3 Anatomie et physiologie

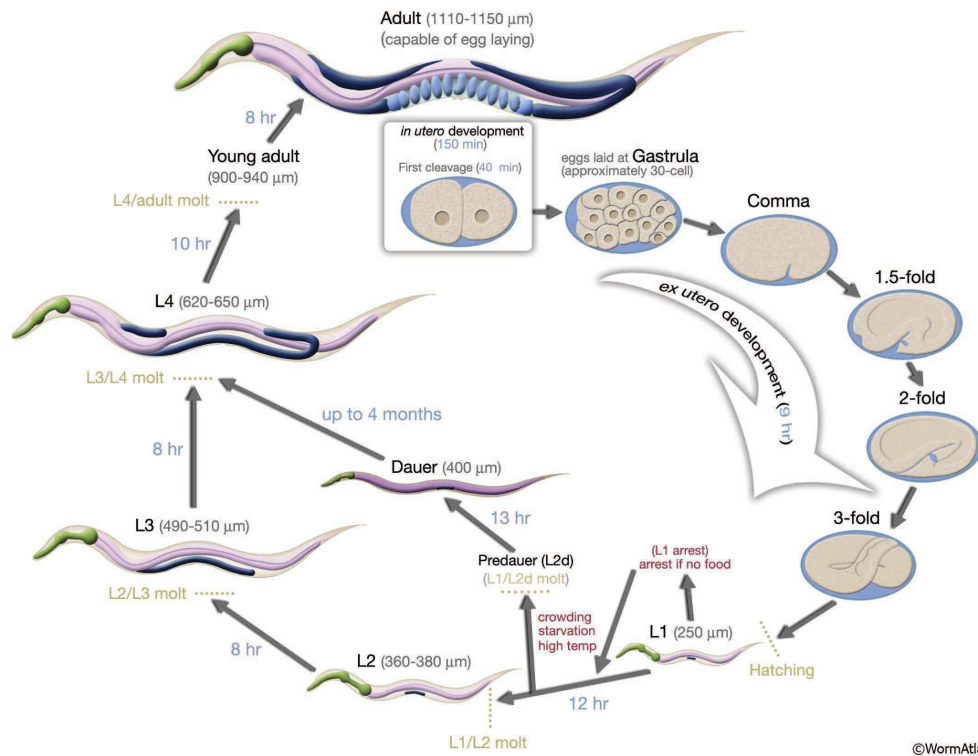
*C. elegans* est un nématode transparent à la lumière du microscope, mesurant entre 200 et 1400 µm de long, en fonction de son stade de développement. Sa croissance s'effectue suivant quatre phases, séparées par des mues successives, avant d'atteindre le stade adulte. La plupart des individus *C. elegans* sont hermaphrodites et autogames (Maupas, 1900). Un adulte pond généralement 300 œufs. Des individus mâles peuvent également apparaître à la suite d'une mauvaise répartition des chromosomes X à la méiose. La fréquence d'apparition est d'environ 0,1 à 0,2 % mais elle peut être amplifiée en condition de stress (Altun et Hall, 2009b).

La température est un paramètre affectant la croissance et la ponte des nématodes, aussi, les températures de cultures en laboratoire sont généralement comprises entre 15 et 25 °C (Byerly *et al.*, 1976 ; Stiernagle, 2006). Dans ces conditions, le cycle de vie de *C. elegans* est très rapide. À 20 °C, trois jours sont nécessaires à une larve L1 qui vient d'éclore pour atteindre l'âge adulte ; cinq jours après éclosion, les nématodes atteignent leur longueur maximale et ont pondu l'ensemble de leurs œufs féconds. Maintenu en laboratoire, *C. elegans* peut vivre jusqu'à trois semaines. Le cycle de vie complet de *C. elegans* est détaillé en figure 1.9. *C. elegans* apparaît comme un organisme hautement tolérant aux variations de pH et de salinité dans les milieux liquides. Khanna *et al.* (1997) ont pu montrer que la mortalité de ce nématode n'était pas significativement affectée après une exposition de 96 h à une gamme de pH entre 3,2 et 11,8 et jusqu'à des concentrations de 15,5 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

En cas de stress (*e.g.* hautes températures, surconcentration des individus, absence de

---

1. Voir section 1.2.3 (p. 34).



**FIGURE 1.9** Cycle de vie de *C. elegans* à 22 °C. (Illustration issue d'Altun *et Hall*, 2009b).

nourriture), les larves L1 proches d'effectuer leur première mue (L1  $\rightarrow$  L2) peuvent réaliser une mue alternative vers un stade de diapause appelé *dauer* (Cassada *et Russell*, 1975). Sous cette forme, les larves peuvent survivre jusqu'à six mois en attente de conditions environnementales plus favorables (Altun *et Hall*, 2009b). Un arrêt du cycle de vie se produit également lorsque les nématodes éclosent en absence de nourriture. Sous cette forme, les larves L1 peuvent survivre plusieurs semaines (Baugh, 2013).

Le corps de *C. elegans* est recouvert d'une cuticule à réseau de collagène sécrétée par des cellules sous-jacentes (épiderme) et renouvelée après chaque mue (Lints *et Hall*, 2009). En dessous, se situent des masses musculaires permettant les mouvements de reptation et de nage (Altun *et Hall*, 2009b). Les organes sont localisés vers le centre et baignent dans le liquide pseudocœlomique, jouant un rôle hydrostatique et de système circulatoire (Altun *et Hall*, 2009b). L'appareil digestif de *C. elegans* débute par une bouche reliée à un pharynx bilobé. Ce dernier assure l'aspiration et le broyage de la nourriture avant de la propulser dans l'intestin. Le pH intra-luminal s'échelonne entre 4,7 et 3,6 le long de l'intestin (Chauhan *et al.*, 2013). Le tractus digestif s'achève par un pore excrétoire situé dans la partie postérieure du nématode (Altun *et Hall*, 2009a).

Chez les individus hermaphrodites, l'appareil reproducteur est constitué d'une gonade

bipartite (*i.e.* proximale et distale) reliée à l'utérus par l'intermédiaire d'une spermathèque, poche contenant les spermatozoïdes produits. La spermatogenèse débute au stade L4 et aboutit, durant le stade adulte, à la constitution d'un nombre fixe de spermatozoïdes. La spermatogenèse, en s'achevant, laisse place à l'oogenèse. Puis, la ponte d'œufs féconds débute et se poursuivra jusqu'à épuisement de la spermathèque (L'Hernault, 2006). L'appareil reproducteur des individus mâles est quant à lui constitué d'une gonade unique, reliée au pore excréteur, qui synthétise les gamètes mâles en continu à partir du stade adulte. Une modification morphologique (*i.e.* présence de terminaisons nerveuses en éventail au niveau de la queue) présente chez les mâles facilite la reproduction sexuée. Lors de la fécondation d'un individu hermaphrodite, les spermatozoïdes du mâle sont transférés vers la spermathèque de l'hermaphrodite et prennent le dessus sur ses propres spermatozoïdes. Les individus ainsi fécondés peuvent doubler leur taille de ponte (Ward et Carrel, 1979).

En condition de stress (*e.g.* absence de nourriture, présence d'un composé toxique) les nématodes adultes peuvent subir le phénomène d'éclosion matricide. Il consiste en une éclosion *in utero* des embryons, engendrant la destruction progressive de la mère par les larves (Luc *et al.*, 1979). Cette propriété permettrait une protection de la progéniture par la cuticule du parent dans l'attente d'une amélioration des conditions extérieures (Chen et Caswell-Chen, 2003). Le phénomène d'éclosion matricide intra-utérine se produit suite à un défaut de fonctionnement de la vulve qui n'arrive plus à expulser les œufs. Dans le cas d'une exposition au Cd, Boyd *et al.* (2010) évoquent l'effet neurotoxique de l'ETM pour expliquer ce défaut d'activité.

### 1.2.4 Intérêts et utilisations pour la recherche en biologie

À partir des années 1960, un intérêt tout particulier est porté au nématode *C. elegans* en raison de ses caractéristiques prometteuses pour la recherche en biologie (Couillault et Kurz, 2010 ; Fatt et Dougherty, 1963). Sa culture aisée sur boîtes de Petri, son cycle de vie court ainsi que la possibilité de cryoconservation des populations ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) en font un organisme approprié pour une utilisation en laboratoire, et permettent de produire de larges populations en un minimum de temps et de coûts (Couillault et Kurz, 2010). La souche sauvage couramment utilisée en recherche est la souche N2 qui a été isolée à Bristol en Angleterre (Brenner, 1974). L'intérêt porté à ce nématode pour la recherche vient également du fait qu'il s'agit d'un organisme pluricellulaire relativement simple. L'hermaphrodite *C. elegans* possède précisément 959 noyaux de cellules somatiques dont 302 appartiennent à des cellules neuronales (Culetto et Sattelle, 2000 ; Félix, 1997), et son matériel génétique, comportant 20000 gènes, est regroupé en seulement six chromosomes (LaDeana *et al.*, 2005).

Le lignage de toutes les cellules ainsi qu'une cartographie complète du réseau neuronal ont ainsi pu être réalisés (Sulston *et al.*, 1983 ; White *et al.*, 1986).

Les avantages offerts par l'utilisation de *C. elegans* ont notamment permis des avancées dans la compréhension des mécanismes de l'apoptose, du rôle des ARN interférents, de la signalisation neuronale, des interactions hôtes-pathogènes ainsi que des maladies génétiques humaines (Couillault *et Kurz*, 2010). L'étude de mutants, débutée avec les travaux de S. Brenner et son équipe en 1974, a permis de cartographier de nombreux gènes et d'étudier de nombreuses voies moléculaires (Brenner, 1974). Aujourd'hui, le génome de *C. elegans* est entièrement séquencé ce qui rend possible l'utilisation des techniques de génomique (T. C. S. C., 1998 ; Viñuela *et al.*, 2010). Enfin, il est possible de compléter ces approches par la génération d'individus transgéniques qui possèdent, par exemple, la séquence d'un gène d'intérêt (ou de son promoteur uniquement) couplé à la séquence d'une protéine fluorescente permettant de suivre son expression au cours du temps (Couillault *et al.*, 2004).

De nombreuses ressources complètes, en libre accès, sont désormais disponibles sur Internet. La ressource *WormAtlas*<sup>1</sup> réunit les connaissances anatomiques et comportementales sur *C. elegans* et met à disposition de nombreuses images de microscopie électronique. La ressource *WormBase*<sup>2</sup> fournit une cartographie interactive du génome de *C. elegans* ainsi que diverses informations sur les mutants disponibles. Enfin, *WormBook*<sup>3</sup> est une base de données regroupant de nombreux protocoles expérimentaux ainsi que diverses informations sur la biologie des nématodes. Par ailleurs, le *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC)<sup>4</sup> financé par les National Institutes of Health - Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440) des États-Unis d'Amérique, collecte, stocke et redistribue les différentes souches et mutants de *C. elegans*.

### 1.2.5 Utilisation en (éco)toxicologie

Les avantages conférés par l'utilisation de *C. elegans* en laboratoire ainsi que l'amplitude des connaissances biologiques acquises ont contribué à l'émergence de son utilisation dans les domaines de la toxicologie humaine et environnementale, que ce soit pour des études mécanistes, de criblage de substances à grande échelle ou d'évaluation des risques (Leung *et al.*, 2008). L'utilisation de *C. elegans* pour les tests toxicologiques pourrait, en particulier, constituer une alternative à l'expérimentation animale sur vertébrés (Williams *et al.*,

---

1. [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org).

2. [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org).

3. [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).

4. [www.cbs.umn.edu/research/resources/cgc](http://www.cbs.umn.edu/research/resources/cgc).

2000 ; Williams *et* Dusenbery, 1988).

La place occupée par les espèces dans les écosystèmes constitue un argument dans le choix d'organismes modèles en écotoxicologie. Dans le cas des nématodes, ceux-ci se trouvent au centre de la chaîne alimentaire détritique (Moore *et* de Ruiter, 1991 ; Yeates *et* Bongers, 1999) ce qui justifie les considérations portées à leur égard. En outre, il a été montré que la sensibilité des nématodes à quelques composés de référence était comparable à celles d'autres invertébrés du sol (Kammenga *et al.*, 1996 ; Peredney *et* Williams, 2000). En revanche, en raison de sa conservation depuis de nombreuses années en laboratoire, la souche N2 de *C. elegans* n'est peut-être pas la souche la plus représentative de l'espèce, d'un point de vue écotoxicologique (Kammenga *et al.*, 1996). Elle reste cependant un point de départ simple et bien documenté pour des études complexes (*e.g.* mécanistes, de mélanges de contaminants ou multi-générationnelles). Aussi, de nombreuses études écotoxicologiques utilisant cet organisme ont été publiées ces dernières années (Buisset-Goussen *et al.*, 2014 ; Dutilleul *et al.*, 2013 ; Goussen *et al.*, 2013 ; Jager *et al.*, 2014 ; Jonker *et al.*, 2004a ; Shen *et al.*, 2009 ; Svendsen *et al.*, 2010 ; Swain *et al.*, 2004).

En raison de son mode de vie particulier<sup>1</sup>, *C. elegans* peut être exposé aux contaminants par l'intermédiaire de différentes matrices, sols, sédiments, eau interstitielle, lixiviats naturels ou artificiels, en fonction des problématiques étudiées. Tyne *et al.* (2013) ont par exemple mis au point une eau interstitielle reconstituée, incluant de la matière organique dissoute, afin d'étudier la toxicité de nanoparticules d'argent (Ag) dans des conditions proches de l'environnement. Néanmoins, le choix de ces matrices comme milieu d'exposition permet difficilement de réaliser un suivi dynamique de critères d'effet tels que la croissance ou la reproduction, exception faite, dans le cas des matrices liquides, avec l'utilisation d'appareils dispendieux de tri et de mesures automatisés (*e.g.* le COPAS<sup>TM</sup>, Pulak, 2006). Les nématodes peuvent également être cultivés par l'intermédiaire d'un milieu gélifié, le *Nematode Growth Medium* (NGM), sur lequel est déposé une solution bactérienne concentrée (Brenner, 1974). Pour les études de toxicité, les composés chimiques sont ajoutés à la gélose et diffusent dans le tapis bactérien (*e.g.* Dutilleul *et al.*, 2013 ; Goussen *et al.*, 2013 ; Harada *et al.*, 2007 ; Nørhave *et al.*, 2012 ; Swain *et al.*, 2010 ; Wren *et al.*, 2011). Les nématodes sont donc exposés *via* leur alimentation et pour certaines substances, à travers leur cuticule. Ce dispositif simplifié vise à mimer une exposition des nématodes en milieu naturel par un matériel semi-liquide, en décomposition et riche en bactéries, dans lequel se trouveraient un ou plusieurs polluants. Ce système d'exposition est le plus polyvalent en termes d'applications et il permet de suivre au cours du temps de nombreux critères d'effet.

---

1. Voir section 1.2.2 (p. 33).

Avec la généralisation de l'utilisation de *C. elegans* en écotoxicologie, des protocoles standardisés ont également mis au point. Ceux-ci proposent une méthode expérimentale dont le but est de caractériser la toxicité d'échantillons de matrices environnementales contaminées (solides ou liquides) ou de substances ajoutées à des sols de référence (ASTM, 2008 ; ISO, 2010).

### 1.2.6 Modélisation DEBtox associée à *C. elegans*

Comme nous l'avons vu précédemment <sup>1</sup>, le modèle DEBtox a été appliqué à différents organismes et notamment *C. elegans*. Afin de prendre en compte certaines particularités physiologiques de cet organisme, des adaptations du modèle DEBtox ont été nécessaires.

#### *Adaptations pour la croissance.*

Le modèle DEBtox standard mis au point chez *D. magna* propose une description de la croissance selon le modèle de Von Bertalanffy en condition d'alimentation *ad libitum*. Les observations expérimentales montrent cependant que le nématode *C. elegans* croît selon une courbe sigmoïde (Byerly *et al.*, 1976). D'après Knight *et al.* (2002), tandis que les structures du corps de *C. elegans* grandiraient de façon continue, les dimensions de la cavité buccale n'augmenteraient que lors des mues. Ce phénomène serait à l'origine d'un faible taux de croissance initial et de son augmentation progressive au cours des stades larvaires. En effet, le faible taux de croissance aux premiers stades de vie serait lié à une limitation de l'ingestion de nourriture due à la faible taille de la cavité buccale (Jager *et al.*, 2005). En conséquence, Jager *et al.* (2005) ont introduit dans le DEBtox, une nouvelle fonction pour améliorer la description de la croissance de *C. elegans* (Eqn. 1.9). Celle-ci fait l'hypothèse que le taux d'ingestion est dépendant de la longueur du nématode.

$$s_f(l) = 1 - \left(1 + \frac{l_f^3}{l^3}\right)^{-1} \quad (1.9a)$$

$$f_{s_f} = f(1 - s_f) \quad (1.9b)$$

avec  $s_f(l)$  : la fonction modulant l'ingestion en fonction de  $l$  ;  $l$  : la longueur de l'organisme normalisée par la longueur maximale ;  $l_f$  : le paramètre correspondant à la longueur normalisée lorsque le taux d'ingestion est à la moitié du taux maximal ;  $f_{s_f}$  : le taux d'ingestion normalisé modulé par la fonction  $s_f$  ;  $f$  : le taux d'ingestion normalisé maximal.

1. Voir section 1.1.3.2 (p. 24).



Une autre étude a par la suite montré que ce modèle présente des inconsistances : il suppose implicitement qu'en cas de restriction calorique moyenne, les nématodes juvéniles ne peuvent pas s'alimenter (Goussen *et al.*, 2015). Les auteurs ont donc rajouté un nouveau paramètre afin que dans cette situation, ils puissent accéder à une petite fraction de nourriture (Eqn. 1.10).

$$s_f(l) = \alpha \left( 1 - \left( 1 + \frac{l_f^3}{l^3} \right)^{-1} \right) \quad (1.10)$$

avec  $1 - \alpha$  : la proportion de nourriture disponible, quelle que soit la taille de l'organisme.

#### *Adaptations pour la reproduction.*

Le modèle DEBtox standard propose un taux de ponte qui devient constant peu de temps après la puberté. Dans le cas du nématode *C. elegans*, le taux de ponte atteint un maximum  $\approx 30$  h après la puberté puis décline progressivement, jusqu'à arrêt total après  $\approx 100$  h (Byerly *et al.*, 1976). Cet arrêt est lié à une réserve de gamètes mâles inférieure à celle des gamètes femelles (Ward *et Carrel*, 1979).

Dans le modèle de Jager *et al.* (2005), ce phénomène a été pris en compte en stoppant brusquement la reproduction, lorsque le nombre maximal d'œuf est atteint (Eqn. 1.11).

$$R \geq R_{tot} \Rightarrow \frac{dR}{dt} = 0 \quad (1.11)$$

avec  $R$  : le nombre d'œufs pondus cumulés ;  $R_{tot}$  : le nombre total de gamètes mâles.

Dans le modèle de Goussen *et al.* (2015), l'atténuation progressive de la cinétique de ponte, observée expérimentalement (*e.g.* Byerly *et al.*, 1976), a été prise en compte au moyen de l'équation suivante :

$$\frac{dR_{att}}{dt} = \frac{dR}{dt} \left( \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \right) \quad (1.12)$$

avec  $R_{att}$  : la ponte atténuée ;  $R_{max}$  : le paramètre d'atténuation.

Les modèles DEBtox *C. elegans* ont été appliqués dans plusieurs études portant sur les effets de contaminants, inorganiques et organiques, seuls (Alda Álvarez *et al.*, 2006 ; Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Goussen *et al.*, 2015 ; Swain *et al.*, 2010 ; Wren *et al.*, 2011) et en mélanges (Jager *et al.*, 2014). Cependant, des problèmes d'application du modèle ont été rapportés dans certaines études. D'une part, il a été montré que les nématodes exposés à certaines substances (*e.g.* le Cd) démarrent leur reproduction à une taille inférieure à celle

des individus non exposés. Or la consistance du modèle repose en partie sur l'hypothèse de la constance de la longueur à la puberté, y compris en condition de stress<sup>1</sup>. Pour le Cd, cet effet a été observé dans les études de [Alda Álvarez \*et al.\* \(2005, 2006\)](#) et [Swain \*et al.\* \(2010\)](#) mais pas dans celle de [Jager \*et al.\* \(2014\)](#). Face à cet effet, les auteurs ont eu recours à un paramètre additionnel au modèle, non fondé sur une base mécaniste. D'autre part, il a été montré que le modèle ne réussit pas, à partir du meilleur mode d'action DEBtox identifié, à décrire correctement l'effet d'ETM tels que l'U ou le Cd sur la ponte cumulée totale de *C. elegans* ([Goussen \*et al.\*, 2015](#) ; [Jager \*et al.\*, 2014](#)). Afin de limiter ce problème, les auteurs ont réduit l'analyse des effets à une période de temps pour laquelle les nématodes exposés n'ont pas achevé leur reproduction (*i.e.*  $t \leq 6j$ ). [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#) ont également proposé l'utilisation d'un mode d'action additionnel, en faisant l'hypothèse que l'U induit des effets directs sur la réserve de spermatozoïdes. La réserve de spermatozoïde étant limitante pour la reproduction de *C. elegans*<sup>2</sup>, une diminution de celle-ci engendre une diminution de la ponte cumulée totale.

### 1.2.7 Synthèse

La souche sauvage N2 de *Caenorhabditis elegans* est donc largement étudiée et utilisée en biologie comme en écotoxicologie. Les caractéristiques physiologiques de ce nématode et le système d'exposition simple associant le milieu NGM-gélose et la bactérie *E. coli* comme source de nourriture facilitent le suivi des effets de contaminants au cours du temps sur différents traits de vie, tels que la croissance et la reproduction. Ces avantages en font un organisme particulièrement intéressant pour la mise en application du modèle DEBtox. Plusieurs études successives ont permis le développement de ce type de modèle pour *C. elegans* afin de décrire les effets de contaminants seuls et en mélange ; mais elles ont également permis de mettre en évidence des lacunes qui restent non totalement résolues à ce jour.

Par ailleurs, la notion de biodisponibilité des substances dans les matrices d'exposition est une notion critique pour comprendre les effets des substances seules mais également des interactions entre substances sur les organismes. Bien que le système d'exposition NGM-gélose ait été utilisé à plusieurs reprises pour caractériser l'effet de substances sur *C. elegans*, aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressée aux voies d'exposition de cet organisme dans un tel système.

---

1. Voir section 1.1.3.2 (p. 24).

2. Voir section 1.2.3 (p. 34).

## 1.3 Contaminants et mélanges considérés dans cette étude

Cette section a pour but de présenter les différents contaminants qui ont été étudiés au cours de ce projet. Elle présente les caractéristiques physico-chimiques des substances dans le but de comprendre leur devenir et cooccurrence dans l'environnement ainsi que leurs interactions avec les espèces biologiques.

### 1.3.1 Uranium (U)

#### 1.3.1.1 Propriétés physicochimiques

L'uranium est un élément trace métallique ( $Z = 92$ ) appartenant au groupe des actinides. L'U ne se trouve jamais à l'état pur dans l'environnement ; il est toujours associé avec d'autres éléments et en particulier, l'oxygène. Il peut se trouver sous six valences différentes donnant lieu aux ions  $U^{3+}$  (III),  $U^{4+}$  (IV),  $UO_2^+$  (V) ainsi que l'ion uranyle  $UO_2^{2+}$  (VI) (ATSDR, 2013 ; Ribera *et al.*, 1996).

Pearson (1963) et Nieboer *et Richardson* (1980) ont inclus les ions de l'U dans la catégorie des « acides durs » et dans la classe A, respectivement, en raison de leur affinité pour les bases dures (*e.g.* l'oxygène (O) et le fluor (F)) et leur capacité à former des liaisons stables avec l'O. Suivant ces propriétés, les ions de l'U apparaissent proches de l'ion calcium ( $Ca^{2+}$ ).

L' $UO_2^{2+}$  présente une forme linéaire et son rayon ionique (RI) non hydraté est de 1,8 Å ; hydraté, il dépasserait 6,5 Å (Al-Shaybe *et Khalili*, 2009). En comparaison, le RI non hydraté du  $Ca^{2+}$  est de 1,0 Å et hydraté, il atteint 4,1 Å (Volkov *et al.*, 1997).

#### 1.3.1.2 Propriétés radioactives

L'U est un radioélément car tous ses isotopes sont radioactifs. L' $U_{naturel}$  est une combinaison des isotopes radioactifs  $^{238}U$ ,  $^{235}U$  et  $^{234}U$  dont les proportions massiques respectives sont d'environ : 99,3 %, 0,7 % et 0,006 %. Ces trois isotopes produisent principalement une émission radioactive de type  $\alpha$ , c'est à dire qu'ils émettent un noyau d'hélium (He) (Browne *et Firestone*, 1986). Ce type de radioactivité est très ionisante mais, en raison de la masse du noyau émis et de sa charge, elle ne parcourt que jusqu'à quelques centimètres dans l'air (Delacroix *et al.*, 2004). L' $^{238}U$  se désintègre en  $^{234}U$  avec une demi-vie de  $4,5 \times 10^9$  années. L' $^{234}U$  se désintègre ensuite en thorium 230 ( $^{230}Th$ ) avec une demi-vie de  $2,5 \times 10^5$  années. Enfin, l' $^{235}U$  se désintègre en  $^{231}Th$  avec une demi-vie de  $7,0 \times 10^8$  années (Craft *et al.*, 2004 ; Ribera *et al.*, 1996). En lien avec sa relativement faible demi-vie, l' $^{234}U$  possède la

plus forte activité et contribue en conséquence à la moitié de l'activité de l' $U_{\text{naturel}}$  ; l'autre moitié étant liée à l' $^{238}\text{U}$ . L'activité résultante de l' $U_{\text{naturel}}$  est de l'ordre de  $2,5 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$  (Aigueperse *et al.*, 2001).

L' $^{235}\text{U}$  est un isotope fissile, c'est à dire qu'il peut se désintégrer spontanément ou sous l'effet d'un neutron. C'est cette propriété qui est utilisée dans les réacteurs thermo-nucléaires. Cependant, l'obtention d'une réaction en chaîne (*i.e.* l'auto-entraînement de la réaction de fission) nécessite un enrichissement de l' $U_{\text{naturel}}$  en isotope  $^{235}\text{U}$ . Le procédé d'enrichissement génère comme sous-produit de l' $U_{\text{appauvri}}$ , avec une concentration d' $^{235}\text{U}$  autour de 0,3 % et une concentration d' $^{234}\text{U}$  d'environ 0,0008 %. L'activité résultante de l' $U_{\text{appauvri}}$ ,  $\approx 1,4 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$ , est donc inférieure à celle de l' $U_{\text{naturel}}$  (Aigueperse *et al.*, 2001).

### 1.3.1.3 Sources et occurrence dans l'environnement

L'U est une substance naturellement présente dans de nombreux types de roches (*e.g.* la pechblende, le gypse) et est largement distribué sur Terre (Ribera *et al.*, 1996). Les principales réserves sont localisées en Australie, au Kazakhstan, au Canada, en Russie, en Afrique du Sud, en Namibie, au Brésil ainsi qu'au Niger (OECD/IAEA, 2012). Sous l'action de différents processus géologiques dont l'érosion des roches et le lessivage des sols, l'U se retrouve dispersé dans tous les compartiments environnementaux (Colle *et al.*, 2001). À cette présence naturelle de l'U s'ajoute sa dissémination par les activités anthropiques dont notamment : (i) les activités liées au cycle du combustible nucléaire (extraction minière de l'U et retraitement des déchets nucléaires), (ii) la combustion du charbon contenant divers radionucléides, (iii) l'utilisation d'intrants agricoles phosphatés naturellement enrichis en U ainsi que (iv) l'usage de l'U pour des activités militaires (Colle *et al.*, 2001 ; Smidt *et al.*, 2012).

Dans les sols non contaminés par l'action de l'Homme, les concentrations en U sont variables et sont dépendantes des particularités géologiques des terrains. Elles s'échelonnent entre 0,002 et 0,02  $\text{mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  (Ribera *et al.*, 1996). Dans certaines zones fortement contaminées (*e.g.* au voisinage immédiat d'une mine uranifère), les sols contiennent généralement entre 0,04 et 4  $\text{mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  (Carvalho *et al.*, 2007 ; Gongalsky, 2006 ; Lottermoser *et al.*, 2005).

De même que pour les sols, les concentrations d'U dans les eaux douces, de surface ou souterraines, sont plutôt hétérogènes. Elles varient du  $\text{pmol}_U \text{ L}^{-1}$  au  $\mu\text{mol}_U \text{ L}^{-1}$  (WHO, 2001). Dans les aires où la présence de l'U a été modifiée par les activités anthropiques, les concentrations se situent autour de 0,13  $\mu\text{mol}_U \text{ L}^{-1}$  et peuvent atteindre jusqu'à

$80 \mu\text{mol}_U \text{L}^{-1}$  (Ragnarsdottir *et* Charlet, 2000 ; Uralbekov *et al.*, 2011). En milieu marin, la concentration d'U est relativement faible et stable, autour de  $0,01 \mu\text{mol}_U \text{L}^{-1}$  ; un équilibre existe entre les apports fluviaux d'U et son piégeage en milieu benthique (Ragnarsdottir *et* Charlet, 2000).

De par ses propriétés chimiques et sa spéciation<sup>1</sup>, l'U s'accumule majoritairement dans les sédiments. Des concentrations jusqu'à  $1,84 \text{mmol}_U \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  et jusqu'à  $23,74 \text{mmol}_U \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  ont été mesurées respectivement, dans des sédiments de rivières à proximité de mines d'U, en Australie (Lottermoser *et al.*, 2005) et au Canada (Hart *et al.*, 1986 ; Joshi *et al.*, 1989 ; McKee *et al.*, 1987 ; Neame *et al.*, 1982).

### 1.3.1.4 Spéciation dans les matrices environnementales

Les concentrations d'U retrouvées dans les milieux terrestres et aquatiques sont gouvernées par les caractéristiques géologiques des terrains comme nous venons de le voir, mais également par d'autres facteurs tels que le degré d'oxygénation (conditions redox), le pH du milieu ou encore par la présence de complexants chimiques ou organiques de l'U (Colle *et al.*, 2001).

Dans le sol, la dissolution de l'U est d'autant plus forte que le potentiel redox est élevé et que le pH est faible. Elle est également favorisée par la présence de carbonates ( $\text{R}-\text{CO}_3$ ) (de Pablo *et al.*, 1999). En condition oxydante (*i.e.* condition aérobie), l'U se trouve sous sa forme  $\text{UO}_2^{2+}$ , la plus stable et la plus mobile. Sous cette forme cependant, il peut se complexer avec la matière organique, les phosphates ( $\text{R}-\text{PO}_4$ ), les carbonates ( $\text{R}-\text{CO}_3$ ) et les sulfates ( $\text{R}-\text{SO}_4$ ) ou s'adsorber sur certains minéraux tels que les oxyhydroxydes de fer et les argiles, le rendant plus ou moins mobile (Ragnarsdottir *et* Charlet, 2000). Dans les milieux réducteurs, souvent riches en matière organique, l'U est peu mobile. Le fer (Fe (II)) d'origine minérale ainsi que les microorganismes ont la capacité de réduire l' $\text{UO}_2^{2+}$  et favorisent ainsi son accumulation dans certaines zones (Ragnarsdottir *et* Charlet, 2000). L'U mobile du sol est transféré dans le compartiment aquatique par l'intermédiaire de la lixiviation ou encore des organismes vivants (Colle *et al.*, 2001).

Dans les eaux douces oxygénées et à  $\text{pH} < 6$ , l'U est majoritairement présent sous forme  $\text{UO}_2^{2+}$ . Entre pH 6 et 8, apparaissent les formes hydroxylées ( $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ ), puis au-delà de pH 8, les formes carbonatées ( $\text{UO}_2[\text{CO}_3]_3^{4-}$ ) (Ragnarsdottir *et* Charlet, 2000). L'U mobile peut se lier aux différents éléments dissous dans l'eau favorisant son transport sur de longues distances ; il s'agit notamment de la matière organique dissoute, des colloïdes minéraux (*e.g.* Fe, Diamètre  $< 0,45 \mu\text{m}$ ) ainsi que différentes particules organiques et bactéries

---

1. Voir section suivante.

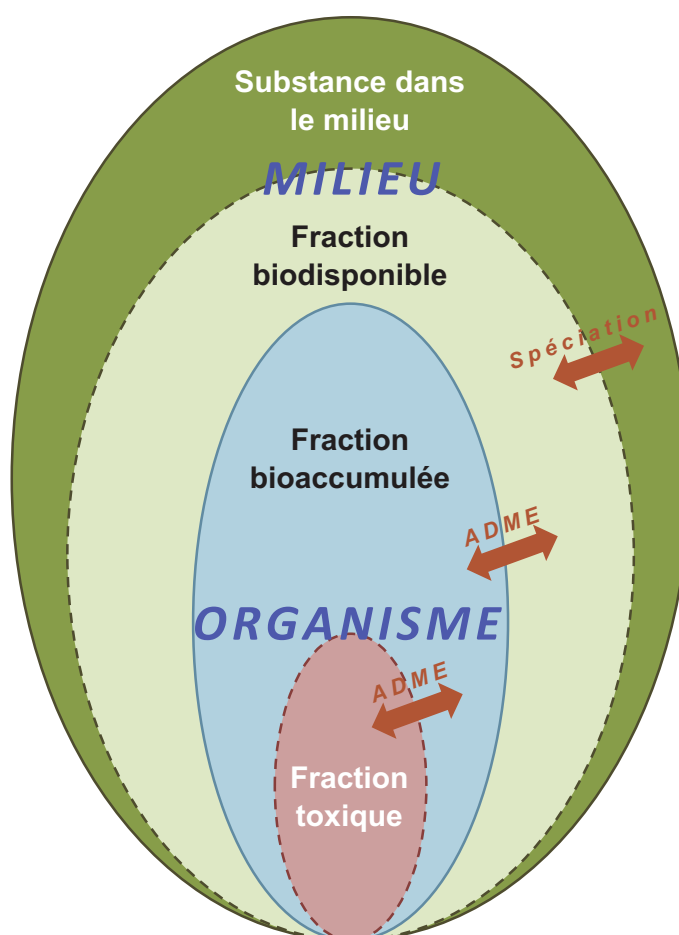
(Anderson *et al.*, 1989 ; Andersson *et al.*, 1998 ; Porcelli *et al.*, 1997). Dans les eaux douces confinées et au niveau de sédiments anoxiques (*e.g.* dans les lacs), l'U se retrouve réduit et a tendance à précipiter (Ragnarsdottir *et Charlet*, 2000). L'U peut également rejoindre le compartiment sédimentaire par précipitation avec les phosphates, lorsque ceux-ci sont suffisamment concentrés (Colle *et al.*, 2001 ; Markich, 2002).

Dans les estuaires et en milieu marin, les formes colloïdales sont quasiment inexistantes. La salinité modifie l'adsorption de l'U sur les colloïdes tandis que ceux-ci ont tendance à flocculer et sédimenter (Porcelli *et al.*, 1997). En condition oxydante, l'U se trouve majoritairement complexé aux carbonates ( $\text{UO}_2[\text{CO}_3]_3^{4-}$ ) (Markich, 2002). Comme dans les systèmes aquatiques continentaux, l'U sédimente en condition anoxique et est piégé petit-à-petit dans les sédiments marins riches en matières organiques et Fe (II) (Choppin *et Wong*, 1998 ; Ragnarsdottir *et Charlet*, 2000).

### 1.3.1.5 Biodisponibilité et bioaccumulation

Du fait de la large distribution d'U dans l'environnement, l'ensemble des organismes vivants présentent de l'U dans leurs tissus. La notion de biodisponibilité de l'U définit la fraction de ce métal présent dans la matrice d'exposition qui est potentiellement assimilable par les organismes biologiques (Fig. 1.10). La biodisponibilité est fonction de la spéciation de l'U dans la matrice et de l'espèce biologique.

Les études portant sur la biodisponibilité de l'U sont peu courantes et ont été menées pour la plupart en milieu liquide. La stratégie expérimentale consiste à évaluer la toxicité de l'U sur un organisme dans des conditions physico-chimiques données (*e.g.* pH, présence de complexants organiques ou inorganiques) puis à corrélérer ces données avec les résultats de modélisation de la spéciation de l'U (*e.g.* CHESS, Visual MINTEQ, HARPHRQ). L'utilisation de la Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle (SLRT) permet de confirmer les prédictions de spéciations. Ainsi un lien de corrélation positive a pu être montré entre la présence des espèces  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{UO}_2[\text{OH}]^+$  et le degré de toxicité observé sur différents organismes (Fortin *et al.*, 2007, 2004 ; Hogan *et al.*, 2005 ; Markich *et al.*, 2000). Les complexes de l' $\text{UO}_2^{2+}$  avec les phosphates, les carbonates, la matière organique ainsi que les complexes polymériques d'hydroxyde d'uranyle ( $[\text{UO}_2]_2[\text{OH}]_2^{2+}$  et  $[\text{UO}_2]_3[\text{OH}]_5^+$ ) apparaissent pas ou peu biodisponibles (Markich, 2002). Les relations entre pH et biodisponibilité de l'U sont encore mal connues en raison de phénomènes couplés ayant des effets antagonistes. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l' $\text{UO}_2^{2+}$  est majoritaire à pH acide, mais la présence accrue d'ions  $\text{H}^+$  entraînerait une compétition au niveau des sites physiologiques d'internalisation. À l'inverse, cette compétition disparaît à pH alcalin, mais l' $\text{UO}_2^{2+}$  n'est



**FIGURE 1.10** Schématisation des liens entre la présence d'une substance toxique dans une matrice environnementale et la fraction toxique internalisée par un organisme. La spéciation de la substance est fonction des paramètres du milieu (pH, matière organique, caractère redox, température, etc.). ADME désigne les différentes phases de toxicocinétique (Adsorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion) qui sont fonction des organismes et de la spéciation de la substance. (Illustration inspirée de Gourlay-Francé *et al.*, 2010).

plus majoritaire ; la complexation de l'U est favorisée, ce qui le rend moins biodisponible. Cependant, dans leur étude sur l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, Fortin *et al.* (2007) rapportent qu'un effet physiologique du pH du milieu d'exposition serait à l'origine de la biodisponibilité contrastée de l'U, observée à pH 5 et 7.

De la part biodisponible d'une substance, seule une fraction est réellement bioaccumulée dans les organismes (Fig. 1.10). Le calcul du Facteur de Bioaccumulation (BAF), ou de Bioconcentration (BCF) pour les milieux aquatiques, rapport entre la concentration dans l'organisme et la concentration dans la matrice environnementale, permet d'estimer le niveau d'internalisation des contaminants. Une surveillance menée au Canada révèle que le BCF se situe entre 0,30 et 3 340 L kg<sup>-1</sup> chez des poissons sauvages (Goulet *et al.*, 2011). Celui-ci est fortement dépendant des caractéristiques de l'eau et donc de la spéciation de l'U. Dans les sols, les BAF mesurés chez différentes espèces de lombrics (Lumbricina) s'étendent entre 0,08 et 1,53 (Giovanetti *et al.*, 2010 ; Mrdakovic Popic *et al.*, 2012 ; Sheppard *et Evenden*, 1992). En raison de sa faible efficacité d'assimilation, l'U n'est pas biomagnifié le long des chaînes trophiques (Goulet *et al.*, 2011 ; Simon *et Garnier-Laplace*, 2005). Les facteurs de bioamplification de l'U (ratio entre la concentration en U chez un prédateur et la concentration en U chez ses différentes proies) sont généralement rapportés inférieurs à 1 (Gongalsky, 2006 ; Goulet *et al.*, 2011 ; Schaller *et al.*, 2011).

### 1.3.1.6 Absorption, distribution et excrétion

Les voies d'internalisation de l'U dépendent de l'organisme considéré et de la matrice par laquelle il est exposé. Les principales voies d'entrée sont l'ingestion pour les organismes terrestres et aquatiques et l'absorption via les téguments ou les branchies pour les organismes aquatiques. Les transporteurs biologiques empruntés par l'U n'ont pas encore été clairement identifiés. Le transporteur de métaux bivalent (DMT, Mims *et Prchal*, 2005), exprimé notamment dans les entérocytes au niveau de la paroi intestinale, pourrait jouer un rôle important dans l'internalisation de l'U (Dublineau *et al.*, 2005). D'autres transporteurs, tels que les transporteurs du calcium, pourraient également être impliqués (Raymond-Whish *et al.*, 2007). Un effet compétiteur des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> pour l'internalisation de l'U par *C. reinhardtii* a par exemple été rapporté (Fortin *et al.*, 2007).

Une fois internalisé, l'U est transporté dans les tissus de l'organisme par l'intermédiaire du système circulatoire (ou équivalent). À pH neutre, dans les fluides biologiques, l'UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> est largement minoritaire. L'U se trouve alors complexé avec les carbonates, les phosphates ainsi que différents types de protéines (Transferrines, lipoprotéines, Albumine, etc.) (Bucher *et al.*, 2014 ; Frelon *et al.*, 2013 ; Ragnarsdottir *et Charlet*, 2000 ; Vidaud *et al.*, 2005).



La redistribution de ce dernier dans les cellules de l'organisme pourrait être causée par les mécanismes d'acquisition du Fe. Le Fe est transporté dans le sang sous forme de complexe avec la Transferrine. Une fois la Transferrine chargée, elle peut se lier à son récepteur exprimé au niveau des membranes cellulaires et être internalisée par endocytose (Wang et Pantopoulos, 2011). Hémadi *et al.* (2011) ont pu montrer par des études physico-chimiques que le transport de l'U, du complexe tri-carbonaté vers la Transferrine et l'interaction entre la Transferrine chargée et son récepteur sont deux processus très rapides. Cela assurerait un état stationnaire de la concentration du couple U-Transferrine et favoriserait son internalisation. Il a également été montré chez le porc *Sus scrofa domesticus* qu'une carence en Fe favorise l'internalisation de l'U (ATSDR, 2013).

L'excrétion de l'U est réalisée majoritairement par la fonction rénale (ou équivalent). Cette élimination est dépendante du pH. Lorsque le pH est peu acide, les complexes avec les carbonates et le citrate sont aisément excrétés. Un pH acide favorise la dissociation des complexes, et l' $\text{UO}_2^{2+}$  ainsi libéré peut se fixer aux cellules tubulaires du rein, empêchant son élimination et induisant une toxicité sur la fonction de réabsorption rénale. La complexation de l'U avec des protéines diminue également son excrétion (Keith *et al.*, 2007).

L'U n'est pas métabolisé par les organismes. La complexation de l'U avec différents composés module la toxicité qu'il exerce sur les cellules. La précipitation de l'U semble également jouer un rôle dans sa détoxification. Des granules riches en U et P ont notamment été observées dans les lysosomes de cellules digestives, dans des macrophages ainsi qu'au niveau de cellules rénales chez différents bivalves (Chassard-Bouchaud et Escaig, 1984 ; Simon *et al.*, 2011). Par ailleurs, Jiang *et al.* (2009) ont pu montrer que les métallothionéines (MT) réduisent la toxicité de l'U chez *C. elegans*. Ces petites protéines sont caractérisées par la présence, dans leur séquence, de nombreuses Cystéines dont les groupements thiol (R-SH) permettent la chélation de métaux (Höckner *et al.*, 2011). Même si l'U ne semble pas présenter une affinité chimique particulière pour ce type de groupement<sup>1</sup>, les résultats de l'étude de Jiang *et al.* (2009) suggèrent que la MT-1 jouerait un rôle dans la séquestration de l'U dans la cellule, tandis que la MT-2 favoriserait son évacuation vers le compartiment extracellulaire.

### 1.3.1.7 Toxicité sur les organismes et valeurs de protection environnementale

L'U ne figure pas parmi les métaux les plus toxiques pour les organismes. Hamilton *et Buhl* (1997) ont par exemple étudié la toxicité de différents contaminants inorganiques chez des larves du poisson *Catostomus latipinnis* exposées durant 14 h. La  $\text{LC}_{50}$  de l'U a

---

1. Voir section 1.3.1.1 (p. 42).

été estimée autour de  $0,18 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  et est proche de celle de l'arsénate ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) ou du sélénate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ). L'U est classé sixième sur neuf composés testés, en allant du plus toxique au moins toxique. Le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) apparaissent comme les plus toxiques dans cette étude.

Sheppard *et al.* (2005) et plus récemment, CEAEQ (2014), ont rassemblé les données écotoxicologiques de l'U concernant de nombreuses espèces, vivant dans des écosystèmes différents, dans le but de fixer des seuils environnementaux de référence. Les E(L)C<sub>20-25</sub> (aiguës et chroniques) rapportées varient entre  $0,39$  et  $4,20 \text{ mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour différentes espèces du sol. Les auteurs concluent ainsi à une PNEC<sub>sol</sub> (*Predicted No-Effect Concentration*) de  $0,42 \text{ mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$ . La toxicité de l'U a également été évaluée chez le nématode *C. elegans*. Dutilleul *et al.* (2013) ont obtenu des EC<sub>20-25</sub> comprises entre  $1,12$  et  $1,17 \text{ mmol}_U \text{ L}_{\text{NGM}}^{-1}$ , et des EC<sub>50</sub> comprises entre  $1,19$  et  $1,22 \text{ mmol}_U \text{ L}_{\text{NGM}}^{-1}$  pour la croissance (après 72 h d'exposition) et la taille de ponte totale. L'exposition a été réalisée à travers un milieu NGM<sup>1</sup> modifié : le tampon phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a été remplacé par un tampon HEPES afin d'éviter la précipitation de l'U avec le  $\text{PO}_4^{2-}$ . Une modélisation DEBtox réalisée par Goussen (2013) à l'aide de données d'exposition d'une population non sauvage de *C. elegans*<sup>2</sup> a permis d'estimer une NEC pour l'U (*No-Effect Concentration*) autour de  $0,42 \text{ mmol}_U \text{ L}_{\text{NGM}}^{-1}$  à partir du mode d'action « réduction de l'assimilation ». Il est intéressant de remarquer que cette valeur est identique à la PNEC<sub>sol</sub> proposée par Sheppard *et al.* (2005).

Concernant les organismes aquatiques, la distribution des sensibilités apparaît plus variable que dans les sols. Les E(L)C<sub>50</sub> extraites de la base de données ECOTOX<sup>3</sup> sont comprises entre  $8,82 \times 10^{-5}$  et  $7,87 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  pour les invertébrés aquatiques et entre  $5,84 \times 10^{-3}$  et  $0,57 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  pour les poissons. Les E(L)C<sub>20-25</sub> (aiguës et chroniques) rapportées par Sheppard *et al.* (2005) varient entre  $1,26 \times 10^{-5}$  et  $3,78 \times 10^{-3} \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  pour les invertébrés aquatiques, entre  $0,06$  et  $20,17 \text{ mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour les invertébrés benthiques, et entre  $5,88 \times 10^{-3}$  et  $0,42 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  pour les poissons. À partir de ces données, les auteurs dérivent des PNEC<sub>eau/sédiment</sub> de  $2,10 \times 10^{-5} \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  et de  $0,42 \text{ mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour les invertébrés aquatiques et benthiques, respectivement, et des PNEC<sub>eau</sub> entre  $1,68 \times 10^{-3}$  et  $0,10 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  pour les poissons, en fonction de la dureté de l'eau. Des modélisations DEBtox ont également été effectuées chez des invertébrés aquatiques/benthiques (*Daphnia magna* et *Chironomus riparius*) ainsi que chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Plaire (2013), complétant les travaux de Massarin *et al.* (2011), a déterminé des NEC com-

1. Voir section 1.2.5 (p. 37).

2. Population de *C. elegans* avec une grande diversité génétique construite par Teotónio *et al.* (2012).

3. EPA.gov/ECOTOX, mise à jour : 29/08/2014.

prises entre  $1,51 \times 10^{-5}$  et  $2,61 \times 10^{-5}$   $\text{mmol}_U \text{L}^{-1}$  chez la daphnie à partir du mode d'action « réduction de l'assimilation » couplé à un des autres modes d'action DEBtox. Dans cette étude transgénérationnelle, il a été mis en évidence une aggravation des effets au cours des générations, lorsque la concentration en U dépasse  $2,48 \times 10^{-5}$   $\text{mmol}_U \text{L}^{-1}$ . Enfin, les auteurs ont étudié l'intégrité de l'ADN des daphnies exposées et ont pu mettre en évidence des dommages significatifs dès  $0,84 \times 10^{-5}$   $\text{mmol}_U \text{L}^{-1}$ . À travers l'étude de plusieurs générations de *C. riparius* exposés à l'U, [Beaudouin et al. \(2012\)](#) ont déterminé une NEC autour de  $0,13 \text{ mmol}_U \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$ . Pour *D. rerio*, une NEC de  $0 \text{ mmol}_U \text{L}^{-1}$  a été estimée par [Augustine et al. \(2012\)](#) à partir d'un mode d'action « augmentation des coûts de maintenance somatique ». Ceci impliquerait que l'U produit des effets délétères chez le poisson pour d'infimes quantités d'U internalisées. Comme pour les espèces du sol, les PNEC et les NEC des invertébrés aquatiques sont plutôt proches. Ce n'est en revanche pas le cas chez le poisson.

D'un point de vue réglementaire, la France a adopté une norme de qualité environnementale provisoire (NQE<sub>p</sub>) pour l'U. Celle-ci est la somme du bruit de fond géochimique et de la  $\text{PNEC}_{\text{eau douce}}$  (*i.e.*  $0,13 \times 10^{-5}$   $\text{mmol}_U \text{L}^{-1}$ ). L'IRSN a récemment proposé une révision de cette valeur guide environnementale à partir de l'état de l'art sur la spéciation de l'U en fonction des propriétés physico-chimiques des cours d'eau et sa biodisponibilité associée ([Février et Gilbin, 2014](#)). Le spectre des valeurs s'étend entre  $1,26 \times 10^{-6}$  et  $1,26 \times 10^{-4}$   $\text{mmol}_U \text{L}^{-1}$ .

### 1.3.1.8 Mécanisme de toxicité

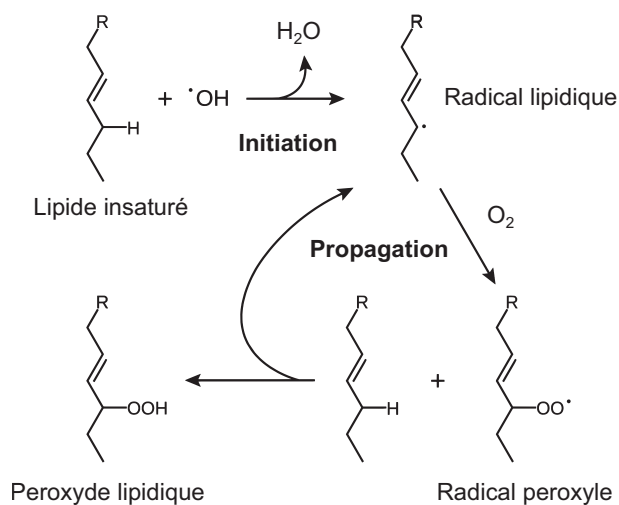
De la fraction bioaccumulée de l'U, seule une partie produit un effet toxique au niveau des organismes (Fig. 1.10). Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes<sup>1</sup>, l'U est un métal possédant des propriétés radioactives. Il présente donc à la fois une toxicité chimique et radioactive. Dans le cas de l'U<sub>naturel</sub> et de l'U<sub>appauvri</sub>, la chimiotoxicité est prépondérante face à la radiotoxicité en raison de leurs faibles activités spécifiques ([Al Kaddissi et al., 2012](#) ; [Mathews et al., 2009](#) ; [Ribera et al., 1996](#)). Par comparaison, l'activité spécifique de l'américium (<sup>241</sup>Am), un autre émetteur  $\alpha$ , est  $2,5 \times 10^6$  fois plus élevée que celle de l'U<sub>naturel</sub>.

*Uranium, élément faiblement radiotoxique.*

La radiotoxicité de l'U provient principalement de son rayonnement  $\alpha$  mais également des rayonnements  $\alpha$  et  $\gamma$  des radionucléides fils, générés par la désintégration des isotopes de l'U ([Mathews et al., 2009](#)). Ces types de rayonnement peuvent induire des effets directs

---

1. Voir sections 1.3.1.1 (p. 42) et 1.3.1.2 (p. 42).



**FIGURE 1.11** Mécanisme de réaction en chaîne radicalaire de la peroxydation des acides gras insaturés.

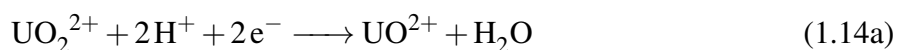
et indirects sur les structures biologiques. D'un côté, les effets directs sont issus des collisions des particules  $\alpha$  sur les molécules et macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines, etc.). Ces collisions ionisent les biomolécules et aboutissent à la formation de radicaux libres, hautement réactifs (*e.g.*  $\text{R}-\text{C}\cdot$ ,  $\text{R}-\text{O}\cdot$ ,  $\text{R}-\text{S}\cdot$  et  $\text{R}-\text{N}\cdot$ ) (Kiang *et al.*, 2012). Au niveau de l'ADN, les radiations ionisantes  $\alpha$  sont capables d'induire des cassures double et simple brin ainsi que l'altération de bases azotées (Close *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2011). D'un autre côté, les effets indirects des radiations ionisantes sont initiés par la réaction de radiolyse de l'eau (Eqn. 1.13), produisant des radicaux hydroxyles ( $\text{HO}\cdot$ ) (Hamilton *et al.*, 1997).



L'ensemble des radicaux libres, produits sous l'effet direct ou indirect du rayonnement  $\alpha$ , sont capables d'endommager presque tous les substrats intracellulaires et de perturber en conséquence l'homéostasie de la cellule. Les protéines ionisées ont un fonctionnement altéré et peuvent former des adduits avec des macromolécules comme l'ADN (Jones *et al.*, 2007). Les radicaux libres peuvent induire la peroxydation des lipides, notamment dans les zones riches en acides gras poly-insaturés (PUFA) comme la membrane plasmique ou mitochondriale. Cette réaction en chaîne se déroule en trois étapes successives (Fig. 1.11) et peut entraîner la peroxydation de nombreux acides gras avant d'être stoppée. La peroxydation des lipides membranaires entraîne une désorganisation des membranes et peut aller jusqu'à l'apoptose des cellules (Kiang *et al.*, 2012).

*Uranium, élément chimiotoxique.*

L'U présente également une toxicité chimique. L'U pourrait induire, à l'instar du Fe ou du chrome (Cr) (VI), un stress oxydatif au niveau cellulaire. Des cycles de transformation entre l'U (VI) et l'U (IV), catalysés par des enzymes cytochrome P450 (CYP) et du glutathion (GSH) (Pourahmad *et al.*, 2006) ou par l'ascorbate (Yazzie *et al.*, 2003), produirait suffisamment d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour induire un stress. Il s'agit d'une réaction similaire à la réaction de Fenton (Eqn. 1.14). Les conséquences cellulaires sont sensiblement identiques à celles du stress radio-induit.



Enfin, il a été montré que l'U est capable d'interagir directement avec l'ADN, notamment en raison de sa forte affinité pour les groupements phosphates. Cette interaction se traduirait par la formation d'adduits, l'induction de mutations ou de cassures par hydrolyses des ponts phosphodiester (Stearns *et al.*, 2005 ; Yazzie *et al.*, 2003).

*Marqueurs moléculaires du stress induit par l'U.*

Depuis une dizaine d'années, des études expérimentales ont été réalisées sur plusieurs biomarqueurs moléculaires afin de préciser le mode d'action de l'U. Après une exposition de saumons juvéniles (*Salmo salar*) à des concentrations d'U élevées, durant 48 h, Song *et al.* (2012) ont pu montrer une induction de gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydant ( $\gamma$ -glutamyl cystéine synthétase (GCS), glutathion réductase (GR) et glutathion peroxydase 3 (GPx)), de gènes liés aux dommages à l'ADN et à leur réparation (Gadd45G et Rad51) ainsi que divers gènes impliqués dans l'apoptose ou la prolifération cellulaire (*e.g.* caspase, Rad51). Dans l'étude de Lerebours *et al.* (2009) menée sur *D. rerio* (exposition de 3 à 28 j), l'expression des gènes impliqués dans le système de défense antioxydant et la réparation de l'ADN apparaît hautement variable en fonction du temps d'exposition, de la concentration d'exposition ainsi que de l'organe considéré. Enfin, Al Kaddissi *et al.* (2012) n'ont observé quasiment aucun changement dans les activités des enzymes de défense contre le stress oxydant (*i.e.* catalase (CAT), GPx, glutathione S-transférase (GST) et superoxyde dismutase (SOD)) après 4 ou 10 j d'exposition de l'écrevisse, *Procambarus clarkii*, à l'U. Chez *C. elegans*, Jiang *et al.* (2009) ont montré qu'une exposition aiguë (1 h à 1,00 mmol<sub>L</sub><sup>-1</sup>) induit significativement l'expression du gène codant pour la MT-1 mais

pas celle du gène codant pour la MT-2. L'étude des biomarqueurs moléculaires ne permet donc pas de définir un motif de réponse clair suite à une exposition à l'U.

## 1.3.2 Cadmium (Cd)

### 1.3.2.1 Propriétés physicochimiques

Le cadmium est un élément trace métallique ( $Z = 48$ ) appartenant aux groupes des métaux de transition. De même que l'U, le Cd n'est pas présent à l'état natif dans l'environnement mais plutôt complexé à l'oxygène, au soufre et aux carbonates (Nordberg *et al.*, 2007). Il se trouve généralement sous sa forme bivalente, Cd (II) (Fleischer *et al.*, 1974).

Dans la classification de Nieboer *et Richardson* (1980), le cadmium fait partie du groupe *borderline* ; groupe dans lequel les composés ont une affinité intermédiaire pour les groupements contenant de l'oxygène, de l'azote ou du soufre. Le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$  font également partie du même groupe. Cependant, à l'inverse de ces deux ions, le  $\text{Cd}^{2+}$  est caractérisé par une affinité prononcée pour les composés sulfurés (Nies, 2007).

Le rayon ionique du  $\text{Cd}^{2+}$  est de 1,0 Å non hydraté et de 4,3 Å hydraté (Vieira *et Beppu*, 2008). Les dimensions de  $\text{Cd}^{2+}$  sont par exemple très proches de celles du  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.3.2.2 Sources et occurrence dans l'environnement

Le Cd est présent sur l'ensemble de la croûte terrestre à une concentration moyenne de  $0,9 \mu\text{mol}_{\text{Cd}} \text{kg}^{-1}$ . Le Cd se retrouve presque exclusivement dans les minerais de zinc, de plomb et de cuivre ainsi que dans des roches phosphatées sédimentaires. La production de Cd est issue principalement de l'extraction et de la production du Zn. Les principaux pays producteurs sont la Chine, le Japon, la Corée du Sud, le Kazakhstan, le Canada, le Mexique et la Russie (UNEP, 2010).

Le cadmium est naturellement dispersé dans l'ensemble des compartiments environnementaux suivant deux processus ; d'un côté, par dispersion atmosphérique lors de combustions (*e.g.* activité volcanique), de l'autre, par érosion des roches et lessivages des sols. Les activités anthropiques participent de manière significative à la dispersion du Cd dans l'environnement. En effet, il a été estimé que les sources naturelles contribuent à une émission atmosphérique de  $41\,000 \text{ t an}^{-1}$  tandis que les activités anthropiques ont contribué, par exemple, à un relargage de 3 000 t en 1995 (UNEP, 2010).

Le Cd est utilisé dans la conception de batteries, de pigments, de revêtements antirouille et comme stabilisant de polymères. Cependant, en raison de la forte toxicité du Cd, son utilisation dans l'industrie est de plus en plus remplacée par l'utilisation d'autres composés

moins toxiques. Les principales sources de rejets anthropiques du Cd dans l'environnement sont la combustion de matières fossiles et de déchets pour le compartiment atmosphérique, et l'industrie minière, l'utilisation d'engrais phosphatés en agriculture ainsi que la gestion des déchets urbains pour les autres compartiments (ECB, 2007 ; Nordberg *et al.*, 2007).

Dans les sols de surface non contaminés, le cadmium est généralement présent à des concentrations comprises entre 0,1 et 10  $\mu\text{mol}_{\text{Cd}} \text{kg}^{-1}$  (Bjerregaard *et Andersen*, 2007). En zone contaminée, la gamme de concentrations de Cd s'étend de quelques  $\mu\text{mol}_{\text{Cd}}$  à plusieurs centaines de  $\mu\text{mol}_{\text{Cd}} \text{kg}^{-1}$  (Pinot *et al.*, 2000 ; UNEP, 2010).

Dans les milieux aquatiques (eaux douces et eaux salées), le cadmium se retrouve principalement dans les sédiments et les matières en suspension. La concentration dans la phase liquide est généralement faible et largement inférieure à 10  $\text{nmolL}^{-1}$  (Nordberg *et al.*, 2007). Dans les zones contaminées, la gamme de concentrations de Cd dans la phase liquide s'étend de quelques dizaines de  $\text{nmolL}^{-1}$  à plusieurs  $\mu\text{molL}^{-1}$  (Morin *et al.*, 2007 ; Nordberg *et al.*, 2007).

Dans les sédiments marins non contaminés, le bruit de fond du Cd est assez élevé et peut atteindre 10  $\mu\text{mol}_{\text{Cd}} \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$ . Dans les sédiments, au niveau de cours d'eau, bassins ou estuaires affectés par des sites industriels, des concentrations de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{mol}_{\text{Cd}} \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  et même jusqu'à quelques  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  sont retrouvées (ATSDR, 2012).

### 1.3.2.3 Spéciation dans les matrices environnementales

À l'inverse de l'U, les conditions redox des matrices environnementales est un facteur secondaire dans la spéciation du Cd. Le pH quant à lui, y joue un rôle prépondérant (UNEP, 2010).

Dans les sols, l'ion libre  $\text{Cd}^{2+}$  s'adsorbe sur les argiles (surfaces chargées négativement), se complexent à la matière organique, précipite sous des formes insolubles et constitue différents complexes inorganiques (*e.g.*  $\text{Cd}_3[\text{PO}_4]_2$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{Cd}[\text{OH}]_2$ ). La mobilité du Cd est inversement proportionnelle au pH. Des pH élevés favorisent l'adsorption du Cd dans le sol de façon irréversible ainsi que la formation des différents complexes. Dans les sols acides ou en présence de compétiteurs cationiques, le Cd devient mobile et peut rejoindre le milieu aquatique (ATSDR, 2012).

Dans les eaux douces, le Cd se trouve sous forme ionique hydratée ( $\text{Cd}[\text{H}_2\text{O}]_6^{2+}$ ). Le Cd peut également se complexer à différents ligands dont l'ordre d'affinité est généralement : acides humiques >  $\text{CO}_3^{2-}$  >  $\text{OH}^-$  >  $\text{Cl}^-$  >  $\text{SO}_4^{2-}$  (ATSDR, 2012). La salinité favorise la complexation du Cd par les chlorures. Dans l'eau de mer, la forme libre  $\text{Cd}^{2+}$  est quasiment inexistante au profit des formes complexées  $\text{CdCl}^-$ ,  $\text{CdCl}_2$  et  $\text{CdCl}_3^-$  (Nordberg *et al.*,

2007). La concentration en Cd dans la phase liquide est inversement corrélée au pH et à la concentration de matières organiques dans l'eau (ATSDR, 2012). En conditions réductrices, le Cd peut former du CdS qui a tendance à précipiter (ECB, 2007). L'adsorption du Cd sur les surfaces minérales (argiles, minéraux carbonatés, etc.) ou organiques (acides humiques, bactéries, etc.) ainsi que les phénomènes de précipitation favorisent l'accumulation du Cd dans les sédiments (ATSDR, 2012 ; Nordberg *et al.*, 2007).

#### 1.3.2.4 Biodisponibilité et bioaccumulation

La forme rapportée la plus biodisponible du Cd est l'ion libre Cd<sup>2+</sup> (Janssen *et al.*, 1997 ; Luoma, 1983). Des études, faisant varier les concentrations de différents ligands, ont pu montrer que la complexation du Cd atténue ses capacités de bioaccumulation et de toxicité (*e.g.* Clifford *et* McGeer, 2010 ; Giesy Jr *et al.*, 1977 ; Sunda *et al.*, 1978).

Le pH joue un rôle ambigu quant à la biodisponibilité du Cd. Un pH acide favorise la présence de Cd sous forme libre mais la présence accrue en ions H<sup>+</sup> tend à réduire l'internalisation du Cd<sup>2+</sup> par inhibition compétitive au niveau des sites d'internalisations biologiques (ECB, 2007).

Dans les sols, la fraction libre d'un métal dans l'eau interstitielle est généralement considérée comme la fraction biodisponible pour les organismes ; cette fraction étant en équilibre avec la fraction du métal présent dans la phase solide (théorie du partage à l'équilibre) (de Groot *et al.*, 1998). Cependant, des auteurs ont mis en évidence que la biodisponibilité du Cd pour l'arthropode *Folsomia candida* ne pouvait être simplement reliée à la concentration en Cd de la phase liquide du sol ; d'autres mécanismes entreraient en jeu. Par exemple, une exposition par le biais de la nourriture pourrait contribuer significativement à l'exposition totale des organismes du sol (Janssen *et al.*, 1996).

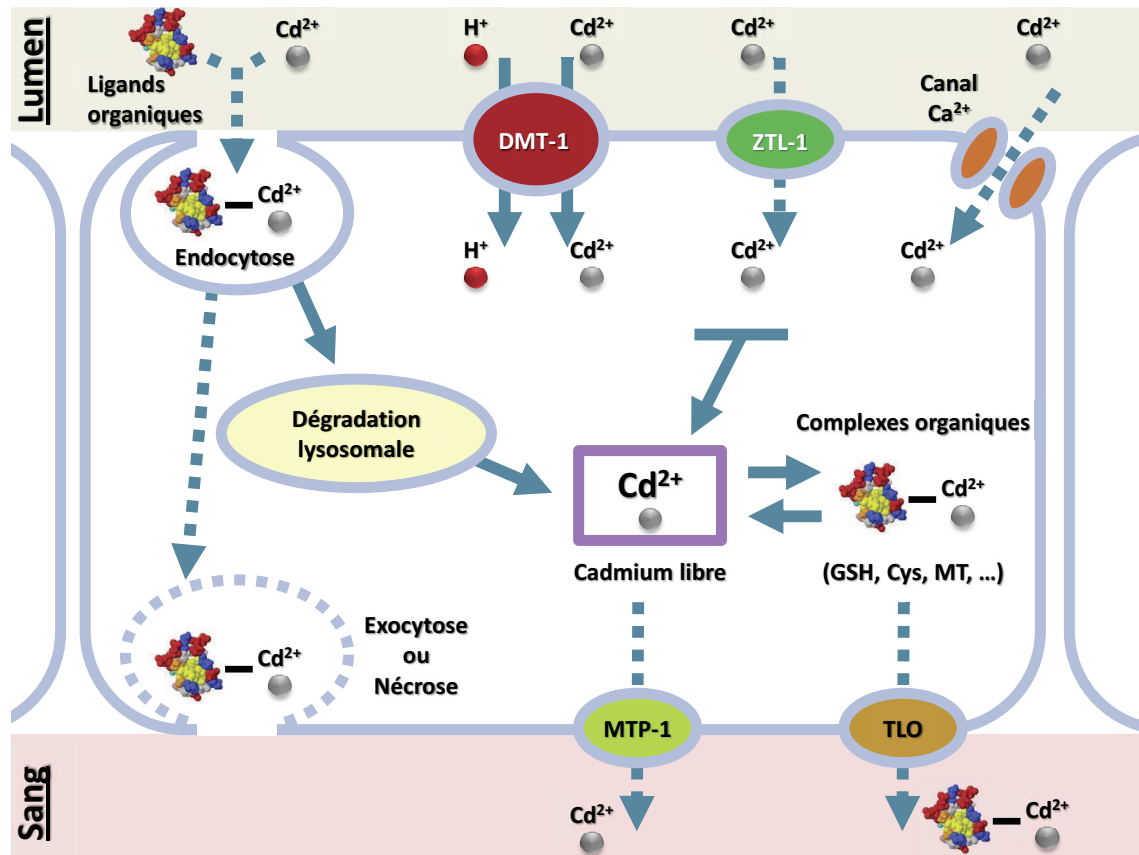
La bioconcentration et la bioaccumulation du Cd chez les organismes terrestres et aquatiques sont de modérées à fortes et sont nettement supérieures à celles de l'U. Dans les sols, les valeurs de BAF rapportées s'étendent entre 1,6 et 151 pour les lombrics (*Lumbricina*) et entre 0,05 et 18,8 pour les arthropodes. En milieu aquatique, les valeurs de BCF rapportées diminuent le long des chaînes trophiques. Des valeurs comprises entre 2222 et 310000 Lkg<sup>-1</sup> ont été calculées pour des algues et entre 5 et 1385 Lkg<sup>-1</sup> chez plusieurs espèces de poissons (ECB, 2007 ; Taylor, 1983). Dans les sédiments, le Cd n'est presque pas bioaccumulé par les organismes benthiques ; les BAF rapportés sont généralement inférieurs à 1 (ECB, 2007). Le potentiel de biomagnification du Cd le long des chaînes trophiques est considéré comme peu élevé dans la littérature scientifique, bien que des données additionnelles, plus précises, soient requises (UNEP, 2010). Une étude récente, menée par



Croteau *et al.* (2005) sur une chaîne trophique simple (épiphytes  $\curvearrowright$  invertébrés  $\curvearrowright$  poissons), rapporte un facteur de biomagnification de 16 et l'enrichissement trophique le plus élevé a été observé pour les invertébrés.

### 1.3.2.5 Absorption, distribution et excrétion

Une fois ingéré par les organismes, le Cd peut être absorbé au niveau du tractus digestif. À partir d'études conduites sur des mammifères, il a été montré que seule une petite fraction du Cd ingéré, de l'ordre de 1 à 6 %, est absorbé (Nordberg *et al.*, 2007 ; UNEP, 2010). Une carence en Zn, Fe, Ca ou en protéines induit une forte absorption du Cd, tandis qu'une supplémentation du régime alimentaire avec du Zn, Fe et Ca peut réduire jusqu'à 80 % l'absorption du Cd (Groten *et al.*, 1992, 1991 ; Nordberg *et al.*, 2007). Le Cd est donc soupçonné de partager les mêmes voies d'internalisation que celles de ces éléments essentiels. Le DMT, impliqué dans l'absorption du Fe mais également de nombreux autres métaux bivalents, jouerait un rôle clef dans l'absorption du Cd (Tallkvist *et al.*, 2001 ; Zalups *et Ahmad*, 2003). Une étude réalisée chez le rat a pu montrer que la surexpression de l'ARNm du DMT-1 est corrélée à une internalisation plus importante de Cd (Park *et al.*, 2002). De plus, des études *in vitro* réalisées sur des cellules humaines ont pu montrer que (i) un *knockout* de l'expression de DMT-1 conduit à une réduction de 50 % l'internalisation du Fe et du Cd (Bannon *et al.*, 2003), (ii) à pH acide, une compétition importante pour le DMT-1 se produit entre le Fe et le Cd et mais pas entre le Zn et le Cd (Elisma *et Jumarie*, 2001 ; Okubo *et al.*, 2003), et (iii) à pH neutre, une compétition importante se produit entre le Zn et le Cd (Elisma *et Jumarie*, 2001). Ces différents résultats soulignent l'efficacité du DMT-1 pour transporter le Cd mais également l'existence d'autres mécanismes de transport. Des transporteurs du Zn (ZTL) ainsi que des canaux calciques seraient également impliqués (Zalups *et Ahmad*, 2003). Par ailleurs, une partie du Cd dans le tractus digestif est liée à des molécules organiques de faible poids moléculaire et riches en groupements thiol (*e.g.* la MT, l'albumine ou la cystéine). Ces différentes formes complexées du Cd pourraient être internalisées par endocytose ou *via* des transporteurs spécifiques à l'absorption de ces molécules (Nordberg *et al.*, 2007 ; Zalups *et Ahmad*, 2003). La figure 1.12 résume les flux possibles de Cd se produisant dans les entérocytes. Pour les organismes aquatiques, l'internalisation du Cd se produit également au niveau de zones perméables telles que les branchies, où le Cd emprunte les transporteurs du  $\text{Ca}^{2+}$  (Li *et al.*, 2011 ; Silvestre *et al.*, 2004). Une fois internalisé dans les cellules épithéliales, une fraction du Cd rejoint le système circulatoire. Les mécanismes impliqués restent encore méconnus. Parmi les voies possibles, le transporteur *metal transport protein 1* (MTP-1), analogue du DMT, identifié chez la souris, pourrait



**FIGURE 1.12** Schématisation des flux de Cd dans les entérocytes. *Flèches pleines* : flux bien caractérisés ; *Flèches en pointillé* : flux hypothétiques. DMT-1 : Transporteur de métaux bivalents 1 ; ZTL-1 : Transporteur de Zn ; MTP-1 : Protéine de transport des métaux 1 ; TLO : Transporteur de ligands organiques du Cd ; GSH : glutathion ; Cys : cystéine ; MT : métallothionéine. (Illustration inspirée de *Zalups et Ahmad, 2003*).

intervenir (*Zalups et Ahmad, 2003*).

Dans le système circulatoire, le Cd est transporté sous formes complexées avec différentes protéines telles que la transferrine, la ferritine, la MT, l'albumine ainsi qu'avec des composés de faible poids moléculaires riches en groupements thiol tels que le GSH ou la cystéine (*ATSDR, 2012 ; Nordberg et al., 2007 ; Zalups et Ahmad, 2003*). Le Cd est ainsi dispersé dans tout l'organisme et s'accumule préférentiellement dans le foie dans un premier temps, puis dans le rein (*ATSDR, 2012*). Une forte accumulation de Cd dans le foie induit la production de MT par les cellules hépatiques. Le Cd complexé à la MT dans le système circulatoire traverse le glomérule du rein et rejoint les urines. Le complexe Cd-MT est alors réabsorbé (notamment par endocytose) et stocké dans les cellules tubulaires (*Nordberg et al., 2007*).

L'excrétion du Cd s'effectue d'une part par l'intermédiaire des urines. En cas d'exposi-

tion à de faibles concentrations de Cd, l'excrétion urinaire est peu importante. Cependant, lorsque des dommages ont été causés aux cellules rénales par le Cd, limitant la réabsorption tubulaire, le taux d'excrétion du Cd dans les urines peut augmenter significativement (UNEP, 2010). D'autre part, l'excrétion fécale contribue à l'élimination du Cd des organismes. La majorité du Cd n'étant pas absorbée dans le tractus digestif, celle-ci se retrouve éliminée au niveau des fèces (Nordberg *et al.*, 2007). Le foie contribue également à cette voie d'excrétion. Dans les cellules hépatiques, le Cd libre peut se complexer au GSH et rejoindre l'intestin par le biais des sécrétions biliaires (Zalups *et Ahmad*, 2003).

Le Cd internalisé n'est pas métabolisé par les organismes. La production de (poly)peptides et protéines riches en groupements thiol (*e.g.* MT) permet de séquestrer le Cd libre et de limiter sa toxicité cellulaire, mais également de le redistribuer dans l'organisme comme nous venons de le voir (Thévenod, 2010 ; Zalups *et Ahmad*, 2003). La production de phytochélatines (PC), polymère  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , jusqu'alors mise en évidence chez les plantes et certains microorganismes et intervenant dans la chélation de métaux tels que le Cd, a été récemment observée chez *C. elegans* et d'autres invertébrés (Vatamaniuk *et al.*, 2002). Hughes *et al.* (2009) ont pu montrer que des mutants *pcs-1*, ayant l'expression de la protéine de synthèse de la PC inactivée, étaient d'au moins un ordre de grandeur plus sensibles que des mutants *mtl*, ayant l'expression de MT inactivée. L'action des PC serait associée à celle du transporteur *Heavy Metal Tolerance factor* (HMT), protéine de la superfamille *ATP-binding cassette* (ABC) (Vatamaniuk *et al.*, 2005). D'autres transporteurs ABC (*e.g.* MRP, PGP) interviendraient également dans l'efflux du Cd en dehors des cellules (Thévenod, 2010 ; Vatamaniuk *et al.*, 2005).

### 1.3.2.6 Toxicité sur les organismes et valeurs de protection environnementale

De nombreuses études ont caractérisé la toxicité du Cd sur la faune terrestre et aquatique. Pour les organismes du sol (microorganismes et invertébrés), les  $E(L)C_{x \geq 50}$  rapportées varient entre 0,06 et 46,83  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  (ECB, 2007). L'utilisation d'une méthodologie de type distribution de sensibilité des espèces (SSD), prenant en compte les NOEC d'espèces de différents groupes taxonomiques, a permis de calculer une  $PNEC_{\text{sol}}$  de 0,01  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  (ECB, 2007). À partir de l'étude de Swain *et al.* (2010), où des nématodes *C. elegans* ont été exposés de façon chronique au Cd, des  $EC_{20-25}$  comprises entre 0,007 et 0,017  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{L}_{\text{NGM}}^{-1}$  et des  $EC_{50}$  comprises entre 0,019 et 0,066  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{L}_{\text{NGM}}^{-1}$  peuvent être estimées pour la croissance et la taille de ponte totale. Les effets du Cd sur *C. elegans* ont également été modélisés à travers une approche DEBtox. Les NEC obtenues varient entre 0 et  $1,19 \times 10^{-6} \text{mmol}_{\text{Cd}} \text{L}_{\text{NGM}}^{-1}$  (Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Jager *et al.*, 2014 ; Swain *et al.*,

2010). Toutes proviennent du même meilleur mode d'action identifié : « réduction de l'assimilation ».

Pour les organismes aquatiques, les  $E(L)C_{50}$  publiées varient entre  $8,90 \times 10^{-6}$  et  $0,66 \text{ mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  pour les invertébrés aquatiques, entre 5,00 et  $32,74 \text{ mmol}_{\text{Cd}}\text{kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour les invertébrés benthiques et entre  $8,01 \times 10^{-6}$  et  $0,36 \text{ mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  pour les poissons et amphibiens. Par la méthode des SSD, la  $\text{PNEC}_{\text{eau}}$  générique calculée est de  $1,70 \times 10^{-6} \text{ mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$ . L'influence de la dureté de l'eau sur la toxicité du Cd peut également être intégrée au calcul de  $\text{PNEC}_{\text{eau}}$  « locales ». Celles-ci peuvent par exemple varier entre  $7,12 \times 10^{-7}$  et  $2,22 \times 10^{-6} \text{ mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  pour une dureté comprise entre 40 et  $200 \text{ mg}_{\text{CaCO}_3}\text{L}^{-1}$  (ECB, 2007). Chez la daphnie, la modélisation DEBtox a permis d'estimer des NEC de  $4,18 \times 10^{-7}$  ( $\pm 0,12 \times 10^{-7}$ )  $\text{mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  (Kooijman *et Bedaux*, 1996) et de  $4,02 \times 10^{-5}$  ( $\pm 0,16 \times 10^{-5}$ )  $\text{mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  (Billoir *et al.*, 2007). Il est intéressant de remarquer pour le Cd que les  $\text{PNEC}_{\text{eau}}$  calculées sont relativement proches des valeurs de NEC estimées.

### 1.3.2.7 Mécanisme de toxicité

*Cadmium, élément chimiotoxique.*

Une intense investigation du mécanisme de toxicité du Cd se poursuit depuis plusieurs dizaines d'années. Bien que le mode d'action précis n'ait pas encore été identifié, les résultats expérimentaux s'accumulent et permettent de dresser un ensemble de processus par lesquels le Cd exercerait sa toxicité. La plupart des effets rapportés sont reliés à l'affinité du  $\text{Cd}^{2+}$  pour les groupements R-SH ainsi qu'à sa « proximité chimique » avec les différents métaux essentiels au fonctionnement des cellules (*e.g.*  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Tout d'abord, il a pu être montré expérimentalement que l'exposition au Cd (particulièrement lors d'expositions aiguës) génère un stress oxydatif par production de ROS, déséquilibrant la balance entre pro- et anti-oxydants des cellules. Cependant, à l'inverse de l' $\text{UO}_2^{2+}$ , le  $\text{Cd}^{2+}$  ne change pas d'état d'oxydation en milieu biologique. L'induction de la production de ROS par le Cd ne passe donc pas par une réaction de type Fenton (Cuypers *et al.*, 2010). Différents mécanismes indirects pourraient en être la cause :

- Le  $\text{Cd}^{2+}$  entrerait en compétition avec différents métaux essentiels (notamment le  $\text{Fe}^{2+}$ ) pour des sites biologiques (*e.g.* la MT, impliquée dans l'homéostasie du Fe) et aboutirait à des concentrations accrues dans le cytosol en métaux libres capables de réaction de type Fenton (Cuypers *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2009).
- Le GSH est un polypeptide jouant un rôle primordial dans les cellules et notam-

ment dans la détoxification des ROS par le biais de son groupement thiol (réaction catalysée par la GPx). Le Cd, ayant une forte affinité pour le GSH, peut épuiser les réserves cellulaires de GSH et ainsi favoriser l'action oxydante des ROS, produits constamment par le métabolisme cellulaire basal ou par d'autres composés xénobiotiques (Cuypers *et al.*, 2010 ; Ercal *et al.*, 2001).

- Outre la GPx, d'autres enzymes, telles que la CAT et la SOD, sont impliquées dans la détoxification des ROS. Leur activité enzymatique dépend de la fixation de métaux réactifs (Fe, Mn, Zn, Cu, Se, etc.). Le remplacement de ces métaux par le Cd ou l'interaction de celui-ci avec les groupements R–SH de ces protéines, réduirait leur activité et favoriserait ainsi l'action des ROS (Cuypers *et al.*, 2010).
- Les mitochondries sont le siège de réactions métaboliques (réactions de transfert d'e<sup>-</sup> et d'énergie au cours de la phosphorylation oxydative) produisant couramment des ROS. Le Cd est suspecté d'interagir avec différentes protéines impliquées dans ces réactions entraînant un fonctionnement anormal et favorisant la génération de ROS (Cuypers *et al.*, 2010).
- Une activation des macrophages par le Cd induirait la libération de facteurs pro-inflammatoires qui favoriseraient la génération de ROS (Liu *et al.*, 2009).

Cependant, l'implication de ces différents mécanismes dans la toxicité du Cd n'a bien souvent été démontrée que par des études *in vitro*, à des concentrations qui peuvent s'avérer parfois peu biologiquement réalistes. Pour des expositions chroniques au Cd, des adaptations cellulaires ont pu être observées avec l'induction de systèmes de lutte contre le stress oxydatif. Le Cd est par exemple un fort inducteur de la MT (Bourdineaud *et al.*, 2006). Les effets pro-oxydant du Cd ne deviendraient significatifs qu'une fois les systèmes de lutte contre les ROS dépassés (Cuypers *et al.*, 2010). Les effets des ROS sur les cellules sont divers et ont été évoqués précédemment pour l'U<sup>1</sup>.

L'ADN figure parmi les cibles biologiques endommagées par les ROS. Le maintien de l'intégrité du génome est assuré par des mécanismes de réparation de l'ADN (mécanismes de réparation par excision de nucléotides ou de bases, de réparation des mésappariements, etc.). Différents travaux expérimentaux ont pu montrer que le Cd est capable d'altérer les principaux mécanismes de réparation de l'ADN et d'accroître les effets d'agents génotoxiques tels que les rayonnements UVC ou le benzo[a]pyrène (Hartwig, 2010 ; Mukherjee *et al.*, 2004 ; Schwerdtle *et al.*, 2010).

---

1. Voir section 1.3.1.8 (p. 50).

Les effets du Cd se manifestent au niveau de nombreux autres cibles biologiques comportant des métaux bivalents essentiels ou des composés organiques à groupement thiol. Le Cd peut ainsi déréguler la transcription de gènes (des motifs à doigt de zinc, riches en soufre, sont fréquemment impliqués dans la liaison de facteurs de transcription à l'ADN, [Hartwig, 2010](#)), perturber les cascades de signalisation cellulaires modifiant l'homéostasie de métaux essentiels (*e.g.* le Zn, [Cuyper \*et al.\*, 2010](#) ; [Moulis, 2010](#)), inhiber la régulation de la prolifération cellulaire (*e.g.* inactivation de la protéine p53 par fixation du Cd entraînant un changement de conformation, [Hartwig, 2010](#) ; [Méplan \*et al.\*, 1999](#)) ou encore altérer les jonctions inter-cellulaires (*e.g.* remplacement du Ca<sup>2+</sup> au niveau des protéines d'adhésion, [Hartwig, 2010](#)).

Enfin, de plus en plus de résultats, compilés par [Byrne \*et al.\* \(2009\)](#), tendent à démontrer que le Cd agirait également au niveau de récepteurs hormonaux (*e.g.* le récepteur  $\alpha$  des œstrogènes) et affecterait ainsi les régulations hormonales des organismes.

#### *Marqueurs moléculaires du stress induit par le Cd.*

Les modulations d'expressions géniques faisant suite à une exposition au Cd ont été étudiées chez différents types d'organismes. De nombreuses modifications d'expressions ont été observées et concernaient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif, l'homéostasie des métaux, la métabolisation des xénobiotiques, la synthèse, le transport et la dégradation de protéines, le cycle cellulaire et l'apoptose, la réponse immunitaire, etc. ([Connon \*et al.\*, 2008](#) ; [Hu \*et al.\*, 2005](#) ; [Joseph, 2009](#) ; [Williams \*et al.\*, 2006](#)). Les gènes de stress dont l'induction est fréquemment rapportée sont ceux impliqués dans la synthèse des MT, des *heat shock protein* (HSP), dans la synthèse et l'homéostasie du GSH ainsi que dans la réponse au stress oxydant (*e.g.* CAT, SOD) ([Joseph, 2009](#)). Suite à une exposition de Daphnies au Cd durant 24 h, [Connon \*et al.\* \(2008\)](#) rapportent que, parmi les gènes dont l'expression est modulée, 29 % codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme, 31 % dans la transcription et traduction et 40 % dans divers processus cellulaires (*e.g.* croissance, transport d'ions, réponse au stress). Des niveaux d'expression différents peuvent être observés en fonction des études. Ceux-ci pourraient être le résultat de différences dans les méthodes expérimentales utilisées pour l'exposition au Cd (formes chimiques du Cd, concentrations et voies d'exposition) mais également de la mise en place au cours du temps de mécanismes d'adaptation au Cd ([Al Kaddissi \*et al.\*, 2014](#) ; [Hu \*et al.\*, 2005](#) ; [Liu \*et al.\*, 2009](#) ; [Williams \*et al.\*, 2006](#)).

Plusieurs études se sont également intéressées aux modifications d'expressions géniques ou de marqueurs métaboliques chez *C. elegans* exposé au Cd. Les gènes dont l'expression

est modulée sont similaires ou appartiennent aux même catégories de gènes que ceux identifiés dans les études menées sur d'autres organismes (Cui *et al.*, 2007 ; Roh *et al.*, 2006 ; Swain *et al.*, 2010). Hughes *et al.* (2009) ont montré à travers une étude de métabolomique qu'une exposition au Cd induit la voie de synthèse de la PC. Par ailleurs, Liao *et al.* (2002) ont identifié le gène *cadmium responding element-1 (cdr-1)* dont les niveaux d'induction suite à une exposition au Cd étaient comparables à ceux des MT. Ce gène code pour la protéine CDR-1 qui est exprimée principalement au niveau de la membrane des lysosomes de cellules intestinales. Six isoformes *cdr* ont été identifiées au total (Dong *et al.*, 2008). Le Cd a été rapporté comme un inducteur spécifique de l'expression de *cdr-1*. En effet, parmi divers facteurs de stress testés (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Paraquat, Juglon et la température), l'induction de ce gène a été seulement rapportée suite à une exposition au Cd (Liao *et al.*, 2002). Une induction de *cdr-4* a été quant à elle observée suite à une exposition des nématodes à l'As, le Cd, l'Hg, le Zn ainsi qu'à un stress hypotonique (Dong *et al.*, 2008).

### 1.3.3 Mélanges U/Cd

#### 1.3.3.1 Cooccurrence de l'U et du Cd dans l'environnement

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, l'U et le Cd disséminés dans l'environnement proviennent à la fois de sources naturelles et anthropiques. Ils sont donc susceptibles de se retrouver en mélange dans les compartiments environnementaux. Une étude à grande échelle menée sur des sols d'Irlande du nord illustre à quelles concentrations l'U et le Cd peuvent être trouvés en mélange dans des sols ruraux n'étant pas à proximité de sources de contamination particulière. Les valeurs mesurées sont comprises entre  $6 \times 10^{-4}$  et  $0,013 \text{ mmol kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour l'U, et  $0,001$  et  $0,008 \text{ mmol kg}_{\text{dw}}^{-1}$  pour le Cd (Barsby *et al.*, 2012).

Des concentrations plus élevées d'U et de Cd en mélange peuvent se retrouver au niveau de sites impactés par des activités anthropiques. Le tableau 1.3 illustre des exemples rapportés dans la littérature. Les matrices dont les teneurs en U et Cd sont les plus élevées sont issues d'anciens sites miniers uranifères. Dans des sols fortement contaminés du site Cunha Baixa (Portugal), Pereira *et al.* (2008) ont pu mesurer jusqu'à  $6,000 \text{ mmol}_U \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$  et  $0,047 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ kg}_{\text{dw}}^{-1}$ .

Des teneurs élevées en Cd et moyennes en U sont également retrouvées dans certains sols utilisés dans le cadre d'une agriculture intensive (Taylor, 2007). Cette contamination est la résultante d'une utilisation massive d'engrais phosphatés, naturellement enrichis en U et Cd (par remplacement du Ca). Smidt *et al.* (2012) indiquent par exemple que l'on retrouvait en 2007 entre  $0,260$  et  $0,865 \text{ mmol}_U$  et entre  $0,100$  et  $0,300 \text{ mmol}_{\text{Cd}}$  par kilogramme

### 1.3 Contaminants et mélanges considérés dans cette étude

**Tableau 1.3** Exemples de concentrations d'U et de Cd pouvant se retrouver en mélange dans des matrices issues de sites contaminés. <sup>a</sup>

Matrice	[U] (mM) <sup>b</sup>		[Cd] (mM) <sup>b</sup>		Description du site d'échantillonnage	Référence
	min	max	min	max		
sol	0,006	0,016	0,028	0,280	Sols urbains à proximité de sites métallurgiques (France)	Douay <i>et al.</i> , 2008
sol	0,003	0,016	0,002	0,012	Sols agricoles (Nouvelle Zélande)	Schipper <i>et al.</i> , 2011
sol	0,007	0,015	0,002	0,041	Sols agricoles (Nouvelle Zélande)	Taylor, 2007
sol	0,008	0,487	<0,001	0,335	Sols à proximité d'un ancien site minier en rémédiation depuis 25 ans (Allemagne)	Carlsson <i>et Büchel</i> , 2005
sol	0,008	0,118	0,002	0,003	Sols à proximité d'anciens sites miniers d'U (USA)	Hinck <i>et al.</i> , 2013
sol	0,019	4,454	0,001	0,022	Sols à l'intérieur d'anciens sites miniers d'U (USA)	Hinck <i>et al.</i> , 2013
sol	0,367	1,985	0,003	0,011	Sols à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Kyrgyzstan)	Lind <i>et al.</i> , 2013
sol	0,017	0,042	0,007	0,010	Sols à proximité d'anciens sites miniers de Fe, Nb et Th (Norvège)	Mrdakovic Popic <i>et al.</i> , 2012
sol	0,013	0,135	0,003	0,014	Sols à l'intérieur d'anciens sites miniers de Fe, Nb et Th (Norvège)	Mrdakovic Popic <i>et al.</i> , 2012
sol	0,050	3,764	<0,001	0,003	Sols à proximité d'un ancien site minier d'U (Portugal)	Pereira <i>et al.</i> , 2008
sol	0,050	6,000	<0,001	0,047	Sols à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Portugal)	Pereira <i>et al.</i> , 2008
sol	0,024	0,491	0,003	0,008	Sols à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Kazakhstan)	Salbu <i>et al.</i> , 2013
sédiment	0,007	0,026	0,006	1,000	Sédiments d'un lac à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Kyrgyzstan)	Lind <i>et al.</i> , 2013
sédiment	0,009	1,383	<0,001	0,017	Sédiments d'un lac à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Kazakhstan)	Salbu <i>et al.</i> , 2013
sédiment	0,008	23,739	0,006	0,016	Sédiment d'une baie à proximité d'un ancien site minier d'U (Canada)	Neame <i>et al.</i> , 1982
sédiment	0,290	0,470	0,020	0,046	Sédiment d'une baie à proximité d'un ancien site minier d'U (Canada)	CanNorth, 2006
eau	0,002	0,008	$2 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-5}$	Lac à l'intérieur d'un ancien site minier d'U (Portugal)	Antunes <i>et al.</i> , 2007
eau	$9 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-5}$	Rivières à proximité d'un ancien site minier de Fe	Taylor <i>et al.</i> , 2012

<sup>a</sup>. Certaines données ont été extraites des graphes publiés à l'aide du logiciel PlotReader 1.55.0.0 (J. Brugerman).

<sup>b</sup>. Les concentrations d'U et de Cd publiées ont été converties en  $\text{mmol kg}^{-1}$  pour les matrices solides et  $\text{mmol L}^{-1}$  pour les matrices liquides.



d'agent fertilisant vendus en Allemagne. Des teneurs en Cd encore supérieures ont été retrouvées dans les engrais phosphatés vendus au Brésil. L'utilisation régulière de ces engrais favoriserait l'accumulation de l'U et du Cd dans les sols au fil des années (Schipper *et al.*, 2011).

### 1.3.3.2 Toxicité de l'U et du Cd en mélange

Les études portant sur les effets combinés de l'U et du Cd sur les organismes sont rares dans la littérature. À notre connaissance, seulement deux études ont été menées et elles ont été réalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Horemans *et al.*, 2011 ; Vanhoudt *et al.*, 2010). L'étude de Vanhoudt *et al.* (2010) s'est focalisée sur la description de différents paramètres (translocation de l'U et du Cd, niveau de stress oxydant, etc.) sans utiliser les modèles d'additivité de référence, CA et RA, pour l'identification d'éventuelles interactions<sup>1</sup>. Les auteurs ont pu montrer que lors d'une coexposition U/Cd de 3 j des plantes, la présence de Cd augmente d'un facteur 2 l'internalisation de l'U et modifie significativement les concentrations en micro-nutriments (Cu, Fe et Mn) dans les racines. Dans l'étude de Horemans *et al.* (2011), les plantes ont été exposées durant 48 h à des mélanges équitoxiques (sur la base de l'additivité CA) d'U et de Cd. Des effets combinés additifs ont été rapportés au niveau de la croissance d'*A. thaliana*. Cependant, une diminution significative de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, marqueur de stress oxydant, a été observée pour les plantes exposées au mélange par rapport à celles exposées au Cd seul ; l'U seul n'induisant pas de production significative d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Trois autres études rapportent les effets de l'U en mélange avec différents métaux bivalents. Dans l'étude de Hamilton *et Buhl* (1997), les auteurs ont testé les effets combinés de composés inorganiques (As, B, Cu, Mo, Se, U, V et Zn) en différentes proportions environnementales sur la survie de larves du poisson *Catostomus latipinnis* après une exposition de 4 j. Ils ont pu montrer que les effets observés suivaient l'additivité CA. L'étude de Charles *et al.* (2006) visait à déterminer les effets du mélange binaire U/Cu sur le macrophyte tropical dulçaquicole, *Lemna aequinoctialis*. Sur la base du modèle CA, des effets inférieurs à l'additivité sur le taux de croissance ont été mis en évidence, laissant suggérer qu'une interaction antagoniste se produisait entre ces deux métaux bivalents. Enfin, un antagonisme a également été identifiée sur la base de l'additivité CA et RA chez *D. magna* après exposition au mélange U/Se (Zeman, 2008). Des expériences complémentaires ont permis de préciser que cette interaction provenait probablement d'une diminution de l'internalisation de l'U en raison de la présence de Se.

---

1. Voir sections 1.1.2.2 (p. 16) et 1.1.2.3 (p. 17).

À l'inverse, la bibliographie sur la thématique des effets combinés du Cd avec d'autres métaux bivalents est très riche. Les effets en mélange rapportés sont de nature très diverse. Dans le cas du mélange binaire Cd/Zn, la similarité physico-chimique entre ces ETM pourrait être en faveur d'une interaction antagoniste, résultante d'une compétition pour leur internalisation dans les organismes. Cependant, certaines études ont pu montrer que les effets combinés suivaient l'additivité (EIFAC, 1987 ; Loureiro *et al.*, 2009 ; Van Gestel *et Hensbergen*, 1997 ; Zidar *et al.*, 2009) tandis que d'autres, ont permis la mise en évidence d'interactions antagonistes, synergiques, ou mixtes (Amorim *et al.*, 2012 ; Cedergreen, 2014 ; EIFAC, 1987 ; Odendaal *et Reinecke*, 2004 ; Qiu *et al.*, 2011 ; Shaw *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2011 ; Zidar *et al.*, 2009). Des paramètres tels que l'organisme d'étude, la matrice d'exposition, le critère d'effet ou le choix du modèle d'additivité de référence pourraient expliquer ces divergences (Cedergreen *et Streibig*, 2005 ; Jonker *et al.*, 2011).

### 1.3.4 Synthèse

L'U et le Cd sont tous deux des éléments traces métalliques présents naturellement dans l'environnement mais dont les concentrations peuvent être considérablement augmentées sous l'effet d'activités anthropiques. De nombreuses études portant sur le comportement de ces ETM dans l'environnement et sur leur toxicité vis-à-vis d'organismes différents ont pu permettre l'établissement de valeurs guides environnementales ou de concentrations prédites sans effet pour les démarches d'évaluation des risques. De manière générale, la toxicité de l'U apparaît comme inférieure à celle du Cd. Par exemple, la  $PNEC_{sol}$  de l'U est 40 fois supérieure à celle du Cd. Par ailleurs, les modélisations DEBtox de la toxicité de l'U et du Cd sur différents organismes suggèrent que des effets pourraient survenir en deçà de leurs valeurs prédites sans effet.

Les activités anthropiques telles que l'extraction minière ou l'agriculture intensive peuvent engendrer des concentrations relativement élevées en U et Cd dans une même matrice environnementale. Pourtant, les données publiées sur la caractérisation des effets combinés de l'U avec d'autres ETM comme le Cd sont peu nombreuses, sont basées sur des plans expérimentaux peu étendus et ne concernent que des espèces de plante ou de poisson.

Les données actuelles sur les modes d'action de l'U et du Cd laissent à penser que ces ETM agissent par le biais de mécanismes relativement peu spécifiques, probablement (mais pas uniquement) par la génération d'un stress oxydant. Il semble donc assez difficile, *a priori*, de faire un choix en faveur d'un des deux modèles d'additivité référence, CA ou RA, pour la prédiction de leurs effets combinés. L'ensemble des études menées jusqu'à présent sur le mélange U/Cd n'ont utilisé que le modèle CA, modèle (le plus souvent) le

plus conservateur, comme additivité de référence.

Par ailleurs, les données publiées dans la littérature scientifique concernant les effets du mélange binaire U/Cd sont trop peu nombreuses pour pouvoir formuler une hypothèse solide concernant une possible déviation de l'additivité pour la toxicité du mélange sur les traits de vie du nématode *C. elegans*. Au vu des caractéristiques chimiques, radiologiques et toxicologique de l'U et du Cd, plusieurs hypothèses d'interaction seraient envisageables. Dans les matrices environnementales, la biodisponibilité de l'U et du Cd est modulée (entre autre) par la matière organique. En mélange, une compétition pour l'adsorption sur la matière organique entre l'U et le Cd pourrait, par exemple, avoir lieu. Celle-ci serait alors susceptible de moduler la toxicité du mélange et d'entraîner une déviation de l'additivité. De plus, même si l' $\text{UO}_2^{2+}$  et le  $\text{Cd}^{2+}$  ont des affinités chimiques contrastées (*e.g.* classification de [Nieboer et Richardson, 1980](#)), ils pourraient tous deux être internalisés *via* des transporteurs de métaux bivalents identiques (*e.g.* le DMT) et donc potentiellement entrer en compétition. Ainsi, une interaction antagoniste se produisant au niveau des individus, durant la phase toxicocinétique, est aussi envisageable. Enfin, différents types d'interaction se produisant au niveau des individus, durant la phase toxicodynamique, peuvent aussi être suspectés. D'un côté, les capacités du Cd à induire les défenses cellulaires antioxydantes pourraient atténuer le stress oxydant provoqué par l'U et aboutir à une interaction antagoniste. D'un autre côté, l'U et le Cd générant tous deux un stress oxydant, leur coprésence pourrait provoquer un fort déséquilibre de la balance oxydative et conduire à des effets combinés synergiques. Par ailleurs, le potentiel génotoxique de l'U, d'une part, et la capacité du Cd à inhiber les mécanismes de réparations de l'ADN, d'autre part, pourraient également générer une interaction synergique.

CHAPITRE 2

Choix stratégiques, hypothèses et objectifs

Comme nous l'avons mentionné en introduction, le WP4 STAR s'est fixé pour objectif d'étudier les effets de mélanges binaires entre contaminants (stresseurs) radioactifs et stables sur des organismes modèles représentant différents phylum d'un écosystème. La présente étude s'est focalisée sur la caractérisation des effets combinés de l'U et du Cd sur un invertébré du sol. Au vu des différents éléments présentés dans la synthèse bibliographique, cette section présente dans un premier temps les objectifs et les choix réalisés pour le déroulement de l'étude. Elle revient ensuite sur les raisons du choix de *C. elegans* comme organisme modèle et d'une approche expérimentale et d'analyse globale pour évaluer les effets combinés de l'U et du Cd.

### 2.1 Objectifs et choix pour le déroulement de l'étude

L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre la toxicité du mélange U/Cd sur le nématode *C. elegans* et d'identifier les interactions éventuelles à travers la mise en place de différentes démarches expérimentales et de modélisation.

Dans un premier temps, une expérience de toxicité sur des nématodes exposés au Cd seul a été réalisée dans le but de vérifier si les niveaux de réponse obtenus dans nos conditions expérimentales étaient similaires aux données publiées dans la littérature. Ces résultats ne sont pas présentés en détail dans ce document ; ils sont évoqués dans le chapitre 4<sup>1</sup>. Ce même type de travail n'a pas été réalisé pour l'U car des travaux réalisés en interne à l'IRSN avaient déjà permis de caractériser correctement les effets de cet ETM sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* (Dutilleul *et al.*, 2013 ; Goussen *et al.*, 2013).

Ensuite, les objectifs de la démarche expérimentale ont été : d'une part, de caractériser les effets combinés de l'U et du Cd sur *C. elegans*, et d'autre part, de préciser et discuter l'origine des interactions identifiées dans les mécanismes de toxicité de l'U et du Cd (Fig. 2.1). Les hypothèses générales testées sont que les effets combinés U/Cd sur les traits de vie du nématode *C. elegans* sont additifs (*i.e.* aucune interaction ne se produit) et que ceux-ci restent stables au cours du temps.

Des expériences d'exposition de *C. elegans* au mélange U/Cd ont été réalisées dans le but de mettre en évidence d'éventuelles interactions affectant la toxicité du mélange sur la taille maximale et la reproduction totale. Les résultats et leur analyse à partir de l'approche descriptive MixTox sont présentés et discutés dans le chapitre 4.

Ensuite, avec la mise en évidence d'une déviation de l'additivité dans les effets combinés de l'U et du Cd, notre objectif a été de préciser si la toxicité observée du mélange

---

1. p. 93.

était la conséquence d'une interaction se produisant dans le milieu d'exposition ou durant la phase toxicocinétique, ou alors d'une interaction plus complexe se produisant durant la phase toxicodynamique. Pour ce faire, nous avons décidé, d'une part, d'investiguer la bioaccumulation de l'U et du Cd, seuls et en mélange, par *C. elegans* et, d'autre part, d'étudier la répartition de ces ETM dans le milieu d'exposition. Les résultats et leur analyse sont présentés et discutés dans les chapitres 5<sup>1</sup> et 6<sup>2</sup>.

À la lumière des résultats de ces expériences complémentaires, les données d'effet du mélange U/Cd ont été réanalysées à partir de l'approche descriptive MixTox dans le but de mettre en évidence d'éventuelles interactions additionnelles. L'étude du développement des effets combinés de l'U et du Cd au cours du temps sur la croissance et la reproduction a également été réalisée. Les résultats et leur analyse sont présentés et discutés dans le chapitre 7<sup>3</sup>.

Enfin, l'ensemble des données d'effet obtenues a été réanalysé à partir de l'approche mécaniste DEBtox afin de conclure sur la présence d'éventuelles interactions additionnelles et de mettre en avant les avantages et limites d'une telle approche pour l'étude des mélanges. De plus, dans le but de vérifier les hypothèses de construction du modèle DEBtox, des critères d'effet additionnels, tels que la taille des œufs produits, la longueur à l'éclosion et la longueur au début de la reproduction, ont également été étudiés. Les résultats et leur analyse sont présentés et discutés dans le chapitre 8<sup>4</sup>.

## 2.2 Choix de l'organisme d'étude

*Caenorhabditis elegans* a été choisi comme organisme modèle pour la présente étude. Comme nous l'avons vu dans la section 1.2<sup>5</sup>, ce nématode est un organisme d'intérêt pour les études écotoxicologiques en laboratoire. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques permettent un suivi aisé des effets de contaminants sur les traits de vie (e.g. croissance, reproduction, longévité). Nous nous sommes concentrés ici sur la croissance et la reproduction, paramètres plus sensibles que la longévité (Swain *et al.*, 2010).

*C. elegans* possède aussi des avantages spécifiques à ce projet. D'une part, les toxicités de l'U et du Cd seul sur les traits de vie de ce nématode ont déjà été caractérisées au cours d'études précédentes (e.g. Dutilleul *et al.*, 2013 ; Goussen *et al.*, 2013 ; Nørhave *et al.*,

---

1. p. 105.  
2. p. 113.  
3. p. 125.  
4. p. 139.  
5. p. 33.

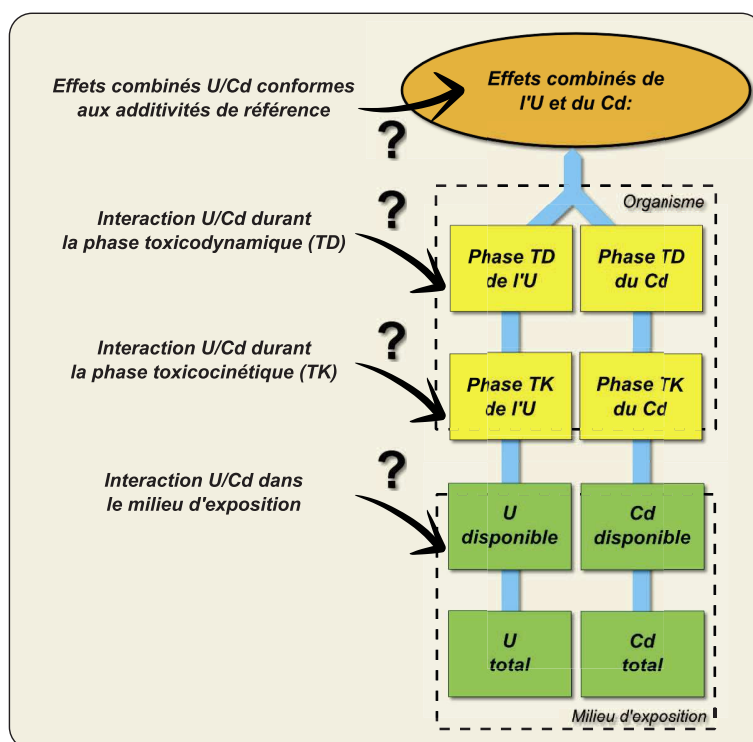


FIGURE 2.1 Schématisation de la démarche d'étude des effets du mélange U/Cd sur *C. elegans*.

2012 ; Swain *et al.*, 2010), et d'autre part, il offre la possibilité de tester les effets d'un grand nombre de combinaisons d'U et de Cd en mélange sur une courte période de temps.

### 2.3 Choix pour la modélisation des effets combinés

Pour la modélisation des effets combinés, nous avons fait le choix de suivre les suggestions de Jonker *et al.* (2005) quant à l'utilisation en parallèle des modèles d'additivité de référence CA et RA. En effet, comme nous l'avons vu, il est malaisé de déterminer lequel de ces deux modèles additifs de référence serait le plus adéquat dans le cadre de l'étude des effets du mélange U/Cd. L'utilisation de l'additivité CA et RA en parallèle nous permettrait en outre, de prendre du recul sur les types et niveaux d'interactions identifiés.

Pour mettre en œuvre ces deux modèles et éventuellement identifier des déviations de l'additivité (interactions), nous avons fait le choix d'utiliser en premier lieu une approche descriptive. Pour cela, le modèle MixTox proposé par Jonker *et al.* (2005) a été sélectionné. MixTox fait partie des modèles descriptifs actuels les plus complets pour l'étude des effets combinés. Il permet d'utiliser en parallèle les additivités CA et RA et propose différents modèles de déviation de l'additivité ainsi qu'une procédure statistique de comparaison des

résultats. En second lieu, nous avons fait le choix d'utiliser une approche mécaniste, utilisant les modèles de référence CA et RA, et intégrant les cinétiques de croissance et de reproduction. Le modèle DEBtox a été sélectionné car il s'agit actuellement du modèle toxicocinétique/toxicodynamique le plus abouti et utilisé en écotoxicologie. Il a par ailleurs été mis en pratique à plusieurs reprises pour modéliser les effets de substances seules et en mélanges chez *C. elegans* (Alda Álvarez *et al.*, 2006 ; Jager *et al.*, 2014), et notamment pour modéliser les effets de l'U et du Cd seuls (Goussen *et al.*, 2015 ; Swain *et al.*, 2010).

## 2.4 Choix dans l'approche expérimentale

Afin de mettre en application les approches descriptives et mécanistes d'analyse des données, mentionnées ci-dessus, dans le cas du mélange U/Cd, nous avons fait le choix de suivre une approche expérimentale « globale » : (i) les effets combinés de l'U et du Cd ont été mesurés au cours du temps sur deux critères d'effet : la croissance et la reproduction de *C. elegans*, de l'éclosion jusqu'à l'arrêt de la croissance et de la reproduction des individus et (ii) un grand nombre de combinaisons U/Cd en mélange, couvrant de façon homogène une grande partie des surfaces de réponse des critères d'effet, a été testé.

Une exposition des nématodes sur boîtes de Petri a été préférée plutôt qu'une exposition en milieu liquide ou dans des sols (reconstitués) car elle permet de suivre aisément un grand nombre de conditions expérimentales et de réaliser des mesures, (bi-)journalières et non destructives, de la croissance et de la reproduction. Les nématodes ont par ailleurs été exposés individuellement afin d'éviter d'éventuelles influences inter-individuelles.

Le choix (ii) favorise la robustesse des analyses par régression sur les surfaces de réponse et permet une utilisation complète des modèles de déviation proposés dans le MixTox, c'est-à-dire, l'identification éventuelle d'interactions dépendantes du ratio entre les substances ou du niveau de dose du mélange (*i.e.* du niveau d'effet produit par le mélange).





## Matériels et méthodes généraux

## 3.1 Produits chimiques

La gélose utilisée pour la préparation des boîtes de Petri dans la présente étude est du Pastagar A (Biorad, France).

Le nitrate d'uranyle ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , >98,5%)<sup>1</sup>, le chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2 \cdot \frac{5}{2}\text{H}_2\text{O}$ , >99%), le tampon HEPES (pH 5,5) ainsi que les autres produits utilisés pour la culture de *C. elegans* proviennent de chez Sigma-Aldrich (France).

Pour les minéralisations, de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 %, AnalaR NORMAPUR (WVR International, France) et du  $\text{HNO}_3$  à 69-70 %, BAKER INSTRANA-ANALYZED<sup>®</sup> Reagent (Avantor Performance Materials, Hollande) ont été utilisés. Le même acide a également été dilué à 2 % pour les étapes de dilution pré-dosage.

## 3.2 Culture de *C. elegans*

### 3.2.1 Souche et conditions de culture

La souche utilisée pour l'ensemble des expériences est la souche sauvage de *Caenorhabditis elegans*, Bristol N2 (Brenner, 1974). Son acquisition a été faite auprès du *Caenorhabditis Genetics Center* (USA).

Les cultures de *C. elegans* ont été maintenues en incubateur à 20 °C, 70 % d'humidité relative (RH), à l'obscurité, sur des boîtes de Petri 6 cm contenant du milieu de culture pour nématode (NGM-gélose), superposé d'un tapis bactérien d'*Escherichia coli* (Stier-nagle, 2006).

Le tampon «  $\text{KPO}_4$  » (pH 6,0), habituellement utilisé dans le NGM, a été remplacé par du tampon HEPES (pH 5,5) au vu d'une exposition des nématodes à l'U. Cette modification du milieu, proposée par Dutilleul *et al.* (2013), empêche la précipitation de l'U avec les phosphates ce qui favorise sa biodisponibilité. La composition du NGM modifié est présentée tableau 3.1.

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations par d'autres agents biologiques, les procédures expérimentales ont été réalisées en conditions stériles (hotte à flux laminaire, utilisation d'un bec Bunsen, de matériel et de solutions de cultures stérilisés).

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations chimiques, la verrerie utilisée pour la préparation des milieux ou la manipulation des nématodes a été nettoyée avec un détergent (RBS,

---

1. L'activité mesurée de la source de nitrate d'uranyle utilisée est de  $1,23 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$ .

**Tableau 3.1** Composition des milieux NGM, M9 et S-base modifiés, utilisés pour la culture, la préparation et l'exposition de *C. elegans*.

Composé	Concentration finale		
	NGM	M9	S-base
Pastagar (% (w/v))	2	—	—
NaCl (mmolL <sup>-1</sup> )	51,3	51,3	51,3
CaCl <sub>2</sub> (mmolL <sup>-1</sup> )	1	—	1
MgSO <sub>4</sub> (mmolL <sup>-1</sup> )	1	1	1
Cholestérol (µg mL <sup>-1</sup> )	5	—	5
HEPES (mmolL <sup>-1</sup> )	25	25	25

France) puis rincée à l'eau, à l'acide acétique ou nitrique (2 %) et enfin à l'eau déminéralisée.

### 3.2.2 Source de nourriture

La souche de bactéries non pathogène *E. coli* OP50, disponible au *Caenorhabditis Genetic Center*, est la source de nourriture de *C. elegans* couramment utilisée en laboratoire (Duttilleul *et al.*, 2015 ; Goussen *et al.*, 2013 ; Nørhave *et al.*, 2012 ; Stiernagle, 2006).

Les bactéries ont été cultivées durant  $\approx 20$  h dans du milieu *Lysogeny Broth* (LB) à 37 °C et sous agitation constante (130 rpm). L'incubation a été stoppée lorsqu'une densité optique de 3 à 595 nm a été atteinte. À l'issue de l'incubation, les bactéries ont été rincées du milieu LB puis concentrées cinq fois (centrifugation à 3 500 g durant 5 min, retrait du surnageant, puis resuspension dans le volume adéquat) à l'aide d'une solution de NaCl à 5 gL<sup>-1</sup>, pour obtenir la solution bactérienne finale (Duttilleul *et al.*, 2015)<sup>1</sup>.

### 3.2.3 Préparation des boîtes

250 µL de solution bactérienne ont été déposés à la surface des boîtes de Petri, remplies à moitié de NGM. Celles-ci ont ensuite été exposées aux rayons UV durant 20 min (Bio-link, Crosslinker ; 254 nm, 200 µWm<sup>-2</sup>) dans le but de supprimer toute activité bactérienne (Smith *et al.*, 2008). Cette étape permet de maintenir la quantité de nourriture disponible

1. Dans le cadre du présent projet, la concentration résultante de la solution a été estimée à  $\approx 4 \times 10^{10}$  cellules mL<sup>-1</sup> à l'aide d'un cytomètre en flux (Guava<sup>®</sup> EasyCyte<sup>™</sup> 8HT, Merck Millipore, FR ; Guavasoft 2.6).

**Tableau 3.2** Préparation de la solution de synchronisation de *C. elegans* par bleaching.

Solution	Concentration	Proportion
NaClO (%)	10-15	2/15
NaOH (mmolL <sup>-1</sup> )	1	1/2
H <sub>2</sub> O	—	1/3

constante, quelles que soient les conditions expérimentales, et de s'affranchir d'éventuelles modifications de la disponibilité de l'U et du Cd du fait de l'activité bactérienne.

### 3.2.4 Obtention de *C. elegans* synchronisés

#### 3.2.4.1 Synchronisation grossière des individus par « bleaching »

Une large quantité d'individus synchronisés à  $\pm 12$  h peut être obtenue par « bleaching », c'est-à-dire, par traitement d'une population contenant des adultes avec une solution alcaline de Javel (NaClO, Tab. 3.2). Celle-ci dissout la cuticule et les membranes des nématodes sans affecter l'intégrité des œufs.

Les nématodes et les œufs d'une culture sont collectés dans du milieu M9 (Tab. 3.1). Plusieurs étapes successives de centrifugation (2 min,  $400 \times g$ ) et de resuspension dans du milieu M9 permettent d'isoler les nématodes et les œufs des bactéries résiduelles.

Lorsqu'un culot propre de nématodes et d'œufs est obtenu, la solution de *bleach* est ajoutée et l'étape de digestion débute. Toutes les minutes, le tube est agité et l'état d'avancement de la réaction est observé au stéréo-microscope. À la fin de la digestion, une centrifugation rapide (1 min,  $1\,000 \times g$ ) permet de retirer la solution de *bleach*, et le culot est rincé par plusieurs étapes successives de centrifugation et de resuspension dans du milieu M9. À l'issue de ces étapes, les œufs sont prêts à être incubés.

#### 3.2.4.2 Synchronisation fine des individus par dépôt d'adultes

Un des objectifs du présent projet est de réaliser un suivi des cinétiques de croissance et de ponte des nématodes exposés au mélange U/Cd dans le but d'étudier l'évolution des effets combinés au cours du temps. Étant donné le cycle de vie extrêmement rapide de *C. elegans*, une synchronisation à  $\pm 12$ h, comme détaillée ci-dessus (Sec. 3.2.4.1), n'est pas assez fine pour réaliser le suivi précis des cinétiques de ces traits de vie. La méthode suivante a donc été employée en alternative.

Pour obtenir des œufs synchronisés à  $\pm 2$  h, des nématodes adultes ont été déposés manuellement sur une boîte de culture (NGM + bactéries) vierge, puis retirés au bout de 2 h.

Bien que le nombre d'œufs synchronisés produit à l'aide de cette méthode soit plus restreint qu'avec la méthode de *bleach*, il peut néanmoins aisément atteindre plus de 500 œufs.

### 3.3 Exposition des nématodes aux contaminants

Les solutions mères de nitrate d'uranyle dans de l'eau déminéralisée ( $62 \text{ mmolL}^{-1}$ ) et de chlorure de cadmium dans de l' $\text{HNO}_3$  à 0,2 % ( $4 \text{ mmolL}^{-1}$ ) ont été utilisées pour contaminer le NGM-gélose, avant que celui-ci soit dispensé dans les boîtes de Petri. Une fois le tapis bactérien ajouté, l'U et le Cd diffusent de la gélose vers les bactéries. Après exposition aux rayons UV, les boîtes ainsi préparées ont été incubées durant 24 h ( $20^\circ\text{C}$ , 70 % RH) afin que les concentrations des contaminants adsorbées sur les bactéries et celles dans le milieu soient à l'équilibre. [Choi et Park \(2005\)](#) ont montré qu'en milieu liquide, l'adsorption de l'U et du Cd sur des bactéries gram négatif mortes atteint l'équilibre au bout de quelques heures.

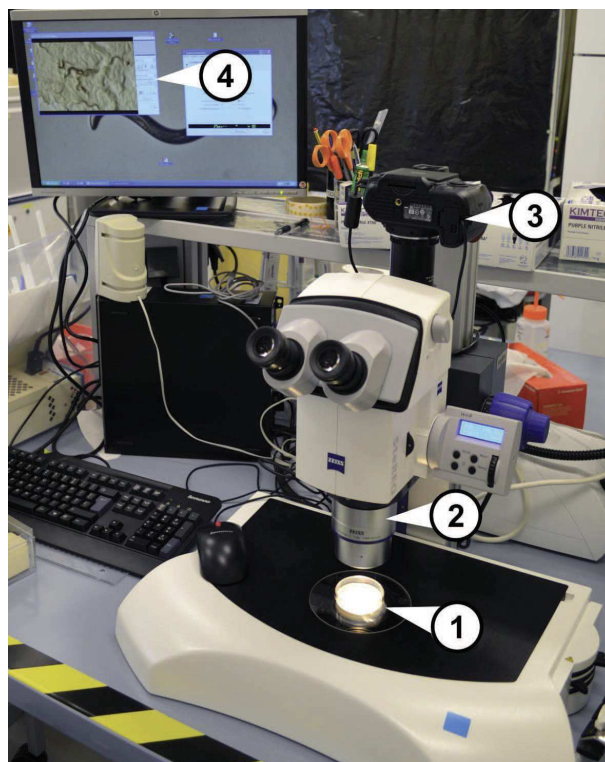
L'acidification du milieu par la solution de nitrate d'uranyle a été compensée par l'addition de NaOH. Par ailleurs, en raison de l'ajout d' $\text{H}^+$  par la solution de Cd et de  $\text{NO}_3^-$  par la solution de Cd et de nitrate d'uranyle, de l' $\text{HNO}_3$  et du  $\text{NaNO}_3$  ont été ajoutés dans les préparations de gélose afin d'atteindre les mêmes concentrations de ces composés dans toutes les conditions ( $\text{pH} = 4,8$ ;  $[\text{NO}_3^-] = 2,9 \text{ mmolL}^{-1}$ ).

Lors de chaque préparation de NGM additionné d'U et/ou de Cd, des échantillons de gélose ont été conservés au vu d'un contrôle des concentrations d'exposition par analyse chimique, après minéralisation des échantillons (Sec. 3.5).

[Alda Álvarez et al. \(2005\)](#) ont montré qu'il y avait une nette réduction de la concentration en Cd soluble dans le NGM-gélose à partir de cinq jours après la préparation des boîtes. Afin de maintenir un niveau d'exposition stable, les nématodes n'ont pas été exposés plus de trois jours consécutifs sur la même boîte.

### 3.4 Mesure des critères d'effet

La taille des nématodes a été mesurée à partir de photographies, réalisées grâce à un couplage d'un stéréo-microscope (SteREO Discovery V20, PlanApo S (1.0x, FWD 60 mm), Zeiss, France;  $\times 160$  ou  $\times 240$ ) avec un appareil photo numérique (D5000, Nikon, France) (Fig. 3.1), et du logiciel ImageJ (1.45s), calibré à l'aide d'une échelle micrométrique.



**FIGURE 3.1** Montage permettant de visualiser et de photographier les nématodes. ① : Boîte de Petri contenant le(s) nématode(s) ; ② : Stéréo-microscope ; ③ : Appareil photo numérique ; ④ : Logiciel de visualisation en direct et de prise de vue.

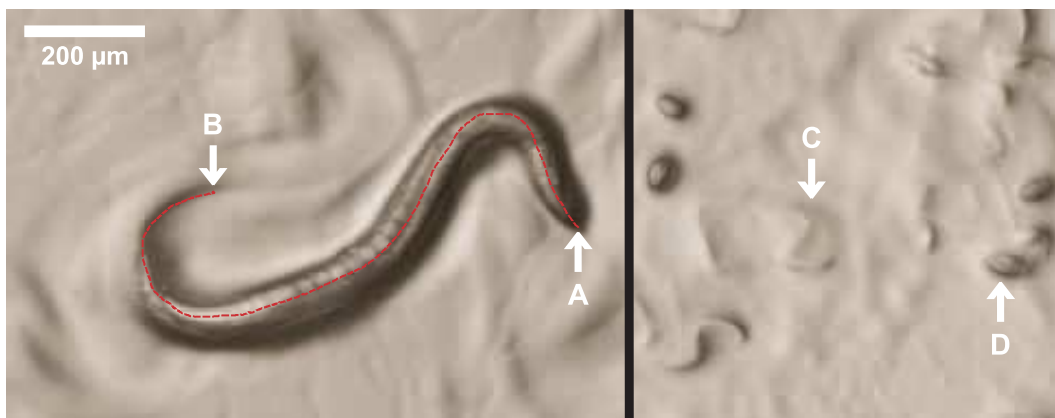
Les mesures des individus ont été effectuées de l’orifice buccal à l’extrémité de la queue (Fig. 3.2).

Les nombres d’œufs et de larves produits par les nématodes ont été évalués par comptages manuels. La procédure utilisée est la suivante : deux comptages successifs sont réalisés, si les scores sont égaux à  $\pm 10\%$ , la moyenne des deux est conservée, sinon des comptages supplémentaires sont réalisés (AFNOR, 2008).

## 3.5 Analyses chimiques

### 3.5.1 Minéralisation

La minéralisation est une technique qui consiste à transformer la matière organique en matière minérale dans des conditions physico-chimiques particulières. Elle permet d’homogénéiser entièrement les échantillons dans une solution afin d’obtenir une analyse précise des composés chimiques qui les constituent.



**FIGURE 3.2** Observation de nématodes et détail d'une mesure de la longueur corporelle à partir d'une photographie. La mesure est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (1.45s), de l'orifice buccal (A) à l'extrémité de la queue (B) ; dans cet exemple, il s'agit d'une mesure d'un nématode adulte. Sur la partie droite de la figure se distinguent des larves L1 (C) et des œufs (D).

Les différents échantillons organiques (gélose, nématodes, etc.), conservés durant les expériences au vu d'une analyse chimique, ont été minéralisés dans des viales en verre (20 mL), sur un bain de sable chauffé à 95 °C, par l'action de plusieurs cycles d'ajout d' $\text{HNO}_3$  à 70 % et d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 % : (i) afin d'améliorer la digestion, l'ajout d'acide nitrique est suivi d'une phase d'incubation avec reflux de 18 h (Fig. 3.3) ; (ii) à l'issue de cette période d'incubation, les verres de montre sont retirés pour laisser évaporer l'acide ; (iii) après évaporation de l'acide, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est ajouté et, lorsque celui-ci est totalement évaporé, le cycle de minéralisation se termine.

La minéralisation s'achève lorsque toute la matière organique a été digérée, laissant apparaître les sels inorganiques au fond des viales. Les échantillons ont été resuspendus dans de l' $\text{HNO}_3$  à 2 % et dilués aux concentrations adéquates juste avant l'analyse chimique.

### 3.5.2 Analyses chimiques

Les appareils d'analyse chimique utilisés au cours de ce projet ont été d'une part, une torche à plasma couplée à un spectromètre d'émission optique (ICP-AES, Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA) et d'autre part, une torche à plasma couplée à un spectromètre de masse (ICP-MS, Agilent 7500 Cs, Agilent, Japan). Une calibration externe des appareils a été réalisée quotidiennement. Une analyse de la concentration d'U et de Cd dans les matériaux de référence SLRS-5 (Conseil National de Recherches, Canada) et TM-23.3 (National Water Research Institute, USA) et de la concentration d'étalons internes dans les échantillons (indium et bismuth) a été réalisée pour s'assurer de la qualité de la procédure de dosage.





**FIGURE 3.3** Phase d'incubation de l'acide nitrique avec reflux durant la minéralisation. Les verres de montre ralentissent l'évaporation et favorisent la digestion de la matière organique.

La méthode ICP-AES a été utilisée uniquement pour des dosages d'U dans une gamme de 0,042 (limite de quantification, LOQ) à 1,681  $\mu\text{molL}^{-1}$ . Une précision de  $\pm 10\%$  a été obtenue pour les dosages.

La méthode ICP-MS a été utilisée pour les dosages d'U dans une gamme de 4  $\text{pmolL}^{-1}$  (LOQ) et 21  $\text{nmolL}^{-1}$  et pour le Cd dans une gamme de 44  $\text{pmolL}^{-1}$  (LOQ) et 21  $\text{nmolL}^{-1}$ . Une précision de  $\pm 7\%$  a été obtenue pour les dosages de l'U et de  $\pm 10\%$  pour les dosages du Cd.

## 3.6 Modélisation et traitement statistique des données

### 3.6.1 Analyse dose-réponse

Les effets dose-réponse ont été modélisés à l'aide du logiciel SigmaPlot 10.0 (Systat Software, USA). L'équation logistique à 3 paramètres (Eqn. 1.1<sup>1</sup>) a été utilisée. Les intervalles de confiance 95 % (CI<sub>95</sub>) des paramètres et de la courbe ont été estimés par le logiciel, à partir de l'écart-type des paramètres produisant les meilleurs ajustements de la régression non linéaire. Par la suite dans le manuscrit, les CI<sub>95</sub> sont mentionnés entre crochets.

### 3.6.2 MixTox, une approche descriptive d'analyse des effets combinés

Le modèle MixTox, mis au point dans le cadre du projet européen du même nom<sup>2</sup>, permet d'analyser des données d'effet de mélanges de contaminants avec une grande flexibilité.

---

1. p. 13.

2. Projet No. ENV4-CT97-0507.

Il propose la mise en application des modèles additivités de référence CA et RA et de tester des modèles d'interactions de complexité croissante. MixTox a été développé dans un environnement tableur Microsoft Excel<sup>®</sup> afin d'assurer son accessibilité à un large public et une utilisation aisée.

### 3.6.2.1 Dose-réponse des substances seules

Dans le MixTox, la fonction logistique à trois paramètres est également utilisée pour décrire les effets dose-réponse (Eqn. 1.1). Ainsi, seules les courbes dose-réponse monotones peuvent être analysées. Une substance présentant des effets « hormétiques »<sup>1</sup> ne peut donc pas être intégrée à l'analyse ou alors en se limitant aux doses correspondant à la partie monotone de sa courbe d'effet.

### 3.6.2.2 Addition des concentrations (CA)

Le modèle CA est généralisé de la façon suivante :

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{f_i^{-1}(y)} = \exp(G) \quad (3.1)$$

avec  $c_i$  : la concentration du composé  $i$  du mélange ;  $f_i^{-1}(y)$  : la concentration du composé  $i$  induisant un niveau de réponse biologique  $y$  ( $f^{-1}$  est la fonction inverse de la fonction logistique) ;  $G$  : une fonction quantifiant le degré d'interaction. Avec  $G = 0$ , l'équation est équivalente à la formulation initiale du CA (Eqn. 1.2<sup>2</sup>).

Étant donné qu'il s'agit d'une équation implicite pour laquelle il est impossible d'isoler la réponse biologique comme une fonction des concentrations des substances en mélange, ce type de modèle est relativement difficile à ajuster ; un procédé itératif doit être utilisé.

### 3.6.2.3 Addition des réponses (RA)

Le modèle RA est généralisé de la façon suivante :

$$y = \max \Phi \left[ \Phi^{-1} \left( \prod_{i=1}^n q_i(c_i) \right) + G \right] \quad (3.2)$$

avec  $\max$  : le niveau de réponse biologique des individus non exposés (permet d'utiliser le modèle RA pour des données non binaires) ;  $q_i(c_i)$  : la probabilité de non-réponse ( $1 - E(c_i)$ ) associée au composé  $i$  seul, à la concentration  $c_i$  ;  $G$  : une fonction quantifiant le degré d'interaction ;  $\Phi, \Phi^{-1}$  : la fonction de répartition de la

1. Voir hormèse.

2. p. 16.

loi normale centrée réduite et son inverse.

Sans les fonctions  $\Phi$  et  $\Phi^{-1}$ , l'équation peut aboutir à des prédictions de fractions d'effet supérieures à 1 ou inférieures à 0 en raison de la fonction de déviation  $G$ . Leur utilisation permet de contraindre les images de la fonction du modèle RA généralisé à un intervalle  $[0; 1]$ . Avec  $G = 0$  et en notant que  $y = 1 - E(c_{mix})$ , cette équation est équivalente à la formulation initiale du modèle d'additivité RA (Eqn. 1.3<sup>1</sup>).

#### 3.6.2.4 Déviations simples (S/A)

Avec le modèle MixTox, une fonction d'interaction  $G$  est introduite dans les équations décrivant le principe des additivités CA et RA. Celle-ci est construite de telle sorte qu'elle dépend des contributions de chaque composé à la toxicité générale du mélange. Les contributions sont notées  $z_i$  et sont formulées :

$$z_i = \frac{TU_{x_i}}{\sum_{j=1}^n TU_{x_j}}, \quad \text{avec} \quad TU_{x_i} = \frac{c_i}{EC_{x_i}} \quad (3.3)$$

Dans le cadre d'une interaction simple, c'est à dire, une synergie ou un antagonisme constant(e) pour l'ensemble des niveaux de dose et ratios entre les substances, la fonction de déviation s'écrit :

$$G(z_1, \dots, z_n) = a \prod_{i=1}^n z_i \quad (3.4)$$

avec  $a$  : un paramètre d'interaction.

Si  $a > 0$ , l'interaction est de type antagoniste tandis que si  $a < 0$ , l'interaction est de type synergique (Tab. 3.3).

#### 3.6.2.5 Déviations dépendantes des ratios (DR)

Le modèle MixTox introduit également des interactions plus complexes telle que l'interaction dépendante des ratios de concentrations entre les substances en mélange. La fonction de déviation s'écrit alors :

$$G(z_1, \dots, z_n) = (a + b_1 z_1 + \dots + b_{n-1} z_{n-1}) \prod_{i=1}^n z_i \quad (3.5)$$

avec  $a$  et  $b_i$  : des paramètres d'interaction ;  $b_i$ , associé au composé  $i$ , indique la modification de toxicité qu'il engendre. Le paramètre  $a$  se rapporte au reste du mélange.

---

1. p. 17.

Pour un mélange à  $n$  substances, il y a donc un total de  $n$  paramètres d'interaction pour le modèle de déviation DR. Les valeurs prises par ces paramètres permettent d'interpréter le type d'interaction qui a lieu (Tab. 3.3).

Dans le cadre d'un modèle DR, pour un mélange à deux substances, le ratio seuil où le changement de type d'interaction apparaît se détermine à partir de l'équation :

$$\frac{c_2}{c_1} = \left( \frac{-b_1}{a} - 1 \right) \frac{EC_{x_2}}{EC_{x_1}} \quad (3.6)$$

### 3.6.2.6 Déviations dépendantes du niveau de dose (DL)

L'autre modèle d'interaction complexe est le modèle d'interaction dépendante du niveau de dose (*i.e.* du niveau d'effet produit par le mélange). La fonction de déviation est moins aisée à définir en raison des différences entre les modèles d'additivité CA et RA (isoboles basées sur les concentrations d'effet pour le premier, et sur les probabilités de réponse pour le deuxième). Deux fonctions différentes doivent être utilisées :

Pour une déviation DL de l'additivité CA :

$$G(z_1, \dots, z_n) = a \left( 1 - b_{DL} \sum_{i=1}^n TU_{50_i} \right) \prod_{i=1}^n z_i \quad (3.7a)$$

Pour une déviation DL de l'additivité RA :

$$G(z_1, \dots, z_n) = a (1 - b_{DL} P_{1, \dots, n}) \prod_{i=1}^n z_i \quad (3.7b)$$

où  $\sum_{i=1}^n TU_{50_i}$  et  $P_{1, \dots, n}$  représentent l'isobole de l'EC<sub>50</sub>.

Dans le cas d'une déviation DL, le paramètre d'interaction  $b_{DL}$  n'est pas spécifique aux composés. Il y a donc seulement deux paramètres d'interaction, quel que soit la complexité du mélange. De même que pour la déviation DR, les valeurs prises par les paramètres  $a$  et  $b_{DL}$  permettent d'interpréter le type d'interaction (Tab. 3.3).

Dans le cadre d'une déviation DL de l'additivité CA, le seuil à partir duquel le type d'interaction change se calcule par  $EC_{50_{\text{mix}}} \cdot b_{DL}^{-1}$  (*e.g.* si  $b_{DL} = 0,5$ , le seuil se situe à un niveau de dose de deux fois l'isobole EC<sub>50</sub>). Dans le cadre d'une déviation DL de l'additivité RA, le seuil se calcule par  $b_{DL}^{-1}$  (*e.g.* si  $b_{DL} = 2$ , le seuil se situe au niveau de l'EC<sub>50</sub>).

**Tableau 3.3** Table d'interprétation des paramètres du modèle MixTox. (Reproduite d'après Jonker *et al.*, 2005).

Paramètre	Valeur		Signification
	CA	RA	
<b>Synergie / antagonisme</b>			
$a$	$> 0$	$> 0$	Antagonisme
	$< 0$	$< 0$	Synergie
<b>Dépendance des ratios de dose</b>			
$a$	$> 0$	$> 0$	Antagonisme, à l'exception des ratios de mélange pour lesquels un $b_i$ significativement négatif indique une synergie
	$< 0$	$< 0$	Synergie, à l'exception des ratios de mélange pour lesquels un $b_i$ significativement positif indique un antagonisme
$b_i$	$> 0$	$> 0$	Antagonisme lorsque la toxicité du mélange provient principalement du composé $i$
	$< 0$	$< 0$	Synergie lorsque la toxicité du mélange provient principalement du composé $i$
<b>Dépendance des niveaux de dose</b>			
$a$	$> 0$	$> 0$	Antagonisme pour les faibles niveaux de dose et synergie pour les hauts niveaux de dose
	$< 0$	$< 0$	Synergie pour les faibles niveaux de dose et antagonisme pour les hauts niveaux de dose
$b_{DL}$	$> 1$	$> 2$	Changement à un niveau de dose inférieur à l' $EC_{50}$
	$= 1$	$= 2$	Changement à un niveau de dose égal à l' $EC_{50}$
	$0 < b_{DL} < 1$	$1 \leq b_{DL} < 2$	Changement à un niveau de dose supérieur à l' $EC_{50}$
	$< 0$	$< 1$	Pas de changement, mais l'intensité de la synergie / antagonisme est dépendante du niveau de dose (CA) ou d'effet (RA)

### 3.6.2.7 Ajustement et procédure statistique

L'un des avantages du modèle MixTox est que la régression non linéaire est réalisée sur l'ensemble des données expérimentales (données des individus non exposés, exposés aux substances seules et exposés au mélange). Ainsi, peu de duplicatas de condition sont nécessaires. Plus les conditions sont réparties de façon homogène et couvrent l'ensemble de la surface de réponse, plus le modèle est puissant et fiable.

Les modèles d'additivité CA et RA possèdent chacun  $2n + 1$  paramètres à ajuster. Ils correspondent aux paramètres des courbes dose-réponse spécifiques à chaque substance (*i.e.*  $b$  et  $EC_{50}$ ) avec le paramètre  $max$  en commun pour toutes les substances.

Le modèle d'interaction simple ajoute à ces  $2n + 1$  paramètres, un seul paramètre d'interaction  $a$ . Avec les modèles d'interaction complexe sont ajoutés, en plus du paramètre  $a$ ,  $n - 1$  paramètres  $b$  (DR) ou un seul paramètre  $b$  (DL). Les modèles du MixTox sont donc des séries de modèles emboîtés<sup>1</sup>. La procédure débute par l'ajustement d'un des modèles d'additivité. Puis est ajusté le modèle d'interaction simple. Le test statistique du  $\chi^2$  permet de tester si l'ajout du paramètre  $a$  améliore significativement l'ajustement. Enfin, les modèles d'interaction complexe sont ajustés et le degré d'amélioration de l'ajustement par l'ajout de nouveaux paramètres est une nouvelle fois évalué. Les modèles d'interaction DR et DL n'étant pas emboîtés entres eux, le test du  $\chi^2$  ne peut être employé pour sélectionner le modèle produisant le meilleur ajustement. Par la suite dans le manuscrit, l'ajout d'un paramètre d'interaction améliore significativement l'ajustement des données lorsque  $p[\chi^2] < 0,05$ . Par ailleurs, l'emploi de « modèle significatif le plus parcimonieux » désigne le modèle avec le plus grand nombre de paramètres d'interaction qui produit un ajustement significatif des données; l'ajout d'un paramètre d'interaction (supplémentaire) ne permet pas une amélioration significative de l'ajustement des données.

### 3.6.2.8 Transcription du code de Excel<sup>®</sup> vers MATLAB<sup>®</sup>

Initialement développé en codage VBA, dans un environnement tableur Microsoft Excel<sup>®</sup>, nous avons fait le choix de retranscrire le modèle MixTox en codage MATLAB<sup>®</sup> (MathWorks) afin d'améliorer l'efficacité des ajustements sur les données et de gagner en liberté dans les analyses complémentaires (*e.g.* calcul d'intervalles de confiance) et dans la représentation des résultats (*e.g.* isobogrammes, surfaces de réponse en 3 dimensions).

1. Un modèle peut être obtenu en fixant ou éliminant un ou plusieurs paramètres dans les modèles supérieurs.

Le codage a été réalisé avec la version 2007a (7.4.0.287, The MathWorks, USA) du logiciel. L'optimisation des modèles non linéaires a été réalisée avec l'algorithme Nelder-Mead proposé sous MATLAB à travers la fonction *fminsearch*.

L'utilisation de ce logiciel nous a permis de représenter les résultats sous forme de surfaces de réponse en 3 dimensions à l'aide des fonctions *mesh* et *plot3* ainsi que sous forme d'isobogrammes à l'aide de la fonction *contour*.

La justesse du nouveau codage a été testée sur les jeux de données d'effet du mélange Cd/Zn sur la reproduction de *F. candida* (Jonker *et al.*, 2005) et du mélange Cu/Zn sur la reproduction de *C. elegans* (Jonker *et al.*, 2004b). Des résultats identiques entre Excel et MATLAB ont été obtenus.

#### 3.6.2.9 Estimation des intervalles de confiance

Les CI<sub>95</sub> des paramètres du MixTox ont été calculés à l'aide d'une méthode de *bootstrap*. Des jeux de données factices ( $n = 5000$ ) ont été simulés par tirage aléatoire avec remise parmi les données expérimentales de chaque condition en mélange. Les paramètres du modèle, dont nous souhaitons obtenir les CI<sub>95</sub>, ont été ajustés sur chaque jeu de données. Les calculs des 2,5<sup>ème</sup> et 97,5<sup>ème</sup> centiles ont permis la détermination des CI<sub>95</sub>.

### 3.6.3 DEBtox, une approche mécaniste d'analyse des effets combinés

#### 3.6.3.1 Le modèle DEBtox utilisé

Le modèle DEBtox utilisé au cours de ce projet est celui de Kooijman *et Bedaux* (1996) avec les corrections proposées par Billoir *et al.* (2008b) ainsi que les modifications spécifiques à son application sur *C. elegans* proposées par Jager *et al.* (2005) et Goussen *et al.* (2015).

Les algorithmes du modèle utilisé pour ce projet ont été codés en MATLAB, en s'inspirant du code du DEBtoxM 1.03 de T. Jager<sup>1</sup> et du DEBtox de F. Alonzo<sup>2</sup>, tout en ajoutant la possibilité de traiter les données de substances en mélange. La liste des paramètres utilisés dans le modèle est présentée tableau 3.4.

Le modèle s'intéresse à la cinétique de quatre variables d'état :  $l$ , la longueur normalisée ;  $R$ , la reproduction cumulée ;  $c_{i_1}$ , la concentration interne normalisée du composé 1 et  $c_{i_2}$ , la concentration interne normalisée du composé 2. Les équations décrivant les cinétiques de croissance et de reproduction, en l'absence ou en présence de composés toxiques, sont

---

1. Université d'Amsterdam. Téléchargement libre sur [www.debtox.info](http://www.debtox.info).

2. Laboratoire d'Écotoxicologie, IRSN/PRP-ENV/SERIS.

détaillées ci-dessous. Les équations décrivant les cinétiques d'internalisation ainsi que le calcul des fonctions de stress ont été présentées dans le chapitre 1 (Eqn. 1.5, 1.6, 1.7c et 1.8c<sup>1</sup>).

### 3.6.3.2 Croissance et reproduction non affectées

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

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f_{sf} - l) \quad (3.8a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[ \left( \frac{g + l}{g + f_{sf}} \right) f_{sf} l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \quad (3.8b)$$

### 3.6.3.3 Croissance et/ou reproduction affectée(s)

La croissance et la reproduction des individus exposés sont déterminées par l'intégration des équations suivantes, en fonction du mode d'action DEBtox utilisé.

*Réduction de l'assimilation de nourriture.*

$$\frac{dl}{dt} = r_B \left( \frac{f_{sf} + g}{f_{sf} (1 - s(c_i)) + g} \right) (f_{sf} (1 - s(c_i)) - l) \quad (3.9a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[ \left( \frac{g + l}{g + f_{sf} (1 - s(c_i))} \right) f_{sf} (1 - s(c_i)) l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \quad (3.9b)$$

*Augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité.*

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f_{sf} - l (1 + s(c_i))) \quad (3.10a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} (1 + s(c_i)) \left[ \left( \frac{g (1 + s(c_i))^{-1} + l}{g + f_{sf}} \right) f_{sf} l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \quad (3.10b)$$

1. p. 27, 28, 29 et 30



**Tableau 3.4** Les différents paramètres du modèle DEBtox simplifié utilisé au cours de ce projet.

Symbole	Interprétation	Valeur fixée	Unité
<i>Paramètres génériques</i>			
$f$	Taux d'ingestion comme fraction du taux d'ingestion maximal	1 <sup>a</sup>	-
$g$	Ratio d'investissement de l'énergie	10	-
$\alpha$	Paramètre lié à la fraction de nourriture disponible	-	-
<i>Paramètres liés à la croissance</i>			
$L_0, l_0$	Longueur à l'éclosion, $l_0 = \frac{L_0}{L_m}$	220 <sup>b</sup>	$\mu\text{m}$
$L_f, l_f$	Longueur lorsque le taux d'ingestion est à la moitié du taux maximal, $l_f = \frac{L_f}{L_m}$	-	$\mu\text{m}$
$L_m$	Longueur maximale	-	$\mu\text{m}$
$r_B$	Taux de croissance de Von Bertalanffy (pour des individus non exposés, avec $f = 1$ )	-	$\text{j}^{-1}$
<i>Paramètres liés à la reproduction</i>			
$L_p, l_p$	Longueur au début de la reproduction, $l_p = \frac{L_p}{L_m}$	984 <sup>c</sup>	$\mu\text{m}$
$R_m$	Taux de reproduction maximal (pour des individus non exposés, avec $f = 1$ )	-	$\#\text{j}^{-1}$
$R_{max}$	Reproduction cumulée maximale (pour des individus non exposés, avec $f = 1$ )	-	$\#$
<i>Paramètres de toxicocinétique</i>			
$k_{e_i}$	Taux d'élimination de la substance $i$	-	$\text{j}^{-1}$
$W_{i+1}$	Facteur d'équivalence de concentration de la substance $i + 1$ par rapport à celle de la substance 1	-	-
<i>Paramètres de toxicodynamique</i>			
$b_{T_{mix\ ou\ i}}$	Pente de la fonction de stress du mélange $mix$ dans le cas du $CA_{Dt}$ ou de la substance $i$ dans le cas du $RA_{Dt}$	-	$\text{c}^{-1}$ <sup>d</sup>
$c_{0_{mix\ ou\ i}}$	Concentration sans effet du mélange $mix$ dans le cas du $CA_{Dt}$ ou de la substance $i$ dans le cas du $RA_{Dt}$	-	$\text{c}$

a. Nourriture *ad libitum*.

b. Moyenne des observations expérimentales,  $\pm 14 \mu\text{m}$  ( $n = 46$ ).

c. Moyenne des observations expérimentales sur les individus non exposés,  $\pm 40 \mu\text{m}$  ( $n = 5$ ).

d. Dans ce projet, les concentrations ont été exprimées en  $\text{mmol L}^{-1}$  ou en  $\text{nmol mg}^{-1}_{\text{dw}}$ .

*Augmentation des coûts de fabrication des unités de structure et de maturation.*

$$\frac{dl}{dt} = r_B \left( \frac{f_{s_f} + g}{f_{s_f} + g (1 + s(c_i))} \right) (f_{s_f} - l) \quad (3.11a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[ \left( \frac{g (1 + s(c_i)) + l}{g (1 + s(c_i)) + f_{s_f}} \right) f_{s_f} l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \quad (3.11b)$$

*Augmentation des coûts de production des œufs.*

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f_{s_f} - l) \quad (3.12a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[ \left( \frac{g + l}{g + f_{s_f}} \right) f_{s_f} l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} (1 + s(c_i))^{-1} \quad (3.12b)$$

*Mortalité durant l'oogenèse.*

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f_{s_f} - l) \quad (3.13a)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} \left[ \left( \frac{g + l}{g + f_{s_f}} \right) f_{s_f} l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{max} - R}{R_{max}} \exp(-s(c_i)) \quad (3.13b)$$

### 3.6.3.4 Méthode d'ajustement

Différentes méthodes peuvent être envisagées pour ajuster un modèle DEBtox. L'inférence bayésienne est une méthode d'ajustement de paramètres à partir des observations expérimentales, mais également à partir des connaissances que l'on a, *a priori*, sur la distribution de ces paramètres (appelé *prior*). Elle est particulièrement intéressante lorsque les données des critères d'effet ont des unités différentes (*e.g.* la croissance et la reproduction) et lorsque les intervalles de confiance de plusieurs paramètres sont à calculer (Billoir *et al.*, 2008a ; Goussen *et al.*, 2015). Cette méthode nécessite cependant une phase intensive de calculs qui est par conséquent chronophage. En alternative, une méthode d'ajustement par maximisation de la vraisemblance normale a été proposée (Lika *et al.*, 2011). Celle-ci requiert que les hypothèses d'indépendance, de normalité et d'homoscédasticité soient vérifiées, même si, en pratique, cela est rarement le cas dans le cadre de l'utilisation du DEBtox (Jager *et Zimmer*, 2012). L'utilisation de la méthode du maximum de vraisemblance peut

aboutir à des résultats similaires à ceux obtenus avec la méthode bayésienne lorsque le *prior* n'est pas assez substantiel d'un point de vu quantitatif ou qualitatif (Jager et Zimmer, 2012). Dans le cadre de la modélisation des effets de l'U et du Cd sur *C. elegans*, nous avons donc fait le choix d'utiliser la méthode du maximum de vraisemblance normale. En pratique, le logarithme de la vraisemblance est utilisé. Pour un jeu de données  $Y$  avec  $n$  observations expérimentales, à partir duquel est ajusté un modèle comportant un jeu de paramètres  $\theta$ , la log-vraisemblance normale  $\ell$  se calcule à partir de l'équation :

$$\ell(\theta | Y; \sigma) = -\frac{n}{2} \ln(2\pi\sigma^2) - \frac{\text{RSS}(\theta; Y)}{2\sigma^2} \quad (3.14)$$

avec RSS : la somme des écarts au carré ;  $\sigma$  : la variance (Jager et Zimmer, 2012).

Jager et Zimmer (2012) proposent d'approximer  $\sigma^2$  par  $\text{RSS}(\theta; Y)/n$ . Cette substitution permet d'obtenir l'équation simplifiée suivante :

$$\ell(\theta | Y; \sigma) = -\frac{n}{2} \ln(\text{RSS}(\theta; Y)) + k \quad (3.15)$$

avec  $k$  : les termes constants de l'équation.

L'ajustement a donc été réalisé par la recherche de la valeur maximale de  $\ell$  à partir de l'équation 3.15.

Dans le but d'explorer au mieux l'espace des paramètres et d'améliorer les chances d'identifier le maximum de vraisemblance global et non pas un des maximum locaux, plusieurs ajustements ont été réalisés en partant de valeurs initiales différentes pour les paramètres dont nous ne disposons pas, *a priori*, des connaissances suffisantes.

Tout comme pour le MixTox, l'algorithme Nelder-Mead a été utilisé pour ajuster les paramètres du modèle. Les équations différentielles ont été quant à elles résolues principalement à l'aide de la fonction *ODE45* proposée par MATLAB. La fonction *ODE15s* a été utilisée comme substitut de *ODE45* pour la résolution d'équations différentielles raides.

### 3.6.3.5 Estimation des intervalles de confiance

À l'inverse du MixTox, la méthode de *bootstrap* n'a pas été employée pour le DEBtox car trop chronophage. Grâce à l'utilisation de la méthode du maximum de vraisemblance, la méthode des profils de vraisemblance a pu être utilisée pour approximer les intervalles de confiance des paramètres (Jager et Zimmer, 2012). Cette méthode consiste à déterminer comment la vraisemblance se détériore en forçant un paramètre (celui dont l'intervalle de confiance est à estimer) à prendre des valeurs de plus en plus éloignées de sa valeur opti-

male (identifiée par l'ajustement) et en réajustant tous les autres paramètres. L'ensemble des valeurs imposées aboutissant à un maximum de vraisemblance significativement inférieur selon le test du ratio de vraisemblance est exclu de l'intervalle de confiance. Le ratio de vraisemblance se calcule à partir de l'équation :

$$D = -2 \ln \left( \frac{\ell_{\text{profil}}}{\ell_{\text{maximale}}} \right) \quad (3.16)$$

Si  $D \geq 3,8415$ , critère de la table du  $\chi^2$  à 95 % avec un degré de liberté, la valeur du paramètre est exclue de l'intervalle de confiance.

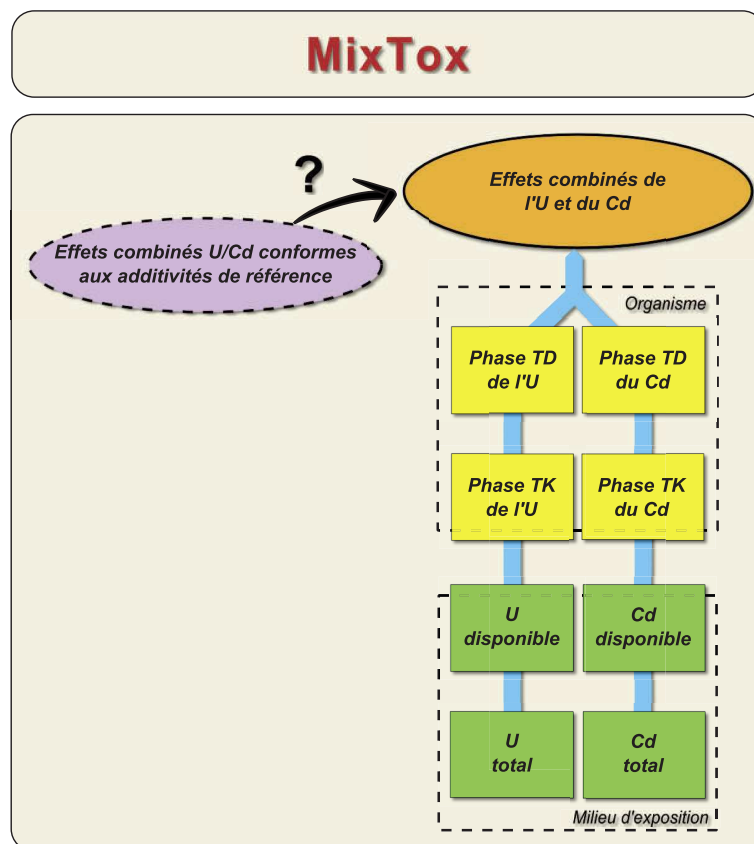
Des exemples de profils sont présentés dans la figure [S.12](#)<sup>1</sup>.

---

1. p. 243.



# Analyse descriptive des effets de l'U et du Cd (concentrations dans la gélose)



## 4.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier les effets du mélange U/Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle (ALC) maximale et le nombre de larves produites (NLP) total par le nématode *C. elegans*. La méthode descriptive MixTox a été utilisée pour analyser les données d'effet sur la base des concentrations d'U et de Cd dans la gélose. L'hypothèse initiale testée dans ce chapitre est que les effets de l'U et du Cd en mélange sont additifs.

Une première expérience comportant une condition contrôle ( $n = 10$ ) et 48 conditions d'exposition ( $n = 3$ ) : 9 conditions U seul, 6 conditions Cd seul et 33 conditions U et Cd en mélange, a tout d'abord été réalisée. Cependant, un mauvais conditionnement des prélèvements de gélose ne nous a pas permis de mesurer avec précision les concentrations en U et Cd dans la gélose. Une seconde expérience a donc été menée, après amélioration de certains points expérimentaux (*e.g.* ajustement du pH, recentrage vers l'EC<sub>50</sub> des concentrations d'U). Dans ce chapitre ainsi que dans les suivants, seuls les résultats issus de la seconde expérience seront présentés et discutés.

## 4.2 Matériels et méthodes spécifiques

### 4.2.1 Exposition des nématodes

Les nématodes *C. elegans* ont été exposés individuellement sur des boîtes de pétri 3,5 cm. Elles ont été préparées comme mentionné précédemment, avec 4,5 mL de NGM-gélose modifié et  $7,5 \times 10^{-2}$  mL de solution bactérienne comme source de nourriture.

Les individus synchronisés à  $\pm 2$  h ont été exposés continuellement durant 11 j dans le but d'enregistrer leur taille maximale ainsi que le nombre total de larves produites. L'exposition a été réalisée à l'obscurité, à  $20,4 \pm 0,4$  °C et  $72 \pm 10$  % RH<sup>1</sup>.

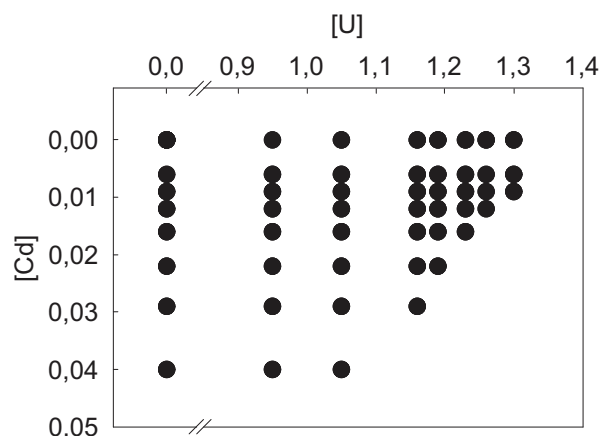
Le critère d'effet « augmentation de longueur corporelle (ALC) maximale », correspondant à la longueur maximale mesurée des individus à laquelle est retranchée la moyenne de la longueur des individus à l'éclosion ( $220 \mu\text{m}$ <sup>2</sup>) a été considéré dans la présente étude. Ce critère d'effet a l'avantage de converger vers  $0 \mu\text{m}$  à l'EC<sub>100</sub>, ce qui est nécessaire pour la modélisation dose-réponse logistique à trois paramètres proposée dans le modèle MixTox.

Trois jours après le début de l'exposition (les individus non exposés ont atteint le stade adulte), les individus ont été transférés quotidiennement par repiquage manuel dans des

---

1. Mesure toutes les 30 min de la température et de l'humidité relative dans l'incubateur, durant les 11 j d'exposition, à l'aide d'un enregistreur de données HOBO (U12, Onset, USA).

2.  $220 \pm 14$ ,  $n = 46$ .



**FIGURE 4.1** Plan expérimental factoriel partiel utilisé dans le cadre de l'étude des effets d'une exposition chronique de *C. elegans* au mélange U/Cd. Les concentrations sont exprimées en  $\text{mmolL}^{-1}$ . ● : combinaisons de concentration d'U et de Cd testées.

boîtes de conditions équivalentes (préparées 24 h à l'avance). Cette procédure a permis un comptage quotidien aisé de la progéniture mais également le maintien des niveaux d'exposition aux contaminants. Les boîtes contenant la progéniture (mélange d'œufs et de larves écloses) ont été incubées durant 24 h (conditions de culture normales) afin de déterminer le taux d'éclosion. Aucune diminution du taux d'éclosion due à l'U ou au Cd n'a été observée. Le critère d'effet de reproduction utilisé est le nombre de larves produites (NLP) total.

## 4.2.2 Plan expérimental

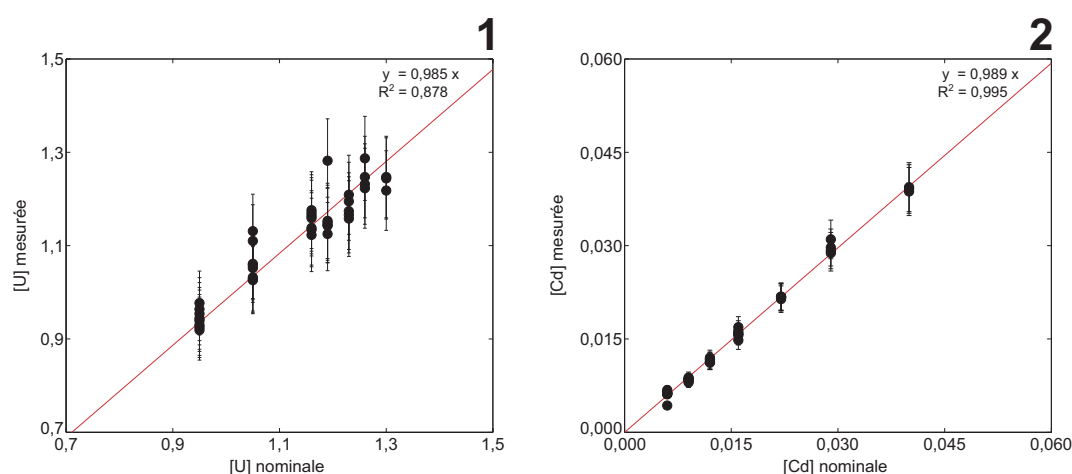
Les nématodes ont été exposés à sept concentrations d'U (0,95 ; 1,05 ; 1,16 ; 1,19 ; 1,23 ; 1,26 et 1,30  $\text{mmolL}^{-1}$ ) et de Cd (0,006 ; 0,009 ; 0,012 ; 0,016 ; 0,022 ; 0,029 et 0,040  $\text{mmolL}^{-1}$ ) combinées selon le plan expérimental factoriel partiel présenté en figure 4.1. Il comporte une condition contrôle ( $n = 10$ ) et 48 conditions d'exposition ( $n = 3$ ) : 14 conditions U ou Cd seul et 34 conditions U et Cd en mélange. Les ratios U/Cd testés s'échelonnent entre 24 et 217.

## 4.3 Résultats et discussions

### 4.3.1 Vérification des concentrations d'U et de Cd dans la gélose

La figure 4.2 présente la correspondance entre les concentrations nominales et les concentrations mesurées dans la gélose par ICP (comme mentionné précédemment) pour l'U et le Cd. Les concentrations d'U et de Cd mesurées dans la gélose sont relativement





**FIGURE 4.2** Relations entre les concentrations nominales et mesurées dans la gélose pour l'U (1) et le Cd (2). Les concentrations sont exprimées en  $\text{mmolL}^{-1}$ . ● : données expérimentales; Traits rouges : relation linéaire; Barres d'erreur verticales : erreurs estimées pour les dosages d'U par ICP-AES et de Cd par ICP-MS.

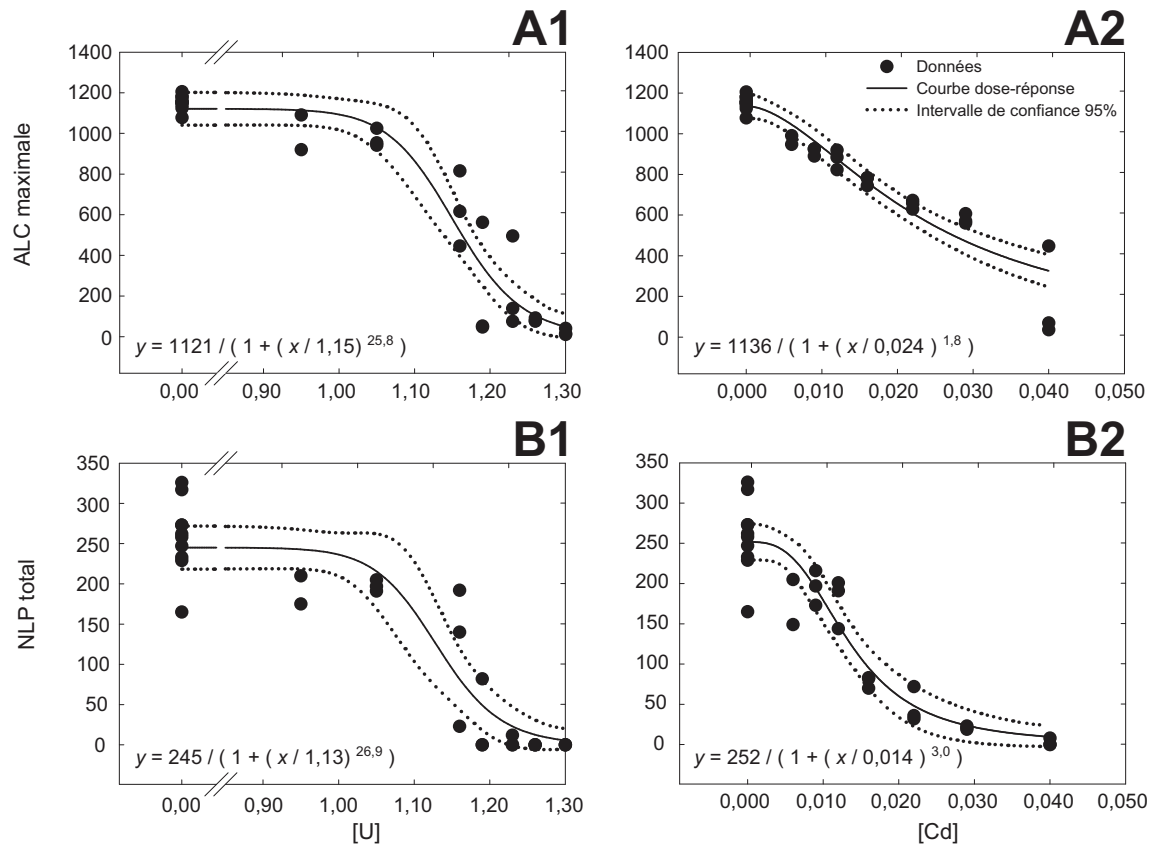
proches des valeurs nominales comme en attestent les coefficients directeurs des régressions linéaires. Une différence de moins de 12 % a été observée pour toutes les concentrations d'U et dans 95 % des cas pour le Cd. Cependant, une dispersion importante des données est observée pour l'U ( $R^2 = 0.878$ ) mais par pour le Cd ( $R^2 = 0.995$ ). Ces différences pourraient provenir de l'erreur associée à la dilution prédosage.

Comme Cedergreen *et al.* (2007) le mentionnent, l'utilisation des concentrations mesurées à la place des concentrations nominales pour l'analyse des effets de substances en mélange permet de tenir compte des variations dans les conditions d'exposition et d'améliorer en conséquence la qualité des interprétations et des comparaisons entre études. Pour la présente étude, au vu de la dispersion des mesures de l'U dans la gélose, les analyses ont été réalisées à titre comparatif, à la fois sur la base des concentrations nominales et mesurées.

### 4.3.2 Effets de l'U et du Cd seuls

Les courbes dose-réponse de l'U et du Cd ajustées sur les données des deux critères d'effet étudiés sont présentées en figure 4.3.<sup>1</sup> Sur la base des concentrations nominales, les  $EC_{50}$  obtenues pour l'ALC maximale et le NLP total (*i.e.* après 11 j d'exposition) sont de  $1,15 [1,13; 1,18] \text{ mmolL}^{-1}$  et de  $1,13 [1,09; 1,17] \text{ mmolL}^{-1}$  respectivement, pour l'U, et de  $0,024 [0,021; 0,027] \text{ mmolL}^{-1}$  et  $0,014 [0,012; 0,016] \text{ mmolL}^{-1}$  respectivement, pour le Cd. Sur

1. Même si l'étude a été conçue dans la perspective d'une analyse par régression, une analyse de la variance a également été réalisée. Celle-ci est présentée figure S.3 (p. 225).



**FIGURE 4.3** Courbes dose-réponse de l'U (1) et du Cd (2) sur l'augmentation de longueur corporelle maximale ( $\mu\text{m}$ , A) et le nombre de larves produites total (B) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations nominales dans la gélose ( $\text{mmolL}^{-1}$ ). ● : données expérimentales ; Traits pleins : courbes dose-réponse ajustées ; Traits pointillés : intervalle de confiance à 95 %.

la base des concentrations mesurées, les  $EC_{50}$  obtenues pour l'ALC maximale et le NLP total sont identiques pour l'U : 1,12 [1,11;1,14]  $mmolL^{-1}$ , et de 0,023 [0,020;0,027]  $mmolL^{-1}$  et 0,013 [0,011;0,015]  $mmolL^{-1}$  respectivement, pour le Cd.

Ainsi, sur la base des concentrations molaires nominales, le Cd est de 48 à 81 fois plus toxique que l'U, dans nos conditions expérimentales.

Les  $EC_{50}$  estimées à partir des données expérimentales de la présente étude sont en accords avec la littérature. Par exemple, à partir des données de reproduction cumulée totale de nématodes exposés au Cd (Swain *et al.*, 2010) et à l'U (Dutilleul *et al.*, 2013) seuls, des  $EC_{50}$  de  $0,019 \pm 0,003 mmol_{Cd}L^{-1}$  et de  $1,19 \pm 0,01 mmol_U L^{-1}$  peuvent être calculées.

Par ailleurs, les courbes dose-réponse du Cd et de l'U ont été reproduites trois fois chacune<sup>1</sup>. Bien que les concentrations réelles en U et Cd n'aient pas été mesurées pour toutes ces expériences, les niveaux de toxicité obtenus ont été similaires.

L'U et le Cd présentent des pentes de courbes dose-réponse contrastées : l'U possède la courbe la plus raide (Fig. 4.3). En raison des valeurs élevées des pentes des courbes dose-réponse de l'U et du Cd, il a pu être déterminé que les effets combinés de ces ETM prédits par le modèle d'additivité CA seront plus sévères que ceux prédits par le modèle d'additivité RA<sup>2</sup>. L'analyse de leurs effets combinés est présentée ci-dessous.

### 4.3.3 Effets combinés de l'U et du Cd

L'ensemble des données (individus témoins, exposés aux substances seules et exposés au mélange) a été analysé sur la base des additivités CA et RA, avec le modèle MixTox, afin de déterminer si les effets combinés de l'U et du Cd sont additifs.

Les résultats d'ajustement du modèle MixTox sur la base des concentrations nominales et mesurées d'U et de Cd dans la gélose sont présentés dans le tableau 4.1. Les meilleurs ajustements des données ont été obtenus à partir des modèles de déviation complexe (*i.e.* déviation dépendante du ratio des concentrations (DR) ou du niveau de dose (DL)), quelle que soit l'additivité de référence utilisée (CA ou RA), ou le critère d'effet considéré. Dans l'ensemble, les modèles basés sur l'additivité RA décrivent mieux les données que ceux basés sur l'additivité CA.

Par ailleurs, l'analyse des données sur la base des concentrations nominales a produit des ajustements de bien meilleure qualité que ceux obtenus sur la base des concentrations mesurées (Tab. 4.1, voir les  $R^2$  ou les  $RSS$ , A/B1 vs A/B2). Ces observations suggèrent que l'utilisation des concentrations mesurées détériore plus la description des effets de l'U et du

---

1. Dont une a été réalisée par Dubois (2013).

2. Voir exemple en figure 1.5 (p. 19).

**Tableau 4.1** Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle maximale (**A**) et le nombre de larves produites total (**B**) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations nominales (**1**) ou mesurées (**2**) dans la gélose.<sup>a</sup>

		Addition des concentrations				Addition des réponses			
		Add	S/A	DR	DL	Add	S/A	DR	DL
<b>A1</b>	RSS ( $10^6$ )	4,00	3,99	<u>3,83</u>	3,99	3,53	3,30	3,20	<u>3,10</u>
	R <sup>2</sup>	0,76	0,76	<u>0,77</u>	0,76	0,79	0,80	0,81	<u>0,81</u>
	p [ $\chi^2$ ]	$1 \times 10^{-43}$	0,6	<u>0,04</u>	0,9	$1 \times 10^{-47}$	0,002	0,03	<u>0,002</u>
<b>A2</b>	RSS ( $10^6$ )	5,35	5,00	<u>4,33</u>	4,59	5,28	4,65	4,51	<u>4,00</u>
	R <sup>2</sup>	0,68	0,70	<u>0,74</u>	0,72	0,68	0,72	0,73	<u>0,76</u>
	p [ $\chi^2$ ]	$2 \times 10^{-64}$	0,002	<u><math>3 \times 10^{-6}</math></u>	0,0003	$8 \times 10^{-35}$	$1 \times 10^{-5}$	0,03	<u><math>2 \times 10^{-6}</math></u>
<b>B1</b>	RSS ( $10^5$ )	2,87	2,87	<u>1,92</u>	2,41	1,48	1,42	<u>1,29</u>	1,33
	R <sup>2</sup>	0,71	0,71	<u>0,81</u>	0,76	0,85	0,86	<u>0,87</u>	0,87
	p [ $\chi^2$ ]	$7 \times 10^{-38}$	0,5	<u><math>8 \times 10^{-14}</math></u>	$2 \times 10^{-6}$	$7 \times 10^{-59}$	0,02	<u>0,0001</u>	0,001
<b>B2</b>	RSS ( $10^5$ )	3,44	3,29	<u>2,28</u>	2,72	2,11	1,95	1,86	<u>1,83</u>
	R <sup>2</sup>	0,65	0,67	<u>0,77</u>	0,72	0,79	0,80	0,81	<u>0,82</u>
	p [ $\chi^2$ ]	$3 \times 10^{-32}$	0,009	<u><math>1 \times 10^{-13}</math></u>	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-47}$	0,0006	0,01	<u>0,002</u>

a. **RSS** : Somme des carrés des résidus ; **p [ $\chi^2$ ]** : p-value du test du ratio de vraisemblance ; **Add** : Modèle d'additivité de référence ; **S/A** : modèle d'interaction synergie/antagonisme simple ; **DR** : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; **DL** : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose. Les valeurs soulignées correspondent aux valeurs des modèles significatifs les plus parcimonieux.

Cd qu'elle ne l'améliore, probablement en raison de l'erreur expérimentale inhérente à la procédure de dosage chimique. En raison de la pente élevée de la courbe dose-réponse de l'U, une faible incertitude sur la concentration mesurée en U peut avoir des conséquences importantes sur la toxicité prédite. Par exemple, une erreur de mesure de 10 % au niveau de l'EC<sub>50</sub> pour l'ALC maximale aboutit à des effets compris entre 6 et 92 % pour l'U. En comparaison, la gamme d'effet obtenue pour le Cd dans ces conditions est comprise entre 45 et 54 %. En conséquence, nous avons fait le choix de poursuivre l'analyse des données uniquement sur la base des concentrations nominales.

Sur la base de l'additivité RA, l'ajout du paramètre *a* du modèle d'interaction simple S/A a permis d'améliorer significativement l'ajustement des données. Le meilleur ajustement a été obtenu grâce à l'ajout du paramètre *b* du modèle de déviation complexe DL ( $p[\chi^2] \leq 0,002$ ) pour l'ALC maximale, et du modèle de déviation complexe DR ( $p[\chi^2] \leq 0,0001$ ) pour le NLP total (Tab. 4.1). Les paramètres de déviation ajustés sont

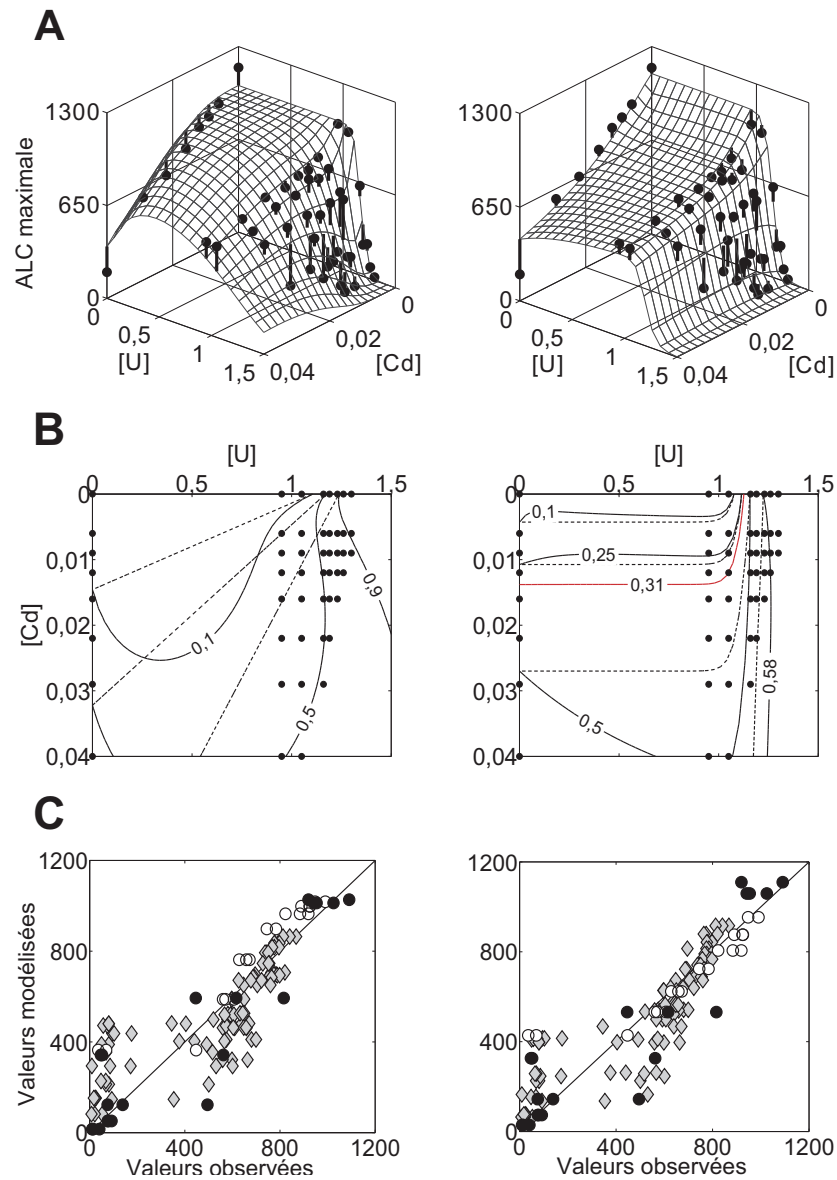
$a = -1,5$   $[-2,4; -0,4]$  et  $b_{DL} = 3,2$   $[2,8; 5,1]$  pour l'ALC maximale, et  $a = -6,0$   $[-12,1; -1,3]$  et  $b_{DR_{Cd}} = 12,9$   $[5,7; 23,7]$  pour le NLP total. Pour l'ALC maximale,  $a < 0$  et  $b_{DL} > 2$  indiquent que les effets combinés sont additifs vers l'EC<sub>31</sub>, qu'une légère synergie se produit pour les niveaux de dose inférieurs et qu'un antagonisme croissant se produit pour les niveaux de dose supérieurs (Fig. 4.4, panneau de droite). Par exemple, pour l'ALC maximale, l'additivité RA sous-estime légèrement la toxicité du mélange à un faible niveau de dose : une EC<sub>18</sub> est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 29\%$  a été observé expérimentalement. Mais pour un niveau de dose plus élevé, l'additivité RA surestime largement la toxicité du mélange : une EC<sub>92</sub> est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 59\%$  a été observé expérimentalement.

Pour le NLP total, les valeurs des paramètres d'interaction indiquent un antagonisme croissant pour les mélanges ayant un ratio U/Cd faible ou modéré ( $< 95$ ) et une légère synergie pour les mélanges ayant un ratio U/Cd élevé (Fig. 4.5, panneau de droite). Par exemple, pour un mélange avec un ratio U/Cd de 43, l'additivité RA surestime largement la toxicité du mélange : une EC<sub>75</sub> est prédite alors qu'un effet de  $\approx 54\%$  a été observé expérimentalement. Mais pour un mélange avec un ratio U/Cd de 132, l'additivité RA sous-estime légèrement la toxicité du mélange : une EC<sub>88</sub> est prédite alors qu'un effet de  $\approx 96\%$  a été observé expérimentalement.

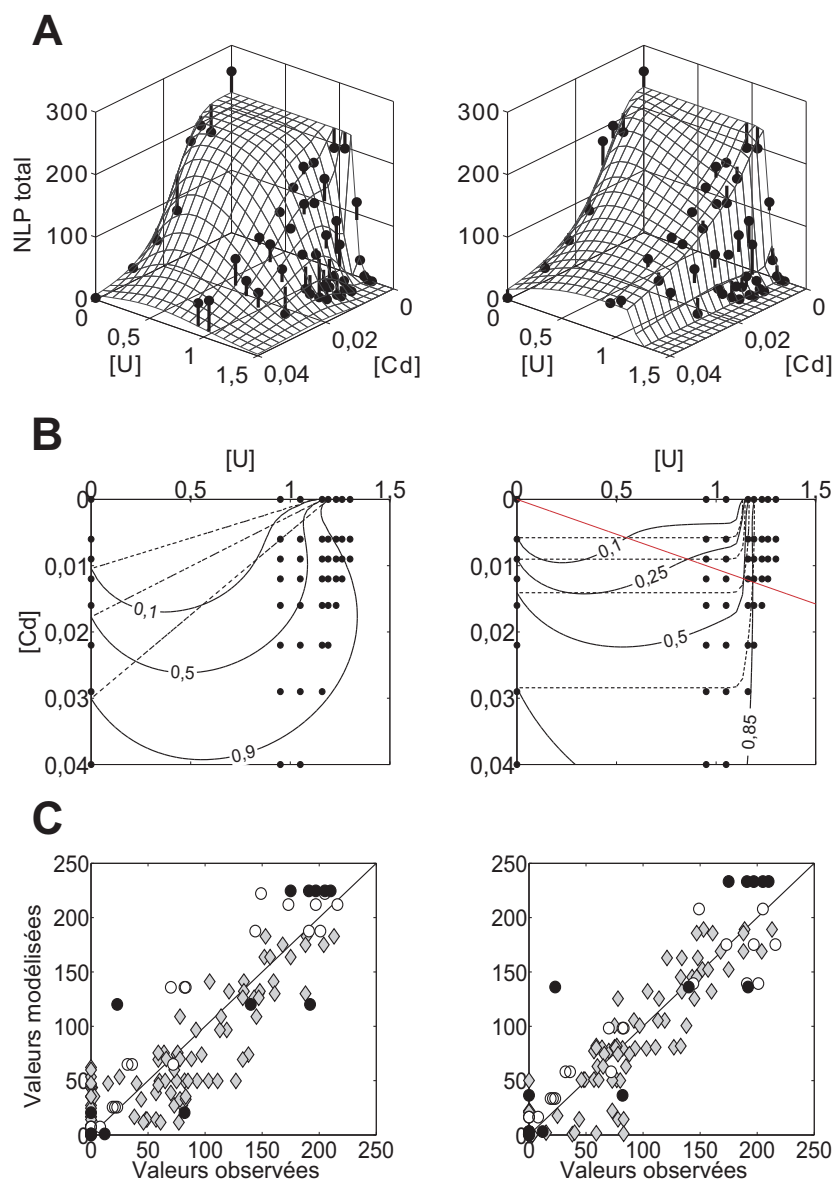
Sur la base de l'additivité CA, le modèle le plus parcimonieux pour la description des données d'ALC maximale et du NLP total est le modèle de déviation DR. Les valeurs des paramètres d'interaction indiquent différents niveaux d'antagonisme, le niveau d'antagonisme étant inversement corrélé au ratio U/Cd (Fig. 4.4 et 4.5, panneau de gauche). Par exemple, pour l'ALC maximale, pour un mélange avec un ratio U/Cd de 43, l'additivité CA prédit une EC<sub>95</sub> alors qu'un effet de  $\approx 27\%$  a été observé expérimentalement, et pour un mélange avec un ratio U/Cd de 77, l'additivité CA prédit une EC<sub>99</sub> alors qu'un effet de  $\approx 55\%$  a été observé expérimentalement.

Les modèles CA et RA ont tous deux abouti à l'identification d'un fort antagonisme pour la plupart des données expérimentales. Bien que des synergies significatives aient été identifiées sur la base de l'additivité RA pour l'ALC maximale et le NLP total, celles-ci étaient de faible intensité. De plus, dans le cas de l'ALC maximale, la synergie ne concerne qu'une région de la surface de réponse où peu de conditions ont été testées expérimentalement (Fig. 4.4, panneau de droite, B).

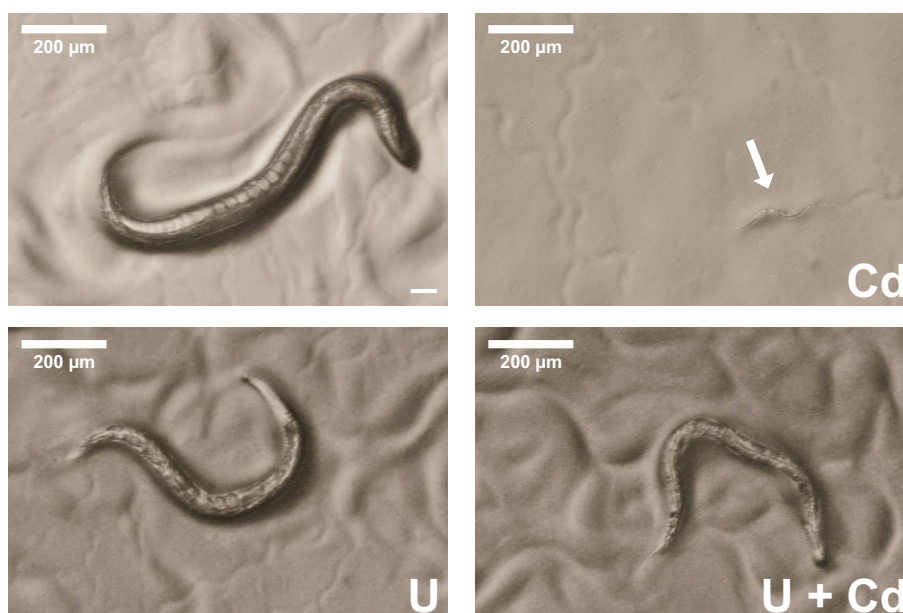
Par ailleurs, l'antagonisme identifié n'est pas seulement un antagonisme de type « effets combinés observés inférieurs à ceux prédits par les modèles d'additivité » puisque pour certains mélanges, des effets combinés inférieurs à l'effet de la substance la plus toxique du mélange (*i.e.* le Cd), ont pu être observés. Sur la figure 4.6, qui propose des photogra-



**FIGURE 4.4** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l’U et du Cd sur l’augmentation de la longueur corporelle (ALC) maximale ( $\mu\text{m}$ ) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose ( $\text{mmolL}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d’antagonisme dépendant du ratio des concentrations, déviant de l’addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle de synergie/antagonisme dépendant du niveau de dose (basculement :  $\text{EC}_{31}$ ), déviant de l’addition des réponses. **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (*grilles*). **B.** Isobogrammes des surfaces de réponse ; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux ; la *ligne rouge* indique la zone de basculement ; les *valeurs* indiquent les niveaux d’effet des isoboles (e.g. 0,5 représente l’isobole 50 %) ; ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l’U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇) ; *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).



**FIGURE 4.5** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites total (NLP) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose ( $\text{mmolL}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d'antagonisme dépendant du ratio des concentrations, déviant de l'addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle synergie/antagonisme dépendant du ratio des concentrations (basculement :  $[U]/[Cd] = 95$ ), déviant de l'addition des réponses. **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (*grilles*). **B.** Isobogrammes des surfaces de réponse ; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux ; les *valeurs* indiquent les niveaux d'effet des isoboles (*e.g.* 0,5 représente l'isobole 50 %) ; ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l'U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇) ; *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).



**FIGURE 4.6** Observation expérimentale de l'interaction antagoniste entre l'U et le Cd au niveau de leurs effets combinés sur la longueur corporelle de *C. elegans*. – : individu témoin, non exposé ; **U** : individu exposé à  $1,05 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  ; **Cd** : individu exposé à  $0,04 \text{ mmol}_{Cd} \text{ L}^{-1}$  ; **U + Cd** : individu exposé au mélange de  $1,05 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  et  $0,04 \text{ mmol}_{Cd} \text{ L}^{-1}$ . Les photographies ont été réalisées  $\approx 4$  j après début de l'exposition.

phies d'individus après 4 j d'exposition, nous pouvons voir que la longueur corporelle d'un individu exposé à un mélange U/Cd ( $1,05 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} + 0,040 \text{ mmol}_{Cd} \text{ L}^{-1}$ ) est clairement moins affectée que celle d'un individu exposé seulement à la même concentration de Cd.

Que ce soit sur la base de l'additivité CA ou RA, les modèles de déviation les plus parcimonieux identifiés montrent que le degré d'antagonisme le plus important est identifié pour les mélanges avec des concentrations d'U produisant des effets faibles à modérés et des concentrations de Cd produisant des effets modérés à forts (voir la distance entre les isoboles des modèles de déviation les plus parcimonieux et les isoboles d'additivité, Fig. 4.4 et 4.5). Ces concentrations d'U pourraient donc produire un effet protecteur vis-à-vis des effets du Cd.

## 4.4 Conclusion

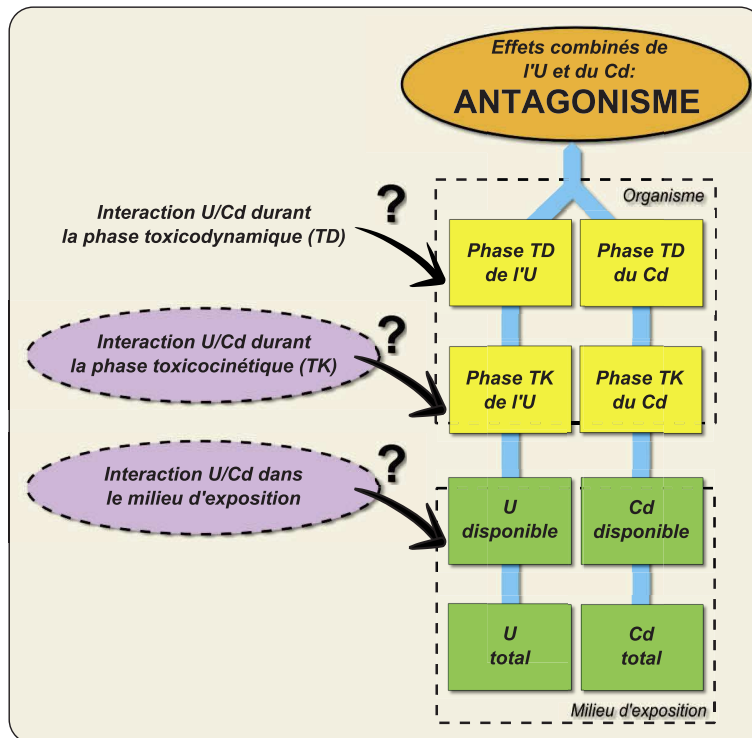
Cette première étape visait à caractériser les effets combinés de l'U et du Cd sur l'ALC maximale et le NLP total de *C. elegans* après 11 j d'exposition. Les résultats nous ont permis de réfuter l'hypothèse de non-interaction entre l'U et le Cd : une interaction antagoniste importante, modulant les effets combinés de l'U et du Cd sur l'ALC maximale et le NLP



total, a été identifiée sur la base des additivités de référence CA et RA. Par ailleurs, cet antagonisme concernerait particulièrement les mélanges dont la toxicité est *a priori* dominée par celle du Cd et pourrait être engendré par l'U.

Lors de l'étude des effets combinés d'éléments traces métalliques (ETM), les interactions identifiées peuvent survenir à différentes étapes du mécanisme de toxicité. Dans le milieu d'exposition, les interactions entre ETM peuvent moduler leurs fractions biodisponibles et réduire en conséquence l'exposition des organismes (Spurgeon *et al.*, 2010b). Au niveau de l'organisme, les interactions peuvent moduler les processus d'internalisation et de dépuración (phase toxicocinétique, TK) des ETM, ou moduler leurs réactions avec des cibles biologiques et/ou la cascade d'évènements qui conduit à l'effet toxique (phase toxicodynamique, TD) (Spurgeon *et al.*, 2010a ; Svendsen *et al.*, 2011). Sous l'hypothèse que les fractions d'U et de Cd internalisées dans les nématodes sont corrélées avec les effets toxiques observés, une investigation de la bioaccumulation de l'U et du Cd, seuls et en mélange, par *C. elegans* pourrait permettre de distinguer si l'interaction antagoniste observée dans cette section interviendrait plutôt (i) dans le milieu d'exposition ou durant la phase TK, ou (ii) au cours de la phase TD. En effet, une modulation de la fraction d'U ou de Cd internalisée pourrait être engendrée par une interaction entre l'U et le Cd se produisant dans le milieu d'exposition comme au niveau de l'organisme, durant la phase TK.

# Effet d'une interaction U/Cd sur la bioaccumulation du Cd par *C. elegans*



## 5.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier la bioaccumulation de l'U et du Cd par *C. elegans* dans le but de déterminer si l'interaction antagoniste identifiée dans le chapitre précédent pourrait avoir lieu dans le milieu d'exposition ou durant la phase TK. Étant donné que (i) l'internalisation des ETM est dépendante du stade de vie de l'organisme et de la durée d'exposition et (ii) l'U et le Cd affectent la croissance des nématodes, nous avons opté pour la réalisation d'une expérience de bioaccumulation avec des nématodes au premier stade de vie (larves L1). Ce choix permet d'une part de rester dans des conditions expérimentales proches de l'expérience de toxicité et d'autre part de garantir un temps et un stade d'exposition constant pour toutes les conditions.

Le stade L1 correspond au premier stade larvaire après éclosion<sup>1</sup>. Durant cette phase d'approximativement 14 h, la longueur corporelle des nématodes non exposés est comprise entre  $\approx 220$  et  $\approx 370\mu\text{m}$  (Byerly *et al.*, 1976). Afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel biologique pour l'étude de bioaccumulation, un travail d'adaptation du système de culture et de manipulation des nématodes a été réalisé. D'un côté, un système de culture en milieu liquide permettant de générer de grosses quantités de nématode a été mis en pratique et d'un autre côté, pour éviter une perte de matériel biologique durant la procédure expérimentale en raison de l'adhérence des nématodes aux parois en plastique, les manipulations ont été réalisées pour l'essentiel avec du matériel en verre.

Les hypothèses initiales testées dans ce chapitre sont que les niveaux d'internalisation de l'U et du Cd dans les larves L1 *C. elegans* ne sont pas affectés par la coprésence de l'autre ETM.

Nous avons observé dans le chapitre précédent que l'interaction antagoniste était particulièrement importante pour les mélanges dont la toxicité était dominée par celle du Cd. En raison des nombreuses étapes requises pour la conduite de la présente expérience de bioaccumulation, un plan expérimental réduit, recentré sur des mélanges U/Cd avec des concentrations de Cd produisant différents niveaux d'effet et une concentration d'U produisant peu d'effets, a été être mis en œuvre.

Les fractions en U et Cd ainsi que les quantités de protéines contenues dans la partie soluble des lysats cellulaires de larves L1 ont été mesurées après centrifugation ( $800 \times g$ , 10 min). Les concentrations en U et Cd mesurées et normalisées par les quantités de protéines ont été considérées comme les fractions internalisées.

---

1. Voir figure 1.9 (p. 35).

## 5.2 Matériels et méthodes spécifiques

### 5.2.1 Élevage de *C. elegans* en culture liquide

Les cultures liquides ont chacune été initiées à partir de 100 mL de milieu S-base (Tab. 3.1<sup>1</sup>) additionnés d'*E. coli* et d'une population de nématodes ayant récemment épuisé le tapis bactérien d'une boîte de culture de 6 cm, et ont été incubées durant 5 j à 20 °C et 150 rpm. Les cultures ont ensuite été traitées par *bleaching*, comme décrit précédemment, pour obtenir des culots d'œufs.

Pour l'obtention de larves synchrones, la capacité d'arrêt du développement des larves L1 en absence de nourriture a été utilisée<sup>2</sup>. Les culots d'œufs resuspendus dans du milieu M9, sans bactérie, ont été incubés durant 18 h, à 20 °C et 150 rpm.

Cette méthode de culture des nématodes permet de produire  $\approx 100\,000$  larves L1 par culture de 100 mL.

### 5.2.2 Exposition des larves L1 *C. elegans*

Pour la réalisation de cette expérience, un plan expérimental plus modeste que celui de l'expérience d'évaluation des effets combinés U/Cd a été employé. Les concentrations de Cd : 0, 0,009, 0,022 et 0,040 mmolL<sup>-1</sup> ont été testées en présence ou en absence de 0,95 mmolL<sup>-1</sup> d'U. La préparation des boîtes a été sensiblement identique à celle de l'expérience de toxicité avec les particularités suivantes : des boîtes de Petri 6 cm contenant 12 mL de NGM et 0,5 mL de solution bactérienne ont été utilisées.

Après avoir dénombré les larves L1 produites et ajusté leur densité, celles-ci ont été exposées aux différentes conditions d'U et de Cd durant 10 h (*i.e.* avant la mue L1 $\rightarrow$ L2), à une densité de  $\approx 15\,000$  larves L1 par boîte. Trois duplicatas de boîte par condition d'exposition ont été réalisés.

À l'issue de l'exposition, les larves L1 ont été récoltées par lavage de la surface des boîtes (agitation douce, sans perturbation du tapis bactérien) à l'aide d'une solution de NaCl à 100 mmolL<sup>-1</sup>. Cette étape a été suivie de cinq étapes de lavage des larves L1 : quatre avec la solution de NaCl à 100 mmolL<sup>-1</sup> et une étape avec une solution composée d'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) à 2 mmolL<sup>-1</sup> et de carbonate d'ammonium à 100 mmolL<sup>-1</sup>. La solution d'EDTA/carbonate d'ammonium permet de désorber d'éventuelles traces d'U et de Cd adsorbées sur la cuticule des nématodes (Bucher *et al.*, 2014 ; Harrington *et al.*, 2012).

1. p. 75.

2. Voir section 1.2.2 (p. 33).

Les culots de larves L1 ont été congelés par refroidissement rapide dans l'azote liquide, puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour analyse ultérieure.

Compte tenu de la durée de la procédure de récolte et de lavage des larves L1 ( $\approx 1\text{h}$ ), le tractus digestif a été supposé vidé de son contenu (Offermann *et al.*, 2009). Des études ont en effet montré que des particules ingérées traversent le tractus digestif de *C. elegans* en quelques minutes et que la défécation s'opère toutes les 45 s (Avery *et Thomas*, 1997).

### 5.2.3 Préparation des échantillons et dosages

Les larves L1 congelées ont été suspendues dans un tampon de lyse compatible avec la réalisation de dosages chimiques par ICP-MS : Acétate d'ammonium à  $100\text{mmolL}^{-1}$  (Bucher *et al.*, 2014), PMSF à  $0,1\text{mmolL}^{-1}$  et Triton X-100 à 0,1 % (v/v) (pH = 7,5). Les échantillons maintenus à  $4^{\circ}\text{C}$  ont ensuite été soumis aux ultrasons afin de rompre la cuticule des larves L1 et lyser les cellules. Cinq séries de sonication (15 s sonication et 45 s refroidissement) ont été réalisées à l'aide d'une microsonde en escalier (2 mm, Vibracell VCX 600, Sonics and Materials, USA ; Fig. 5.1). Entre chaque échantillon, deux cycles de sonication ont été réalisés dans une solution d' $\text{HNO}_3$  2 % et dans de l' $\text{H}_2\text{O}$  déminéralisée, respectivement, pour rincer la sonde. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à  $800 \times g$  durant 10 min pour retirer les débris et les cellules non lysées (Harford *et Bonifacino*, 2009).

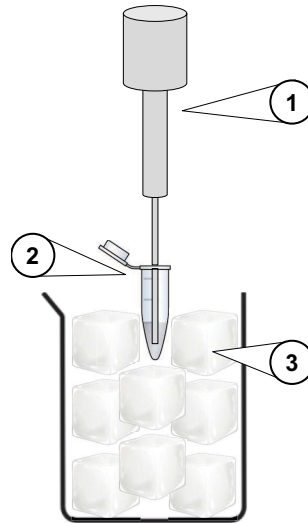
Une petite fraction du surnageant a été collectée pour un dosage des protéines totales, réalisé à l'aide du Micro BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, USA), selon les instructions du fabricant. Le reste du surnageant a été minéralisé comme détaillé précédemment.

Les concentrations d'U et de Cd dans les échantillons de surnageant minéralisés ont été mesurées par ICP-MS et normalisées par la quantité de protéine.

Afin de vérifier l'efficacité de la procédure de rinçage des larves L1 ainsi que l'absence d'éventuelles contaminations extérieures, les procédures de récolte, de rinçage, de sonication, de minéralisation et de dosage ont été appliquées à des boîtes d'exposition sans nématode ( $n = 1$  contrôle qualité par condition).

### 5.2.4 Analyse des données

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R (v. 3.0.3). Les conditions de normalité et d'homoscédasticité n'étant pas toujours vérifiées, l'analyse a été réalisée à partir d'une ANOVA non paramétrique (test de Kurskal-Wallis) suivie du test de comparaisons multiples proposé dans le *package nparcomp* (v. 2.6, Konietzschke *et Hothorn*, 2012). Un seuil de significativité de 5 % a été utilisé.



**FIGURE 5.1** Dispositif de sonication des échantillons de larves L1 *C. elegans*. ① : microsonde de sonication en escalier (2 mm) permettant la sonication de faibles volumes (150  $\mu$ L - 5 mL); ② : Larves L1 décongelées dans le tampon de lyse; ③ : Bain de glace permettant d'éviter une élévation trop importante de la température engendrée par la sonication.

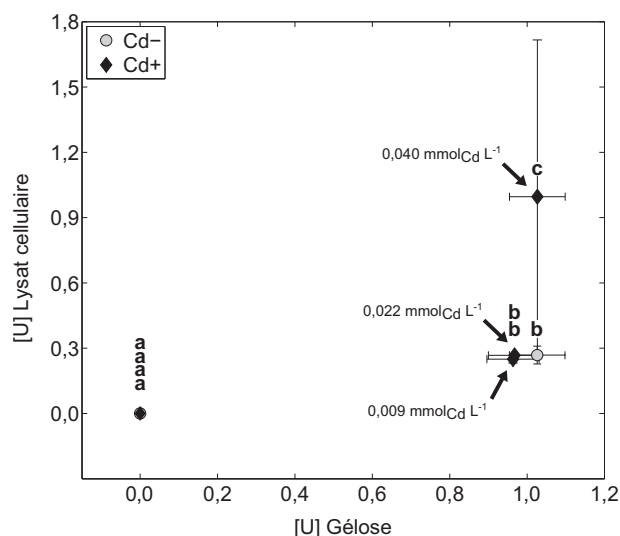
## 5.3 Résultats et discussion

### 5.3.1 Internalisation de l'U

Les larves L1 exposées à l'U, ont significativement internalisé l'U en présence ou en absence de Cd (Fig. 5.2). Le niveau d'internalisation se situe à  $\approx 0,26 \text{ nmol}_U \text{ mg}^{-1}_{\text{protéines}}$ , correspondant à un ratio de concentrations  $\frac{\text{Nématode}}{\text{Gélose}}$  de  $\approx 0,27 \text{ L kg}^{-1}_{\text{protéines}}$ .

Pour les conditions  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,009 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$  et  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,022 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ , la présence de Cd ne modifie pas les niveaux d'internalisation de l'U. Des internalisations élevées (*i.e.* 0,47, 0,70 et 1,82) ont été observées pour la condition  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,040 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ . Cependant, des niveaux élevés d'U ont également été mesurés dans les échantillons du contrôle qualité des conditions  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,022 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$  et  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,040 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ . Le niveau d'internalisation de l'U pour la condition  $0,95 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1} - 0,040 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$  a donc été interprétée comme le résultat d'un aléa expérimental, possiblement survenu lors de la procédure de lavage.

Dans les travaux de Jiang *et al.* (2009), des ratios de concentrations d'U ( $\frac{\text{Nématode}}{\text{Gélose}}$ ) élevés (*i.e.* 275, 468 et 393) ont été mesurés chez des larves L1 exposées durant 24 h à 0,01, 0,1 et 1  $\text{mmol}_U \text{ L}^{-1}$ . Ces taux d'internalisation de l'U sont largement supérieurs à ceux rapportés dans la présente étude. À notre connaissance, l'étude de Jiang *et al.* (2009) ne comportait pas de procédure de rinçage, nécessaire à la désorption de l'U de la cuticule



**FIGURE 5.2** Internalisation cellulaire de l'U chez des larves L1 *C. elegans* exposées à l'U, en présence ou en absence de Cd. Les larves L1 ont été exposées 10 h à 0 et 0,95 mmol<sub>U</sub> L<sup>-1</sup> en présence (◆) ou en absence (○) de 0,009, 0,022 et 0,040 mmol<sub>Cd</sub> L<sup>-1</sup> (concentrations nominales ; les concentrations mesurées ont été utilisées pour la construction de la figure). Les données moyennées des mesures de la concentration d'U dans les lysats cellulaires (nmol mg<sup>-1</sup><sub>protéines</sub>) sont représentées ( $n = 3$  ( $\times 15000$  larves L1)) ; Barres d'erreur verticales : écart-type de ces mesures ; Barres d'erreur horizontales : erreur estimée de dosage par ICP-MS. Les lettres en minuscule identiques désignent les conditions non statistiquement différentes ( $p \leq 0,05$ ).

des nématodes et les dosages ont été réalisés sur des homogénats totaux de larves L1<sup>1</sup>. Ces éléments ainsi que les durées d'exposition contrastées entre les deux études pourraient expliquer, en partie, les différences constatées.

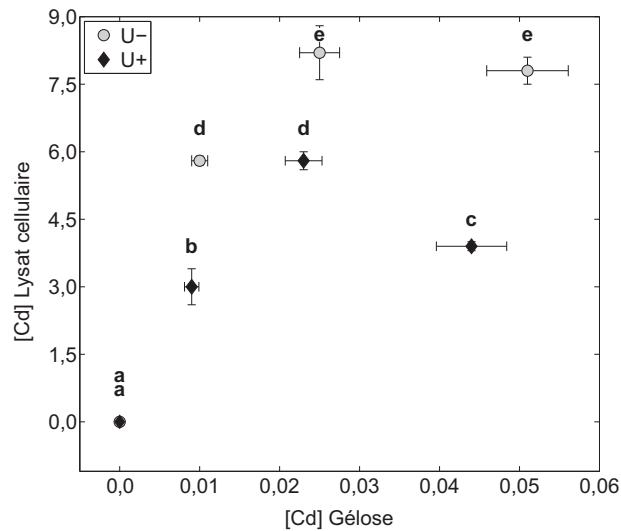
### 5.3.2 Internalisation du Cd, comparaison avec celle de l'U

Les larves L1 exposées au Cd, ont significativement internalisé le Cd en absence d'U (Fig. 5.3, U-). L'internalisation à 0,022 mmol<sub>Cd</sub> L<sup>-1</sup> est significativement supérieure à celle à 0,009 mmol<sub>Cd</sub> L<sup>-1</sup> ( $5,8 \pm 0,1$  contre  $8,2 \pm 0,6$  nmol mg<sup>-1</sup><sub>protéines</sub>). Des niveaux d'internalisation identiques ont été mesurés pour les conditions 0,022 et 0,040 mmol<sub>Cd</sub> L<sup>-1</sup> ( $8,2 \pm 0,6$  et  $7,8 \pm 0,3$  nmol mg<sup>-1</sup><sub>protéines</sub>). Les ratios de concentrations ( $\frac{\text{Nématode}}{\text{Gélose}}$ ) sont de 555, 332 et 153 L kg<sup>-1</sup><sub>protéines</sub>.

À l'inverse de l'U, des niveaux de Cd identiques ont été mesurés pour tous les échantillons du contrôle qualité.

Le transfert moyen gélose-nématode du Cd est de trois ordres de grandeur supérieur à celui de l'U. Dans la littérature, des facteurs d'internalisation élevés sont généralement rap-

1. Aucune étape de centrifugation.



**FIGURE 5.3** Internalisation cellulaire du Cd chez des larves L1 *C. elegans* exposées au Cd, en présence ou en absence d'U. Les larves L1 ont été exposées 10 h à 0, 0,009, 0,022 et 0,040 mmol<sub>Cd</sub>L<sup>-1</sup> en présence (◆) ou en absence (●) de 0,95 mmol<sub>U</sub>L<sup>-1</sup> (concentrations nominales ; les concentrations mesurées ont été utilisées pour la construction de la figure). Les données moyennées des mesures de la concentration en Cd dans les lysats cellulaires (nmol mg<sup>-1</sup><sub>protéines</sub>) sont représentées ( $n = 3$  ( $\times 15\,000$  larves L1)) ; Barres d'erreur verticales : écart-type de ces mesures ; Barres d'erreur horizontales : erreur estimée de dosage par ICP-MS. Les lettres en minuscule identiques désignent les conditions non statistiquement différentes ( $p \leq 0,05$ ).

portés pour le Cd. Dans la base de données construite par [Sample et al. \(1999\)](#), regroupant les résultats de 105 études de bioaccumulation d'ETM<sup>1</sup> par des lombrics, le Cd, avec l'Hg, le Pb et le Zn, présentent les plus forts taux d'internalisation. Par exemple, entre un et trois ordres de grandeur séparent le taux d'internalisation du Cd et celui du Cr, du Cu, du Mn, du Ni et du Se. À partir des données de l'étude de [Gongalsky \(2006\)](#) portant sur la bioaccumulation d'ETM<sup>2</sup> par des invertébrés du sol vivant à proximité d'un site minier d'U, le plus fort taux d'internalisation a été obtenu pour le Ni. Bien que variables, les niveaux d'internalisation de l'U apparaissent proches de ceux de l'As, du Rb et du Zn et sont généralement d'un ordre de grandeur supérieurs à ceux du Ba, du Co, du Cr, du Cu, du Mo, du Pb, du Sc, du Sr et du Th. Dans l'étude de [Al Kaddissi \(2012\)](#) menée chez l'écrevisse *P. clarkii*, l'internalisation mesurée de l'U dans les branchies est d'un ordre de grandeur supérieure à celle du Cd tandis que dans l'hépatopancréas, des niveaux d'internalisation similaires ont été observés pour les deux ETM. Dans ce cas particulier, la forte accumulation de l'U dans les branchies par rapport au Cd est probablement liée à une plus forte adsorption de l'U sur les cellules branchiales ([Al Kaddissi, 2012](#)).

1. As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se et Zn.

2. As, Ba, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Rb, Sc, Sr, Th, U et Zn.



### 5.3.3 L'U affecte l'internalisation du Cd

L'internalisation du Cd est modifiée par la présence de l'U. En effet, en absence d'U (U-), l'internalisation du Cd s'échelonne entre 5,66 et 8,56  $\text{nmol mg}^{-1}_{\text{protéines}}$  avec des ratios de concentrations  $\frac{\text{Nématode}}{\text{Gélose}}$  de 555, 332 et de 153  $\text{L kg}^{-1}_{\text{protéines}}$ , tandis qu'en présence d'U (U+), elle s'échelonne entre 2,73 et 5,94  $\text{nmol mg}^{-1}_{\text{protéines}}$  avec des ratios de concentrations  $\frac{\text{Nématode}}{\text{Gélose}}$  de 341, 252 et de 89  $\text{L kg}^{-1}_{\text{protéines}}$  (Fig. 5.3). L'internalisation du Cd a donc été réduite d'un facteur 1,6, 1,3 et 1,7, respectivement, lorsque l'U était également présent dans la gélose.

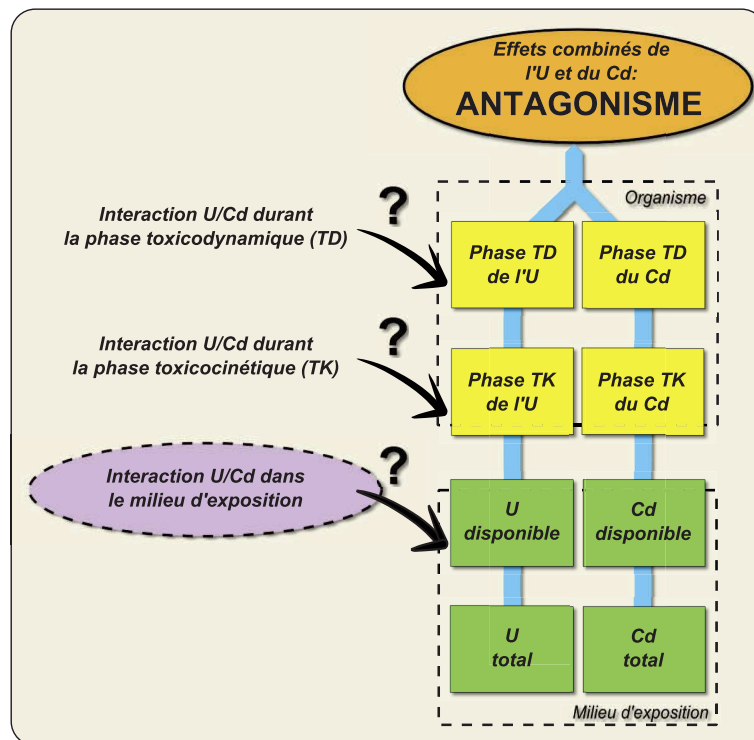
Les résultats de cette expérience reflètent théoriquement les niveaux d'internalisation du Cd à  $t = 0,4\text{j}$ , en présence et en absence de  $0,95 \text{ mmol U L}^{-1}$  de l'expérience de toxicité en mélange. Si l'on suppose que l'effet de l'U sur l'internalisation du Cd persiste au cours du temps, il pourrait expliquer, au moins partiellement, les niveaux d'antagonisme importants mis en évidence par l'expérience de toxicité en mélange. Par exemple, dans leur étude de coexposition de l'amphipode *Carophium volutator* au Cd et au Zn, Bat *et al.* (1998) ont montré que la présence du Zn diminue significativement, à la fois l'internalisation et l'effet toxique du Cd. De même, Péry *et al.* (2008) se sont intéressés à l'internalisation et la toxicité d'ETM (Cu, Zn et Cd) seuls et en mélange, sur la larve du diptère *Chironomus riparius*. Les auteurs ont montré que la coprésence de ces ETM pouvait moduler de manière importante leur internalisation et ont pu correctement décrire la toxicité de ces ETM à partir de mesures de leurs concentrations cytosoliques après une courte période d'exposition.

## 5.4 Conclusion

Les résultats de l'étude de bioaccumulation de l'U par *C. elegans*, limités à une seule concentration, ne permettent pas de rejeter l'hypothèse initiale de non-interaction avec le Cd. À l'inverse, les résultats de l'étude de bioaccumulation de Cd montrent que celle-ci est affectée par la présence d'U dans notre système expérimental. Cette interaction mise en évidence entre l'U et le Cd pourrait expliquer l'interaction antagoniste identifiée à partir des données de l'expérience de toxicité du mélange U/Cd.

Deux types d'interaction pourraient expliquer une réduction de la bioaccumulation du Cd due à l'U : (i) une interaction dans le milieu d'exposition pour laquelle la présence d'U modifie la fraction de Cd disponible aux nématodes ; (ii) une interaction durant la phase TK où l'U pourrait, entre autre, modifier la cinétique d'internalisation ou d'excrétion du Cd.

# Origine de l'interaction U/Cd dans le milieu d'exposition



## 6.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, une interaction entre l'U et le Cd se-rait à l'origine d'une bioaccumulation réduite de Cd et potentiellement du fort antagonisme identifié à partir des données de toxicité du mélange. Cette interaction pourrait se produire dans le milieu d'exposition et/ou durant la phase TK de l'U ou du Cd. Étant donné que l'ex-position externe est le point initial du mécanisme de toxicité, une investigation a été menée dans le but de déterminer si la réduction de la bioaccumulation de Cd en présence d'U par *C. elegans* aurait pour origine une interaction à ce niveau.

Dans le cas d'une interaction dans le milieu d'exposition, les fractions disponibles des substances en mélange peuvent être modulées, aboutissant à une exposition « réelle » accrue ou atténuée. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de telles modulations. Lorsque un ou plusieurs ETM sont impliqués, il s'agit principalement de modulations de la spéciation chimique (*i.e.* équilibres entre complexes chimiques non biodisponibles et formes chimiques biodisponibles, Fortin *et al.*, 2004), d'une part, ou de compétitions pour la fixation sur des sites d'immobilisation (*e.g.* adsorption sur des fractions non biodisponibles du sol, Staunton, 2004 ; Van Gestel *et Hensbergen*, 1997) ou sur des vecteurs d'internalisation (*e.g.* particules de nourriture, Lores *et Pennock*, 1999 ; microplastiques, Rochman *et al.*, 2013), d'autre part.

L'exposition des organismes du sol aux ETM s'opère au niveau des membranes externes (*e.g.* épiderme, tractus digestif). Dans le cas de *C. elegans*, des résultats expérimentaux sont en faveur d'une exposition au Cd principalement par l'alimentation (Höss *et al.*, 2011 ; Offermann *et al.*, 2009). Par exemple, à travers une étude conduite en milieu liquide avec *C. elegans*, Höss *et al.* (2011) ont montré qu'en absence de bactérie, le Cd n'a pas d'effet significatif sur la reproduction, y compris à  $0,070 \text{ mmol L}^{-1}$ . Cette concentration correspond à plus de 50 fois l'EC<sub>50</sub> (exposition de 48 h) du Cd en présence de bactéries (Höss *et al.*, 2011). En lien avec cette voie d'internalisation, Swain *et al.* (2010) ont identifié chez *C. ele-gans* un mode d'action physiologique du Cd sur l'assimilation de nourriture<sup>1</sup> et Popham *et Webster* (1979) ont démontré l'effet de cet ETM sur le tractus digestif du nématode. De façon similaire, une étude récente a permis d'identifier une diminution de l'assimilation de nourriture comme mode d'action physiologique de l'U<sup>2</sup> chez *C. elegans* (Goussen *et al.*, 2015) et une étude menée avec le ver *Eisenia fetida* a permis de mettre en évidence les dommages de l'U au niveau du tractus digestif (Giovanetti *et al.*, 2010). Ces résultats sug-gèrent que l'U et le Cd affectent tous deux l'alimentation de *C. elegans*. Dans notre système

---

1. Identifié par modélisation DEBtox.

2. *Idem.*

expérimental, les nématodes se déplacent et s'alimentent dans le tapis bactérien, déposé à la surface de géloses contaminées en U et/ou Cd ; nous pouvons donc supposer que les concentrations en ETM dans le tapis bactérien reflètent plus l'exposition des nématodes que les concentrations dans la gélose.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de la caractérisation du transfert de l'U et/ou du Cd depuis la gélose vers le tapis bactérien, dans l'ensemble des conditions testées dans le chapitre 4. La caractérisation du transfert a été réalisée à partir d'une mesure de l'U et du Cd dans les tapis bactériens, d'un côté, et à partir d'une modélisation de la spéciation de l'U et du Cd dans le milieu NGM-gélose, d'un autre côté. Les hypothèses initiales testées dans ce chapitre sont (i) les concentrations de l'U ou du Cd dans le tapis bactérien ne sont pas affectées par la coprésence de Cd ou d'U, respectivement et (ii) la spéciation de l'U ou du Cd dans la gélose n'est pas affectée par la coprésence de Cd ou d'U, respectivement.

## **6.2 Matériels et méthodes spécifiques**

### **6.2.1 Préparation des boîtes**

Le plan expérimental utilisé pour la caractérisation de la toxicité du mélange U/Cd (Sec. 4.2.2<sup>1</sup>) a également été mis en œuvre dans cette étude. La préparation des boîtes a été sensiblement identique mais avec les particularités suivantes : des boîtes de Petri 6 cm contenant 12 mL de NGM et 0,5 mL de tapis bactérien ont été utilisées. Trois duplicatas de boîte par condition ont été réalisés.

### **6.2.2 Récolte, préparation et analyse des échantillons bactériens**

24 h après la préparation des boîtes, les tapis bactériens ont été récoltés par grattage de la surface de la gélose à l'aide d'une œuse et déposés dans des micro-capsules de pesée en aluminium (VWR international, France), prépesées à sec. Les échantillons ont ensuite été séchés durant 24 h à 60 °C.

Au terme du séchage, les échantillons ont été pesés à l'aide d'une ultra-microbalance (SE2, Sartorius, USA ; précision :  $\pm 0,9 \mu\text{g}$ ), puis minéralisés et stockés jusqu'au dosage.

Les concentrations en U et en Cd des échantillons minéralisés ont été mesurées par ICP-MS et normalisées par les masses de tapis bactérien correspondantes (poids sec, « dw »).

---

1. p. 95.

### 6.2.3 Modélisation de la spéciation chimique dans la gélose

La spéciation de l'U et du Cd dans le milieu NGM-gélosé a été déterminée à partir du logiciel Visual MINTEQ (v. 3.0.)<sup>1</sup>. L'agar, l'HEPES et l'éthanol n'ont pas été inclus dans la modélisation en raison du manque de données thermodynamiques. L'effet de ces composés sur la spéciation de l'U et du Cd dans la gélose a été supposé négligeable. Le pH, mesuré expérimentalement, a été fixé à 4,8. La base de données de constantes thermodynamiques par défaut, additionnée de la constante thermodynamique du complexe  $\text{MgUO}_2[\text{CO}_3]^{2-}$  (Dong et Brooks, 2006), a été utilisée. Le système n'a pas été considéré à l'équilibre avec l'atmosphère ; des résultats similaires ont néanmoins été obtenus en considérant l'équilibre.

## 6.3 Résultats

### 6.3.1 Transferts de l'U et du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien

Les résultats des dosages d'U et de Cd dans le tapis bactérien sont présentés en figure 6.1. Les concentrations d'U et de Cd dans la gélose correspondent aux concentrations nominales corrigées à partir des résultats des mesures d'U et de Cd dans la gélose<sup>2</sup>.

Pour la gamme de concentrations d'U dans la gélose testée, les transferts de l'U vers le tapis bactérien suivent une relation non linéaire, de type sigmoïde, indépendamment de la présence de Cd dans la gélose. Les données ont été décrites à l'aide d'une fonction logistique à 4 paramètres (Fig. 6.1, A). Les ratios de concentration de l'U  $\left(\frac{\text{Tapis bactérien}}{\text{Gélose}}\right)$  s'échelonnent entre 25,0 et 104,0  $\text{L kg}_{\text{dw}}^{-1}$ .

Pour la gamme de concentrations de Cd dans la gélose testée, les transferts du Cd vers le tapis bactérien suivent deux types de relation linéaire (Fig. 6.1, B). En absence d'U, le ratio de concentrations moyen du Cd  $\left(\frac{\text{Tapis bactérien}}{\text{Gélose}}\right)$  est de 326,1  $\text{L kg}_{\text{dw}}^{-1}$  ( $R^2 = 0.968$ ). En présence d'U, qu'elle que soit la concentration testée, le ratio de concentration moyen du Cd est de 148,9  $\text{L kg}_{\text{dw}}^{-1}$  ( $R^2 = 0.988$ ).

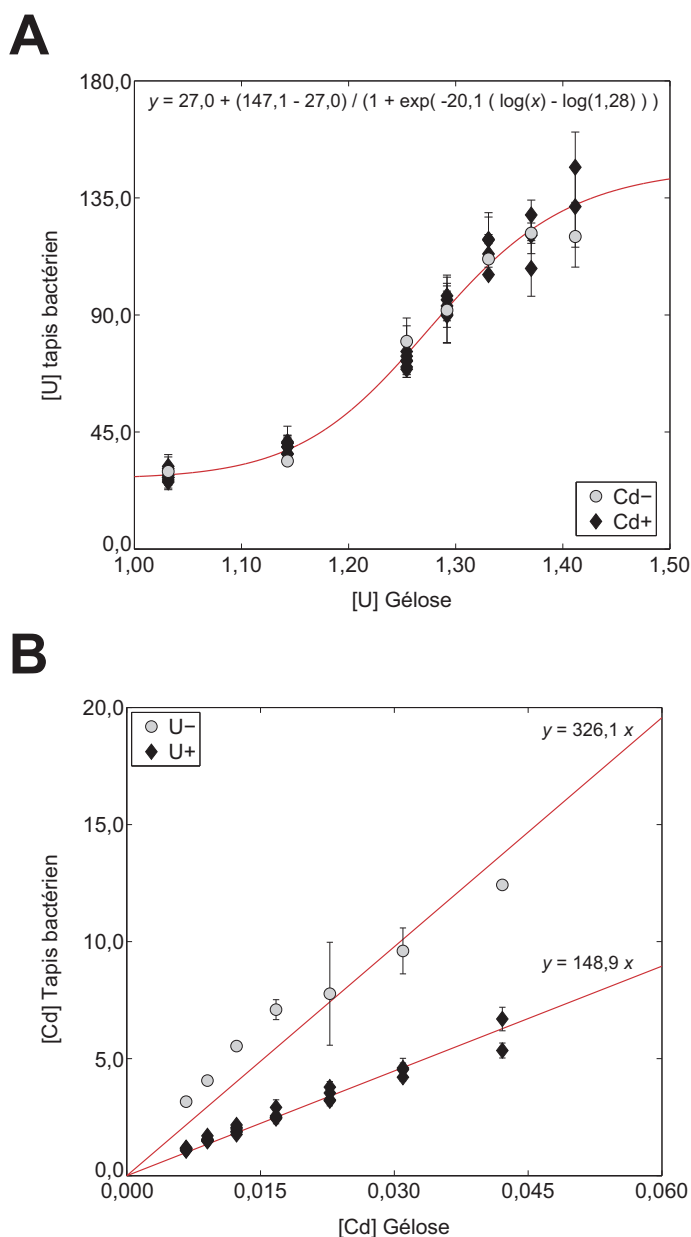
### 6.3.2 Spéciation de l'U et du Cd dans la gélose (milieu NGM)

Les résultats de la modélisation de la spéciation de l'U et du Cd dans le milieu NGM gélosé sont résumés dans les tableaux 6.1 et 6.2, respectivement. Seuls quelques mélanges représentatifs de l'ensemble des mélanges testés sont présentés.

---

1. J. P. Gustafsson, 2012, téléchargement libre sur [vminteq.lwr.kth.se](http://vminteq.lwr.kth.se).

2. Application des coefficients directeurs des régressions linéaires ; voir figure S.4 (p. 228).



**FIGURE 6.1** Transfert gélose-tapis bactérien de l'U et du Cd. Les données moyennées des mesures de la concentration en U ou Cd dans les tapis bactériens ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ) sont représentées en fonction des concentrations nominales corrigées en U ou Cd dans la gélose ( $\text{mmol L}^{-1}$ ); *Barres d'erreur verticales* : écart-types des duplicatas de mesure dans le tapis bactérien ( $n = 3$ ). **A.** Une fonction log-logistique à quatre paramètres (*courbe rouge*) a été utilisée pour décrire les données de transfert de l'U en présence (◆) et en absence de Cd (○) :  $\min + (\max - \min) / (1 + \exp(-\beta (\log(x) - \log(C_{50}))))$ ; *min* : transfert minimum d'U; *max* : transfert maximum;  $C_{50}$  : concentration dans la gélose produisant un transfert médian;  $\beta$  : pente de la courbe lorsque  $x = C_{50}$ . **B.** Deux fonctions linéaires (*droites rouges*) ont été utilisées pour représenter le transfert du Cd en présence (◆) ou en absence d'U (○).

**Tableau 6.1** Résumé de la modélisation de la spéciation de l'U dans la gélose, en présence ou en absence de Cd. La modélisation a été réalisée avec Visual MINTEQ (v. 3.0.), à pH = 4,8. Neuf des 49 conditions U/Cd en mélange sont présentées. Les trois espèces chimiques majoritaires sont détaillées.

Condition		Spéciation de l'uranium			
Cd total	U total	UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	(UO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	(UO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (OH) <sub>5</sub> <sup>+</sup>	Autres complexes de l'UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>
mM	mM	mM / (%)	mM / (%)	mM / (%)	mM / (%)
0	0,95	0,167	0,223	0,365	0,190
		(17,7)	(23,6)	(38,6)	(20,1)
0,006	0,95	0,167	0,223	0,365	0,190
		(17,7)	(23,6)	(38,6)	(20,1)
0,016	0,95	0,167	0,223	0,365	0,190
		(17,7)	(23,6)	(38,6)	(20,1)
0,040	0,95	0,167	0,223	0,365	0,190
		(17,7)	(23,6)	(38,6)	(20,1)
0	1,19	0,183	0,270	0,485	0,242
		(15,5)	(22,8)	(41,1)	(20,5)
0,006	1,19	0,183	0,270	0,485	0,242
		(15,5)	(22,8)	(41,1)	(20,5)
0,016	1,19	0,183	0,270	0,485	0,242
		(15,5)	(22,8)	(41,1)	(20,5)
0	1,30	0,190	0,290	0,541	0,267
		(14,8)	(22,5)	(42,0)	(20,7)
0,006	1,30	0,190	0,290	0,541	0,267
		(14,8)	(22,5)	(42,0)	(20,7)

**Tableau 6.2** Résumé de la modélisation de la spéciation du Cd dans la gélose, en présence ou en absence d'U. La modélisation a été réalisée avec Visual MINTEQ (v. 3.0.), à pH = 4,8. Neuf des 49 conditions U/Cd en mélange sont présentées. Les trois espèces chimiques majoritaires sont détaillées.

Condition		Spéciation du cadmium			
Cd total	U total	Cd <sup>2+</sup>	CdCl <sup>+</sup>	CdCl <sub>2</sub> (aq)	autres complexes du Cd <sup>2+</sup>
mM	mM	mM / (%)	mM / (%)	mM / (%)	mM / (%)
0,006	0	1,86 × 10 <sup>-3</sup> (29,6)	3,83 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	5,12 × 10 <sup>-4</sup> (8,2)	7,38 × 10 <sup>-5</sup> (1,2)
0,006	0,95	1,86 × 10 <sup>-3</sup> (29,7)	3,84 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	5,13 × 10 <sup>-4</sup> (8,2)	7,15 × 10 <sup>-5</sup> (1,1)
0,006	1,19	1,86 × 10 <sup>-3</sup> (29,7)	3,83 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	5,12 × 10 <sup>-4</sup> (8,2)	7,11 × 10 <sup>-5</sup> (1,1)
0,006	1,30	1,86 × 10 <sup>-3</sup> (29,7)	3,82 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	5,11 × 10 <sup>-4</sup> (8,2)	7,09 × 10 <sup>-5</sup> (1,1)
0,016	0	4,68 × 10 <sup>-3</sup> (29,6)	9,63 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	1,29 × 10 <sup>-3</sup> (8,2)	1,86 × 10 <sup>-4</sup> (1,2)
0,016	0,95	4,69 × 10 <sup>-3</sup> (29,7)	9,65 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	1,29 × 10 <sup>-3</sup> (8,2)	1,08 × 10 <sup>-4</sup> (1,1)
0,016	1,19	4,68 × 10 <sup>-3</sup> (29,7)	9,63 × 10 <sup>-3</sup> (61,0)	1,29 × 10 <sup>-3</sup> (8,2)	1,79 × 10 <sup>-4</sup> (1,1)
0,040	0	1,18 × 10 <sup>-2</sup> (29,6)	2,42 × 10 <sup>-2</sup> (61,0)	3,24 × 10 <sup>-3</sup> (8,2)	4,66 × 10 <sup>-4</sup> (1,2)
0,040	0,95	1,18 × 10 <sup>-2</sup> (29,7)	2,43 × 10 <sup>-2</sup> (61,0)	3,25 × 10 <sup>-3</sup> (8,2)	4,52 × 10 <sup>-4</sup> (1,1)



Dans le cas de l'U, les trois espèces chimiques majoritaires prédites sont l' $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$  ( $\approx 39\%$ ), l' $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$  ( $\approx 24\%$ ) et l' $\text{UO}_2^{2+}$  ( $\approx 18\%$ ). D'autres complexes moins abondants ( $< 7\%$ ), avec les hydroxyles, les sulfates, les chlorures et les nitrates, sont également prédits. L'ion libre uranyle n'apparaît donc pas comme l'espèce majoritaire dans nos conditions expérimentales.

Dans le cas du Cd, de même que pour l'U, l'ion libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) n'apparaît pas comme l'espèce majoritaire mais figure en deuxième position. Les trois espèces chimiques majoritaires prédites sont le  $\text{CdCl}^+$  ( $\approx 61\%$ ), le  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\approx 30\%$ ) et le  $\text{CdCl}_{2(\text{aq})}$  ( $\approx 8\%$ ). D'autres complexes moins abondants ( $< 1\%$ ), avec les sulfates et les nitrates, sont également prédits.

Pour les mélanges U/Cd, la présence d'U ou de Cd à différentes concentrations dans le milieu ne modifie pas sensiblement la spéciation de l'autre ETM.

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Un transfert gélose-tapis bactérien triphasique pour l'U ?

La relation non linéaire observée pour le transfert gélose-tapis bactérien de l'U pourrait être la résultante de trois composantes. Une composante d'adsorption linéaire de l'U sur les bactéries pour la tranche basse des concentrations dans la gélose, puis une phase de transfert exponentiel puis de saturation pour la tranche haute des concentrations dans la gélose. Dans le cas d'ETM, une telle relation de transfert pourrait être expliquée par la présence d'un ligand limitant l'adsorption de l'ETM jusqu'à la saturation du ligand (Limousin *et al.*, 2007).

Une précipitation de surface de l'U au niveau des bactéries pourrait également contribuer à cette relation de transfert particulière. En effet, nous avons pu observer que la texture des tapis bactériens était modifiée en présence d'U, et particulièrement pour la tranche haute de la gamme des concentrations. Les bactéries présentent par exemple des groupements phosphate à leur surface qui peuvent engendrer la précipitation de l'U. Cette tendance est plus fortement accentuée chez les bactéries gram positif mais une précipitation de l'U à la surface de bactéries gram négatives a également été rapportée (Tabak *et al.*, 2005). Par ailleurs, Bayer *et Bayer* (1991) ont pu mettre en évidence la précipitation des lanthanides : La, Tb et Eu au niveau de l'espace périplasmique (zone entre la membrane interne et externe) chez *E. coli*. Les lanthanides ayant des comportements chimiques proches des actinides, comme l'U, nous pouvons supposer qu'un phénomène similaire pourrait se produire.

À l'inverse de l'U, le transfert gélose-tapis bactérien du Cd semble suivre une relation linéaire. Cette différence pourrait provenir du contraste important entre les gammes de

concentrations testées pour les deux ETM.

#### **6.4.2 Différents niveaux de transfert gélose-tapis bactérien pour l'U et le Cd**

Dans nos conditions expérimentales, le transfert gélose-tapis bactérien du Cd est entre 3 et 19 fois supérieur à celui de l'U. Si l'on considère que seules les formes ioniques libres peuvent être adsorbées sur les bactéries, la différence de transfert est légèrement atténuée ; le transfert du Cd est entre 1,5 et 8 fois supérieur à celui de l'U. Cette différence pourrait provenir d'une affinité ou d'une quantité de sites contrastée pour l'adsorption de l'U et du Cd sur *E. coli*.

Dans la littérature, les études portant sur l'affinité de l'U et du Cd pour les différents groupements chimiques présents à la surface des bactéries révèlent une affinité supérieure de l'U par rapport au Cd. Dans leurs conditions expérimentales avec une bactérie gram négatif, [Mishra et al. \(2010\)](#) ont montré que le Cd se complexait préférentiellement aux sites sulfhydriles à faibles concentrations, puis sur les sites carboxylés et phosphorylés avec l'augmentation de la concentration. Pour l'U, les sites de complexation préférentiels identifiés sont les groupements phosphates et carboxyles ([Haas et al., 2001](#) ; [Llorens et al., 2012](#)). Dans une étude sur l'adsorption de l'U sur les lipopolysaccharides (LPS), composants présents dans la membrane des bactéries gram négatif, [Barkleit et al. \(2008\)](#) ont pu montrer que l'affinité de l'U pour les groupements phosphates et carboxyles était supérieure à celle du Cd. À l'inverse, dans une étude menée sur l'adsorption d'ETM sur des *E. coli* tuées, [Choi et Park \(2005\)](#) ont montré qu'un plus grand nombre de sites est disponible pour l'adsorption de l'U par rapport au Cd, mais que ce dernier possède une affinité plus importante que l'U.

Dans nos conditions expérimentales, la différence importante dans les niveaux de concentrations testées pour l'U et le Cd ne permet pas d'émettre une hypothèse quant à une éventuelle différence d'affinité ou de nombre de sites disponibles pour l'adsorption de ces deux ETM.

#### **6.4.3 L'uranium réduit le transfert gélose-tapis bactérien du cadmium**

Les résultats de l'étude du transfert gélose-tapis bactérien du Cd en présence d'U indiquent que l'U réduit d'un facteur proche de 2 le transfert du Cd. Ces résultats mettent donc en évidence la présence d'une interaction entre l'U et le Cd dans le milieu d'exposition.

Comme les résultats de modélisation de la spéciation le suggèrent, il est peu probable que la coprésence d'U ou de Cd ne modifie la spéciation de l'autre ETM. De même, l'étude de [Lofts \*et al.\* \(2015\)](#) montre que la spéciation de l'U semble peu affectée par la présence d'autres ETM (As, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Th, Zn). Seul le Fe(III), dans un cas particulier de formation d'oxydes de fer, a affecté la spéciation de l'U en raison de l'adsorption de  $UO_2^{2+}$  sur ces oxydes.

L'interaction entre l'U et le Cd se déroulerait donc au niveau du tapis bactérien. Cette interaction pourrait, par exemple, provenir d'une compétition entre l'U et le Cd pour l'adsorption à la surface des bactéries. Comme nous venons de le voir, l'U et le Cd partagent des sites communs de fixation : les groupements carboxyles et phosphates ([Haas \*et al.\*, 2001](#) ; [Mishra \*et al.\*, 2010](#)). La présence d'U à plus forte concentration molaire (y compris sur la base des concentrations en ions libres, estimées par modélisation) pourraient expliquer que la compétition pour l'adsorption soit en faveur de l'U, y compris dans le cas où l'affinité de l'U serait inférieure celle du Cd. Par exemple, dans une étude sur la bactérie gram négatif *Sinorhizobium meliloti*, les auteurs ont pu montrer que l'adsorption du Cd pouvait être réduite d'un facteur 2,5 en présence de Ca à plus fortes concentrations molaires, et ce, malgré la plus forte affinité du Cd pour l'adsorption ([Slaveykova \*et al.\*, 2009](#)).

Dans le cadre de l'étude des effets de mélanges d'ETM, des exemples d'interactions dans le milieu d'exposition existent dans la littérature. Par exemple, [Jonker \*et al.\* \(2004b\)](#) ont montré que la présence simultanée de Cu et de Zn dans un sol standard produit des effets synergiques sur l'augmentation de populations de *C. elegans*. L'utilisation de  $CaCl_2$  pour extraire et estimer les fractions biodisponibles des deux ETM du sol a permis de montrer que la fraction en Zn biodisponible était augmentée en présence de Cu et d'expliquer la synergie identifiée pour la toxicité du mélange. D'autres études montrent cependant que des mécanismes d'interaction mis en évidence expérimentalement n'ont pas forcément de conséquences significatives sur les effets combinés. En effet, [Van Gestel \*et Hensbergen\* \(1997\)](#) ont montré d'un côté que la présence de Zn augmente la fraction biodisponible de Cd tandis que la présence de Cd ne modifie pas la fraction biodisponible de Zn. Mais d'un autre côté, ils ont montré que l'internalisation des deux ETM n'était pas modifiée par la coprésence de l'autre ETM. Finalement, les auteurs ont identifié des effets combinés antagonistes au niveau de la croissance et additifs au niveau de la reproduction de *F. candida*.

Dans notre projet d'étude, bien que le plan expérimental utilisé pour caractériser l'internalisation du Cd par *C. elegans* ait été relativement modeste, les résultats obtenus sont plutôt en accord avec l'identification d'une interaction entre l'U et le Cd dans le milieu d'exposition. En effet, le transfert du Cd, de la gélose au tapis bactérien, et l'internalisation du Cd

par *C. elegans* ont été réduits d'un facteur proche de 2 dans le cas d'une coprésence de l'U.

## 6.5 Conclusion

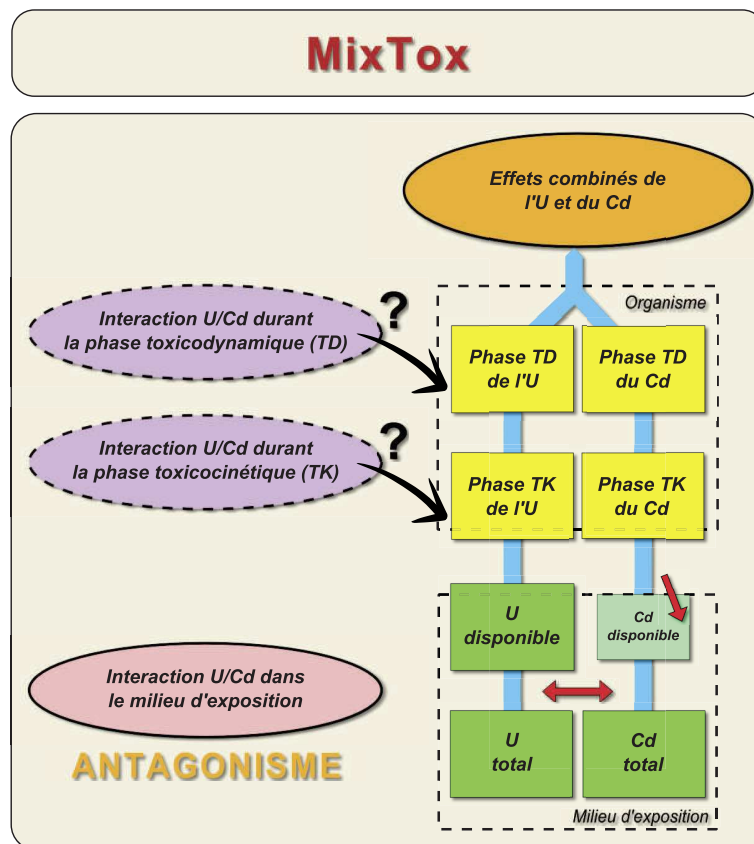
À partir de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que d'un côté l'U interagit avec le Cd dans le milieu d'exposition, ce qui aboutit à une réduction d'un facteur proche de 2 de la concentration en Cd dans le tapis bactérien et, d'un autre côté, le Cd ne perturbe pas le transfert de l'U.

Une telle réduction de la présence de Cd dans le tapis bactérien pourrait expliquer, au moins en partie, l'internalisation réduite de Cd en présence d'U, mise en évidence au cours de l'expérience de bioaccumulation du Cd par des larves L1 *C. elegans*, ainsi que le fort antagonisme mis en évidence dans l'expérience de toxicité du mélange U/Cd.

Dans le chapitre suivant, nous nous proposons de prendre en compte cette interaction dans une nouvelle analyse des données de toxicité du mélange U/Cd afin de déterminer si l'interaction antagoniste pourrait être entièrement expliquée par l'interaction entre l'U et le Cd dans le milieu d'exposition ou si d'autres mécanismes d'interaction pourraient entrer en jeu.



# Réanalyse descriptive des effets de l'U et du Cd (concentrations dans le tapis bactérien)



## 7.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous nous proposons de reprendre l'analyse des effets combinés de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien, dans le but de déterminer si une interaction antagoniste est toujours identifiée. Cependant, ces concentrations n'ayant pas été mesurées directement durant l'expérience de caractérisation de la toxicité du mélange U/Cd, elles ont dû être estimées à partir des relations de transfert gélose-tapis bactérien de l'U et du Cd, présentées dans le chapitre précédent.

En plus de l'analyse des effets sur l'augmentation de longueur corporelle (ALC) maximale et le nombre de larves produites (NLP) total, comme réalisée dans le chapitre 4, nous proposons également dans ce chapitre une analyse de la cinétique des effets combinés U/Cd afin de déterminer s'ils restent stables au cours du temps (relativement à l'additivité) ou si, comme certaines études ont pu le montrer pour d'autres mélanges, ils évoluent (Baas *et al.*, 2007 ; Kamunde *et MacPhail*, 2011 ; Van Gestel *et Hensbergen*, 1997). Les données d'ALC et de NLP ont été analysées pour différents temps d'exposition avec l'outil MixTox, au moyen des modèles d'additivité de référence : addition des concentrations (CA) et addition des réponses (RA).

Les hypothèses initiales testées dans ce chapitre sont (i) l'analyse des effets combinés U/Cd sur la base des concentrations dans le tapis bactérien permet d'expliquer entièrement le fort antagonisme observé précédemment ; les effets de l'U et du Cd combinés sont donc additifs et (ii) ils ne dévient pas de l'additivité au cours du temps.

## 7.2 Matériels et méthodes spécifiques

Les procédures d'expérimentation et d'analyse correspondent à celles présentées dans les chapitres 3 et 4. Les détails suivant précisent la procédure d'estimation des concentrations d'U et de Cd dans le tapis bactérien et la méthode de suivi de l'effet de ces ETM sur *C. elegans* au cours du temps.

### 7.2.1 Estimation des concentrations U/Cd dans le tapis bactérien

Les concentrations d'U et de Cd dans le tapis bactérien de l'expérience de caractérisation de la toxicité du mélange U/Cd ont été estimées à partir des concentrations nominales d'U et de Cd dans la gélose et des relations de transfert gélose-tapis bactérien de l'U et du Cd,

identifiées dans le chapitre 6.<sup>1</sup>

Dans le cas du Cd, les données ne semblent pas suivre strictement un modèle linéaire, notamment en absence d'U<sup>2</sup>. Cependant, les écarts par rapport au modèle linéaire étant relativement modérés et dans l'absence de preuve physico-chimique justifiant l'utilisation d'un modèle plus complexe, nous avons opté pour l'utilisation des modèles linéaires simples. Pour l'U, le modèle sigmoïde a été utilisé. Les concentrations ainsi estimées s'échelonnent entre 27,3 et 96,2 nmol mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup> pour l'U. Pour le Cd, elles s'échelonnent entre 0,9 et 6,0 ou entre 2 et 13,1 nmol mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>, en présence ou en absence d'U, respectivement. Les ratios U/Cd s'échelonnent entre 5 et 85.

## 7.2.2 Mesure des critères d'effet au cours du temps

L'étude cinétique des effets de contaminants sur la croissance et la reproduction nécessite l'exposition en continu d'organismes correctement synchronisés. Dans l'expérience de caractérisation des effets combinés de l'U et du Cd sur *C. elegans*, des individus synchronisés à  $\pm 2$  h ont été utilisés. Ils ont été obtenus comme indiqué dans le chapitre 3.

La longueur des nématodes a été mesurée deux fois par jour durant la phase larvaire ( $t \leq 3$  j), puis une fois par jour jusqu'à la fin de l'expérience. Au total, 14 mesures de longueur ont été réalisées<sup>3</sup>. L'ALC a été calculée comme indiqué précédemment.

Pour la reproduction, les larves produites durant des intervalles de  $\approx 1$  j ont été dénombrées pour chaque individu et le cumul du nombre de larves produites a été calculé. Un total de 11 comptages par individu a été réalisé durant l'expérience.

Seules les données issues de sept temps de mesure représentatifs par critère d'effet (rapprochés au début, puis plus espacés) ont été analysées dans ce chapitre.

## 7.3 Résultats

### 7.3.1 Effets de l'U et du Cd seuls

Les courbes dose-réponse de l'U et du Cd seuls, ajustées sur les données d'ALC maximale et du NLP total, sur la base des concentrations estimées dans le tapis bactérien sont présentées en figure 7.1. Les EC<sub>50</sub> obtenues pour l'ALC maximale et le NLP total (*i.e.* après

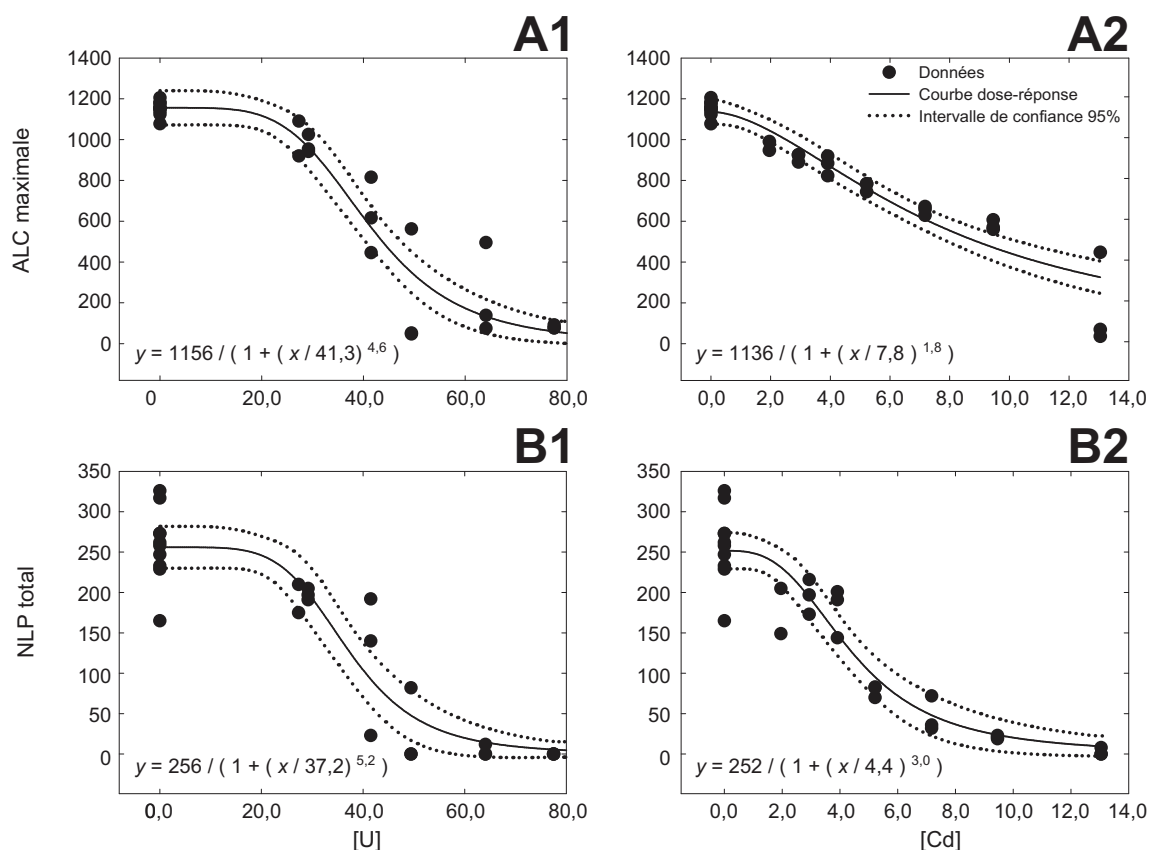
---

1. L'estimation a également été réalisée à partir des concentrations d'U et de Cd mesurées dans la gélose. Ces concentrations ont permis une moins bonne description des données d'effet de l'U et du Cd. L'analyse est présentée dans le Support 2 au chapitre 6 (p. 235).

2. Voir figure 6.1 (p. 117).

3. Voir tableau S.2 (p. 230).





**FIGURE 7.1** Courbes dose-réponse de l'U (1) et du Cd (2) sur l'augmentation de longueur corporelle (ALC) maximale ( $\mu\text{m}$ , **A**) et le nombre de larves produites (NLP) total (**B**) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). ● : données expérimentales ; Traits pleins : courbes dose-réponse ajustées ; Traits pointillés : intervalle de confiance à 95 %.

11 j d'exposition) sont de 41,3 [37,6;44,9]  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$  et 37,2 [32,8;41,6]  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$  respectivement, pour l'U, et de 7,8 [6,7;8,8]  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$  et 4,4 [3,7;5,1]  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$  respectivement, pour le Cd.

Sur la base des concentrations dans le tapis bactérien, le contraste entre les pentes des courbes dose-réponse de l'U et du Cd est atténué (Fig. 7.1). Par ailleurs, le Cd apparaît ici comme entre 5 et 9 fois plus toxique que l'U. La différence de toxicité des deux ETM est largement réduite<sup>1</sup>. Le transfert différentiel de l'U et du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien pourrait donc expliquer partiellement les différences substantielles de toxicité, observées à partir des concentrations en ETM dans la gélose.

Le développement des courbes dose-réponse de l'U et du Cd au cours du temps a également été analysé<sup>2</sup>. Les deux ETM suivent les mêmes tendances pour l'ALC : les  $\text{EC}_{50}$  restent stables au cours du temps tandis que les pentes ont tendance à diminuer. Pour le NLP, les  $\text{EC}_{50}$  de l'U et du Cd ont tendance à augmenter. De manière contrastée, la pente du Cd reste stable au cours du temps tandis que celle de l'U tendrait à diminuer, comme pour l'ALC. De manière générale, l'incertitude associée aux paramètres des courbes dose-réponse diminue au cours du temps ; elle est minimisée pour l'ensemble des paramètres et des critères d'effet à partir de 7,5 j.

### 7.3.2 Effets combinés de l'U et du Cd

L'ensemble des données (individus témoins, exposés aux substances seules et exposés aux mélanges) a été réanalysé sur la base des concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien à l'aide de l'outil MixTox, dans le but de déterminer si les effets combinés de l'U et du Cd sont désormais additifs.

Les modèles significatifs les plus parcimonieux identifiés sur la base du CA et du RA ont abouti à une description des données de qualité équivalente (*i.e.*  $R^2$  similaires) pour les deux critères d'effet (Tab. 7.1). Des effets combinés contrastés ont été identifiés en fonction du modèle d'additivité de référence (CA ou RA), du critère d'effet ainsi que du temps d'exposition considéré.

Pour l'ALC maximale, une déviation significative de l'additivité CA a été mise en évidence. Le modèle le plus parcimonieux identifié est le modèle de déviation DR, décrivant différents niveaux d'antagonisme ; le niveau d'antagonisme étant inversement corrélé au ratio U/Cd ( $p[\chi^2] = 0,04$  ; Tab. 7.1, A, à  $t = 10,2$  j ; Fig. 7.2, gauche). Par exemple, pour

1. Sur la base des concentrations dans la gélose, Cd est de 48 à 81 fois plus toxique que l'U. Voir section 4.3.2 (p. 96).

2. Voir figures S.5 (p. 232) et S.6 (p. 233).

un mélange avec un ratio U/Cd de 11, l'additivité CA prédit une EC<sub>47</sub> alors qu'un effet de  $\approx 35\%$  a été observé expérimentalement, et pour un mélange avec un ratio U/Cd de 22, l'additivité CA prédit une EC<sub>39</sub> alors qu'un effet de  $\approx 34\%$  a été observé expérimentalement.

Au cours du temps, un antagonisme simple et déviant significativement de l'additivité CA a été identifié après 0,6 j d'exposition. Puis la déviation antagoniste dépendante du ratio entre les ETM a été observée jusqu'au dernier point de mesure (Tab. 7.1, A).

Avec l'additivité RA comme référence, l'ajout des différents paramètres de déviations n'a pas permis d'améliorer significativement la description des données d'ALC maximale. Le modèle significatif le plus parcimonieux est donc le modèle d'additivité RA, indiquant l'absence d'interaction ( $p[\chi^2] = 3 \times 10^{-52}$ ; Tab. 7.1, A, à  $t = 10,2$  j; Fig. 7.2, droite). Au cours du temps, les données sont dans l'ensemble en accord avec l'additivité RA. Une légère synergie a cependant été identifiée pour deux temps d'exposition intermédiaires ( $t = 2,2$  et  $3,5$  j; Tab. 7.1, A).

Pour le NLP total, le modèle significatif le plus parcimonieux déviant de l'additivité CA, est un modèle DR décrivant différents niveaux d'antagonisme en fonction du ratio des substances en mélange, proche de celui identifié pour l'ALC maximale ( $p[\chi^2] = 0,04$ ; Tab. 7.1, B, à  $t = 10,8$  j; Fig. 7.3, gauche). Par exemple, pour un mélange avec un ratio U/Cd de 9, l'additivité CA prédit une EC<sub>83</sub> alors qu'un effet de  $\approx 59\%$  a été observé expérimentalement, et pour un mélange avec un ratio U/Cd de 55, l'additivité CA prédit une EC<sub>88</sub> alors qu'un effet de  $\approx 73\%$  a été observé expérimentalement.

Ce même type de déviation de l'additivité CA a été identifié pour tous les temps de mesures intermédiaires (Tab. 7.1, B).

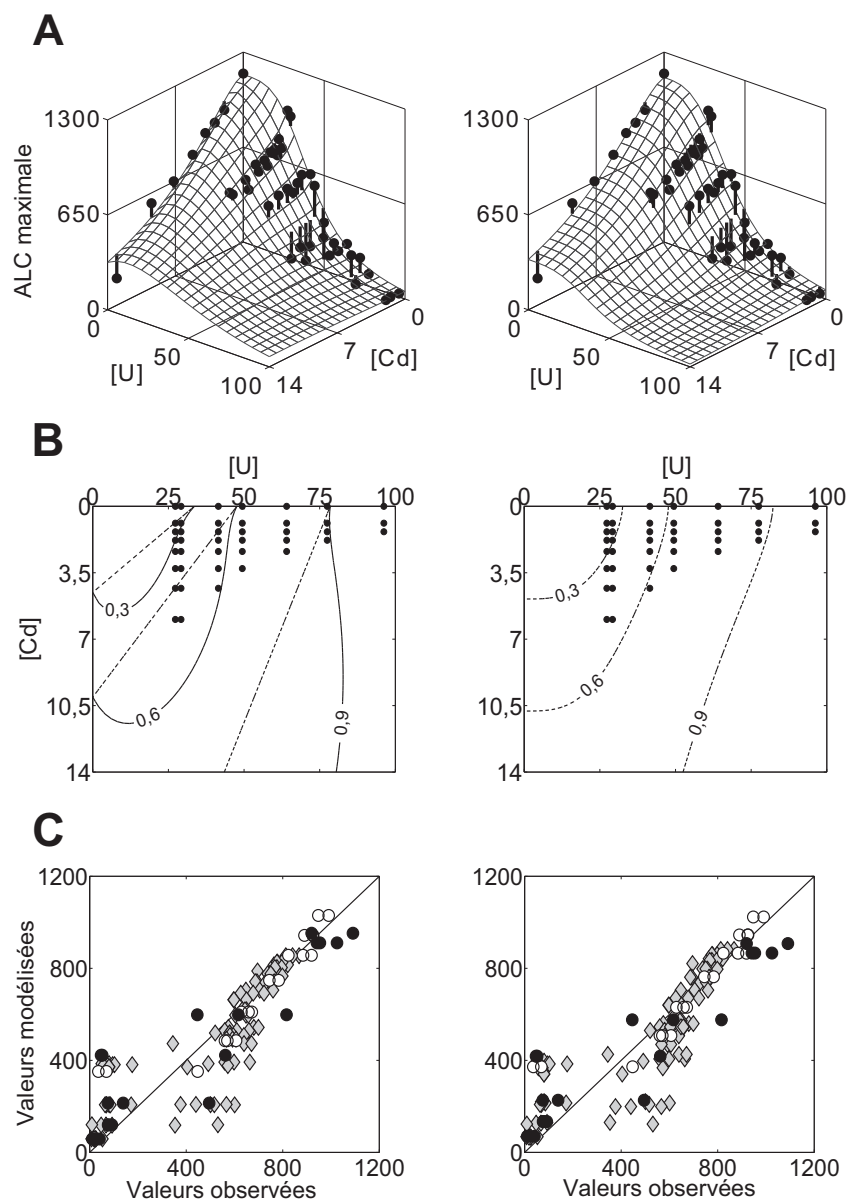
Enfin, avec pour référence l'additivité RA, le modèle significatif le plus parcimonieux identifié est un modèle de déviation DL. Celui-ci indique une synergie modérée pour des mélanges à niveaux de dose inférieurs à l'EC<sub>95</sub>, diminuant vers l'additivité, voire un léger antagonisme pour des mélanges à niveaux de dose supérieurs ou égaux à l'EC<sub>95</sub> (Tab. 7.1, B, à  $t = 10,8$  j; Fig. 7.3, droite). Par exemple, l'additivité RA sous-estime la toxicité du mélange à un faible niveau de dose : une EC<sub>19</sub> est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 40\%$  a été observé expérimentalement. Mais pour un niveau de dose plus élevé, l'additivité RA surestime légèrement la toxicité du mélange : une EC<sub>97</sub> est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 95\%$  a été observé expérimentalement.

Pour tous les temps d'exposition, une déviation synergique a toujours été identifiée. Les modèles de déviation les plus parcimonieux identifiés sont les modèles S/A, DR et DL.

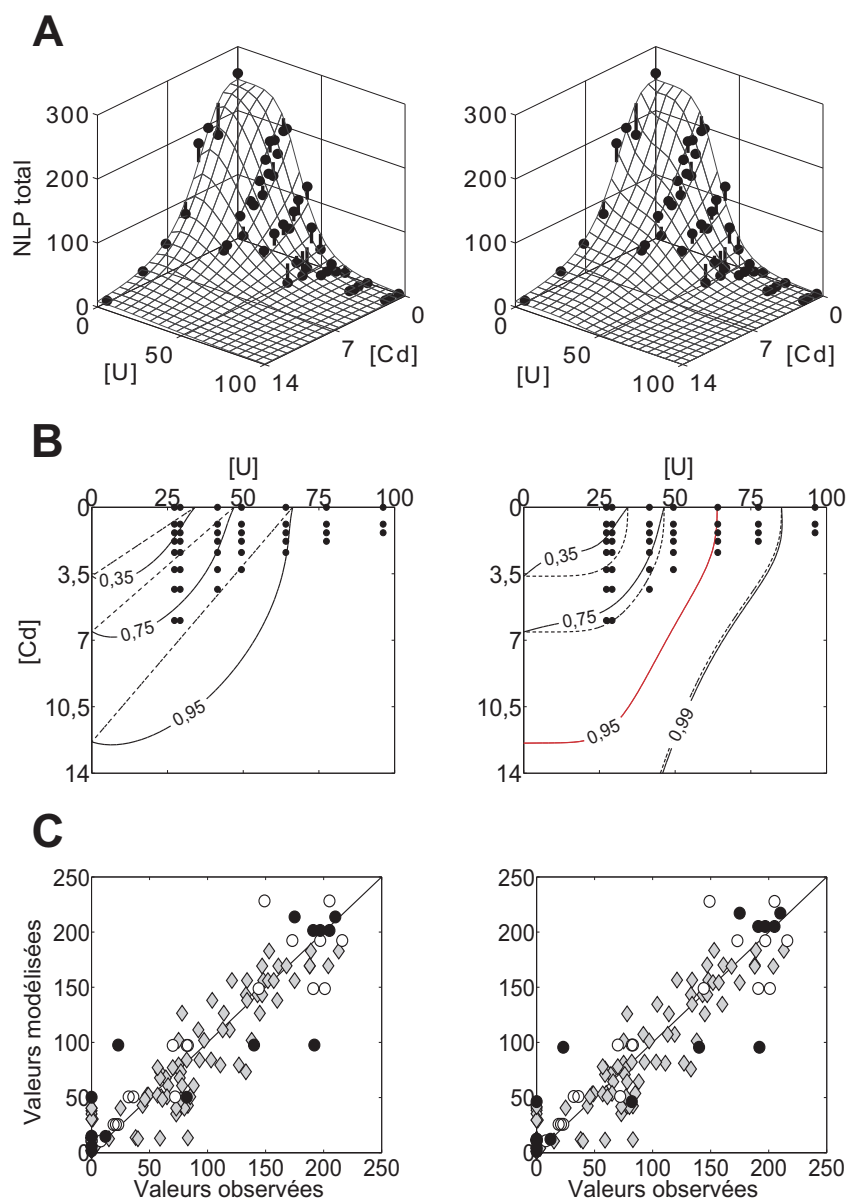
**Tableau 7.1** Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle (**A**) et le nombre de larves produites (**B**) de *C. elegans* pour différents temps d'exposition après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien.<sup>a</sup>

Temps	Addition des concentrations				Addition des réponses				
	Modèle	R <sup>2</sup>	p [ $\chi^2$ ]	Conclusion	Modèle	R <sup>2</sup>	p [ $\chi^2$ ]	Conclusion	
<b>A</b>	0,6	S/A	0,65	$8 \times 10^{-5}$	Antagonisme	Add	0,65	$3 \times 10^{-32}$	–
	1,2	DR	0,87	0,0001	Antagonisme	Add	0,86	$7 \times 10^{-60}$	–
	2,2	DR	0,93	$2 \times 10^{-7}$	Antagonisme	DR	0,93	0,008	Synergie
	3,5	DR	0,94	$4 \times 10^{-7}$	Antagonisme	S/A	0,94	0,02	Synergie
	5,5	DR	0,89	0,001	Antagonisme	Add	0,88	$1 \times 10^{-63}$	–
	7,5	DR	0,85	0,03	Antagonisme	Add	0,84	$9 \times 10^{-57}$	–
	10,2	DR	0,82	0,04	Antagonisme	Add	0,82	$3 \times 10^{-52}$	–
<b>B</b>	3,5	DR	0,92	0,006	Antagonisme	S/A	0,92	$9 \times 10^{-6}$	Synergie
	4,5	DR	0,94	0,001	Antagonisme	DR	0,94	0,01	Synergie
	5,5	DR	0,93	0,001	Antagonisme	DL	0,93	0,04	Synergie
	7,5	DR	0,91	0,02	Antagonisme	S/A	0,91	0,0001	Synergie
	9,5	DR	0,89	0,03	Antagonisme	S/A	0,89	0,04	Synergie
	10,8	DR	0,88	0,04	Antagonisme	DL	0,88	0,03	Synergie (< EC <sub>95</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>95</sub> )

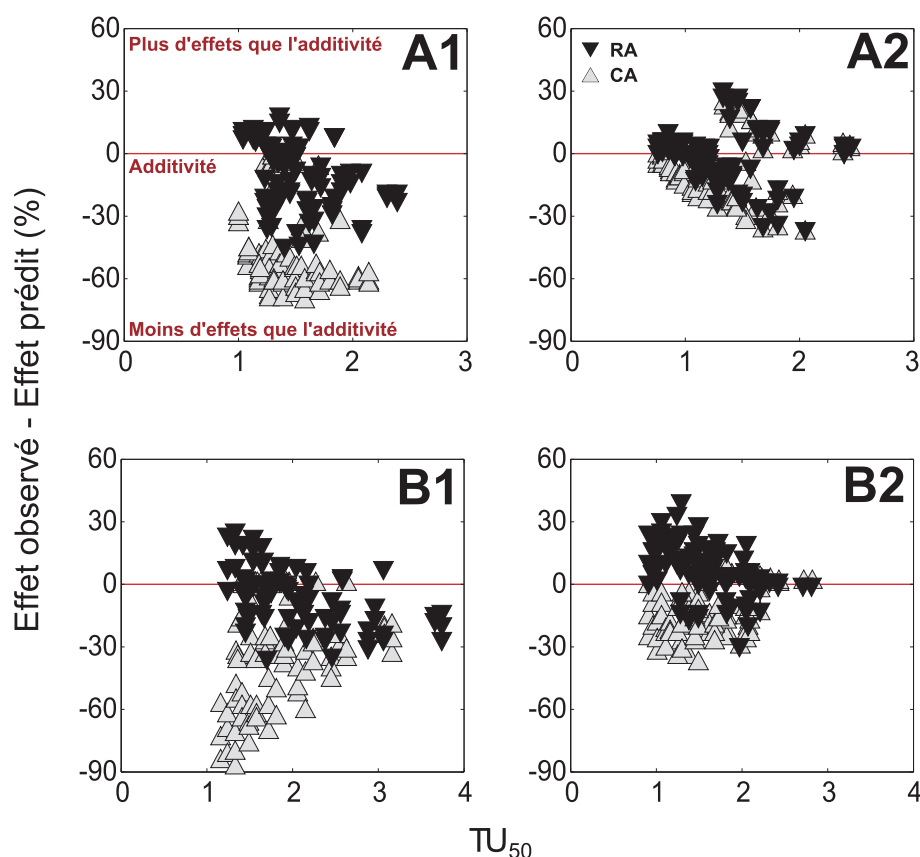
<sup>a</sup>. Le temps est exprimé en jours après éclosion ; les informations en orange correspondent aux données d'augmentation de longueur corporelle maximale et du nombre de larves produites total. **Modèle** : modèles d'effets combinés significatifs les plus parcimonieux, identifiés sur la base de l'addition des concentrations ou de l'addition des réponses ; Add : additivité ; S/A : modèle d'interaction simple (synergie ou antagonisme) ; DR : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; DL : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose du mélange. **R<sup>2</sup>** : coefficient de corrélation. **p [ $\chi^2$ ]** : p-value du test du ratio de vraisemblance. **Conclusion** : interprétation des déviations de l'additivité identifiées.



**FIGURE 7.2** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle (ALC) maximale ( $\mu\text{m}$ ) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d'antagonisme dépendant du ratio des concentrations, déviant de l'addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle de non-interaction suivant l'addition des réponses. **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (*grilles*). **B.** Isobogrammes des surfaces de réponse ; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux ; les *valeurs* indiquent les niveaux d'effet des isoboles (e.g. 0,5 représente l'isobole 50 %) ; ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l'U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇) ; *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).



**FIGURE 7.3** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larve produites (NLP) total de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d'antagonisme dépendant du ratio des concentrations, déviant de l'addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle de synergie/antagonisme dépendant des niveaux de dose du mélange (basculement :  $\text{EC}_{95}$ ), déviant de l'addition des réponses. **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (*grilles*). **B.** Isobogrammes des surfaces de réponse ; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux ; la *ligne rouge*, l'isobole de basculement ; les *valeurs* indiquent les niveaux d'effet des isoboles (e.g. 0,5 représente l'isobole 50 %) ; ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l'U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇) ; *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).



**FIGURE 7.4** Comparaison des effets U/Cd combinés observés et prédits sur la base de l'additivité CA et RA (%), pour l'augmentation de longueur corporelle maximale (A) et le nombre de larves produites total (B) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, à partir des concentrations dans la gélose (1) et dans le tapis bactérien (2). ▼ : effets observés – effets prédits suivant l'additivité RA. ▲ : effets observés – effets prédits suivant l'additivité CA.  $TU_{50} = [U]/EC_{50_U} + [Cd]/EC_{50_{Cd}}$ .

## 7.4 Discussion

### 7.4.1 Une partie importante de l'antagonisme expliquée par l'interaction dans le milieu d'exposition

La figure 7.4 présente la comparaison entre les effets combinés U/Cd observés et prédits, sur la base des additivités CA et RA, pour l'ALC maximale (A) et le NLP total (B), à partir des concentrations dans la gélose (1) ou dans le tapis bactérien (2). Elle illustre l'influence de la prise en compte de l'interaction entre l'U et le Cd dans le tapis bactérien sur l'analyse de leurs effets combinés. En effet, nous pouvons voir que les données qui étaient largement présentes dans la zone d'effets inférieurs à l'additivité CA ou RA dans un premier temps (A1 et B1), se rapprochent vers la ligne d'additivité (A2 et B2) avec la prise en compte de

l'interaction.

L'analyse des données d'ALC maximale et de NLP total, sur la base des additivités CA et RA, a engendré l'identification d'effets combinés contrastés : avec l'additivité CA pour référence, un antagonisme global a été identifié pour les deux critères d'effet, tandis qu'avec l'additivité RA pour référence, des effets combinés synergiques, additifs ou antagonistes ont été identifiés en fonction du critère d'effet ou du niveau de dose du mélange. Ainsi, malgré le rapprochement des données de la ligne d'additivité, des déviations de l'additivité (CA et RA) modérées, mais significatives, sont identifiées.

### 7.4.2 CA versus RA : des conclusions contrastées pour les effets combinés de l'U et du Cd

De même que sur la base des concentrations en U et Cd dans la gélose, les courbes dose-réponse obtenues sur la base des concentrations dans le tapis bactérien comportent des valeurs de pentes élevées. Dans ces conditions, il peut être déterminé que pour un même mélange U/Cd, le modèle d'additivité CA prédit des effets plus sévères que ceux prédits par le modèle d'additivité RA<sup>1</sup>. Ceci explique les interprétations contrastées obtenues dans cette étude. En effet, lorsque les données ont été analysées sur la base des concentrations U/Cd dans la gélose, le niveau d'interaction était suffisamment élevé pour qu'un antagonisme soit identifié à partir des additivités CA et RA, pour la majorité des données<sup>2</sup>. Cependant, en analysant les données sur la base des concentrations U/Cd dans le tapis bactérien, étant donné qu'une partie importante des effets observés a été expliquée par le transfert réduit du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien, le niveau de déviation de l'additivité résiduel pour l'ensemble des données se retrouve amoindri. Dans le cas du NLP total, les données sont globalement localisées entre les prédictions des additivités CA et RA, correspondant à la situation C de la figure 1.5<sup>3</sup>. Ainsi, sur la base de l'additivité CA, un antagonisme est identifié tandis que sur la base de l'additivité RA, une synergie est identifiée. Dans le cas de l'ALC maximale, le positionnement des données correspond à une situation intermédiaire entre la situation B et C (Fig. 1.5) : les données sont globalement localisées sur l'isobole de l'additivité RA.

Que peut-on conclure à partir de ces résultats contrastés ? Comme nous l'avons men-

---

1. Voir exemple figure 1.5 (p. 19).

2. Pour les niveaux de dose supérieurs à l' $EC_{31}$  pour l'ALC maximale ou pour les ratios [U]/[Cd] inférieurs à 95.

3. p. 19.



tionné dans le premier chapitre<sup>1</sup>, il est pratiquement impossible, dans la pratique, de déterminer avec certitude quelle additivité de référence (CA ou RA) il conviendrait le mieux d'utiliser pour l'étude des effets d'un mélange. Alternativement, certains auteurs ont proposé d'utiliser à la fois les principes d'additivité CA et RA (e.g. Jonker *et al.*, 2005). Dans ce cas, soit (i) on utilise comme référence le modèle d'additivité décrivant le mieux les données puis on teste si des déviations significatives de cette additivité se produisent (e.g. Jonker *et al.*, 2005 ; Loureiro *et al.*, 2010), soit (ii) on considère que l'additivité CA et RA encadrent une « fenêtre de prédiction de l'additivité ». Une interaction est alors uniquement identifiée lorsque les données dévient significativement de cette fenêtre de prédiction (e.g. Altenburger *et al.*, 2003 ; Walter *et al.*, 2002).

Dans ce chapitre, la meilleure description des données a été obtenue avec le modèle d'additivité de référence RA pour les deux critères d'effet ( $R^2$  : 0,82 vs 0,79 pour l'ALC maximale et 0,88 vs 0,84 pour le NLP total)<sup>2</sup>. Ainsi, en suivant le principe (i), nous pouvons conclure, sur la base de l'additivité RA, qu'une synergie modérée se produit entre l'U et le Cd sur le NLP total tandis qu'aucune déviation significative ne se produit sur l'ALC maximale. Par contre, en suivant le principe (ii), les données ne déviaient pas significativement de la fenêtre d'additivité, sauf pour le NLP total, dans le cas de mélanges à niveaux de dose supérieurs à l'EC<sub>95</sub>, pour lesquels un antagonisme significatif a été identifié. La déviation étant minime et se produisant dans une zone proche de 100 % d'effet, elle peut cependant être considérée comme peu vraisemblable. Il n'y aurait donc pas d'autre interaction entre l'U et le Cd que celle identifiée au niveau des transferts des ETM de la gélose vers le tapis bactérien.

### 7.4.3 Évolution des effets combinés au cours du temps

Sur la base de l'additivité RA, différents types d'effets combinés ont été identifiés au cours du temps pour l'ALC et le NLP. Pour l'ALC, une synergie transitoire a été identifiée tandis que pour le NLP, différents types de déviation ont été identifiés et un léger antagonisme est devenu significatif au dernier temps de mesure, pour les forts niveaux de dose.

Dans le cas du NLP, pour certaines conditions d'exposition, le niveau de la synergie identifiée aux premiers temps d'exposition, diminue à partir de 7,5 j et conduit à un basculement vers un antagonisme. L'effet observé de ces mélanges diminue donc au cours du temps par rapport aux effets prédits par l'additivité RA, à partir de la toxicité des substances seules. Ces conditions correspondent à des mélanges dont la concentrations en U

---

1. Voir section 1.1.2.4 (p. 17).

2. Voir tableau S.3 (p. 230), modèles d'additivité de référence.

est proche de l'EC<sub>50</sub> (*i.e.* entre 41,5 et 64,1 mmol mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>). Les concentrations d'U ou de Cd seul proches de leurs EC<sub>50</sub> estimées respectives engendrent des effets observés contrastés parmi les individus. En effet, certains ont une croissance et une reproduction tardives qui deviennent conséquentes seulement autour du quatrième jour. Tandis que d'autres ont une croissance et une reproduction négligeables<sup>1</sup>. Le développement tardif de certains de ces individus est notamment à l'origine de la diminution des EC<sub>50</sub> du NLP total au cours du temps, observée pour l'U et le Cd. Dans le cas des mélanges mentionnés, l'amplitude de la reproduction et/ou la proportion d'individus retardés par rapport aux individus ayant une reproduction nulle serait légèrement plus importante que les prévisions de l'additivité RA, à partir des substances seules. Ceci aboutit à l'identification d'un faible niveau d'antagonisme. Ce phénomène se produisant également au niveau de la croissance (ALC), une diminution des effets combinés par rapport à l'additivité peut également être observée pour certaines conditions pour ce critère d'effet. Mais à l'inverse du NLP, un antagonisme significatif n'est pas identifié. Néanmoins, les paramètres de déviation du modèle RA DL, proche de la significativité ( $p [\chi^2] = 0,06$ ), indiqueraient un antagonisme pour les niveaux de dose de mélange supérieurs à l'EC<sub>45</sub>.

Dans le cas de l'ALC, l'identification d'une synergie transitoire ( $t = 2,2$  et  $3,5$  j) est probablement la résultante d'un léger retard de croissance des individus exposés à certaines conditions de mélange U/Cd, qui est ensuite globalement compensé. Ce retard n'a pas pu être relié à des concentrations particulières d'U ou de Cd en mélange.

Plus généralement, pour les deux critères d'effet, différents motifs d'interaction (*i.e.* interaction simple : S/A, et complexe : DR ou DL) ont été identifiés au cours du temps sur la base de l'additivité RA. De telles transitions versatiles dans les meilleurs modèles de déviation MixTox identifiés ont également été observées au cours d'autres études (Baas *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2015). Celles-ci pourraient être liées à la variabilité inhérente aux données expérimentales pour chaque temps de mesure.

## 7.5 Conclusion

Avec la prise en compte de l'interaction entre l'U et le Cd dans le milieu d'exposition, une partie importante du fort antagonisme identifié précédemment a pu être expliqué. D'un côté, en se basant sur l'additivité RA (permettant la meilleure description des données), la réanalyse des effets combinés, sur les critères d'effet finaux mais également au cours du temps, en utilisant les concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien, laisse

---

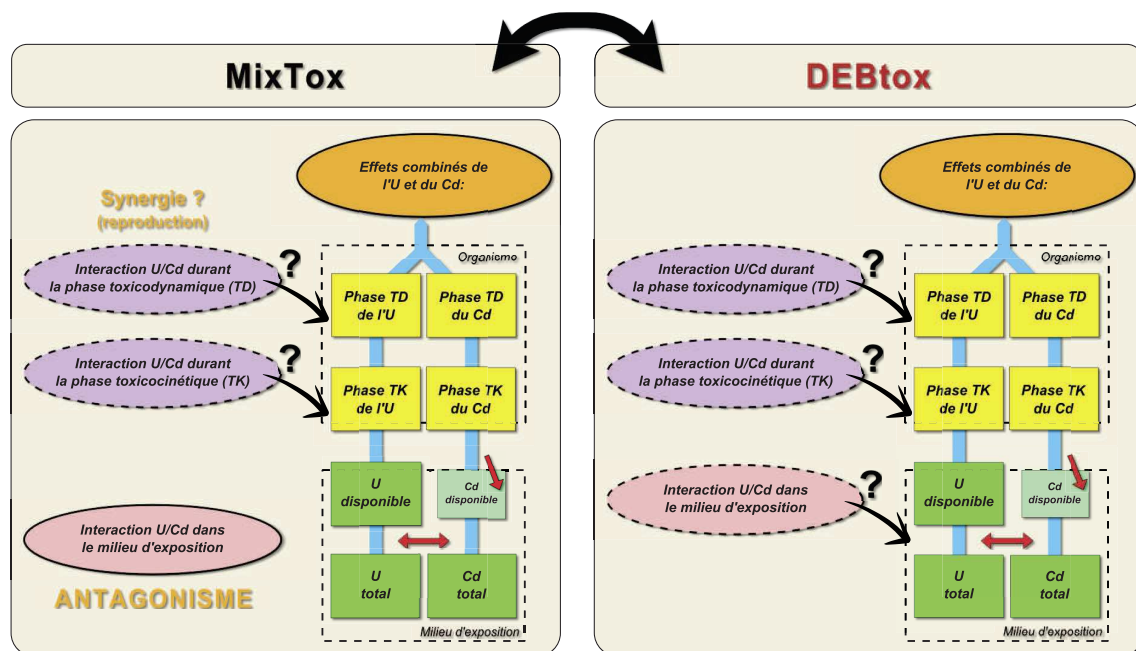
1. Voir figure S.7 (p. 234).

supposer que d'autres mécanismes d'interaction pourraient avoir lieu au niveau des individus, c'est-à-dire, durant les phases toxicocinétiques ou toxicodynamiques. Ils aboutiraient notamment à l'identification d'une synergie modérée au niveau du nombre de larves produites. Par ailleurs, même si dans l'ensemble, la nature des effets combinés apparaît peu changeante au cours du temps, cette étude suggère que des modulations, en lien avec la cinétique d'apparition des effets, peuvent se produire. Les hypothèses initiales (i) et (ii) seraient donc rejetées.

D'un autre côté, si la fenêtre d'additivité définie par les deux additivités (CA et RA) est considérée, aucune interaction, autre que la réduction du transfert du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien, n'entrerait en jeu et l'hypothèse initiale (i) serait vérifiée.

Dans ce chapitre, le modèle descriptif MixTox a été appliqué à l'analyse de jeux de données issus de différents temps d'exposition, séparément. Cependant, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, d'autres modèles permettent d'intégrer directement la notion de temps dans la description des effets toxiques. Ceux-ci pourraient constituer une structure intéressante : d'une part, plus robuste grâce à l'analyse de l'ensemble des données au cours du temps, tout en limitant le nombre de paramètres utilisé (Baas *et al.*, 2007), et d'autre part, permettant de formuler et de tester des hypothèses mécanistes sur l'origine des interactions (Jager *et al.*, 2014), pour l'étude de la toxicité des mélanges. Dans le chapitre suivant, nous présentons la mise en œuvre du modèle mécaniste DEBtox pour l'analyse des effets de l'U et du Cd, seuls et en mélanges, sur le nématode *C. elegans*.

# Modélisation mécaniste des effets de l'U et du Cd, comparaison avec l'approche MixTox



## 8.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous proposons la réanalyse des effets combinés de l'U et du Cd sur *C. elegans* à partir de l'approche mécaniste DEBtox, dans le but de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus à partir du modèle descriptif MixTox. À l'inverse du modèle MixTox, le modèle DEBtox permet l'analyse intégrée de l'ensemble des données de croissance et de reproduction au cours du temps à partir d'un même jeu de paramètres.

Dans la littérature, deux exemples de comparaison de l'analyse des effets de mélanges à partir des approches MixTox et DEBtox ont été proposés. L'étude de Baas *et al.* (2007) porte sur les effets de mélanges binaires d'ETM sur la survie du collembole *F. candida*. Pour le mélange Cu/Cd, à l'instar de notre étude, une synergie simple se développant en synergie dépendante du niveau de dose du mélange au cours du temps a été identifiée sur la base de l'additivité RA. Sur la base de l'additivité CA, des effets combinés synergiques, additifs ou antagonistes ont été identifiés au cours du temps. Au contraire, aucune interaction n'a été identifiée à partir du modèle mécaniste utilisé. L'analyse des données à tous les temps d'exposition avec le même jeu de paramètres, rendrait la méthode moins sensible aux variations aléatoires (Baas *et al.*, 2007). Dans l'étude de Jager *et al.* (2014) portant sur l'effet du mélange Cd/fluoranthène sur *C. elegans*, un antagonisme a été identifié à la fois à partir des modèles MixTox et DEBtox. Ce dernier a permis en plus de tester différents mécanismes d'interaction, en lien avec les modes d'action DEBtox des substances. L'hypothèse la plus probable, retenue par les auteurs, est que le Cd pourrait réduire l'assimilation de nourriture des nématodes qui, en conséquence, diminuerait l'internalisation du fluoranthène, majoritairement apporté par cette voie (Jager *et al.*, 2014). L'utilisation du modèle DEBtox pour étudier les effets combinés de l'U et du Cd pourrait donc nous permettre, d'une part, d'identifier une éventuelle interaction entre ces ETM, et d'autre part, de proposer un mécanisme possible pour cette interaction.

En complément des effets de l'U et du Cd sur l'augmentation de longueur corporelle et sur le nombre de larves produites, jusqu'alors considérés, des effets sur la longueur à l'éclosion, la longueur à la puberté ( $L_p$ ) ainsi que sur la quantité de réserve contenue dans les œufs pondus ont également été analysés dans le but de réduire le nombre de paramètres ajustés et de vérifier les hypothèses du modèle DEBtox simplifié utilisé<sup>1</sup>. Des études ont par exemple montré que le Cd pouvait affecter la  $L_p$  de *C. elegans* (e.g. Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Swain *et al.*, 2010).

---

1. Voir § ... au modèle DEBtox standard pour l'écotoxicologie (p. 26).

Les objectifs spécifiques de ce chapitre sont multiples :

- Vérifier les hypothèses de la constance de la  $L_p$  et de la quantité de réserve allouée à un œuf, y compris dans le cas d'une exposition à l'U et/ou au Cd.
- Modéliser la croissance et la reproduction des individus témoins non exposés et comparer les paramètres physiologiques ainsi obtenus avec ceux d'autres études de la littérature.
- Modéliser la croissance et la reproduction des individus exposés à l'U et au Cd seuls sur la base des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien, identifier le mode d'action DEBtox de l'U et du Cd<sup>1</sup> et comparer les paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques ainsi obtenus avec ceux d'autres études de la littérature.
- Analyser les effets combinés U/Cd sur la base des concentrations dans la gélose, au moyen des paramètres DEBtox obtenus pour ces ETM seuls et d'un paramètre d'interaction, afin de déterminer si ce modèle permet de confirmer l'interaction antagoniste identifiée avec le modèle descriptif MixTox (Chp. 4) ainsi que son origine.
- Analyser les effets combinés U/Cd sur la base des concentrations dans le tapis bactérien, au moyen des paramètres DEBtox obtenus pour ces ETM seuls et d'un paramètre d'interaction, afin de déterminer si une interaction au niveau des organismes (durant les phases toxicocinétiques ou toxicodynamiques) pourrait se produire et comparer les interprétations ainsi obtenues avec celles obtenues à partir du modèle descriptif MixTox. L'hypothèse initiale testée est que les effets combinés sont additifs.
- Dans le cas où d'autres interactions seraient mises en évidence, proposer des hypothèses mécanistes probables, en lien avec les modes d'action DEBtox.

Dans ce chapitre, en raison de la mauvaise description des effets de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites (NLP) total par le modèle DEBtox, l'analyse des effets des substances a été limitée dans un premier temps à la période de 0 à 6,5 j<sup>2</sup>. Dans un second temps, afin d'améliorer la qualité de l'ajustement des données de reproduction, les effets

---

1. Voir § ... *au modèle DEBtox standard pour l'écotoxicologie* (p. 26).

2. Une solution équivalente a par exemple été utilisée par Jager *et al.* (2014).

des ETM sur la  $L_p$  ont été décrits de manière descriptive même si cela engendre une inconsistance (énergétique) dans le modèle<sup>1</sup>, et un second mode d'action produisant des effets directs de l'U et du Cd sur la réserve de spermatozoïdes a été ajouté. Avec ce second mode d'action est faite l'hypothèse que ces deux ETM affectent directement la reproduction de *C. elegans* par une réduction du nombre de spermatozoïdes fonctionnels.<sup>2</sup> Ces modifications ont permis d'analyser l'ensemble des données au cours du temps (*i.e.*  $0 \leq t \leq 10,8j$ ) et ainsi de comparer complètement les interprétations des effets combinés de l'U et du Cd sur la base des modèles DEBtox et MixTox. Pour les différentes étapes de l'analyse, dans la suite du chapitre, nous présentons dans un premier temps la modélisation pour  $t \leq 6,5j$  à partir du modèle DEBtox simplifié sans modification puis, nous présentons dans un second temps la modélisation sur l'ensemble de la durée d'exposition ( $t \leq 10,8j$ ) à partir du modèle comportant les modifications évoquées ci-dessus.

## 8.2 Méthodes spécifiques

### 8.2.1 Mesure et analyse des critères d'effet additionnels de cette étude

Les résultats de la première série de mesure de longueur corporelle, obtenus à partir de photographies réalisées en moyenne 3 h après la date d'éclosion théorique ont été considérés comme les longueurs à l'éclosion ( $L_0$ ). À cette date, l'éclosion ne s'était d'ailleurs pas encore produite pour certaines conditions.

La mesure de la longueur à la puberté ( $L_p$ ) n'est pas aisée lorsque les contaminants affectent la croissance des individus exposés (*e.g.* l'U et le Cd) car ceux-ci atteignent la puberté à des dates différentes. Pour cette expérience, les longueurs des individus mesurées au moment où ceux-ci n'avaient pondé qu'entre 1 et 5 œufs ont été considérées comme les  $L_p$  ( $n = 27$ ). Pour les individus contrôles, une production de 5 œufs est réalisée en moyenne en 2,7 h, ce qui correspond à un accroissement de longueur corporelle de seulement 28  $\mu\text{m}$ . Pour augmenter le nombre d'observations, parmi les conditions où la  $L_p$  n'a pas été observée, si le coefficient de variation des mesures de longueurs corporelles encadrant la  $L_p$  non observée était inférieur au coefficient de variation des données de  $L_p$  observées pour les individus contrôles, les moyennes des deux longueurs encadrantes ont été considérées comme des observations de la  $L_p$  (*i.e.*  $n = 8$ ).

---

1. Une solution équivalente a par exemple été proposée par Swain *et al.* (2010).

2. Une solution équivalente a par exemple été proposée par Goussen *et al.* (2015) pour décrire les effets de l'U ; voir § *Adaptations pour la reproduction* (p. 40).

Parce qu'une mesure directe de la masse d'œufs de *C. elegans* est difficilement réalisable, Byerly *et al.* (1976) estiment la masse d'un œuf à 35 ng, une estimation indirecte de la quantité de réserve contenue dans un œuf a été réalisée à partir de l'estimation de son volume. Celle-ci repose sur plusieurs hypothèses simplificatrices. La taille des œufs a été mesurée sur des photographies à l'aide de la fonction d'ajustement d'ellipse du logiciel imageJ. Cette dernière permet de mesurer la longueur majeure (a) et mineure (b) de l'ellipse. Le volume des œufs ( $V_{\text{œuf}}$ ) a ensuite été calculé à l'aide de la formule suivante, sous l'hypothèse que l'épaisseur d'un œuf est égale à la longueur mineure <sup>1</sup> :

$$V_{\text{œuf}} = \frac{4}{3} \pi a b^2 \quad (8.1)$$

Enfin, sous l'hypothèse importante d'une densité de réserve constante, le volume d'un œuf est proportionnel à la quantité de réserve accumulée.

Les effets de l'U et du Cd sur les critères d'effet  $L_0$ ,  $L_p$  et  $V_{\text{œuf}}$  ont été analysés par régression linéaire multiple à l'aide du logiciel d'analyse statistique R (v. 3.0.3). Aucun effet significatif de l'U ou du Cd n'a été identifié sur la  $L_0$  ( $p[t] > 0,05$ ). La  $L_0$  a donc été fixée à  $220 \mu\text{m}^2$  pour l'ensemble des analyses.

### 8.2.2 Procédure d'ajustement du modèle DEBtox

Pour l'ensemble de l'étude, le temps a été exprimé en jours après éclosion théorique <sup>3</sup>.

L'ajustement du modèle a été réalisé en plusieurs étapes successives d'apprentissage. La première étape a consisté à ajuster les paramètres physiologiques (*i.e.*  $\alpha$ ,  $L_f$ ,  $L_m$ ,  $r_B$ ,  $R_m$  et  $R_{max}$ ) à partir des données des individus non exposés. La  $L_p$  a été fixée à  $984 \mu\text{m}^4$ . Ensuite, pour les différents modes d'action DEBtox considérés, les paramètres TK et TD ont été ajustés à partir des données des individus exposés aux substances seules, sur la base des concentrations dans la gélose ou dans le tapis bactérien. Dans le cadre de l'additivité  $CA_{Dt}$ , deux ajustements par mode d'action ont été réalisés en miroir sur l'ensemble des données d'effet des substances seules (U et Cd) : la toxicité de l'U a servi de référence pour l'estimation du potentiel toxique du Cd (paramètre  $W$  <sup>5</sup>) et inversement. Des ajustements de qualité similaire doivent théoriquement être obtenus. Dans le cadre de l'additivité  $RA_{Dt}$ , les

1. La troisième dimension de l'œuf n'est pas mesurable sur une photographie.

2. Valeur moyennée pour  $n = 46$  avec un écart-type de  $14 \mu\text{m}$ . Nørhove *et al.* (2012) rapportent une  $L_0$  de  $210 \pm 30 \mu\text{m}$  ( $n = 5$ ).

3. Estimée à partir de la date de ponte moyenne lors de la synchronisation des individus et du temps d'incubation moyen à  $20^\circ\text{C}$  (11 h, Byerly *et al.*, 1976).

4. Moyenne de 5 observations (écart-type = 40).

5. Voir équations 1.7 (p. 29).



toxicités de l'U et du Cd ont été ajustées de manière indépendante, d'un côté sur les données d'effet de l'U seul, et de l'autre sur celles du Cd seul. Les différents jeux de paramètres obtenus ont enfin été utilisés dans la phase de confrontation des modèles d'additivité  $CA_{Dt}$  et  $RA_{Dt}$  aux données expérimentales des individus exposés aux mélanges.

Afin de représenter d'éventuelles interactions, un paramètre ( $a$ ) a été ajouté au modèle. Celui-ci a été placé de manière à affecter l'un des paramètres TK/TD ou la concentration d'exposition externe de l'U ou du Cd, uniquement pour les données issues d'une coexposition U/Cd. Par exemple avec un paramètre  $a$ , tel que  $0 < a < 1$ , qui affecte le paramètre  $k_{eCd}$ , une diminution de l'internalisation du Cd pour les individus exposés au mélange U/Cd est représentée. Pour tenir compte de l'incertitude associée aux paramètres TK/TD des substances seules, la procédure d'ajustement suivante a été utilisée : les paramètres TK/TD ont été réajustés, en présence ou en absence du paramètre d'interaction  $a$  (lui-même également ajusté), à partir de l'ensemble des données d'effet (ETM seuls et en mélange). Pour déterminer si l'ajout du paramètre d'interaction améliore significativement l'ajustement, les modèles avec et sans paramètre d'interaction étant emboîtés, le test du ratio de vraisemblance a été utilisé comme approximation, même si les hypothèses d'indépendance des mesures, de normalité et d'homoscédasticité n'étaient pas vérifiées (Jager *et al.*, 2014).

### 8.2.3 Modifications du modèle DEBtox

Pour décrire l'internalisation de l'U et du Cd par les nématodes, l'équation suivante a été utilisée :

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{k_e f_{sf}}{l} (C_e - c_i) - c_i \frac{3}{l} \frac{dl}{dt} \quad (8.2)$$

avec  $C_e$  : la concentration externe du composé toxique ;  $c_i$  : la concentration interne  $C_i$  du composé toxique normalisée par son BCF ;  $k_e$  : le taux d'élimination ;  $f_{sf}$  : le taux d'ingestion normalisé modulé par la fonction  $s_f$ <sup>1</sup> ;  $l$  : la longueur de l'organisme normalisée par la longueur maximale.

Avec cette équation est faite l'hypothèse que les nématodes sont principalement exposés à ces deux ETM *via* l'alimentation (Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Goussen *et al.*, 2015 ; Jager *et al.*, 2014 ; Swain *et al.*, 2010). Dans cette étude, elle a permis l'obtention de meilleurs ajustements qu'avec l'équation d'internalisation classique<sup>2</sup>.

Afin d'améliorer la description du NLP total des individus exposés à l'U, Goussen *et al.* (2015) ont proposé l'utilisation d'un mode d'action supplémentaire produisant un effet direct sur la réserve de spermatozoïdes, en combinaison avec le mode d'action « réduction de

1. Voir équation 1.10 (p. 40).

2. Voir équation 1.5 (p. 27).

l'assimilation de nourriture » (①). L'évolution du NLP au cours du temps se calcule dans ce cas à partir de l'équation suivante <sup>1</sup> :

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_m}{1 - l_p^3} (1 - s(c_i)) \left[ \dots \right] \frac{R_{max} \exp(-s(c_i)) - R}{R_{max} \exp(-s(c_i))} \quad (8.3)$$

Dans le reste du chapitre, l'utilisation de cette combinaison particulière de modes d'action pour les ajustements (à la place du mode d'action ① seul) est mentionnée explicitement.

## 8.3 Résultats

### 8.3.1 Effets de l'U ou du Cd sur la $L_p$ et le volume des œufs

Les effets de l'U ou du Cd sur le volume des œufs et la  $L_p$  ont été analysés par régression linéaire multiple afin de vérifier certaines des hypothèses sur lesquelles repose la construction du modèle DEBtox simplifié.

La régression indique que l'U réduit significativement le volume des œufs ( $p[t] = 0,01$ ) tandis que pour le Cd, l'effet n'est pas significatif ( $p[t] = 0,08$ ). L'effet de l'U reste cependant faible et le modèle n'explique que 5 % de la variabilité. En effet, la grande majorité des volumes d'œuf mesurés pour les individus exposés à l'U et/ou au Cd ne se distinguent pas de l'étendue des mesures obtenues pour les individus non exposés <sup>2</sup>.

Au niveau de la  $L_p$ , la régression indique un effet significatif de l'U et du Cd ( $p[t] = 9 \times 10^{-9}$  et  $p[t] = 1 \times 10^{-5}$ , respectivement). La régression explique 70 % de la variabilité des données. Par exemple, des individus exposés à  $1,16 \text{ mmol}_U \text{ L}^{-1}$  <sup>3</sup> ou  $0,040 \text{ mmol}_{Cd} \text{ L}^{-1}$  <sup>4</sup> ont débuté leur reproduction à partir d'une longueur corporelle proche de  $630 \mu\text{m}$ . En comparaison, les individus non exposés débutent généralement leur reproduction à une longueur corporelle proche de  $1000 \mu\text{m}$ . D'autre part, une relation linéaire significative a été obtenue entre la  $L_p$  et la longueur corporelle maximale atteinte par les individus  $L_m$  <sup>5</sup>. Afin de caractériser la nature des effets combinés de l'U et du Cd sur la  $L_p$ , les données ont été analysées à l'aide du modèle MixTox, à partir des concentrations dans le tapis bactérien. La plus petite  $L_p$  mesurée (*i.e.*  $578 \mu\text{m}$ ) a été considérée comme le niveau de réponse à 100 % d'effet. L'additivité RA a permis un meilleur ajustement des données que l'additivité CA ( $R^2 : 0,77$  vs

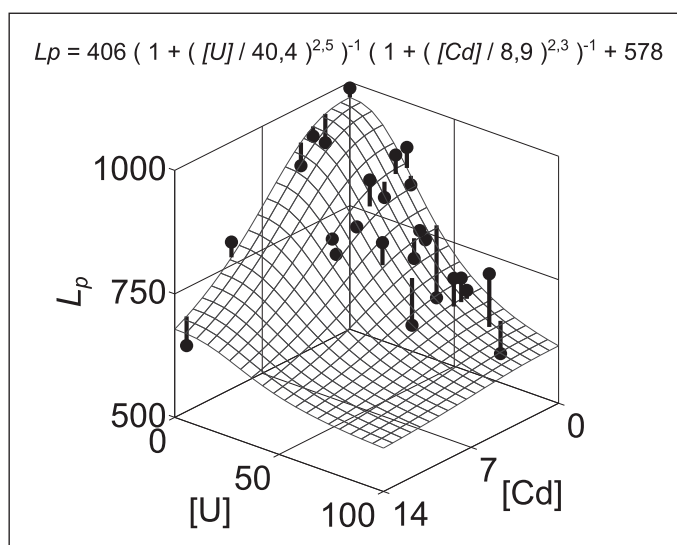
1. Voir équation 3.9b (p. 87) en comparaison.

2. Voir figure S.10 (p. 242).

3. Soit  $41,5 \text{ nmol}_U \text{ mg}_{dw}^{-1}$  dans le tapis bactérien.

4. Soit  $13,5 \text{ nmol}_{Cd} \text{ mg}_{dw}^{-1}$  dans le tapis bactérien.

5. Voir figure S.11 (p. 242).



**FIGURE 8.1** Ajustement du modèle d'addition des réponses sans interaction pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur la longueur à la puberté ( $L_p$ ,  $\mu\text{m}$ ) de *C. elegans*, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). ● : données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ ); Grille : valeurs modélisées de la surface de réponse; Barres verticales : distance entre les deux.

0,71). Aucune déviation significative de l'additivité RA n'a été identifiée. L'ajustement du modèle d'additivité RA est présenté en figure 8.1.

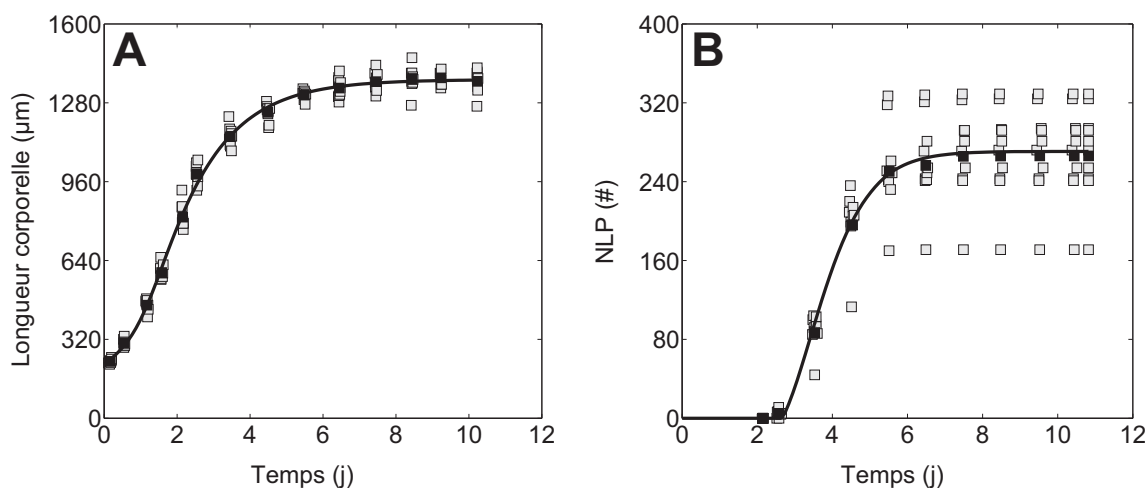
### 8.3.2 Ajustements du modèle DEBtox pour les individus non exposés

Le modèle DEBtox simplifié incluant les modifications pour *C. elegans*, a permis le bon ajustement des données (Fig. 8.2). Les paramètres ajustés (ainsi que ceux d'une autre étude comparable) sont présentés dans le tableau 8.1. Ces paramètres ajustés ont ensuite été maintenus fixés pour l'analyse des effets de l'U et/ou du Cd.

### 8.3.3 Ajustements du modèle DEBtox pour les individus exposés à l'U ou au Cd

Les données issues des individus exposés à l'U ou au Cd seul ont été analysées avec le modèle DEBtox dans le but d'identifier le mode d'action les décrivant le mieux. Des effets ayant été observés à la fois sur la croissance et la reproduction des nématodes exposés à l'U comme au Cd, seuls les modes d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » (①) et « augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité » (②) ont été testés<sup>1</sup>. D'un côté, les paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques (TK/TD) de l'U et

1. Voir § ... au modèle DEBtox standard pour l'écotoxicologie (p. 26).



**FIGURE 8.2** Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle (**A**) et du nombre de larves produites (NLP, **B**) au cours du temps (j après éclosion), des nématodes non exposés. ■ : données moyennées ( $n = 10$ ); □ : données individuelles; *Trait plein* : prédiction du modèle.

**Tableau 8.1** Ajustement des paramètres physiologiques du modèle DEBtox simplifié à partir des données de croissance et de reproduction des nématodes non exposés. <sup>a</sup>

Paramètres	Présente étude		Goussen <i>et al.</i> , 2015	
	Valeur	CI <sub>95</sub>	Valeur	SD
$f$ (-)	1,00*	–	0,97	0,95 : 0,99
$g$ (-)	10*	–	10	5 : 15
$a$ (-)	0,87	0,84 : 0,90	0,88	0,81 : 0,95
$L_0$ (µm)	220*	–	219	175 : 264
$L_f$ (µm)	400	378 : 426	418	367 : 469
$L_m$ (µm)	1403	1400 : 1406	1414	1368 : 1460
$r_B$ (j <sup>-1</sup> )	0,76	0,73 : 0,80	0,82	0,70 : 0,94
$L_p$ (µm)	984*	–	764	677 : 851
$R_m$ (# j <sup>-1</sup> )	417	389 : 435	379	331 : 428
$R_{max}$ (#)	271	267 : 274	312	285 : 339

<sup>a</sup>. CI<sub>95</sub> : intervalle de confiance 95 % ; SD : Écart-type ; \* : paramètre non ajusté.

**Tableau 8.2** Bilan des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques pour les modes d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » et « augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité » du modèle DEBtox sur les données d'exposition à l'U et au Cd seuls, sur la base des concentrations dans la gélose ou le tapis bactérien.<sup>a</sup>

No Ajustement	ETM	[C]	MoA	Dépendance	$\ell$
<u>1</u>	<u>Cd</u>	<u>G</u>	①	-	<u>-16371</u>
2	Cd	G	②	-	-16502
<u>3</u>	<u>U</u>	<u>G</u>	①	-	<u>-16226</u>
4	U	G	②	-	-16250
5	Cd	G	①	U~Cd	-16458
6	Cd	G	②	U~Cd	-16609
5	U	G	①	U~Cd	-17818
6	U	G	②	U~Cd	-17879
7	Cd	G	①	Cd~U	-17325
8	Cd	G	②	Cd~U	-17585
7	U	G	①	Cd~U	-16228
8	U	G	②	Cd~U	-16265
<u>9</u>	<u>Cd</u>	<u>TB</u>	①	-	<u>-16368</u>
10	Cd	TB	②	-	-16502
<u>11</u>	<u>U</u>	<u>TB</u>	①	-	<u>-15991</u>
12	U	TB	②	-	-16037
13	Cd	TB	①	U~Cd	-16756
14	Cd	TB	②	U~Cd	-16580
13	U	TB	①	U~Cd	-16563
14	U	TB	②	U~Cd	-16993
15	Cd	TB	①	Cd~U	-17068
16	Cd	TB	②	Cd~U	-17193
15	U	TB	①	Cd~U	-16016
16	U	TB	②	Cd~U	-16104

*a.* ETM : élément trace métallique ; [C] : concentration de l'ETM dans la gélose (G) ou dans le tapis bactérien (TB) ; MoA : mode d'action DEBtox testé, ① : « réduction de l'assimilation de nourriture », ② : « augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité » ; Dépendance : dans le cadre du  $CA_{Dt}$ , soit la toxicité de l'U est exprimée en fonction de celle du Cd (U~Cd), soit la toxicité du Cd est exprimée en fonction de celle de l'U (Cd~U) ;  $\ell$  : maximum de log-vraisemblance. Les meilleurs ajustements obtenus pour l'U et le Cd sont soulignés.

**Tableau 8.3** Estimation des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd selon le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » du modèle DEBtox avec  $t \leq 6,5j$ <sup>a</sup>

	Présente étude (gélose)		Goussen <i>et al.</i> (2015) (gélose)		Présente étude (tapis bactérien)	
	Valeur	CI <sub>95</sub> <sup>b</sup>	Valeur	SD	Valeur	CI <sub>95</sub>
$k_{eU}$	6,36	5,99 : 6,72	3,84	1,20 : 6,48	1,94	1,80 : 2,12
$b_{TU}$	1,64	1,61 : 1,68	0,31	0,28 : 0,34	0,014	0,014 : 0,014
$c_{0U}$	0,93	0,92 : 0,94	0,42	0,36 : 0,48	16,18	15,70 : 16,64
$k_{eCd}$	0,88	0,87 : 0,99	–	–	0,95	0,94 : 0,96
$b_{TCd}$	18,04	17,78 : 18,29	–	–	0,054	0,053 : 0,055
$c_{0Cd}$	0,001	0,001 : 0,002	–	–	0,48	0,47 : 0,53

a. Ajustements réalisés sur la base des concentrations en U ou Cd dans la gélose ou le tapis bactérien. CI<sub>95</sub> : intervalles de confiance 95 % ; SD : Écart-type ;  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $L\text{ mmol}^{-1}$  ou  $\text{mg}_{\text{dw}}\text{ nmol}^{-1}$ ) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $\text{mmolL}^{-1}$  ou  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ).

b. Voir figure S.12 (p. 243).

du Cd ont été ajustés séparément en vue d'un ajustement des données d'effet en mélange sur la base de l'additivité RA<sub>Dt</sub>. De l'autre, les potentiels de toxicité de l'U et du Cd ont été ajustés alternativement sur la base de la toxicité de l'autre ETM, en vue d'un ajustement des données d'effet en mélange sur la base de l'additivité CA<sub>Dt</sub>.<sup>1</sup> Par ailleurs, en raison de la mauvaise description des effets de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites (NLP) total par le modèle DEBtox, l'analyse a été limitée dans un premier temps à  $t \leq 6,5j$ .

Les résultats des différents ajustements sur la base des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien sont présentés dans le tableau 8.2. Les paramètres des meilleurs ajustements ainsi que ceux d'une autre étude comparable sont présentés dans le tableau 8.3. Les meilleurs ajustements des données de longueur corporelle et du nombre de larves produites cumulé (NLP), obtenus sur la base des concentrations dans la gélose, sont présentés dans les figures S.13 et S.14<sup>2</sup>.

La meilleure description des effets de l'U ou Cd seul, sur la base des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien, a été obtenue à partir du mode d'action ①. Le mode d'action ② a néanmoins permis des ajustements proches, notamment pour l'U. Lorsque le potentiel de toxicité de l'U ou du Cd a été ajusté en fonction de la toxicité de l'autre ETM (dans une optique de l'utilisation de l'additivité CA<sub>Dt</sub>), de moins bons ajustements ont été obtenus (Tab. 8.2, U~Cd et Cd~U). Ceci suggère que les développements des effets de l'U

1. Voir équations 1.7 (p. 29) et section 3.6.3.4 (p. 89).

2. p. 244 et 245.

et du Cd seul, au cours du temps, sont trop différents pour être décrits à partir de paramètres  $b_T$  et  $c_0$  communs, après addition des concentrations internes au moyen du paramètre  $W$ . Les meilleurs paramètres TK/TD obtenus indépendamment pour l'U et le Cd sont en effet plutôt différents (Tab. 8.3). Le paramètre  $k_e$  de l'U indique que le modèle prédit une internalisation très rapide de cet ETM. L'état stationnaire est quasiment atteint au bout d'un jour pour l'ensemble des conditions (Fig. S.13, C). La vitesse d'internalisation prédite du Cd est pour sa part plus modérée (Fig. S.14, C). L'état stationnaire de la plus forte concentration n'est atteint qu'au bout d'approximativement 3 j.

Bien que l'analyse ait été limitée à  $t \leq 6,5$  j en raison des difficultés du modèle DEBtox à décrire les effets de l'U ou du Cd sur le NLP total, la description de la reproduction des individus exposés est peu satisfaisante. En raison de l'effet de ces ETM sur la  $L_p$ , décrit précédemment, le début de la reproduction prédit par le modèle est en retard par rapport au début de reproduction observé. Par exemple, pour les individus exposés à  $0,016 \text{ mmol}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ , le début de reproduction estimé est autour de 4 j alors qu'en réalité, celui-ci s'opère probablement entre 3 et 3,5 j. Pour l'U, ce problème est masqué par une sous-estimation des effets sur la croissance lorsque les concentrations dans la gélose sont utilisées. Il est néanmoins visible sur les ajustements réalisés à partir des concentrations dans le tapis bactérien. Le problème de la mauvaise description de la  $L_p$  des individus exposés s'ajoute au problème initial de la mauvaise description du NLP total, lorsque l'ensemble des données de reproduction est analysé (*i.e.*  $0 < t \leq 10,8$ ).

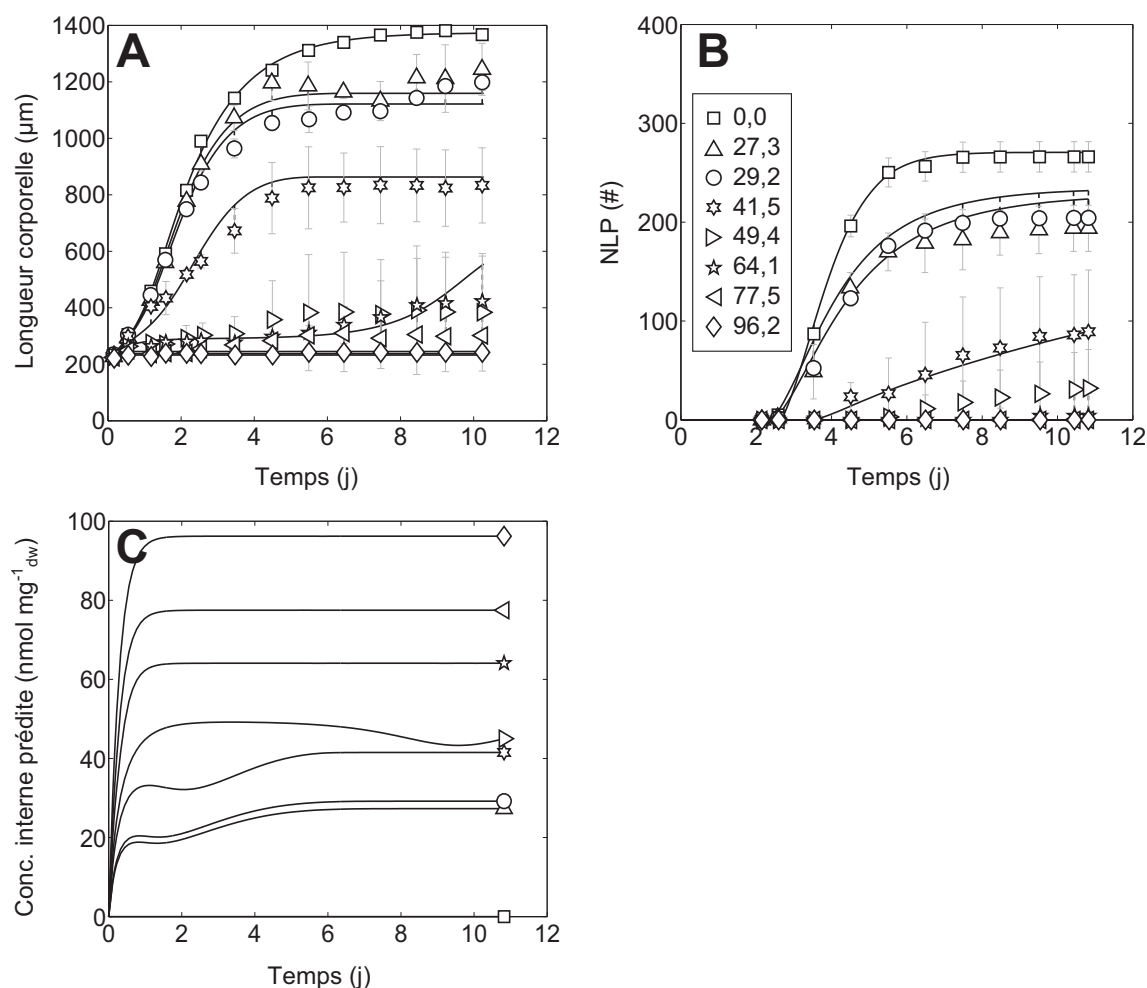
Alternativement, une réanalyse des données d'effet de l'U et du Cd seul a été effectuée à partir d'un modèle DEBtox comportant (i) un module descriptif des effets sur la  $L_p$ , basé sur la surface de réponse de l'addition des réponses, obtenue par l'intermédiaire du modèle MixTox (Fig. 8.1), et (ii) un mode d'action combinant le mode d'action ① et un mode d'action à effet direct sur la réserve de spermatozoïdes. Cette analyse a été étendue à l'ensemble de la période d'exposition (*i.e.*  $0 < t \leq 10,8$ ). Elle a été réalisée sur la base des concentrations dans le tapis bactérien.

Les maximums de vraisemblance et les paramètres obtenus pour les différentes modifications (i et/ou ii) sont présentés dans le tableau S.6<sup>1</sup>. Les ajustements du modèle avec les deux modifications sont présentés dans les figures 8.3 et 8.4.

Les données de croissance et de reproduction des individus exposés à l'U ou au Cd ont été relativement bien décrites pour l'ensemble des temps considérés. Les nouvelles valeurs ajustées des paramètres TK/TD de l'U sont très proches de celles obtenues précédemment (Tab. 8.3 vs S.6, E). Au contraire, des valeurs différentes ont été obtenues pour le Cd. Le

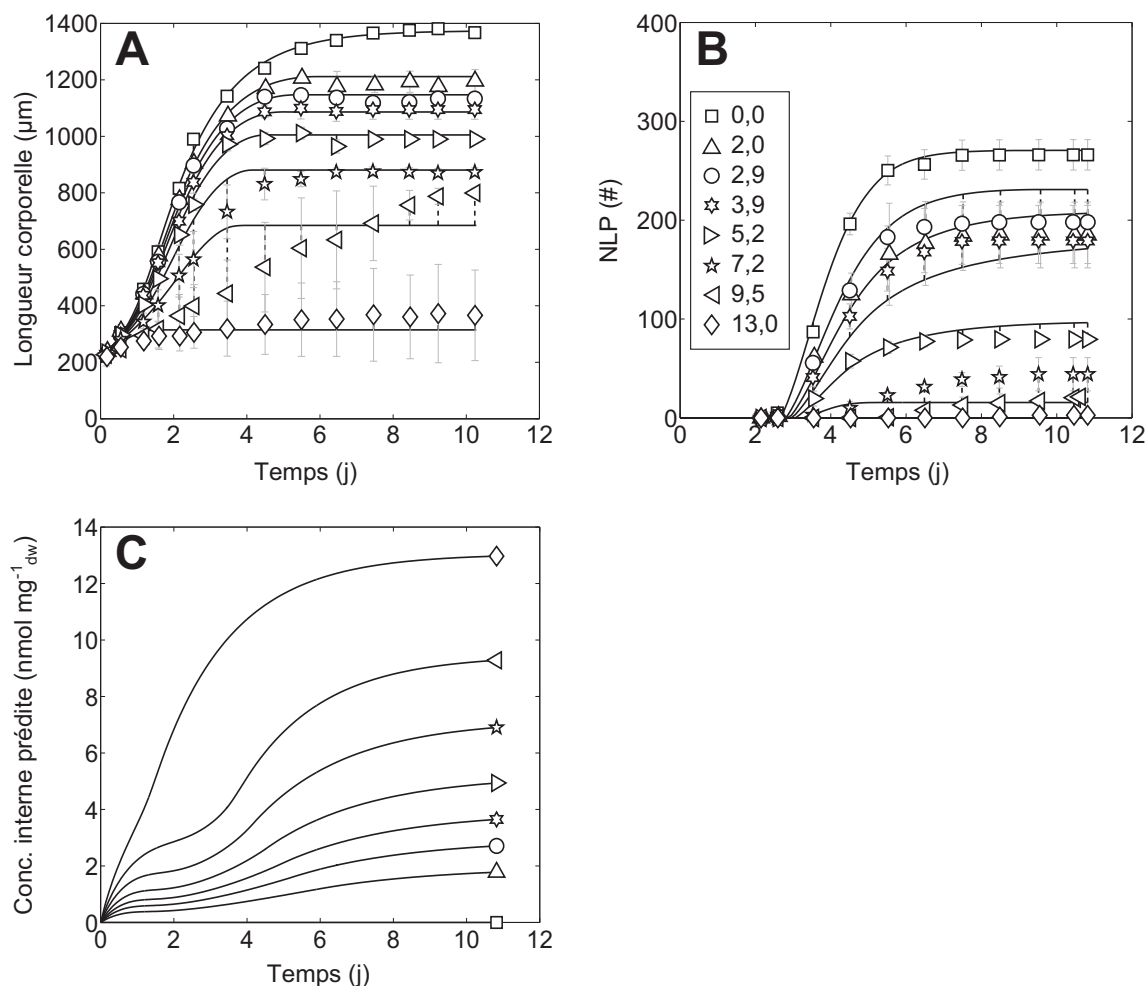
---

1. p. 246.



**FIGURE 8.3** Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle (A) et du nombre de larves produites (NLP) (B) des individus *C. elegans* exposés à l'U au cours du temps (j après éclosion), sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol}_U \text{mg}_{dw}^{-1}$ ).  $\square$  [...]  $\diamond$  : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n = 3$ )  $\pm$  erreur type ; *Trait plein* : prédictions du modèle ; *Tirets* : écart entre les deux. C : Concentrations internes (pondérées par le facteur de bioaccumulation, *i.e.* exprimées en  $\text{nmol mg}_{dw}^{-1}$ ) prédites par le modèle pour les différentes concentrations d'exposition de l'U.





**FIGURE 8.4** Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle (**A**) et du nombre de larves produites (NLP) (**B**) des nématodes exposés au Cd au cours du temps (j après éclosion), sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol}_{\text{Cd}} \text{mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ).  $\square$  [...]  $\diamond$  : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n = 3$ )  $\pm$  erreur type ; *Trait plein* : prédictions du modèle ; *Tirets* : écart entre les deux. **C** : Concentrations internes (pondérées par le facteur de bioaccumulation, *i.e.* exprimées en  $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ) prédites par le modèle pour les différentes concentrations d'exposition du Cd.

meilleur ajustement a été obtenu en diminuant la cinétique d'internalisation du Cd d'un côté et en augmentant le stress lié au Cd internalisé de l'autre (*i.e.* diminution de  $c_{0Cd}$  et augmentation de  $c_{TCd}$ ). Avec  $c_{0Cd}$  ajustée à 0,002 [0,000;0,019] nmol mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>, le modèle prédit un effet du Cd sur les individus dès la plus infime quantité internalisée.

Dans les deux sections suivantes où la toxicité du mélange U/Cd est abordée, étant donné que l'additivité CA<sub>Dt</sub> n'a pas permis une bonne description des effets des ETM seuls, seule l'additivité RA<sub>Dt</sub> a été utilisée.<sup>1</sup>

### 8.3.4 Effets combinés de l'U et du Cd sur la base des concentrations dans la gélose

Les effets combinés de l'U et du Cd ont été analysés sur la base des concentrations dans la gélose, à partir de l'additivité RA<sub>Dt</sub> et du mode d'action ①, pour  $t \leq 6,5j$  (*i.e.* sans les modifications du modèle évoquées ci-dessus). Les résultats des réajustements des paramètres TK/TD de l'U et du Cd, en présence ou en absence du paramètre d'interaction  $a$  sont présentés dans le tableau 8.4.

Dans le modèle DEBtox utilisé, une diminution du niveau d'effet d'un composé toxique  $i$  est obtenue par une diminution des paramètres  $k_{e_i}$  ou  $b_{T_i}$ , ou de la concentration d'exposition externe, ou encore par une augmentation du paramètre  $c_{0_i}$ . Dans l'ensemble, les valeurs ajustées de  $a$  indiquent un antagonisme : une amélioration de l'ajustement B est obtenue par exemple en diminuant la cinétique d'internalisation du Cd ( $k_{eCd}$ , F) ou en augmentant la concentration sans effet de l'U ( $c_{0U}$ , D). Pour l'ajustement J néanmoins, une amélioration de l'ajustement B est obtenue par une diminution de la concentration sans effet du Cd, elle-même déjà faible.

Pour tous les ajustements où une interaction a été prise en compte, l'ajout du paramètre  $a$  a permis d'améliorer significativement l'ajustement des données selon la méthode du ratio de vraisemblance. Cette dernière semble cependant trop sensible pour discriminer les ajustements. Une différence de maximum de log-vraisemblance de 2 entre deux modèles emboîtés (*e.g.*  $\ell_n = -60000$  et  $\ell_{n+1} = -60002$ , avec  $n$  : le nombre de paramètres) est considérée comme significative alors que l'amélioration n'est pas détectable visuellement.

Les trois meilleurs ajustements, de qualité équivalente, ont été obtenus par la diminution du paramètre  $k_{eCd}$  (facteur 1,5, F),  $b_{TCd}$  (facteur 2, H) ou par la diminution de la concentration d'exposition externe du Cd (facteur 1,5, D). Ces résultats indiquent que l'antagonisme,

1. En plus de la moins bonne description des substances seules de base, l'additivité CA<sub>Dt</sub> prédit une toxicité trop importante du mélange, comme observé précédemment avec l'additivité CA du modèle descriptif MixTox.

**Tableau 8.4** Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et d'un paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans la gélose. <sup>a</sup>

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>
			( $aC_{eU}$ )	( $aC_{eCd}$ )	( $ak_{eU}$ )	( $ak_{eCd}$ )	( $ab_{TU}$ )	( $ab_{TCd}$ )	( $ac_{0U}$ )	( $ac_{0Cd}$ )
$\ell$	-62 942	-61 348	-60 710	<u>-60 370</u>	-60 744	<u>-60 336</u>	-60 805	<u>-60 373</u>	-60 706	-60 987
$k_{eU}$	6,36	5,41	5,83	5,98	7,13	5,84	5,98	5,92	5,81	6,46
$b_{TU}$	1,64	1,90	2,01	1,72	2,01	1,75	2,05	1,77	1,95	1,84
$c_{0U}$	0,93	0,97	0,95	0,95	0,97	0,95	0,97	0,96	0,95	0,97
$k_{eCd}$	0,88	0,66	0,61	0,50	0,59	0,47	0,61	0,49	0,57	0,29
$b_{TCd}$	18,04	13,28	13,56	19,74	13,61	20,60	13,03	20,03	14,07	21,26
$c_{0Cd}$	0,001	$4 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$8 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-7}$
$a$	-	-	0,98*	<u>0,67*</u>	0,72*	<u>0,52*</u>	0,90*	<u>0,67*</u>	1,03*	0,60*

a. L'ajustement est réalisé à partir du mode d'action DEBtox « réduction de l'assimilation de nourriture » pour l'U et le Cd et selon l'additivité  $RA_{Dt}$  pour  $t \leq 6,5j$ .  $\ell$  : maximum de log-vraisemblance ;  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $L\text{mmol}^{-1}$ ) ;  $C_{e_i}$  : concentration d'exposition externe de  $i$  (il s'agit d'une variable et non d'un paramètre) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $\text{mmolL}^{-1}$ ) ;  $a$  : paramètre d'interaction affectant l'un(e) des variables ou paramètres précédents (u.a.). Les meilleurs ajustements sont soulignés ; \* : indique que l'ajout de  $a$  améliore significativement l'ajustement des données ( $p[\chi^2] < 0,05$ ).

**A** : paramètres TK/TD non réajustés.

**B** : paramètres TK/TD réajustés sur l'ensemble des données (ETM seuls et en mélange).

**C-D** : paramètres **B** réajustés avec ajustement du paramètre  $a$  affectant  $C_{eU}$  ou  $C_{eCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**E-F** : paramètres **B** réajustés avec ajustement du paramètre  $a$  affectant  $k_{eU}$  ou  $k_{eCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**G-H** : paramètres **B** réajustés avec ajustement du paramètre  $a$  affectant  $b_{TU}$  ou  $b_{TCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**I-J** : paramètres **B** réajustés avec ajustement du paramètre  $a$  affectant  $c_{0U}$  ou  $c_{0Cd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

identifié sur la base des concentrations en U et Cd dans la gélose à partir du modèle MixTox, peut également être identifié à partir du modèle DEBtox. Ces résultats suggèrent également que cette interaction est très probablement liée au Cd, même si l'interaction diminuant le transfert du Cd de la gélose vers le tapis bactérien, d'un facteur proche de 2, ne peut pas être directement identifiée à partir du modèle. Il faut néanmoins noter, que si l'ajustement du paramètre  $a$ , affecté à la concentration d'exposition externe au Cd, est réalisé en maintenant fixés les paramètres TK/TD aux valeurs permettant la meilleure description des effets de l'U et du Cd seul (*i.e.* Tab. 8.4, A), une valeur de 0,49 est obtenue pour le paramètre. Le modèle prédit ainsi une diminution de la concentration de Cd dans le tapis bactérien d'un facteur 2 lorsque l'U est également présent dans le milieu.

### 8.3.5 Effets combinés de l'U et du Cd sur la base des concentrations dans le tapis bactérien

Les effets combinés de l'U et du Cd ont été analysés sur la base des concentrations dans le tapis bactérien à partir de l'additivité  $RA_{Dt}$  et du mode d'action ①. Dans un premier temps, les ajustements ont été réalisés avec le modèle de base (*i.e.* sans modification de la  $L_p$  et sans ajout d'un effet direct sur la réserve de spermatozoïdes) et sur la période de 0 à 6,5 j. Les résultats des réajustements des paramètres TK/TD de l'U et du Cd, en présence ou en absence du paramètre d'interaction  $a$  sont présentés dans le tableau S.7<sup>1</sup>.

L'utilisation des concentrations dans le tapis bactérien, permettant entre autre la prise en compte de l'interaction entre l'U et le Cd à ce niveau, a permis d'améliorer notablement l'ajustement de l'ensemble des données (Tab. 8.4, A vs Tab. S.7, A). Les valeurs ajustées de  $a$  sont en faveur d'un antagonisme : pour les conditions U/Cd en mélange, les paramètres  $k_e$  ou  $b_T$  sont diminués ( $a < 1$ ), ou les paramètres  $c_0$  sont augmentés ( $a > 1$ ). Le meilleur ajustement est obtenu grâce à une diminution de la pente de la fonction stress de l'U ( $b_{T_U}$ , Tab. S.7, E). L'amélioration du critère d'ajustement  $\ell$  entre E et B est relativement modeste. Le paramètre  $a$  permet une dégradation moins importante de la description des effets de l'U seul ( $\ell$  : -16343 vs -15992), tout en conservant une description correcte des effets des mélanges U/Cd ( $\ell$  : -32338 vs -32301).

Dans un second temps, les ajustements ont été réalisés avec le modèle modifié, c'est-à-dire, avec le module descriptif d'effet sur la  $L_p$  et un mode d'action combinant le mode d'action ① et un effet direct sur la réserve de spermatozoïdes. Ils ont été réalisés sur l'ensemble de la période d'exposition (*i.e.* 0 à 10,8 j). Les résultats des réajustements des para-

1. p. 247.

mètres TK/TD de l'U et du Cd, en présence ou en absence du paramètre d'interaction  $a$  sont présentés dans le tableau S.8<sup>1</sup>.

Les valeurs ajustées de  $a$  sont comme précédemment en faveur d'un antagonisme. Les meilleurs ajustements sont obtenus avec une réduction des paramètres  $k_{ecd}$  ou  $b_{TCd}$  ( $a < 1$ , Tab. S.8, D et F). L'amélioration du critère d'ajustement  $\ell$  entre D ou F, et B est également relativement modeste. Pour l'ajustement F, le paramètre  $a$  permet une dégradation moins importante de la description des effets du Cd seul ( $\ell : -26916$  vs  $-26649$ ) en améliorant légèrement la description des effets des mélanges U/Cd ( $\ell : -54168$  vs  $-53845$ ).

Les surfaces de réponses prédites pour la longueur corporelle maximale et le NLP total (*i.e.* à  $t = 10,2j$  et  $10,8j$ , respectivement), à partir des ajustements A, B et F, sont présentées dans la figure 8.5. L'observation de ces surfaces révèle que la qualité de l'ajustement des données par le modèle est contrastée en fonction des zones de la surface de réponse. L'ajustement A est de bonne qualité pour les concentrations d'U produisant les effets les plus faibles. Il prédit une toxicité trop importante pour la croissance pour les conditions d'U seul ou en mélange avec le Cd produisant des effets importants. Au contraire dans cette même zone, les données de NLP total sont plutôt bien décrites. De manière plus globale, il semble que les données d'exposition aux mélanges proches de 50 % d'effet, c'est-à-dire les données proches de la zone où la surface de réponse chute brutalement, sont assez mal décrites par le modèle. Le réajustement des paramètres TK/TD de l'U et du Cd en présence ou en absence du paramètre d'interaction permet d'améliorer la description des données dans cette zone (Fig. 8.5, B et F, ●) sans améliorer de façon notable l'ajustement sur le reste des données.

## 8.4 Discussion

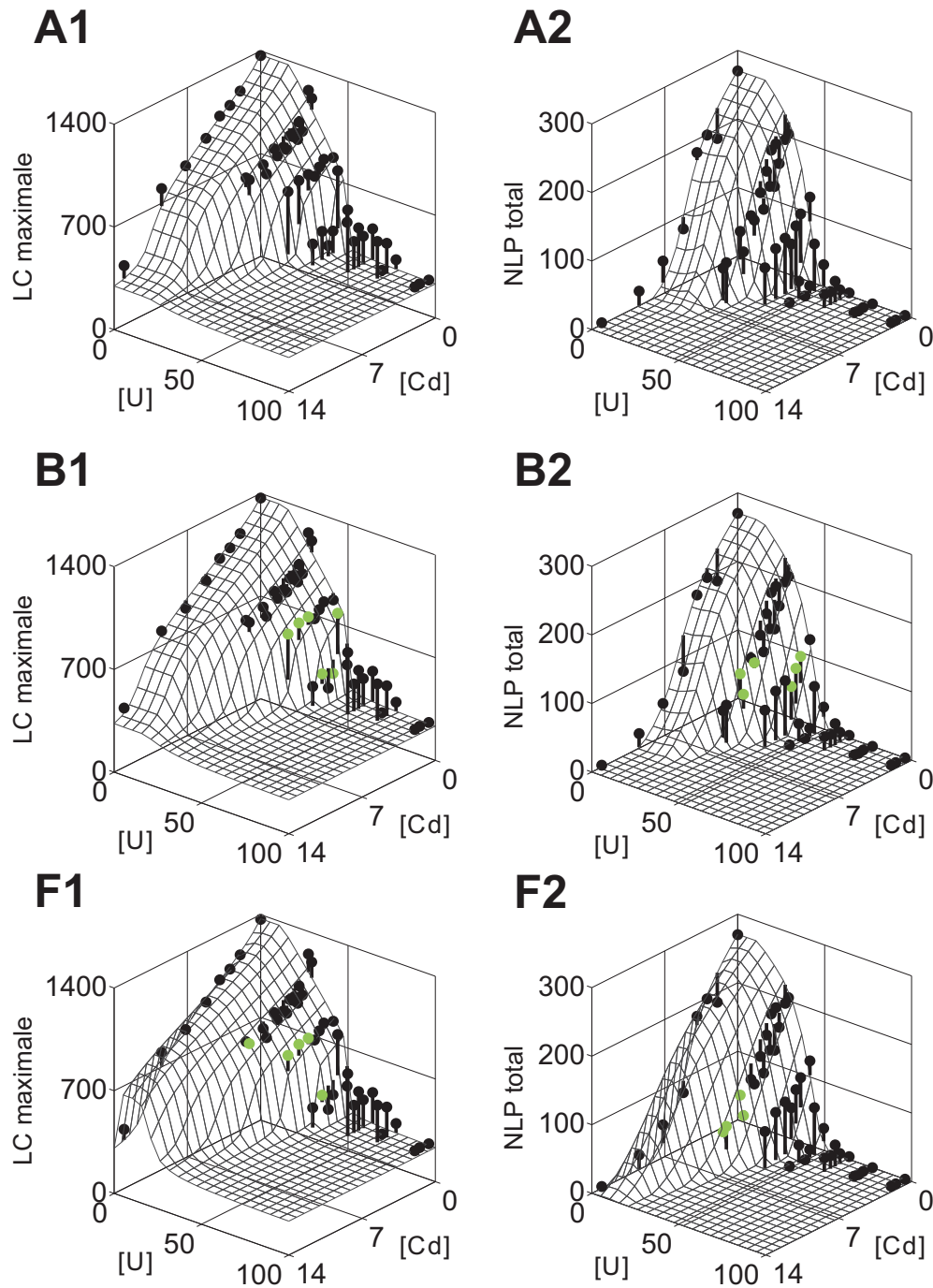
### 8.4.1 Effets de l'U et du Cd : des hypothèses du modèle DEBtox non vérifiées ?

Des effets significatifs de l'U sur le volume des œufs pondus et de l'U et du Cd sur la  $L_p$  des individus exposés ont été mis en évidence dans la présente étude.

La diminution du volume des œufs produits par les individus en raison de leur exposition à l'U pourrait suggérer que les individus allouent moins de ressources aux œufs et donc que leur coût de production n'est pas constant. Dans notre étude, l'estimation de ce critère d'effet repose cependant sur deux simplifications importantes : d'une part la mesure de l'œuf sous forme d'ellipse est supposée représentative du volume et d'autre part la den-

---

1. p. 248.



**FIGURE 8.5** Surfaces de réponse prédites pour la longueur corporelle (LC) maximale (1) et le nombre de larves produites (NLP) total (2) à partir de différents jeux de paramètres DEBtox sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). **A** : meilleurs paramètres TK/TD obtenus pour l'U et le Cd seuls ; **B** : paramètres TK/TD réajustés sur l'ensemble des données (ETM seuls et en mélange) ; **F** : paramètres TK/TD réajustés avec un paramètre d'interaction affectant le paramètre de pente du stress du Cd. ● : données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ ) ; Grille : valeurs modélisées ; Barres verticales : distance entre les deux ; ● : données pour lesquelles l'ajustement est amélioré (B vs A et F vs B).

sité des ressources allouées est supposée constante. Une mesure directe de la quantité de ressource (*e.g.* masse des œufs) serait nécessaire pour pouvoir conclure avec plus de certitudes. D'autres organismes d'étude sont plus propices que *C. elegans* pour ce genre de mesures. [Helling \*et al.\* \(2000\)](#) ont par exemple pu montrer une diminution significative de la masse des cocons produits par le ver *Eisenia fetida* suite à une exposition au Cu.

Une diminution significative de la  $L_p$  des individus exposés à l'U et/ou au Cd a également été identifiée. Cet effet, plus notable que celui sur le volume des œufs, a déjà été observé dans différentes études portant sur la toxicité du Cd sur *C. elegans* ([Alda Álvarez \*et al.\*, 2005](#) ; [Nørhave \*et al.\*, 2012](#) ; [Swain \*et al.\*, 2010](#)) et sur d'autres organismes (*e.g.* [Souza \*et al.\*, 2014](#)), mais n'a pas été observé dans l'étude de [Jager \*et al.\* \(2014\)](#) sur *C. elegans*. [Nørhave \*et al.\* \(2012\)](#) ont par exemple estimé une  $L_p$  de 520  $\mu\text{m}$  pour des nématodes exposés à 0,044  $\text{mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$ . Celle-ci est proche de la  $L_p$  observée dans nos conditions expérimentales pour un nématode exposé à 0,040  $\text{mmol}_{\text{Cd}}\text{L}^{-1}$  (*i.e.* 634  $\mu\text{m}$ ). À notre connaissance, l'effet de l'U sur la  $L_p$  n'avait pas encore été mis en évidence. Par ailleurs, il a été démontré que d'autres contaminants induisent une réduction de la  $L_p$  chez les nématodes (*e.g.* composés organiques, [Swain \*et al.\*, 2010](#)).

Chez les nématodes exposés à un stress, la diminution de la taille au début de la reproduction pourrait être due à leur mode de reproduction particulier : ce n'est qu'une fois la maturation des spermatozoïdes achevée que débute la maturation des oocytes et l'ovulation. [Cutter \(2004\)](#) a suggéré que le nombre de spermatozoïdes produits par les individus pourrait être ajusté afin de maximiser les chances d'accroissement des populations. En cas de stress, le compromis serait une diminution du nombre de spermatozoïdes produits permettant un début de reproduction plus précoce ([Alda Álvarez \*et al.\*, 2005](#)).

D'un autre côté, un effet reprotoxique direct est également possible dans le cas du Cd. Des études menées chez des poissons ont permis de montrer que cet ETM engendre (i) une maturation précoce des juvéniles de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L par le biais d'une vitellogenèse anticipée ([Pierron \*et al.\*, 2008](#)) et (ii) des taux élevés de gonadotrophines et d'œstradiol chez *Oreochromis mossambicus* ([Amutha \*et Subramanian\*, 2013](#)). Chez *C. elegans*, même si le rôle de la vitellogénine (*i.e.* transport du cholestérol dans les oocytes) n'est pas identique à celui chez les vertébrés, des diminutions et des augmentations dans le niveau d'expression de cette protéine ont été observées à la suite d'une exposition à des composés androgéniques et anti-androgéniques, respectivement ([Höss \*et Weltje\*, 2007](#)). [Novillo \*et al.\* \(2005\)](#) ont cependant montré par la technique des puces à ADN que le Cd n'induisait pas l'expression du gène de la vitellogénine chez *C. elegans* après une exposition de 4 et 7 j.

La diminution de la  $L_p$  due au Cd et à l'U pose un problème d'application du modèle DEBtox simplifié. Une des simplifications réalisée requiert la constance de ce paramètre pour que le modèle conserve sa cohérence énergétique. Il conviendrait donc, dans l'idéal, d'utiliser un modèle DEBtox complet (*i.e.* non simplifié) pour l'analyse des données de cette étude. À notre connaissance, un tel modèle n'a pas encore été proposé pour *C. elegans* ; sa construction nécessite l'estimation de paramètres physiologiques supplémentaires à partir d'expériences dédiées. Pour cette étude, deux alternatives ont été proposées. La première consiste à faire l'hypothèse que l'effet sur la  $L_p$  influence peu l'analyse globale ; il est donc ignoré. La seconde consiste à prendre en compte l'effet sur la  $L_p$  de manière descriptive même si cela dégrade le caractère mécaniste du modèle. Cette dernière, en combinaison avec l'hypothèse d'un mode d'action additionnel d'effet direct sur la réserve de spermatozoïdes, a permis d'améliorer l'ajustement des données sur la durée totale de l'exposition et a conduit à l'estimation de paramètres TK/TD différents, par rapport au modèle non modifié (Tab. S.6<sup>1</sup>).

#### 8.4.2 Ajustement des individus non exposés : comparaison avec la littérature

Les valeurs des paramètres physiologiques obtenues dans la présente étude sont proches de celles rapportées dans l'étude de [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#), utilisant un modèle similaire, même si les souches utilisées ne sont pas strictement identiques (N2 vs Teotónio, Tab. 8.1). Les différences les plus notables se situent au niveau de la  $L_p$  et du paramètre  $R_m$ . Dans le cas de la  $L_p$ , le manque de mesures de longueur au moment du début de la reproduction dans l'étude de [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#) explique la valeur ajustée, plus faible, obtenue par les auteurs. En effet, le modèle n'est pas suffisamment contraint par des données expérimentales dans cette zone pour estimer une valeur de  $L_p$  proche de celle que nous avons observée expérimentalement. Dans le cas du paramètre  $R_m$ , et dans une moindre mesure du paramètre  $L_m$ , des valeurs ajustées supérieures à celles de la présente étude ont été obtenues par [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#). Une fois encore, ces différences sont le reflet d'une absence de données expérimentales pour contraindre le modèle. En effet, à l'inverse de notre étude, [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#) ont réalisé l'ensemble de leurs ajustements pour  $t < 6,5j$ , le modèle ne peut donc pas identifier avec précision la longueur corporelle et le nombre de larves produites maximal.

---

1. p. 246.



### 8.4.3 Ajustement des individus exposés à l'U ou au Cd : comparaison avec la littérature

Pour l'U comme pour le Cd, le meilleur mode d'action identifié dans la présente étude est le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture ». D'autres études menées sur divers organismes ont conduit à l'identification du même mode d'action DEBtox pour les deux ETM (Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Augustine, 2012 ; Goussen *et al.*, 2015 ; Jager *et al.*, 2004, 2014 ; Massarin *et al.*, 2011 ; Plaire, 2013 ; Swain *et al.*, 2010). La distinction entre les modes d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » et « augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité » est cependant bien souvent difficile à réaliser et nécessite des expériences complémentaires (Goussen *et al.*, 2015). Il a par exemple été montré que l'U perturbait l'intégrité de l'intestin de daphnies (Massarin *et al.*, 2011 ; Zeman *et al.*, 2008) et du poisson *D. rerio* (Augustine, 2012), et diminuait l'ingestion de nourriture et l'assimilation de carbone par les daphnies (Massarin *et al.*, 2011 ; Zeman *et al.*, 2008). Des observations similaires ont également été réalisées chez des nématodes *C. elegans* exposés au Cd (Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Popham *et Webster*, 1979). Ces observations expérimentales sont donc en faveur du mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » pour l'U et le Cd.

Les valeurs des paramètres TK/TD de l'U, obtenues dans cette étude, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues dans l'étude de Goussen *et al.* (2015) (Tab. 8.3). D'un côté, les paramètres  $k_{eU}$  des deux études indiquent tous deux une cinétique très rapide de l'internalisation de l'U. Ce type de cinétique a d'ailleurs également été retrouvé dans l'étude de Massarin *et al.* (2011) sur *D. magna*. D'un autre côté, les paramètres  $c_{TU}$  et  $c_{0U}$  dénotent que le niveau de stress induit par l'U internalisé est moins important dans la présente étude que dans celle de Goussen *et al.* (2015). Cette fois, le nombre d'observations expérimentales ne semble pas être à l'origine de ces différences. En effet, en réduisant les temps d'observation de la présente étude, les valeurs estimées de  $c_{TU}$  et  $c_{0U}$  ne se rapprochent pas de celles de Goussen *et al.* (2015). Une différence de sensibilité de la souche utilisée ou encore des conditions expérimentales légèrement différentes pourraient en être la cause. Le pH, jouant un rôle primordial dans la toxicité de l'U, pourrait par exemple être un facteur clef pour expliquer ces différences. Le pH expérimental n'est pas mentionné dans l'étude de Goussen *et al.* (2015).

Pour le Cd, il est plus difficile de trouver dans la littérature un point de comparaison pour les valeurs TK/TD estimées. Même si des études menées sur *C. elegans* ont été publiées, les auteurs ont utilisé un module TK différent de celui utilisé dans la présente étude pour mo-

déliser l'internalisation du Cd (Alda Álvarez *et al.*, 2005 ; Jager *et al.*, 2014 ; Swain *et al.*, 2010). Par exemple, comme le module TK ne permettait pas de décrire correctement les effets du Cd sur *C. elegans*, Jager *et al.* (2014) ont eu recours à un paramètre additionnel  $c_A$ . Celui-ci représente une concentration de Cd fixe qui est ajoutée à la concentration de Cd nominale pour constituer la concentration d'exposition. Dans les études de Alda Álvarez *et al.* (2005) et Swain *et al.* (2010), une hypothèse de saturation de l'internalisation, de type Michaelis-Menten, a été réalisée. Dans notre étude, le module TK simple a permis une bonne description des effets du Cd. Nous n'avons donc pas eu recours à ces modifications. Lorsque l'ensemble des données de mesure a été analysé (*i.e.*  $t \leq 10,8j$ ), une  $c_{0Cd}$  quasi nulle a été obtenue. Les études de Alda Álvarez *et al.* (2005) et Swain *et al.* (2010) rapportent une valeur similaire et dans l'étude de Jager *et al.* (2014), les auteurs ont fait le choix de fixer  $c_{0Cd}$  à  $0 \text{ mmolL}_{Cd}^{-1}$ . À l'inverse de l'U, ces valeurs indiquent que la toxicité du Cd débute après l'internalisation d'infimes quantités de Cd.

Dans la présente étude, afin d'améliorer la description des effets de l'U et du Cd sur le NLP total, le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » a dû être accompagné d'un mode d'action à effet direct sur la réserve de spermatozoïdes (Fig. S.15 vs Fig. 8.3 et 8.4, Tab. S.6<sup>1</sup>). D'autres études ont été confrontées à la mauvaise description du NLP total de *C. elegans* à partir du mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » seul, pour l'U (Goussen *et al.*, 2015) et le Cd (Jager *et al.*, 2014 ; Swain *et al.*, 2010). Cependant, comme le mentionnent Goussen *et al.* (2015), pour valider complètement l'ajout d'un mode d'action à effet direct sur la réserve de spermatozoïdes au modèle, des confirmations expérimentales seraient nécessaires.

#### 8.4.4 Effets combinés U/Cd : confirmation de l'interaction U/Cd dans le tapis bactérien

L'analyse des données d'exposition au mélange U/Cd à partir du modèle DEBtox et sur la base des concentrations dans la gélose a permis de mettre en évidence qu'une interaction antagoniste se produisait entre l'U et le Cd et que celle-ci affectait très probablement la toxicité du Cd. Le modèle ne permet cependant pas d'identifier clairement que l'interaction provient d'une réduction de la concentration d'exposition au Cd d'un facteur proche de 2. Une diminution de la constante d'élimination ou de la pente du stress du Cd permet également d'améliorer l'ajustement des données.

Afin de comparer le niveau de renseignements que peut apporter le modèle DEBtox par

---

1. p. 249, 151, 152, 246.

rapport au modèle MixTox, ce dernier a été adapté afin de pouvoir ajuster un paramètre d'interaction affectant les concentrations d'exposition à l'U ou au Cd, à la place de ses fonctions d'interactions descriptives habituelles (interaction simple synergie/antagonisme, etc.<sup>1</sup>). Le modèle MixTox ainsi modifié n'a pas permis d'identifier clairement que l'interaction affectait la concentration d'exposition au Cd (Fig. S.9<sup>2</sup>).

Le modèle DEBtox apparaît donc plus performant que le modèle MixTox pour l'identification de l'origine de l'interaction. Néanmoins, cette différence de performance des deux modèles est probablement un cas particulier de notre étude, en lien avec la pente élevée de la courbe dose-réponse de l'U, lorsque sont utilisées les concentrations dans la gélose. En effet, si le jeu de données est modifié pour comporter d'un côté les concentrations d'U dans le tapis bactérien, générant une courbe dose-réponse moins pentue, et de l'autre, les concentrations de Cd dans la gélose, alors le modèle MixTox permet d'identifier que l'interaction antagoniste affecte très probablement la concentration d'exposition au Cd. En procédant de même avec le modèle DEBtox, ce dernier permet d'identifier que se produit une interaction affectant, soit la concentration d'exposition au Cd, soit la pente du stress du Cd, mais pas la constante d'élimination du Cd. Le caractère prédictif des modèles MixTox et DEBtox pour l'étude des effets de mélanges semble donc être amoindri lorsqu'un ou plusieurs des contaminants du mélange présentent une pente de courbe dose-réponse raide, produisant une large gamme d'effet sur un organisme à partir d'une gamme étroite de concentrations.

### 8.4.5 Effets combinés U/Cd : une seconde interaction ?

Dans le chapitre précédent, en se basant sur l'additivité RA, l'analyse des données d'ALC maximale et de NLP total sur la base des concentrations dans les bactéries à partir du modèle MixTox a permis de mettre en évidence l'absence d'interaction entre l'U et le Cd pour l'ALC maximale et des interactions synergiques et antagonistes (en fonction du niveau de dose et évoluant au cours du temps) pour le NLP total. Qu'en est-il lorsque l'ensemble des données de cinétique de croissance et de reproduction est intégré au moyen du modèle DEBtox ?

Les analyses des effets combinés de l'U et du Cd à partir du modèle DEBtox standard<sup>3</sup> et du modèle DEBtox modifié<sup>4</sup> pourraient toutes deux suggérer qu'une interaction antagoniste entre l'U et le Cd se produit au niveau des individus, durant la phase TK ou TD. En effet,

---

1. Voir sections 3.6.2.4, 3.6.2.5 et 3.6.2.6 (p. 82, 82 et 83).  
2. p. 249.  
3. Pour  $t \leq 6,5j$ .  
4. Mode d'action additionnel sur la réserve de spermatozoïdes et prise en compte de l'effet des ETM sur la  $L_p$ , pour  $t \leq 10,8j$ .

dans la première, le meilleur ajustement a été obtenu avec une réduction de la pente du stress engendré par l'U. Dans la seconde, les deux meilleurs ajustements, de qualité comparable, ont été obtenus par une réduction de la constante d'élimination ou de la pente du stress du Cd. Mais, comme nous l'avons vu, il semble que le niveau d'effet prédit sur la base de l'additivité  $RA_{Dt}$  au niveau de la zone d'effondrement de la surface de réponse est trop important par rapport au niveau d'effet observé pour les données expérimentales.

En comparant les effets prédits selon l'additivité RA du modèle descriptif MixTox ( $RA_{Mt}$ ) avec ceux prédits selon l'additivité RA du modèle DEBtox ( $RA_{Dt}$ ), il est possible de montrer que cette dernière prédit une toxicité plus importante que l'additivité  $RA_{Mt}$ . Cette différence est peu marquée pour les faibles niveaux de dose mais peut avoir des conséquences importantes à partir de l' $EC_{50}$ . Par exemple, pour un mélange où un effet de 39 % a été observé ( $29,2 \text{ nmol}_U \text{ mg}_{dw}^{-1}$ ,  $3,3 \text{ nmol}_{Cd} \text{ mg}_{dw}^{-1}$ ), les additivités  $RA_{Mt}$  et  $RA_{Dt}$  prédisent toutes deux une  $EC_{38}$ . Au contraire, pour un mélange à niveau de dose un peu plus élevé, où un effet de 52 % a été observé ( $41,5 \text{ nmol}_U \text{ mg}_{dw}^{-1}$ ,  $4,3 \text{ nmol}_{Cd} \text{ mg}_{dw}^{-1}$ ), l'additivité  $RA_{Mt}$  prédit une  $EC_{59}$  tandis que l'additivité  $RA_{Dt}$  prédit une  $EC_{92}$ .

Cette différence est également visible dans l'étude de Jager *et al.* (2014) portant sur la toxicité du mélange fluoranthène/Cd (deux composés qui ne partagent pas le même mode d'action DEBtox<sup>1</sup>) sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*. En extrayant les données d'effet du 5<sup>ème</sup> jour d'exposition, il peut être montré que le modèle d'additivité  $RA_{Dt}$  décrit correctement la plupart des données. Cependant, pour la seule condition « mélange » à niveau de dose élevé testée<sup>2</sup>, où un effet de 57 % a été observé, l'additivité  $RA_{Dt}$  surestime la toxicité : l'additivité  $RA_{Mt}$  prédit une  $EC_{52}$  tandis que l'additivité  $RA_{Dt}$  prédit une  $EC_{88}$ .

Les différences de prédictions entre l'additivité  $RA_{Mt}$  et  $RA_{Dt}$  peuvent s'expliquer par la différence conceptuelle entre le modèle DEBtox, mécaniste, et les approches descriptives (e.g. MixTox). En suivant l'additivité  $RA_{Mt}$ , le calcul d'un effet de deux substances repose sur la multiplication des probabilités de non-réponse des substances (*i.e.*  $1 - \text{effet}$ ). Selon l'additivité  $RA_{Dt}$ , les effets sont quant à eux calculés de manière indirecte, soit en multipliant les fonctions de stress affectées au même paramètre physiologique, soit en affectant les fonctions de stress sur différents paramètres physiologiques. De plus, lorsqu'au moins une des substances en mélange affecte la croissance, l'utilisation du modèle DEBtox implique une interaction implicite au niveau de l'internalisation des substances puisque la toxicocinétique des substances est fonction de la taille des individus et du taux de croissance (Svendsen *et al.*, 2011).

1. Le mode d'action DEBtox du fluoranthène est le mode d'action « Augmentation des coûts maturation/reproduction et de fabrication des unités de structure ».

2. Cd/fluoranthène :  $2/1 \text{ mg L}^{-1}$  (soit  $0,018 \text{ mmol}_{Cd} \text{ L}^{-1}$ ).

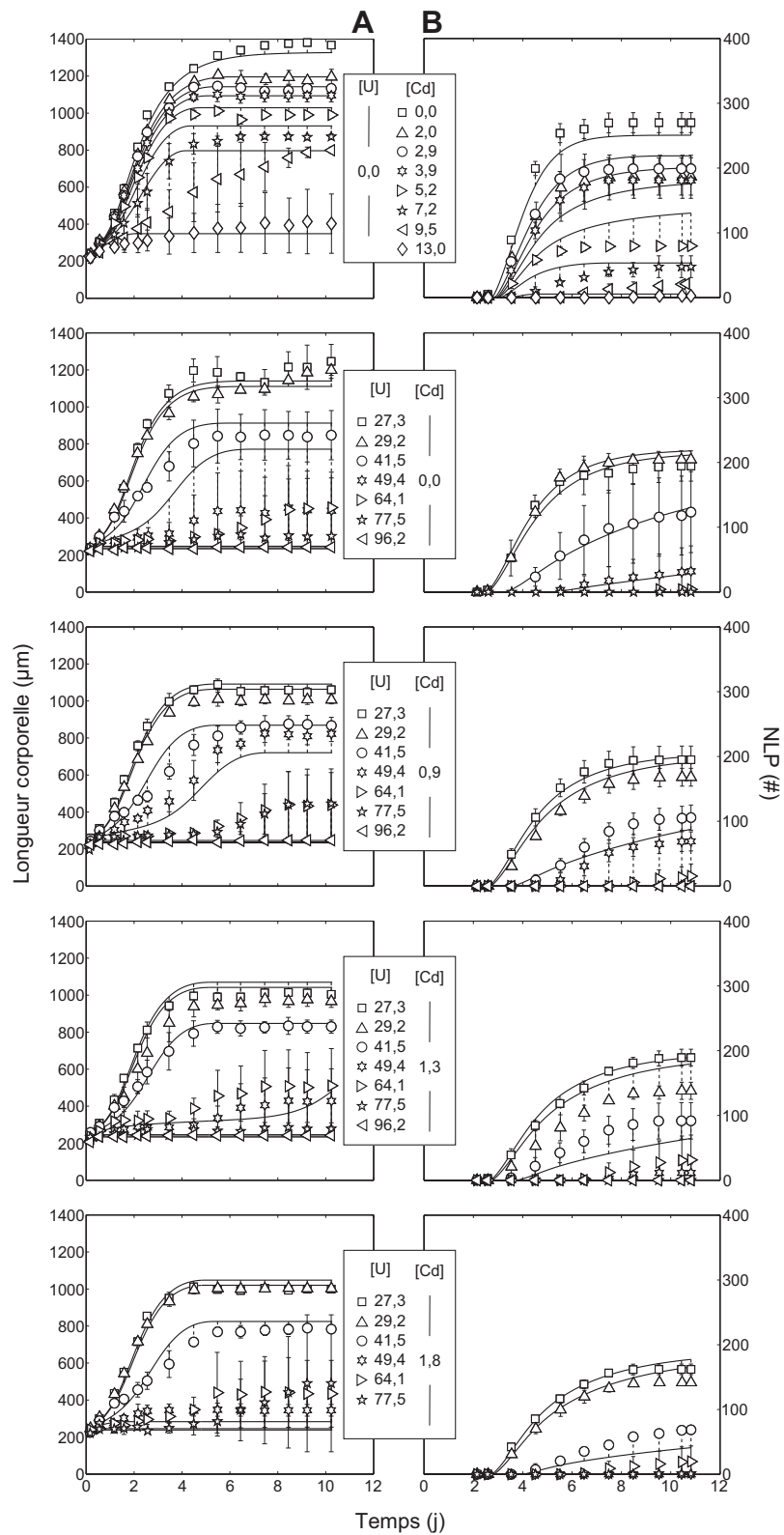
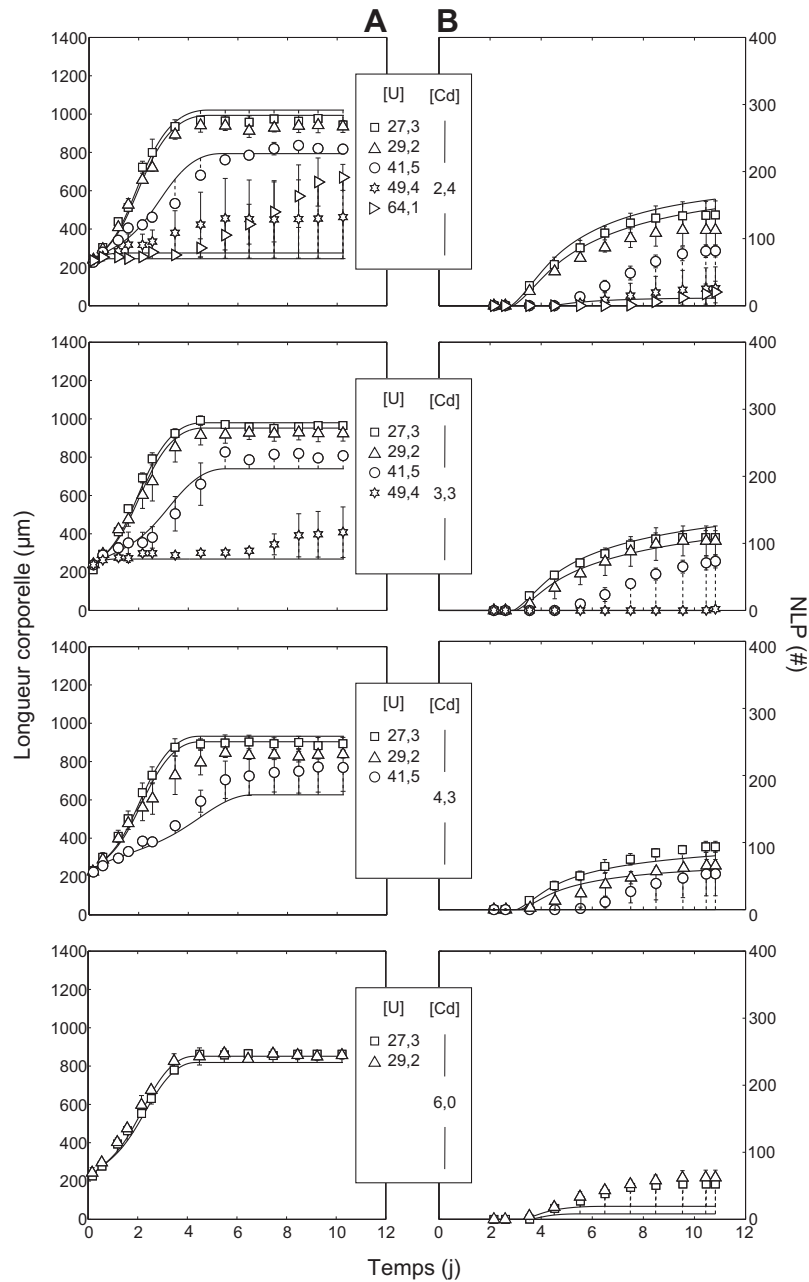


FIGURE 8.6 [début]



**FIGURE 8.6** [fin] Prédications du modèle DEBtox pour les données de longueur corporelle ( $\mu\text{m}$ , **A**) et du nombre de larves produites (NLP, **B**) au cours du temps ( $t \leq 10,8\text{j}$  après éclosion), où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). Mode d'action de l'U et du Cd : « réduction de l'assimilation de nourriture » et « effet direct sur la réserve de spermatozoïdes », avec un module descriptif des effets des deux ETM sur la longueur à la puberté. □ [...] ◇ : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n \geq 3$ )  $\pm$  erreur type ; *Trait plein* : prédictions du modèle ; *Tirets* : écart entre les deux. Maximum de log-vraisemblance : 96607.

Pour notre étude, il semble néanmoins difficilement concevable que le modèle DEBtox prédise un antagonisme très important pour la croissance d'individus exposés à certains mélanges à niveau de dose élevé, tandis que l'approche classique MixTox, basée sur l'additivité RA sans interaction, permet une bonne description des mêmes données (Chp. 7). Une première explication au problème rencontré est que les hypothèses de constructions du modèle DEBtox pour décrire la toxicocinétique et la toxicodynamique des substances seules et en mélange chez *C. elegans* ne seraient pas entièrement vérifiées. Une seconde explication possible est que les paramètres DEBtox estimés seraient trop spécifiques des données utilisées pour l'« apprentissage » du modèle (*i.e.* données des individus non exposés et exposés aux substances seules). La variabilité expérimentale ne serait pas assez prise en compte. La réestimation des paramètres TK/TD à partir de l'ensemble des données (individus non exposés, exposés aux ETM seuls et exposés au mélange des deux ETM) a permis d'améliorer l'ajustement global (Tab. S.8, B<sup>1</sup> et Fig. 8.5, B). La réestimation de tous les paramètres, physiologiques et TK/TD à partir de l'ensemble des données (individus non exposés, exposés aux ETM seuls et exposés au mélange des deux ETM) permet d'améliorer un peu plus l'ajustement global et de décrire correctement la plupart des données de longueur corporelle à partir de l'additivité RA<sub>Dt</sub> sans interaction (Fig. 8.6 et S.16<sup>2</sup>).

La description de la reproduction des individus exposés à certains mélanges à niveau de dose élevé reste cependant non optimale (Fig. 8.6 et S.16, 2). Par exemple, le modèle décrit correctement la croissance des trois nématodes exposés à 41,3 nmol<sub>U</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup> / 3,3 nmol<sub>Cd</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup> (Fig. S.17<sup>3</sup>). Seulement, la prédiction de la longueur corporelle maximale (738 μm) est légèrement inférieure à celle atteinte par ces individus en réalité (≈ 800 μm) et reste inférieure à la  $L_p$  estimée pour cette condition (756 μm). Le modèle prédit donc, par effet de seuil, une reproduction nulle par effet de seuil qui est contraire aux observations expérimentales. Dans le deuxième exemple de la figure S.17 (41,3 nmol<sub>U</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup> / 4,3 nmol<sub>Cd</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>), deux types de cinétiques de croissance ont été observés parmi les duplicatas : un des trois nématodes a produit une croissance faible et n'a pas atteint sa  $L_p$  tandis que les deux autres ont connu une croissance plus importante et ont dépassé leur  $L_p$ . Le modèle prédit quant à lui une cinétique de croissance intermédiaire qui ne dépasse jamais la  $L_p$  estimée. En conséquence, une reproduction nulle est prédite y compris pour les deux individus ayant dépassé leur  $L_p$ . Ces deux exemples illustrent les difficultés que rencontre le modèle pour l'intégration des cinétiques de croissance et de reproduction. Des facteurs comme l'incertitude associée à l'estimation des  $L_p$  et la variabilité biologique

---

1. p. 248.
2. p. 250.
3. p. 251.

contribuent à ce problème.

Pour résumer, nous pouvons conclure au vu de tous ces éléments que (i) l'additivité  $RA_{Dt}$  permet la bonne estimation des cinétiques de croissance et de reproduction des nématodes exposés à différentes conditions du mélange U/Cd, (ii) la moins bonne description de certaines données provient probablement de la variabilité expérimentale et biologique mais aussi des hypothèses et simplifications sur lesquelles repose le modèle (*e.g.* estimation de la  $L_p$ ) et (iii) l'ajout d'un paramètre d'interaction affectant l'un des paramètres TK/TD des substances ne permet pas une amélioration notable des ajustements. Il semble donc que si une interaction se produit entre l'U et le Cd durant la phase TK ou TD, celle-ci reste de faible ampleur et est probablement localisée sur une zone restreinte de la surface de réponse testée.

## 8.5 Conclusion

Divers aspects de l'application du modèle DEBtox pour l'étude de l'effet du mélange U/Cd sur *C. elegans* ont été abordés dans ce chapitre.

Tout d'abord, l'étude des critères d'effet de longueur à la puberté et de volume d'œufs produits nous a permis de mettre en évidence que les conditions d'application du modèle DEBtox n'étaient pas forcément entièrement vérifiées. Le développement d'un modèle complet pourrait s'avérer utile à l'avenir afin de mieux appréhender les effets nocifs des contaminants sur la physiologie de cet organisme.

Malgré ces petites inconsistances, le modèle DEBtox simplifié a été mis en pratique pour analyser nos données expérimentales. La proximité des ajustements obtenus pour les individus non exposés ou exposés à l'U ou au Cd seul, avec les ajustements d'autres études de la littérature tend à souligner la robustesse du modèle. Comme pour d'autres études auparavant, le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » apparaît comme le meilleur mode d'action pour décrire les effets de l'U et du Cd. L'ajout d'un mode d'action additionnel d'effet direct sur la réserve de spermatozoïdes et la prise en compte des effets des deux ETM sur la  $L_p$  se sont avérés nécessaires pour améliorer la description des données de reproduction. Ces dernières ont eu un impact non négligeable sur l'estimation de la concentration sans effet du Cd.

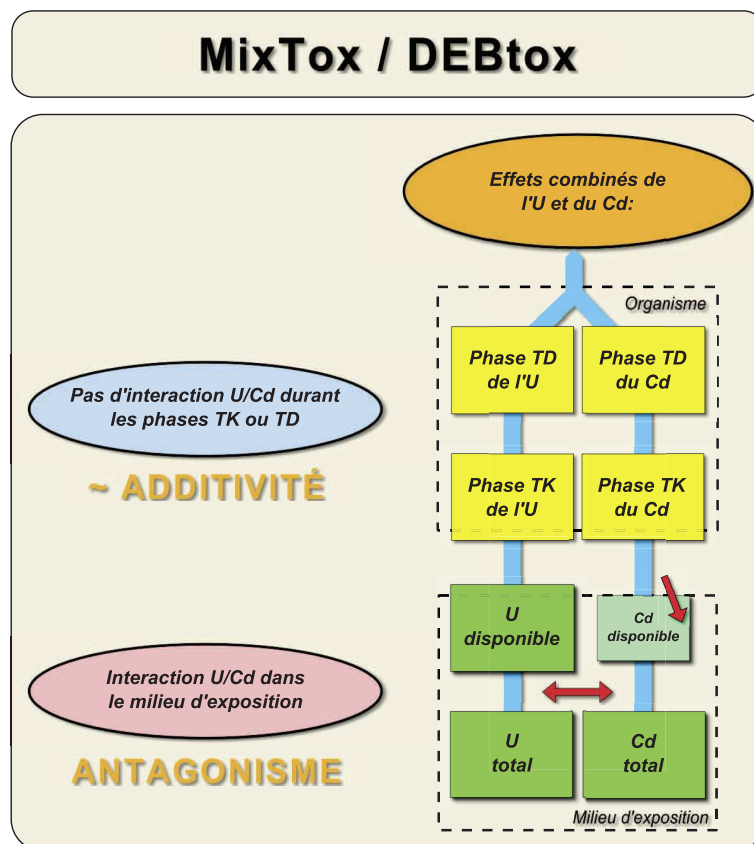
Pour l'analyse des effets combinés de l'U et du Cd, l'additivité  $CA_{Dt}$  a été écartée en raison d'une moins bonne description de la toxicité des substances seules et d'une surestimation des effets combinés. L'analyse de la toxicité du mélange U/Cd a donc été conduite à partir de l'additivité  $RA_{Dt}$ . Sur la base des concentrations dans la gélose, le modèle DEBtox



s'est montré plus performant que le modèle MixTox pour l'identification de l'origine de l'interaction observée expérimentalement. Ces résultats soulignent le potentiel du modèle pour l'identification de mécanismes d'interaction simples.

L'étude des effets combinés sur la base des concentrations dans le tapis bactérien a permis de mettre en évidence que si le modèle obtenu est capable de décrire correctement les effets combinés de l'U et du Cd pour les faibles niveaux de dose, il semble moins adéquat pour les niveaux de dose plus élevés. Le réajustement de l'ensemble des paramètres sur l'ensemble des données permet néanmoins une bonne description de celles-ci. Au regard de cette étude, la présence d'une seconde interaction se produisant au niveau des individus, durant la phase TK ou TD, apparaît donc comme peu probable et dans tous les cas, de faible ampleur, comme l'avait suggéré l'analyse à partir du modèle MixTox.

# Conclusion : synthèse, discussions et perspectives



Dans le cadre de ce projet, nous avons mis en place différentes démarches expérimentales et de modélisation afin de mieux comprendre la toxicité du mélange U/Cd sur le nématode *C. elegans* et d'identifier les interactions éventuelles. Dans ce chapitre, nous proposons tout d'abord une synthèse des résultats obtenus puis nous apportons des éléments de discussion autour de notions jouant un rôle déterminant pour notre étude et plus généralement, pour la caractérisation du risque causé par des substances en mélange.

## 9.1 Synthèse de l'étude des effets combinés de l'U et du Cd

### 9.1.1 Bilan des principaux résultats

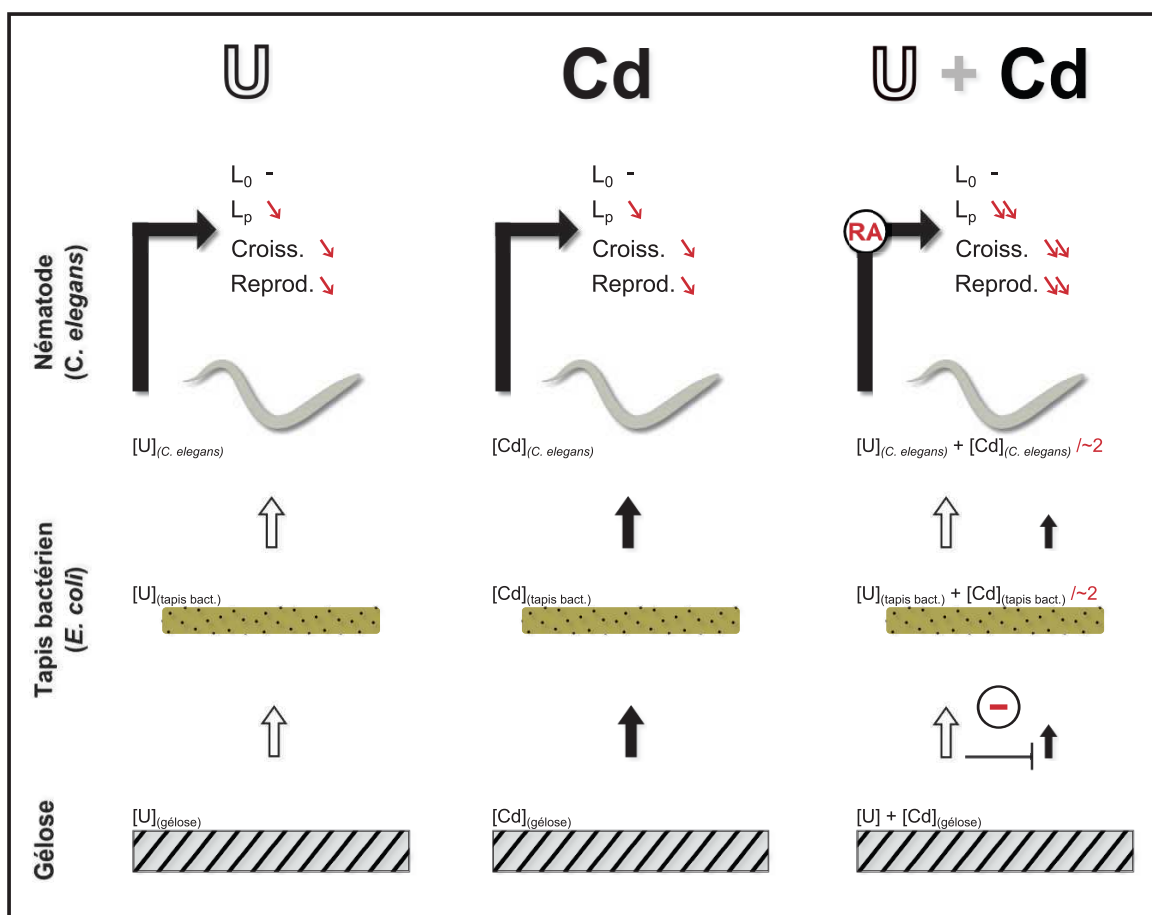
L'exposition à l'U ou au Cd seul affecte la croissance et la reproduction de *C. elegans*. En effet, la cinétique de croissance et de reproduction, la longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total, ainsi que la longueur à la puberté ( $L_p$ ) ont été significativement diminués chez les individus exposés (Fig. 9.1, Chp. 4, 7 et 8).

En accord avec ce qui avait été observé dans la littérature (e.g. Dutilleul *et al.*, 2013 ; Swain *et al.*, 2010), le Cd s'est révélé être plus toxique que l'U. Sur la base des concentrations molaires dans la gélose, les  $EC_{50}$ <sup>1</sup> de l'U sont entre 50 et 80 fois plus élevées que celles du Cd. Le transfert différentiel de ces ETM de la gélose vers le tapis bactérien explique cependant une grande partie de cette différence de toxicité puisque sur la base des concentrations molaires dans le tapis bactérien, les  $EC_{50}$  de l'U ne sont plus qu'entre 5 et 8 fois plus élevées que celles du Cd (Tab. 9.1, Chp. 4 et 7). D'un autre côté, la modélisation DEBtox, en s'appuyant sur l'estimation des cinétiques d'internalisation des substances et du développement des effets, a permis d'identifier une différence substantielle entre les concentrations sans effet (NEC) de l'U et du Cd (Tab. 9.1, Chp. 8). Les effets du Cd débutent à partir d'infimes quantités internalisées avec une cinétique modérée tandis qu'il faut, au contraire, une internalisation plus conséquente de l'U, mais avec une cinétique rapide, pour que l'apparition des effets se produise. Le meilleur mode d'action identifié pour les deux ETM est le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture ». Ces différents résultats sont en accord avec des études portant sur la modélisation des effets de l'U et du Cd seuls sur *C. elegans*, menées au préalable (Goussen *et al.*, 2015 ; Swain *et al.*, 2010).

L'analyse des effets combinés de l'U et du Cd sur la base des concentrations dans la gélose, à partir des modèles MixTox et DEBtox, a permis de mettre en évidence d'une part, que le modèle de référence d'addition des réponses (RA) permet une meilleure description

---

1. Augmentation de longueur corporelle maximale et nombre de larves produites total ; 11 j d'exposition.



**FIGURE 9.1** Schéma de synthèse des résultats de l'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*. ⇨ : flux d'U; ⇨ (⇨) : flux (réduit) de Cd; ⊖ : interaction antagoniste, l'U réduit le transfert de Cd de la gélose vers le tapis bactérien; L<sub>0</sub> : longueur à l'éclosion; L<sub>p</sub> : longueur à la puberté; Croiss. : croissance; Reprod. : reproduction; RA : effets combinés suivant globalement le modèle de référence d'addition des réponses; - : absence d'effet; ↓ : effet négatif des contaminants.

**Tableau 9.1** Récapitulatif des valeurs de toxicité de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* sur la base des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien. <sup>a</sup>

Critère	Données	Gélose		Tapis bactérien	
		(mmolL <sup>-1</sup> )		(nmol mg <sub>dw</sub> <sup>-1</sup> )	
		U	Cd	U	Cd
NOEC		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LOEC	croiss.	1,05	0,009	29,2	2,9
EC <sub>10</sub>		1,11	0,014	33,6	4,5
EC <sub>50</sub>		1,15	0,024	41,3	7,8
NOEC		1,16	0,009	41,5	2,9
LOEC	reprod.	1,19	0,012	49,4	3,9
EC <sub>10</sub>		1,04	0,010	30,9	3,2
EC <sub>50</sub>		1,13	0,014	37,2	4,4
NEC	croiss./reprod.	0,92	2 × 10 <sup>-4</sup>	16,5	2 × 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>. NOEC : concentration testée la plus élevée ne produisant pas d'effet statistiquement significatif; LOEC : concentration testée la plus faible produisant un effet statistiquement significatif; EC<sub>x</sub> : concentration produisant *x* % d'effet sur l'augmentation de longueur maximale ou le nombre de larves produites total (*i.e.* après 11 j d'exposition); NEC : concentration sans effet pour l'ensemble de la croissance et de la reproduction (obtenue à partir de la modélisation DEBtox). Les concentrations sont exprimées en mmolL<sup>-1</sup> dans la gélose et en nmol mg<sup>-1</sup> dans le tapis bactérien.

des données expérimentales par rapport au modèle d'addition des concentrations (CA), et d'autre part, qu'une interaction antagoniste, de forte amplitude, s'est produite entre ces deux ETM. Le modèle DEBtox a également permis de préciser que cette interaction interférait probablement avec la toxicité<sup>1</sup> du Cd. Deux expériences complémentaires ont permis de confirmer ces prédictions : il a été montré que la coprésence d'U réduit d'un peu plus d'un facteur 2 le transfert du Cd de la gélose vers le tapis bactérien et que la bioaccumulation du Cd par les nématodes semble suivre la même tendance. Ces résultats laissent d'ailleurs supposer que les concentrations d'U et de Cd dans le tapis bactérien reflètent mieux la biodisponibilité de ces ETM que les concentrations dans la gélose.

Finalement, afin de vérifier si l'interaction mise en évidence dans le milieu d'exposition permettait d'expliquer la totalité de la déviation de l'additivité, et que d'autres interactions (*e.g.* au niveau des individus, durant la phase toxicocinétique ou toxicodynamique) n'intervenaient pas, les données ont été réanalysées sur la base des concentrations dans le tapis bactérien à partir des modèles MixTox et DEBtox. Le modèle MixTox nous a permis de mettre en évidence que les effets combinés de l'U et du Cd étaient globalement proches de l'additivité RA. Néanmoins, des interactions de faible amplitude mais significatives, de type synergie pour les faibles niveaux de dose et de type antagonisme pour les forts niveaux de dose ont été identifiées pour la reproduction. L'analyse, réalisée à différents temps de mesure, révèle que la nature des effets combinés évolue peu au cours du temps. Seul le basculement vers l'interaction antagoniste pour les données de reproduction apparaît tardivement. Même si des difficultés d'application ont été rencontrées, la réanalyse des données à partir du modèle DEBtox nous permettrait quant à elle de conclure à une absence d'interaction au niveau des individus ; les effets combinés de l'U et du Cd suivraient globalement l'additivité selon le modèle d'addition des réponses implémentés dans le DEBtox (RA<sub>DT</sub>).

### **9.1.2 Influence de la variabilité expérimentale pour l'identification des interactions U/Cd au niveau des individus**

Avant, de conclure de manière globale sur la présence d'une interaction au niveau des individus, il convient de discuter de la variabilité associée à nos résultats expérimentaux. Pour un même protocole expérimental, celle-ci peut en effet entraîner l'identification d'effets combinés contrastés en fonction des études (Cedergreen *et al.*, 2007). Nous discutons dans un premier temps de la variabilité en lien avec les concentrations d'exposition, puis, dans un second temps, de la variabilité en lien avec le plan expérimental.

---

1. Au sens général : de l'exposition à la toxicodynamique.

Les incertitudes au niveau des concentrations d'exposition aux contaminants contribuent à une part de la variabilité observée au niveau de la réponse des organismes. Afin de la réduire, Cedergreen *et al.* (2007) suggèrent d'utiliser les concentrations mesurées plutôt que les concentrations nominales. Dans un premier temps, l'ensemble des analyses de données de ce projet a été réalisé sur la base des concentrations mesurées dans la gélose. Les interprétations réalisées ne sont pas entièrement identiques à celles présentées dans la trame principale de ce document. En utilisant les concentrations dans la gélose, le niveau d'interaction étant élevé, peu de différences ont été retrouvées dans les interprétations des effets combinés (Tab. 4.1, Chp. 4). Au contraire, sur la base des concentrations dans les bactéries, l'utilisation des concentrations mesurées a conduit à des interprétations d'effets combinés différentes de celles présentées dans le chapitre 7. Les résultats sont présentés dans l'annexe *Support 2 au chapitre 6*<sup>1</sup>. Brièvement, pour l'ALC maximale des effets combinés synergiques, pour les niveaux de dose inférieurs à l'EC<sub>41</sub>, additifs, pour les niveaux de dose autour de l'EC<sub>41</sub>, et antagonistes, pour les niveaux de dose supérieurs à l'EC<sub>41</sub>, ont été mis en évidence. Pour le NLP total, des effets combinés additifs ont été identifiés. L'étude cinétique du développement de ces effets a permis de souligner que ceux-ci avaient tendance à diminuer de manière globale au cours du temps, par rapport à ceux prédits selon l'additivité RA ; passant de l'additivité à des effets antagonistes pour la plupart des données d'ALC maximale et d'effets synergiques à l'additivité pour la plupart des données de NLP total.

L'obtention d'ajustements notablement meilleurs à partir des concentrations nominales par rapport à ceux obtenus à partir des concentrations mesurées suggère qu'au lieu d'expliquer une part de la variabilité des données expérimentales, la mesure des concentrations des contaminants dans le milieu contribue à accentuer la variabilité. Différentes analyses réalisées en utilisant soit les concentrations nominales, soit les concentrations mesurées de l'U et du Cd, nous ont permis d'identifier que l'augmentation de variabilité provenait principalement de la mesure des concentrations d'U. En raison de la pente accentuée des courbes dose-réponse de l'U, une erreur de mesure de 10 % peut aboutir à des prédictions d'effet allant de moins de 6 % à plus de 92 %. L'utilisation des concentrations mesurées semble donc délicate lorsqu'un ou plusieurs des composants du mélange étudié possède une pente de courbe dose-réponse élevée. Par ailleurs, dans le cas de l'analyse des effets combinés sur la base des concentrations dans le tapis bactérien, l'estimation de ces concentrations à partir de régressions décrivant le transfert de l'U et du Cd, de la gélose vers le tapis bactérien, obtenues à partir d'une expérience complémentaire, contribue probablement à l'augmentation de l'incertitude associée aux concentrations d'exposition.

---

1. p. 235.

Dans les études portant sur la toxicité des mélanges, l'utilisation d'un plan expérimental comportant de nombreuses conditions d'exposition expérimentale couvrant la surface de réponse, comme celui utilisé dans la présente étude, permet généralement la réalisation d'analyses robustes ne nécessitant que peu de duplicatas (Jonker *et al.*, 2011). Nous avons cependant pu mettre en évidence dans cette étude que pour certaines conditions d'exposition, la réponse biologique apparaissait comme hautement variable (*e.g.* un coefficient de variation de 60 % a parfois été observé, Fig. S.7). Dans ces cas-là, plusieurs solutions pourraient être envisagées pour rendre l'interprétation plus robuste : augmenter le nombre de duplicatas par condition d'exposition, augmenter le nombre de conditions d'exposition ou encore répéter plusieurs fois l'expérience (Cedergreen *et al.*, 2007). En conservant un protocole expérimental similaire, augmenter le nombre de duplicatas ou de conditions représenterait un effort expérimental supplémentaire non négligeable et difficilement réalisable. La répétition de l'expérience serait alors probablement la meilleure solution.

Par ailleurs, en raison de l'interaction dans le milieu d'exposition, le plan expérimental initial de la présente étude, couvrant de manière homogène la surface de réponse sur la base des concentrations d'U et de Cd dans la gélose, s'est trouvé recentré vers les concentrations de Cd produisant de faibles effets lorsque les concentrations dans les bactéries ont été utilisées. Une adaptation du plan expérimental initial serait nécessaire afin de mieux explorer la surface de réponse pour des concentrations de Cd produisant de forts effets.

### 9.1.3 Conclusion sur la nature des effets combinés U/Cd au niveau des individus

L'identification et la quantification des interactions synergiques revêt un intérêt particulier pour la caractérisation du risque causé par les mélanges de contaminants. Dans la revue de la littérature de Cedergreen (2014), l'auteur souligne la rareté des interactions synergiques de forte amplitude entre les ETM. Dans la présente étude, une interaction synergique significative a été identifiée, aux faibles niveaux de dose, pour les données du nombre de larves produites total à partir de l'approche descriptive MixTox et sur la base des concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien. Au regard des connaissances actuelles sur le mode d'action de ces ETM, une telle interaction pourrait par exemple s'expliquer par le potentiel génotoxique de l'U (Barillet *et al.*, 2005 ; Stearns *et al.*, 2005 ; Yazzie *et al.*, 2003) et la capacité du Cd à inhiber certains mécanismes de réparation de l'ADN (Hartwig, 2010 ; Mukherjee *et al.*, 2004 ; Schwerdtle *et al.*, 2010)<sup>1</sup>. Cette synergie reste cependant de faible

---

1. Voir sections 1.3.1.8 (p. 50) et 1.3.2.7 (p. 59).



amplitude et n'a par conséquent été identifiée que sur la base de l'additivité RA.

Dans la mesure où (i) les incertitudes dans les concentrations d'exposition ou dans les réponses biologiques, soulignées ci-dessus, peuvent avoir une influence importante sur les analyses à partir des modèles MixTox et DEBtox, (ii) que seuls des niveaux modérés d'interaction ont été identifiés à partir du modèle MixTox sur la base des concentrations dans le tapis bactérien et (iii) que le modèle DEBtox serait plus en faveur d'une absence d'interaction, nous pouvons estimer que les effets combinés de l'U et du Cd sur l'ensemble de la croissance et de la reproduction de *C. elegans* suivent globalement l'additivité RA et qu'aucune interaction au niveau de la phase toxicocinétique ou toxicodynamique, n'affecte notablement ces critères d'effet. Cette étude souligne donc qu'aux concentrations expérimentales testées, une interaction entre l'U et le Cd, ayant des conséquences importantes au niveau de leurs effets combinés, est susceptible de se produire dans le milieu d'exposition mais pas au niveau de l'organisme *C. elegans*, durant les phases toxicocinétiques et toxicodynamiques. Elle met ainsi en évidence, comme d'autres études auparavant (Jonker *et al.*, 2004b ; Trenfield *et al.*, 2011b), la nécessité de vérifier expérimentalement l'origine d'une interaction dans le milieu d'exposition, dans le cas de l'étude des effets de mélanges comportant des ETM.

## 9.2 Modèles descriptifs et modèles mécanistes pour l'étude des mélanges

Au cours de ce projet, l'étude des effets combinés de l'U et du Cd ont été abordés suivant deux stratégies d'analyse : une analyse descriptive, fondée sur les courbes dose-réponses de ces ETM, à partir du modèle MixTox, et une analyse mécaniste, fondée sur les mécanismes toxicocinétiques/toxicodynamiques de ces ETM, à partir du modèle DEBtox.

Les méthodes d'analyse descriptive de la toxicité des mélanges ont été largement éprouvées depuis plusieurs dizaines d'années. Les modèles les plus avancés, tels que le modèle MixTox, permettent une analyse rapide des données expérimentales sur l'ensemble de la surface de réponse. Couplés à une approche expérimentale étendue, c'est-à-dire, l'étude de la toxicité de nombreuses conditions de mélange, sur plusieurs critères d'effet, pour plusieurs temps d'exposition, ils permettent une étude détaillée des effets combinés et l'identification d'éventuelles interactions dépendantes des ratios de concentration des substances en mélange, des niveaux de dose du mélange, du critère d'effet ou encore du temps d'exposition. En contrepartie, ces modèles peuvent apparaître comme trop sensibles à la variabilité

expérimentale. Plusieurs études ont en effet mis en évidence une variabilité notable dans les effets combinés identifiés à différents temps d'exposition (Baas *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2015 ; Van Gestel *et Hensbergen*, 1997) et ont souligné le manque de reproductibilité de la méthode (Baas *et al.*, 2007 ; Cedergreen *et al.*, 2007). Les analyses réalisées au cours de cette étude tendent à appuyer ces observations.

D'un autre côté, l'application d'approches mécanistes de type DEBtox, où les effets de contaminants sur un organisme sont considérés comme la résultante d'une perturbation de la gestion de l'énergie au sein de cet organisme, à l'étude de la toxicité des mélanges n'est que très récente. À notre connaissance, seulement trois applications avaient été réalisées sur des critères d'effet sublétaux (Jager *et al.*, 2014, 2010 ; Péry *et al.*, 2008). L'un des principaux avantages de l'approche DEBtox réside dans l'intégration de la description de la cinétique des effets sur la croissance et la reproduction au sein d'un même modèle. Ceci permet d'analyser l'ensemble des données à partir du même jeu de paramètres, ce qui rendrait le modèle moins sensible à la variabilité (Baas *et al.*, 2009). Par ailleurs, le modèle DEBtox, décrivant les processus toxicocinétiques et toxicodynamiques des substances, peut permettre de tester des hypothèses d'interaction pour expliquer les effets combinés observés et d'orienter ainsi les recherches futures (Jager *et al.*, 2014). Par exemple, la diminution de la constante en lien avec l'internalisation ( $k_e$ ) d'une substance pour les conditions en mélange pourrait rendre compte d'un antagonisme par compétition pour l'internalisation de Ni et Co (He *et al.*, 2015). Pour un mélange binaire, la diminution du  $k_e$  d'une substance et l'augmentation de son homologue pour l'autre substance pourrait par exemple rendre compte d'une interaction de type synergie/antagonisme ratio-dépendant. Le modèle DEBtox présente également des avantages pour la caractérisation des risques des substances en mélange. Ce dernier permet l'estimation d'une NEC qui, contrairement aux NOEC et  $EC_x$ , est indépendante du temps d'exposition et du critère d'effet (croissance et reproduction). Enfin à l'inverse des modèles descriptifs, l'utilisation du modèle DEBtox rend possible l'extrapolation des effets combinés de substances pour des temps d'exposition non mesurés expérimentalement, pour des situations où le niveau de nourriture ou les concentrations d'exposition fluctuent au cours du temps (Kooijman *et Bedaux*, 1996 ; Péry *et al.*, 2003) ou encore du niveau individuel aux populations (Beaudouin *et al.*, 2012 ; Martin *et al.*, 2013). Une extrapolation à d'autres espèces est par ailleurs théoriquement possible (Kooijman, 2010).

Des difficultés d'application et d'utilisation du modèle DEBtox ont néanmoins été rencontrées au cours de cette étude. Dans nos conditions expérimentales, des irrégularités vis-à-vis des hypothèses du modèle simplifié ont été constatées et nécessiteraient le développement d'un modèle DEBtox complet pour *C. elegans*. Par exemple, la constance de la

longueur à la puberté ( $L_p$ ), y compris en condition de stress, figure parmi les hypothèses du modèle DEBtox simplifié. La présente étude a cependant permis de mettre en évidence une diminution significative de ce paramètre chez les individus exposés à l'U et/ou au Cd. D'autre part, un problème a été rencontré pour l'estimation des effets combinés additifs de l'U et du Cd : le modèle tend à surestimer la toxicité de quelques conditions U/Cd en mélange à niveau de dose élevé<sup>1</sup>. La trop grande spécificité des paramètres (physiologiques, TK et TD), estimés à partir des jeux de données d'apprentissage (individus non-exposés, exposés à l'U ou au Cd seul) et non totalement réajustés pour la prédiction des effets combinés de l'U et du Cd, contribue certainement en partie à ce problème. En effet, [Goussen \*et al.\* \(2015\)](#) préconisent la réestimation des paramètres DEBtox sur l'ensemble des données afin de mieux tenir compte de l'incertitude associée aux données expérimentales et au modèle. D'un autre côté, [Jager \*et al.\* \(2014\)](#) proposent de conserver les paramètres physiologiques fixés afin qu'une mauvaise représentation des effets des substances par le modèle soit compensée par une modification des paramètres physiologiques. Dans la présente étude, la réestimation de tous les paramètres DEBtox a permis une description satisfaisante de l'ensemble des données expérimentales.

D'autres inconvénients d'application, non spécifiques à cette étude, peuvent également être évoqués. Le modèle DEBtox fait intervenir de nombreux paramètres qui devraient être réajustés sur l'ensemble des données afin d'identifier d'éventuelles interactions (*e.g.* jusqu'à 14 dans notre étude, si l'on considère les paramètres physiologiques). Ceci allonge considérablement les durées d'analyse et rend plus difficile la convergence du modèle et l'estimation des paramètres<sup>2</sup>. L'utilisation de l'inférence bayésienne, en alternative à la méthode d'ajustement utilisée dans la présente étude, peut permettre de compenser en partie ces difficultés. En effet, l'utilisation d'une méthode d'échantillonnage aléatoire des valeurs des paramètres en suivant une certaine loi de distribution (méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov) améliore l'estimation des paramètres pour lesquels des connaissances *a priori* sont disponibles et rend directement possible l'estimation des intervalles de confiance ([Billoir \*et al.\*, 2008a](#)). Par ailleurs, l'inférence bayésienne peut permettre la prise en compte de facteurs d'incertitude (*e.g.* l'incertitude individuelle) dans l'analyse afin d'améliorer la robustesse des ajustements. Néanmoins, des problèmes de convergence et de durée d'analyse peuvent également être rencontrés avec l'inférence Bayésienne.

Enfin, les nombreuses possibilités de modélisation des effets, offertes par les modèles DEBtox (simplifiés ou complets) impliquent qu'un grand nombre de mécanismes de toxicité

---

1. Au niveau de la zone d'effondrement de la surface de réponse.

2. La méthode consistant à ajuster plusieurs fois les paramètres du modèle à partir de valeurs initiales différentes (Sec. 3.6.3.4, p. 89), devient difficile à mettre en place lorsque le nombre de paramètres est important.

des substances seules et de mécanismes hypothétiques d'interaction de substances en mélange peuvent être testés. Le meilleur mode d'action pour décrire les effets d'une substance peut par exemple dépendre des concentrations ou du temps d'exposition de l'organisme (Augustine *et al.*, 2012). L'étude des effets combinés de substances en mélange peut alors se révéler très complexe et plusieurs hypothèses d'interaction peuvent aboutir à une description équivalente des données expérimentales, comme observé dans la présente étude<sup>1</sup>. Dans ces cas-là, la limite de l'utilité du modèle est atteinte. D'autres données expérimentales sont nécessaires pour d'une part, valider les hypothèses sur lesquelles s'appuie le modèle et d'autre part, approfondir l'étude.

### 9.3 Modèles d'additivité de référence et interactions

L'étude des effets combinés de substances en mélange et l'identification des interactions nécessite une méthode pour déterminer les effets combinés de ces substances lorsqu'elles n'interagissent pas, à partir de la toxicité de ces substances prises séparément. Deux concepts ont émergé et sont classiquement utilisés : l'additivité CA dans le cas de mélange de substances ayant un mode d'action similaire et l'additivité RA dans le cas contraire.

Dans la pratique, il est très difficile de déterminer *a priori* à quel modèle se référer pour l'étude d'un mélange particulier. En effet, les modes d'action des substances sont rarement précisément caractérisés et même s'ils le sont, il est concevable que ceux-ci soient susceptibles d'évoluer en fonction de la concentration ou du temps d'exposition (Cedergreen *et al.*, 2008). De plus, la notion de « (non-)similarité de mode d'action » est en elle-même vague et peut être aussi bien interprétée au niveau moléculaire (même site d'action biologique<sup>2</sup>) qu'à des échelles supérieures (Cedergreen *et al.*, 2008 ; Svendsen *et al.*, 2010). Dans notre étude par exemple, l'U et le Cd partagent le même mode d'action DEBtox, « réduction de l'assimilation de nourriture », pourtant l'additivité RA décrit mieux les effets combinés de ces deux ETM que l'additivité CA. Plus généralement, les modèles d'additivité CA et RA se sont révélés tous deux capables de prédire correctement les effets de mélanges de substances ayant des modes d'action considérés comme similaires ou non similaires (Arrhenius *et al.*, 2004 ; Cedergreen *et al.*, 2008 ; Faust *et al.*, 2001, 2003).

Bien que les prédictions entre les additivités CA et RA soient généralement proches, il existe des situations, déterminées par la pente des courbes dose-réponse des substances en mélange, pour lesquelles l'additivité CA prédit plus de toxicité que l'additivité RA et

1. Voir section 8.3.4 (p. 153).

2. *e.g.* cas d'un mélange d'inhibiteurs du photosystème II chez les organismes photosynthétiques.

inversement (Kortenkamp *et al.*, 2009). Dans la présente étude, en raison de la raideur des pentes des courbes dose-réponse (principalement de l'U), l'additivité CA a prédit, pour une même condition expérimentale, un effet deux fois plus grand en moyenne et jusqu'à neuf fois plus grand que celui prédit selon l'additivité RA. Par ailleurs, dans le cas où un mélange est constitué d'un ensemble de substances à des concentrations égales ou inférieures à leurs concentrations sans effet, les prédictions des deux types d'additivité vont s'opposer. Sur la base de l'additivité CA est faite l'hypothèse que n'importe quelle concentration d'une substance contribue à la toxicité générale du mélange dans lequel elle se trouve, tandis que sur la base de l'additivité RA, seules les substances dont la concentration est supérieure à leurs concentrations sans effet contribueront à la toxicité générale (Kortenkamp, 2011). L'identification des interactions peut donc être fortement dépendante du modèle additif choisi.

Le manque de connaissances sur les mécanismes fins qui régissent la génération de l'effet combiné d'un mélange de substances rend difficile l'identification des interactions. Lorsqu'une étude a pour but de clarifier la toxicité d'un mélange sur un organisme ainsi que les mécanismes d'interaction qui peuvent s'opérer, l'utilisation en parallèle des additivités de référence CA et RA semble indispensable (Jonker *et al.*, 2005). Si le niveau d'interaction est important, les deux additivités aboutissent à des conclusions similaires. Par contre, lorsque le niveau d'interaction est plus modéré, la nature et la significativité de l'interaction sont généralement ambiguës. La répétition de l'expérience et l'utilisation de l'additivité décrivant le mieux les données comme référence pour l'identification de l'interaction peuvent permettre de conclure.

Dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque écotoxicologique, l'objectif est de minimiser l'incertitude sur la caractérisation des effets d'un mélange tout en restant conservateur. Dans le cas de l'étude d'un mélange dont tout ou partie des composants sont connus, l'additivité CA est généralement préférée pour la prédiction des combinés (Backhaus *et al.*, 2010). En effet, la compilation de nombreuses données expérimentales a permis de mettre en évidence que celle-ci est capable de prédire relativement bien la toxicité des mélanges et qu'elle est la plupart du temps la plus conservatrice<sup>1</sup>. Cependant, dans des situations comme celle décrite dans la présente étude, l'utilisation du CA comme modèle d'additivité de référence peut surestimer de manière non négligeable la toxicité d'un mélange par rapport au modèle d'additivité RA. Ainsi, en fonction du degré de protection désiré, l'utilisation de l'additivité RA pourrait se révéler plus appropriée. Par ailleurs, dans le cas de contaminations multiples, où plus de deux substances sont impliquées, des approches plus complexes,

---

1. Sous certaines conditions de pentes des courbes dose-réponse des substances en mélange, l'additivité RA peut néanmoins être plus conservatrice.

alliant les additivités CA et RA, ont été proposées. Celles-ci reposent sur la classification des substances d'un mélange en groupes de substances partageant un mode d'action similaire. La toxicité de chaque groupe est dans un premier temps estimée sur la base de l'additivité CA, puis la toxicité totale du mélange est estimée en unissant les toxicités de chaque groupe au moyen de l'additivité RA (Ragas *et al.*, 2011). De plus, dans le cas de preuves expérimentales d'une synergie de forte amplitude<sup>1</sup> des facteurs de sécurité supplémentaires sont utilisés (Ragas *et al.*, 2011).

## 9.4 La biodisponibilité dans l'étude de la toxicité des mélanges sur les organismes du sol

Afin de clarifier à quel niveau du mécanisme de toxicité se produit une interaction entre des substances en mélange, l'analyse des données peut être réalisée sur la base de différentes concentrations d'exposition. Par exemple, la comparaison de l'analyse des données sur la base des concentrations totales et des concentrations supposées biodisponibles peut permettre d'identifier une interaction dans le milieu d'exposition tandis que la comparaison de l'analyse des données sur la base des concentrations biodisponibles et des concentrations internalisées/toxiques peut permettre d'identifier une interaction durant la phase toxicocinique.

Dans la présente étude, les concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien semblent mieux refléter la disponibilité de ces ETM pour *C. elegans* que les concentrations dans la gélose. Certaines études, menées en milieu liquide, se sont intéressées à la caractérisation des voies d'exposition de *C. elegans* au Cd. Elles montrent que ce nématode est principalement exposé par le biais de l'alimentation (Höss *et al.*, 2011 ; Offermann *et al.*, 2009). L'étude de Höss *et al.* (2011) suggère que la fraction soluble ingérée de Cd décrit mieux la toxicité que la fraction totale de Cd ou celle associée aux bactéries. L'étude ne fait cependant pas la distinction, au niveau des bactéries, entre la fraction adsorbée et la fraction absorbée. Dans le chapitre 6, l'activité des bactéries étant supprimée par une exposition aux UV, nous avons fait l'hypothèse que le transfert réduit de Cd de la gélose vers le tapis bactérien en présence d'U était le résultat d'une compétition pour l'adsorption des deux ETM à la surface des bactéries. Cette dernière suppose implicitement que la fraction adsorbée sur les bactéries ingérées est rendue biodisponible dans les conditions acides du tractus digestif de *C. elegans*. La réanalyse des données sur la base des concentrations dans le tapis bactérien nous

---

1. Cas peu fréquent dans la littérature (Backhaus *et al.*, 2010 ; Cedergreen, 2014).

a permis de conclure globalement à une absence d'interaction, au cours des phases toxicocinétiques ou toxicodynamiques, ayant des répercussions importantes sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*.

Pour les organismes du sol en général, l'identification des concentrations réellement biodisponibles ou internalisées/toxiques n'est pas aisée et est régulièrement discutée et remise en question. Dans certains cas, les fractions en ETM dissous dans l'eau interstitielle ou faiblement liés au sol (*e.g.* fraction extraite d'un sol à l'aide d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ ) peuvent s'avérer être de bons indicateurs de la bioaccumulation et de la toxicité des ETM (Janssen *et al.*, 1997 ; Lanno *et al.*, 2004). Dans d'autres cas cependant, les concentrations d'ETM totales ou pouvant être extraites à partir de solutions reproduisant les conditions d'un tractus digestif peuvent être de meilleurs indicateurs de la bioaccumulation et de la toxicité (Hobbelen *et al.*, 2006 ; Oste *et al.*, 2001). Ces différences pourraient être provoquées par la grande variabilité des propriétés physico-chimiques des sols, des ETM, et également par des voies d'exposition différentielles chez les organismes considérés (Peijnenburg *et Jager*, 2003). Par exemple, dans le cas d'une exposition par voie dermique majoritaire, seules les formes chimiques libres des ETM pourraient être internalisées (Lanno *et al.*, 2004). Mais dans le cas d'une exposition par l'alimentation, la fraction biodisponible peut être supérieure à la seule fraction d'ETM libres (Peijnenburg *et Jager*, 2003). Les conditions régnant dans le tractus digestif peuvent entraîner la désorption des ETM des particules de sol ou de nourriture ingérées. Ces dernières agissent alors comme vecteur de contamination. Mais les conclusions sur les voies d'exposition majoritaires peuvent être contrastées, même pour des espèces proches. Par exemple, l'étude de Vijver *et al.* (2003), où a été réalisée une exposition aux ETM de vers *Lumbricus rebellus* dont l'orifice buccal a été obstrué par de la colle, indique que l'exposition par l'alimentation est négligeable par rapport à la voie dermique. D'autres études sur *L. rebellus* et *Eisenia andrei*, suggèrent au contraire, que la voie d'exposition aux ETM par l'alimentation n'est pas négligeable (Morgan *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'identification des fractions d'ETM internalisées par un organisme qui sont réellement toxiques n'est également pas aisée. Les organismes disposent de systèmes de gestion des ETM qui permettent la détoxification d'une partie de la fraction internalisée (prise en charge des ETM par les MT, précipitation, etc. ; Rainbow, 2007). La concentration bioaccumulée totale n'est pas forcément un bon indicateur de la fraction internalisée toxique (Bur *et al.*, 2012 ; Van Gestel, 2012).

Dans le cadre de l'étude de la toxicité des mélanges, les difficultés d'identification des fractions réellement biodisponibles ou internalisées toxiques d'ETM entraînent des incertitudes importantes pour l'identification des interactions (Peijnenburg *et Vijver*, 2007). Par

exemple, dans l'étude de [Jonker et al. \(2004b\)](#) sur des populations de *C. elegans*, l'utilisation d'une extraction au  $\text{CaCl}_2$  a pu permettre d'expliquer une interaction synergique entre le Cu et le Zn. Mais dans le cas du mélange Cu/Cd, cette méthode n'a pas permis d'expliquer les effets combinés observés. De plus, dans l'étude de [He et al. \(2015\)](#) portant sur la toxicité chronique du mélange Ni/Co sur la survie du ver *Enchytraeus crypticus*, même si l'utilisation des concentrations bioaccumulées de ces ETM a permis d'expliquer une interaction antagoniste (diminution de la bioaccumulation de Ni en présence de Co), elle n'a pas permis d'expliquer plus de 60 % de la variation des données. Les concentrations bioaccumulées de Ni et Co ne reflètent donc pas totalement les effets combinés de ces ETM chez *E. crypticus*. Par conséquent, l'amélioration de la prise en compte de la toxicité des mélanges pour les organismes (du sol) dans les démarches d'évaluation du risque écotoxicologique n'ira de pair qu'avec une meilleure compréhension des liens existants entre les concentrations d'exposition, biodisponibles et bioaccumulées des ETM, et leur toxicité ([Vijver et al., 2011](#)).

## 9.5 Perspectives générales

Dans la présente étude, l'évaluation des effets d'une exposition chronique au mélange U/Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* nous a permis de mettre en évidence que les interactions entre l'U et le Cd sont peu susceptibles de se produire au niveau des individus (durant la phase toxicocinétique ou toxicodynamique) mais qu'au contraire, des interactions de forte amplitude peuvent se produire dans le milieu d'exposition. Cette étude ayant été conduite à travers un système expérimental simplifié où l'influence de paramètres environnementaux importants n'a pas été abordée, il serait désormais intéressant d'envisager l'étude du mélange U/Cd à travers des matrices d'exposition plus proches de la réalité environnementale. Les paramètres tels que le pH, la présence de complexants chimiques et biologiques peuvent influencer la biodisponibilité des ETM ([Lanno et al., 2004](#)) et être à l'origine d'interactions ([Jonker et al., 2004b](#)). L'utilisation d'organismes du sol plus adaptés à ce genre d'étude que *C. elegans* pourrait s'avérer nécessaire (e.g. permettant des mesures de bioaccumulation plus aisées et le recours au fractionnement subcellulaire). Par ailleurs, le couplage des modèles de prédiction de spéciation chimique ou des méthodes expérimentales pour tenter d'approximer la biodisponibilité (e.g. utilisation d'échantillonneurs passifs DGT) avec le modèle DEBtox pourrait constituer une structure d'analyse complète et détaillée du mécanisme de toxicité, de l'exposition à la phase toxicodynamique ([Chen et al., 2010](#)). Le développement d'un module toxicocinétique, plus évolué qu'un module de diffusion passive, pourrait s'avérer nécessaire pour mieux rendre compte des compétitions entre



ETM pour l'internalisation. Cela nécessiterait cependant la génération de jeux de données conséquents.

Dans ce projet, l'exposition des nématodes au mélange U/Cd a été abordée de manière statique : les individus ont été exposés dès leur éclosion à des concentrations fixes d'U et de Cd en mélange. Or dans l'environnement, les concentrations d'exposition sont susceptibles d'évoluer. Comment évoluent alors les effets combinés ? Peut-on mettre en évidence des interactions au niveau des processus de dépuración ? Une approche expérimentale d'exposition chronique de nématodes à des mélanges fluctuants couplée à une analyse des résultats avec un modèle capable de décrire la toxicocinétique des substances (*e.g.* le DEBtox) pourrait par exemple permettre un début de réponse. Des scénarios d'exposition sur plusieurs générations sont également envisageables. L'exposition de populations à un contaminant peut entraîner une pression de sélection importante et conduire, à l'issue de plusieurs générations, à une spécialisation de la population par la sélection d'un caractère avantageux vis-à-vis du contaminant. Mais cette spécialisation peut s'avérer être un désavantage pour la résistance face à d'autres contaminants (Hoffmann *et Juha*, 1999). Une problématique de travail pourrait par exemple être l'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur une population qui se serait adaptée depuis plusieurs générations à l'un des deux ETM. Le nématode *C. elegans* (notamment la souche construite par Teotónio *et al.* (2012) présentant une grande diversité génétique) s'avère particulièrement intéressante pour les études multigénérationnelles en raison de son cycle de vie très rapide (Goussen *et al.*, 2013). Par exemple, en utilisant cette population, Dutilleul (2013) a étudié les coûts adaptatifs engendrés par une exposition durant 22 générations à l'U ou à un stress salin. L'étude montre, entre autre, qu'une population spécialisée suite à une exposition au NaCl devient plus sensible à l'effet de l'U.

L'influence des rayonnements ionisants dans les effets combinés de l'U et du Cd n'a pas été abordée dans la présente étude. En raison de l'isotopie de la source d'U utilisée, la chimiotoxicité de cet ETM est plus importante que sa radiotoxicité (Ribera *et al.*, 1996). Une expérience combinant les effets de l'irradiation- $\gamma$  externe et du Cd<sup>1</sup>, menée en marge de l'étude du mélange U/Cd, ainsi que différents résultats publiés dans la littérature (Danšvá *et al.*, 2010 ; Geras'kin *et al.*, 2005 ; Qiu *et al.*, 2012 ; Salovsky *et al.*, 1993), suggèrent que les rayonnements ionisants pourraient interagir de manière synergique avec le Cd. Une étude des effets combinés U/Cd au moyen d'un mélange isotopique d'U produisant une irradiation plus importante, pourrait être comparée à la présente étude et fournir d'éventuelles pistes quant à l'influence des rayonnements ionisants sur la toxicité du mélange U/Cd.

---

1. Voir annexe *Déroulement du projet de thèse* (p. 215).

Initialement conçues pour des approches descriptives, les additivités CA et RA ont été implémentées dans le cadre du modèle mécaniste DEBtox. Une étude menée sur un mélange binaire de deux composés aromatiques polycycliques (partageant le même mode d'action) a pu valider la bonne intégration de l'additivité CA au modèle DEBtox (Jager *et al.*, 2010). La présente étude, menée sur deux ETM partageant le même mode d'action DEBtox ainsi que l'étude de Jager *et al.* (2014), menée sur un mélange binaire d'un composé aromatique polycyclique et d'un ETM, ne partageant pas le même mode d'action DEBtox, suggèrent que l'additivité RA du modèle DEBtox permet également une bonne description des effets combinés. La génération de jeux de données supplémentaires sur d'autres substances en mélange ou sur des mélanges plus complexes et compatibles avec une analyse DEBtox sera nécessaire à l'avenir afin de mieux éprouver le modèle.

Le *work package* 4 du réseau européen STAR, dans lequel s'inscrit la présente étude, avait (entre autre) pour objectif l'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur des espèces issues de différents phylum : la plante *Arabidopsis thaliana*, le crustacé dulçaquicole *Daphnia magna*, le nématode *Caenorhabditis elegans* ainsi que le poisson *Salmo salar*. Ce projet arrivera à son terme en juin 2015. Une synthèse globale de tous les résultats obtenus sera alors réalisée afin d'en dégager les principales conclusions et de définir d'éventuels axes de recherche futurs.

En raison de la grande diversité des substances en mélange dans l'environnement, la caractérisation du risque engendré par ces mélanges est un défi pour les évaluateurs : la toxicité de tous les mélanges possibles ne peut être testée expérimentalement. Récemment, un nouveau cadre d'étude de la toxicité des substances, *adverse outcome pathways* (AOP), a vu le jour dans le but d'utiliser au maximum l'ensemble des connaissances acquises jusqu'à présent ainsi que de limiter et d'orienter efficacement les recherches futures (limitation des ressources nécessaires, réduction de l'expérimentation animale) (Groh *et al.*, 2015a). Les AOP sont des modèles conceptuels qui font le bilan des connaissances obtenues sur le(s) mécanisme(s) de toxicité des substances : des évènements moléculaires initiateurs, à un effet biologique néfaste, pertinent pour l'évaluation des risques (*e.g.* la croissance ou la reproduction des individus ou encore le maintien d'une population), en remontant les chaînes d'évènements successifs au niveau cellulaire, des tissus, des organes et des individus. Cette démarche de compilation et d'organisation des connaissances a pour objectif de décrire les mécanismes biologiques généraux engendrés à la suite d'une certaine perturbation (Ankley *et al.*, 2010 ; Groh *et al.*, 2015a,b). Elle pourrait aider à l'avenir à identifier les recoupements entre les chaînes d'évènements de l'AOP de différentes substances et à mieux appréhender la nature de leurs effets combinés (*e.g.* additivité CA, additivité RA,

interaction) (Ankley *et al.*, 2010). L'approche AOP reste cependant encore conceptuelle et qualitative. Des problèmes importants, comme l'intégration de l'exposition aux substances, n'ont pas encore été résolus pour l'application de cette méthode à l'évaluation des risques. L'intégration aux AOP de modèles complémentaires comme par exemple les modèles de spéciation ou les modèles dynamiques TK/TD (*e.g.* le DEBtox) est envisagée (Groh *et al.*, 2015b).

## Références bibliographiques

- Abboud, R. *et* Wilkinson, K. J., 2013. Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Pollut.*, 179, pp. 33–38.
- AFNOR, Association Française de Normalisation, 2008. Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 4: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol. No. NF ISO 23611-4.
- Aigueperse, J., Bouvier, C., Chambrette, V., Chazel, V., Cossonnet, C., Donnadiou-Claraz, M., Franck, D., Gourmelon, P., Houpert, P., Jourdain, J.-R., Lorthioir, S., Paquet, F., Rannou, A., Telle Lambertson, M., *et* Timarche, M., 2001. État des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. No. DPHD/2001-01. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, FR.
- Al Kaddissi, S. 2012. *Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse Procambarus clarkii après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233)*. Thèse de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (FR) & Université de Bordeaux 1 (FR), p. 333.
- Al Kaddissi, S., Frelon, S., Elia, A.-C., Legeay, A., Gonzalez, P., Coppin, F., Orjollet, D., Camilleri, V., Beaugelin-Seiller, K., Gilbin, R., *et* Simon, O., 2012. Are antioxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in the crayfish *Procambarus clarkii*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 80, pp. 266–272.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Elia, A. C., Gonzalez, P., Floriani, M., Cavalie, I., Massabuau, J.-C., Gilbin, R., *et* Simon, O., 2014. Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. *Environ. Toxicol.*, 29(8), pp. 893–907.
- Al-Shaybe, M. *et* Khalili, F., 2009. Adsorption of thorium (IV) and uranium (VI) by Tulul al-Shabba Zeolitic Tuff, Jordan. *Jord. J. Earth Env. Sci.*, 2(1), pp. 108–119.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Colao, B. N., *et* Kammenga, J. E., 2006. Temporal dynamics of effect concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 40(7), pp. 2478–2484.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Kooijman, S. A. L. M., *et* Kammenga, J. E., 2005. Responses to stress of *Caenorhabditis elegans* populations with different reproductive strategies. *Funct. Ecol.*, 19(4), pp. 656–664.

## Références bibliographiques

---

- Alda Álvarez, O. A., Jager, T., Redondo, E. M., et Kammenga, J. E., 2006. Physiological modes of action of toxic chemicals in the nematode *Acroboloides nanus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(12), pp. 3230–3237.
- Altenburger, R., Nendza, M., et Schüürmann, G., 2003. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(8), pp. 1900–1915.
- Altun, Z. F. et Hall, D. H., 2009a. Alimentary system, pharynx. In Herndon, L. A. (Ed.), *WormAtlas*. WormAtlas. [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org).
- Altun, Z. F. et Hall, D. H., 2009b. Introduction to *C. elegans* anatomy. In Herndon, L. A. (Ed.), *WormAtlas*. WormAtlas. [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org).
- Amorim, M. J. B., Pereira, C., Menezes-Oliveira, V. B., Campos, B., Soares, A. M. V. M., et Loureiro, S., 2012. Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil. *Environ. Pollut.*, 160(1), pp. 145–152.
- Amutha, C. et Subramanian, P., 2013. Cadmium alters the reproductive endocrine disruption and enhancement of growth in the early and adult stages of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 39(2), pp. 351–361.
- Anderson, R. F., Fleisher, M. Q., et LeHuray, A. P., 1989. Concentration, oxidation state, and particulate flux of uranium in the Black Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 53(9), pp. 2215–2224.
- Andersson, P. S., Porcelli, D., Wasserburg, G. J., et Ingri, J., 1998. Particle transport of  $^{234}\text{U}$ – $^{238}\text{U}$  in the Kalix River and in the Baltic Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 62(3), pp. 385–392.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., et Villeneuve, D. L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(3), pp. 730–741.
- Antunes, S. C., de Figueiredo, D. R., Marques, S. M., Castro, B. B., Pereira, R., et Gonçalves, F., 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Sci. Total Environ.*, 374(2–3), pp. 252–259.
- Arrhenius, Å., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., et Blanck, H., 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquat. Toxicol.*, 68(4), pp. 351–367.
- Ashauer, R., Boxall, A. B. A., et Brown, C. D., 2007. Modeling combined effects of pulsed exposure to carbaryl and chlorpyrifos on *Gammarus Pulex*. *Environ. Sci. Technol.*, 41(15), pp. 5535–5541.
- ASTM, American Society for Testing and Materials, 2008. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. No. E2172-01.
- ATSDR, U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012. Toxicological profile for cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, USA.

- ATSDR, U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2013. Toxicological profile for uranium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, USA.
- 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 de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (FR), Université Aix-Marseille (FR) & Université de Vrije (NL), p. 182.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., et Kooijman, S. A. L. M., 2012. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.*, 118–119, pp. 9–26.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., et Kooijman, S. A. L. M., 2011. Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 159(3), pp. 275–283.
- Avery, L. et Thomas, J. H., 1997. Feeding and defecation. In Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B. J., et Priess, J. R. (Eds.), *C. elegans II. 2nd edition, Cold Spring Harbor Monograph Series*, pp. 679–716. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baas, J., Jager, T., et Kooijman, S. A. L. M., 2009. A model to analyze effects of complex mixtures on survival. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(3), pp. 669–676.
- Baas, J., Van Houte, B. P. P., Van Gestel, C. A. M., et Kooijman, S. A. L. M., 2007. Modeling the effects of binary mixtures on survival in time. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(6), pp. 1320–1327.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., et Grimme, L. H., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(9), pp. 2348–2356.
- Backhaus, T., Blanck, H., et Faust, M., 2010. Hazard and risk assessment of chemical mixtures under REACH: State of the art, gaps and options for improvement. Swedish Chemicals Agency, Bromma, SE.
- Bannon, D. I., Abounader, R., Lees, P. S. J., et Bressler, J. P., 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 284(1), pp. C44–C50.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., et Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? *Radioprotection*, 40(S1), pp. 175–180.
- Barkleit, A., Moll, H., et Bernhard, G., 2008. Interaction of uranium(VI) with lipopolysaccharide. *Dalton Trans.*, (21), pp. 2879–2886.
- Barrière, A. et Félix, M.-A., 2005. High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Curr. Biol.*, 15(13), pp. 1176–1184.
- Barsby, A., McKinley, J. M., Ofterdinger, U., Young, M., Cave, M. R., et Wragg, J., 2012. Bioaccessibility of trace elements in soils in Northern Ireland. *Sci. Total Environ.*, 433, pp. 398–417.

## Références bibliographiques

---

- Bat, L., Raffaelli, D., et Marr, I. L., 1998. The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (pallas). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 223(2), pp. 167–184.
- Baugh, L. R., 2013. To grow or not to grow: Nutritional control of development during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest. *Genetics*, 194(3), pp. 539–555.
- Bayer, M. E. et Bayer, M. H., 1991. Lanthanide accumulation in the periplasmic space of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.*, 173(1), pp. 141–149.
- Baudouin, R., Dias, V., Bonzom, J., et Péry, A., 2012. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology*, 21(4), pp. 1225–1239.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M. L., Péry, A. R. R., et Charles, S., 2008a. A bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. *Environ. Sci. Technol.*, 42(23), pp. 8978–8984.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M. L., Péry, A. R. R., Geffard, O., et Charles, S., 2008b. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *J. Theor. Biol.*, 254(1), pp. 55–64.
- Billoir, E., Péry, A. R. R., et Charles, S., 2007. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecol. Model.*, 203(3–4), pp. 204–214.
- Bjerregaard, P. et Andersen, O., 2007. Ecotoxicology of metals—sources, transport, and effects in the ecosystem. In Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., et Friberg, L. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, pp. 445–486. Burlington, USA: Academic Press, 3<sup>rd</sup> edition.
- Bliss, C. I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.*, 26(3), pp. 585–615.
- Bourdineaud, J.-P. and Baudrimont, M., Gonzalez, P., et Moreau, J.-L., 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, 88(11), pp. 1787–1792.
- Boyd, W. A., McBride, S. J., Rice, J. R., Snyder, D. W., et Freedman, J. H., 2010. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 245(2), pp. 153–159.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), pp. 71–94.
- Browne, E. et Firestone, R. B., 1986. Shirley, V. S. (Ed.), *Table of radioactive isotopes*. New York, USA: Wiley-VCH.
- Bucher, G., Mounicou, S., Simon, O., Floriani, M., Lobinski, R., et Frelon, S., 2014. Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures. *Chemosphere*, 111, pp. 412–417.
- Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., et Lecomte-Pradines, C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: A multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *J. Environ. Radioact.*, 137, pp. 190–197.

- Bur, T., Crouau, Y., Bianco, A., Gandois, L., et Probst, A., 2012. Toxicity of Pb and of Pb/Cd combination on the springtail *Folsomia candida* in natural soils: Reproduction, growth and bioaccumulation as indicators. *Sci. Total Environ.*, 414, pp. 187–197.
- Byerly, L., Cassada, R. C., et Russell, R. L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild type growth and reproduction. *Dev. Biol.*, 51(1), pp. 23–33.
- Byrne, C., Divekar, S. D., Storchan, G. B., Parodi, D. A., et Martin, M. B., 2009. Cadmium – a metallo-hormone? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3), pp. 266–271.
- CanNorth, Canada North Environmental Services Limited Partnership, 2006. Gunnar site characterization: 2004 and 2005 aquatic assessments - Final report. No. 1141. CanNorth, Saskatoon, CA.
- Capasso, R., Pigna, M., De Martino, A., Pucci, M., Sannino, F., et Violante, A., 2004. Potential remediation of waters contaminated with Cr(III), Cu, and Zn by sorption on the organic polymeric fraction of olive mill wastewater (polymerin) and its derivatives. *Environ. Sci. Technol.*, 38(19), pp. 5170–5176.
- Carlsson, E. et Büchel, G., 2005. Screening of residual contamination at a former uranium heap leaching site, Thuringia, Germany. *Chem. Erde*, 65(1), pp. 75–95.
- Carvalho, F. P., Madruga, M. J., Reis, M. C., Alves, J. G., Oliveira, J. M., Gouveia, J., et Silva, L., 2007. Radioactivity in the environment around past radium and uranium mining sites of Portugal. *J. Environ. Radioact.*, 96(1–3), pp. 39–46.
- Cassada, R. C. et Russell, R. L., 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 46(2), pp. 326–342.
- CEAEQ, Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, 2014. Toxicité chimique de l'uranium sur les organismes terrestres - Revue de littérature. CEAEQ, Québec, CA.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One*, 9(5), pp. 1–12.
- Cedergreen, N., Christensen, A. M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Streibig, J. C., et Sørensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(7), pp. 1621–1632.
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Sørensen, H., et Streibig, J. C., 2007. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(1), pp. 149–156.
- Cedergreen, N. et Streibig, J. C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(7), pp. 1676–1683.
- Chapman, P. M., Caldwell, R. S., et Chapman, P. F., 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(2), pp. 77–79.
- Charles, A. L., Markich, S. J., et Ralph, P., 2006. Toxicity of uranium and copper individually, and in combination, to a tropical freshwater macrophyte (*Lemna aquinoctialis*). *Chemosphere*, 62(8), pp. 1224–1233.



## Références bibliographiques

---

- Chassard-Bouchaud, C. *et* Escaig, F., 1984. Uptake, storage and excretion of uranium by *Mytilus edulis*, a structural, ultrastructural and microanalytical study by secondary ion emission and X ray spectrometry. *J. Phys. Colloques*, 45(C2), pp. 545–548.
- Chauhan, V. M., Orsi, G., Brown, A., Pritchard, D. I., *et* Aylott, J. W., 2013. Mapping the pharyngeal and intestinal pH of *Caenorhabditis elegans* and real-time luminal pH oscillations using extended dynamic range pH-sensitive nanosensors. *ACS Nano*, 7(6), pp. 5577–5587.
- Chen, J. *et* Caswell-Chen, E., 2003. Why *Caenorhabditis elegans* adults sacrifice their bodies to progeny. *Nematology*, 5, pp. 641–645.
- Chen, W.-Y., Tsai, J.-W., Ju, Y.-R., *et* Liao, C.-M., 2010. Systems-level modeling the effects of arsenic exposure with sequential pulsed and fluctuating patterns for tilapia and freshwater clam. *Environ. Pollut.*, 158(5), pp. 1494–1505.
- Choi, J. *et* Park, J. W., 2005. Competitive adsorption of heavy metals and uranium on soil constituents and microorganism. *Geosci. J.*, 9(1), pp. 53–61.
- Choppin, G. R. *et* Wong, P. J., 1998. The chemistry of actinide behavior in marine systems. *Aquat. Geochem.*, 4(1), pp. 77–101.
- Chou, T.-C. *et* Talalay, P., 1983. Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4, pp. 450–454.
- Clifford, M. *et* McGeer, J. C., 2010. Development of a biotic ligand model to predict the acute toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquat. Toxicol.*, 98(1), pp. 1–7.
- Close, D. M., Nelson, W. H., *et* Bernhard, W. A., 2013. DNA damage by the direct effect of ionizing radiation: Products produced by two sequential one-electron oxidations. *J. Phys. Chem. A*, 117(47), pp. 12608–12615.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., *et* Baudin, J. P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In Métivier, H. (Ed.), *L'Uranium, de l'environnement à l'homme*, pp. 187–211. Les Ulis, FR: EDP Sciences.
- Connon, R., Hooper, H. L., Sibly, R. M., Lim, F.-L., Heckmann, L.-H., Moore, D. J., Watanabe, H., Soetaert, A., Cook, K., Maund, S. J., Hutchinson, T. H., Moggs, J., Coen, W. D., Iguchi, T., *et* Callaghan, A., 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.*, 42(6), pp. 2181–2188.
- Couillault, C. *et* Kurz, C. L., 2010. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *Stal*, 36(4), pp. 59–74.
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J. F., Kohara, Y., *et* Ewbank, J. J., 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.*, 5(5), pp. 488–494.

- Craft, E. S., Abu-Qare, A. W., Flaherty, M. M., Garofolo, M. C., Rincavage, H. L., et Abou-Donia, M. B., 2004. Depleted and natural uranium: Chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 7(4), pp. 297–317.
- Croteau, M. N., Luoma, S. N., et Stewart, A. R., 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.*, 50(5), pp. 1511–1519.
- Cui, Y., McBride, S. J., Boyd, W. A., Alper, S., et Freedman, J. H., 2007. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol.*, 8(6).
- Culetto, E. et Sattelle, D. B., 2000. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum. Mol. Genet.*, 9(6), pp. 869–877.
- Cutter, A. D., 2004. Sperm-limited fecundity in nematodes: How many sperm are enough? *Evolution*, 58(3), pp. 651–655.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A., Munters, E., Artois, T., Nawrot, T., Vangronsveld, J., et Smeets, K., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), pp. 927–940.
- Daněšová, D., Kafka, I., Kaleničová, Z., et Nováková, J., 2010. The effect of low dose ionizing radiation and cadmium chloride on glucose metabolism in broiler chickens. *Acta Vet. Brno*, 79(3), pp. 415–418.
- de Groot, A. C., Peijnenburg, W. J. G. M., Van den Hoop, M. A. G. T., Ritsema, R., et Van Veen, R. P. M., 1998. Heavy metals in Dutch field soils: an experimental and theoretical study on equilibrium partitioning. No. 6072200001. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, NL.
- de Pablo, J., Casas, I., Giménez, J., Molera, M., Rovira, M., Duro, L., et Bruno, J., 1999. The oxidative dissolution mechanism of uranium dioxide. I. the effect of temperature in hydrogen carbonate medium. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 63(19–20), pp. 3097–3103.
- Delacroix, D., Guerre, J. P., et Leblanc, P., 2004. EDP Sciences (Ed.), *Guide Pratique Radionucléides & Radioprotection: Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible et moyenne activité*. Les Ulis, FR: EDP Sciences.
- Dong, J., Boyd, W. A., et Freedman, J. H., 2008. Molecular characterization of two homologs of the *Caenorhabditis elegans* cadmium-responsive gene *cdr-1*: *cdr-4* and *cdr-6*. *J. Mol. Biol.*, 376(3), pp. 621–633.
- Dong, W. M. et Brooks, S. C., 2006. Determination of the formation constants of ternary complexes of uranyl and carbonate with alkaline earth metals ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ , and  $Ba^{2+}$ ) using anion exchange method. *Environ. Sci. Technol.*, 40(15), pp. 4689–4695.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., et Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air Soil Pollut.*, 188(1–4), pp. 247–260.

## Références bibliographiques

---

- Dublineau, I., Grison, S., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J., et Gourmelon, P., 2005. Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81(6), pp. 473–482.
- Dubois, C. 2013. Étude des effets du mélange binaire entre un radioélément (uranium) et une substance organique (fluoranthène) chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Rapport de Master : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (FR) & Université Montpellier I (FR).
- Ducrot, V., Péry, A. R. R., Mons, R., Quéau, H., Charles, S., et Garric, J., 2007. Dynamic energy budget as a basis to model population-level effects of zinc-spiked sediments in the gastropod *Valvata piscinalis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(8), pp. 1774–1783.
- Dutilleul, M. 2013. *Réponses microévolutives et coûts adaptatifs de populations de Caenorhabditis elegans exposées à des stress environnementaux*. Thèse de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (FR) & Université Montpellier 1 (FR), p. 224.
- Dutilleul, M., Goussen, B., Bonzom, J. M., Galas, S., et Réale, D., 2015. Pollution breaks down the genetic architecture of life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 10(2), pp. e0116214.
- 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*, 22(5), pp. 862–868.
- EC, European Commission, 2011. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC): Guidance document No. 27 – Technical guidance for deriving environmental quality standards. No. 2011-055.
- ECB, European Chemicals Bureau, 2007. European Union risk assessment report: Cadmium oxide and cadmium metal, Part I - environment. PL-3, 72. No. EUR 22919 EN. ECB, Ispra, IT.
- EDF, 2009. Bilan 2008 des CNPE en exploitation : rejets radioactifs et chimiques, déchets radioactifs. Nucléaire et environnement 2008.
- EIFAC, European Inland Fisheries Advisory Commission Working party on Water Quality, 1987. Water quality criteria for European freshwater fish. Revised report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. No. EIFAC/T.P.37/Rev.1. EIFAC, Rome, IT.
- Elisma, F. et Jumarie, C., 2001. Evidence for cadmium uptake through Nramp2: Metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285(3), pp. 662–668.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., et Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1(6), pp. 529–539.
- Fatt, H. V. et Dougherty, E. C., 1963. Genetic control of differential heat tolerance in two strains of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 141(3577), pp. 266–267.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., et Grimme, L. H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 56(1), pp. 13–32.

- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., et Grimme, L. H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.*, 63(1), pp. 43–63.
- Félix, M.-A., 1997. Un ver, 959 cellules et 13000 gènes. *Méd. Sci.*, 13(2), pp. 156–65.
- Février, L. et Gilbin, R., 2014. Proposition de valeurs de PNEC<sub>eau</sub> de l'uranium conditionnelles à des domaines physico-chimiques représentatifs des eaux douces françaises. No. PRP-ENV/SERIS/2014-0028. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Cadarache, FR.
- Fleischer, M., Sarofim, A. F., Fassett, D. W., Hammond, P., Shacklette, H. T., Nisbet, I. C. T., et Epstein, S., 1974. Environmental impact of cadmium: A review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health Perspect.*, 7, pp. 253–323.
- Fortin, C., Denison, F. H., et Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Mg^{2+}$ ) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(2), pp. 242–248.
- Fortin, C., Dutel, L., et Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(4), pp. 974–981.
- Frelon, S., Mounicou, S., Lobinski, R., Gilbin, R., et Simon, O., 2013. Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere*, 91(4), pp. 481–490.
- Gennings, C., 1995. An efficient experimental design for detecting departure from additivity in mixtures of many chemicals. *Toxicology*, 105(2–3), pp. 189–197.
- Gennings, C., Carter, W. H., Campain, J. A., Bae, D.-S., et Yang, R. S. H., 2002. Statistical analysis of interactive cytotoxicity in human epidermal keratinocytes following exposure to a mixture of four metals. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.*, 7(1), pp. 58–73.
- Geras'kin, S. A., Kim, J. K., Dikarev, V. G., Oudalova, A. A., Dikareva, N. S., et Spirin, Y. V., 2005. Cytogenetic effects of combined radioactive ( $^{137}Cs$ ) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. *Mutat. Res.*, 586(2), pp. 147–159.
- Giesy Jr, J. P., Leverssee, G. J., et Williams, D. R., 1977. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (daphnidae) and *Gambusia affinis* (poeciliidae). *Water Res.*, 11(11), pp. 1013–1020.
- Giovanetti, A., Fesenko, S., Cozzella, M. L., Asencio, L. D., et Sansone, U., 2010. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *J. Environ. Radioact.*, 101(6), pp. 509–516.
- Goldoni, M. et Johansson, C., 2007. A mathematical approach to study combined effects of toxicants *in vitro*: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol. in Vitro*, 21(5), pp. 759–769.

## Références bibliographiques

---

- Gongalsky, K. B., 2006. Bioaccumulation of metals by soil-dwelling insects in a uranium production area. *Eur. J. Soil Biol.*, 42(S1), pp. 180–185.
- Goulet, R. R., Fortin, C., et Spry, D. G., 2011. Uranium. In Wood, C. M., Farrell, A. P., et Brauner, C. J. (Eds.), *Fish physiology: homeostasis and toxicology of non-essential metals*, pp. 391–428. Burlington, USA: Academic press.
- Gourlay-Francé, C., Delmas, F. and Mazzella, N., et Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. L'évaluation du risque toxique dans les milieux aquatiques : Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique ? *Sci. Eaux Terr.*, 1, pp. 6–11.
- Goussen, B. 2013. *Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de Caenorhabditis elegans exposée à un stress métallique radioactif*. Thèse de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (FR), Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (FR) & Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech, FR), p. 199.
- Goussen, B., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Bonzom, J. M., et Péry, A. R. R., 2015. Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans* : A case study on uranium. *Chemosphere*, 120, pp. 507–514.
- Goussen, B., Parisot, F., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Péry, A. R. R., et Bonzom, J. M., 2013. Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*, 22(5), pp. 1–10.
- Greco, W. R., Bravo, G., et Parsons, J. C., 1995. The search for synergy: A critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.*, 47(2), pp. 331–385.
- Grewal, P. S., 1991. Influence of bacteria and temperature on the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) infesting mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Nematologica*, 37, pp. 72–82.
- Groh, K. J., Carvalho, R. N., Chipman, J. K., Denslow, N. D., Halder, M., Murphy, C. A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., et Watanabe, K. H., 2015a. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: II. A focus on growth impairment in fish. *Chemosphere*, 120, pp. 778–792.
- Groh, K. J., Carvalho, R. N., Chipman, J. K., Denslow, N. D., Halder, M., Murphy, C. A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., et Watanabe, K. H., 2015b. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere*, 120, pp. 764–777.
- Groten, J. P., Luten, J. B., et Van Bladeren, P. J., 1992. Dietary iron lowers the intestinal uptake of cadmium-metallothionein in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 228(1), pp. 23–28.
- Groten, J. P., Sinkeldam, E. J., Muys, T., Luten, J. B., et Van Bladeren, P. J., 1991. Interaction of dietary Ca, P, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn and Se with the accumulation and oral toxicity of cadmium in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 29(4), pp. 249–258.

- Guven, K., Duce, J. A., et De Pomerai, D. I., 1995. Calcium moderation of cadmium stress explored using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 110(1), pp. 61–70.
- Haas, C. N., Kersten, S. P., Wright, K., Frank, M. J., et Cidambi, K., 1997. Generalization of independent response model for toxic mixtures. *Chemosphere*, 34(4), pp. 699–710.
- Haas, J. R., Dichristina, T. J., et Wade, R., 2001. Thermodynamics of U(VI) sorption onto *Shewanella putrefaciens*. *Chem. Geol.*, 180(1), pp. 33–54(22).
- Hamilton, M. M., Ejnik, J. W., et Carmichael, A. J., 1997. Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999(12), pp. 2491–2494.
- Hamilton, S. J. et Buhl, K. J., 1997. Hazard evaluation of inorganics, singly and in mixtures, to flannelmouth sucker *Catostomus latipinnis* in the San Juan River, New Mexico. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38(3), pp. 296–308.
- Harada, H., Kurauchi, M., Hayashi, R., et Eki, T., 2007. Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66(3), pp. 378–383.
- Harford, J. B. et Bonifacino, J. S., 2009. Subcellular fractionation and isolation of organelles. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 45(3), pp. 3.0.1–3.33.33.
- Harrington, J. M., Boyd, W. A., Smith, M. V., Rice, J. R., Freedman, J. H., et Crumbliss, A. L., 2012. Amelioration of metal-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*: Utility of chelating agents in the bioremediation of metals. *Toxicol. Sci.*, 129(1), pp. 49–56.
- Hart, D. R., McKee, P. M., Burt, A. J., et Goffin, M. J., 1986. Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *J. Great Lakes Res.*, 12(3), pp. 206–220.
- Hartwig, A., 2010. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: Recent insights. *Biometals*, 23(5), pp. 951–960.
- Hartwig, A. et Beyersmann, D., 1989. Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 21(1), pp. 359–365.
- He, E., Baas, J., et Van Gestel, C. A. M., 2015. Interaction between nickel and cobalt toxicity in *Enchytraeus crypticus* is due to competitive uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 34(2), pp. 328–337.
- Helling, B., Reinecke, S. A., et Reinecke, A. J., 2000. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (oligochaeta). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46(1), pp. 108–116.
- Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T., et El Hage Chahine, J.-M., 2011. Can uranium be transported by the iron-acquisition pathway? Ur uptake by Transferrin. *J. Phys. Chem. B*, 115(14), pp. 4206–4215.
- Hewlett, P. S., 1969. Measurement of the potencies of drug mixtures. *Biometrics*, 25(3), pp. 477–487.

## Références bibliographiques

---

- Hinck, J. E., Linder, G., Otton, J. K., Finger, S. E., Little, E., et Tillitt, D. E., 2013. Derivation of soil-screening thresholds to protect the chisel-toothed kangaroo rat from uranium mine waste in Northern Arizona. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 65(2), pp. 332–344.
- Hinton, T. G., Garnier-Laplace, J., Vandenhove, H., Dowdall, M., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., Barnett, C., Beaugelin-Seiller, K., Beresford, N. A., Bradshaw, C., Brown, J., Eyrolle, F., Fevrier, L., Gariel, J. C., Gilbin, R., Hertel-Aas, T., Horemans, N., Howard, B. J., Ik aheimonen, T., Mora, J. C., Oughton, D., Real, A., Salbu, B., Simon-Cornu, M., Steiner, M., Sweeck, L., et Vives i Batlle, J., 2013. An invitation to contribute to a strategic research agenda in radioecology. *J. Environ. Radioact.*, 115, pp. 73–82.
- Hobbelen, P. H. F., Koolhaas, J. E., et Van Gestel, C. A. M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environ. Pollut.*, 144(2), pp. 639–646.
- Höckner, M., Dallinger, R., et Stürzenbaum, S. R., 2011. Nematode and snail metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16(7), pp. 1057–1065.
- Hoffmann, A. A. et Juha, M., 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends Ecol. Evol.*, 14(3), pp. 96–101.
- Hogan, A. C., Van Dam, R. A., Markich, S. J., et Camilleri, C., 2005. Chronic toxicity of uranium to a tropical green alga (*Chlorella sp.*) in natural waters and the influence of dissolved organic carbon. *Aquat. Toxicol.*, 75(4), pp. 343–353.
- Horemans, N., Vanhoudt, N., Janssens, M., Van Chaze, B., Wannijn, J., Van Hees, M., et Vandenhove, H., 2011. On the nature and timing of oxygen radical production following exposure of *Arabidopsis thaliana* leaves to uranium, cadmium or a combination of both stressors. *Radioprotection*, 46(S6), pp. 491–496.
- Höss, S., Schlottmann, K., et Traunspurger, W., 2011. Toxicity of ingested cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.*, 45(23), pp. 10219–10225.
- Höss, S. et Weltje, L., 2007. Endocrine disruption in nematodes: effects and mechanisms. *Ecotoxicology*, 16(1), pp. 15–28.
- Howard, B. J., Beresford, N. A., Andersson, P., Brown, J. E., Copplestone, D., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Howe, P. D., Oughton, D., et Whitehouse, P., 2010. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context-an overview of the protect coordinated action project. *J. Radiol. Prot.*, 30(2), pp. 195–214.
- Hu, P., Brodie, E. L., Suzuki, Y., McAdams, H. H., et Andersen, G. L., 2005. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 187(24), pp. 8437–8449.
- Hughes, S. L., Bundy, J. G., Want, E. J., Kille, P., et Stürzenbaum, S. R., 2009. The metabolomic responses of *Caenorhabditis elegans* to cadmium are largely independent of metallothionein status, but dominated by changes in cystathionine and phytochelatins. *J. Proteome Res.*, 8(7), pp. 3512–3519.

- ISO, International Organization for Standardization, 2010. Water Quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (nematoda). TC 147/SC 5, No. ISO 10872:2010.
- Iwasaki, Y. et Brinkman, S. F., 2015. Application of a generalized lineotoxicity model to analyze mixture toxicity: survival of brown trout affected by copper and zinc. *Environ. Toxicol. Chem.*, 34(4), pp. 816–820.
- Jager, T., 2011. Some good reasons to ban ECx and related concepts in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.*, 45(19), pp. 8180–8181.
- Jager, T., 2012. Bad habits die hard: The NOEC's persistence reflects poorly on ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31(2), pp. 228–229.
- Jager, T. 2013. *Making Sense of Chemical Stress - Application of the Dynamic Energy Budget Theory in Ecotoxicology and Stress Ecology. v 1.0.* <http://www.debtox.info/book.php>.
- Jager, T., Alda Álvarez, O., Kammenga, J. E., et Kooijman, S. A. L. M., 2005. Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Funct. Ecol.*, 19(1), pp. 136–144.
- Jager, T., Crommentuijn, T., Van Gestel, C. A. M., et Kooijman, S. A. L. M., 2004. Simultaneous modeling of multiple endpoints in life-cycle toxicity tests. *Environ. Sci. Technol.*, 38(10), pp. 2894–2900.
- Jager, T., Crommentuijn, T., Van Gestel, C. A. M., et Kooijman, S. A. L. M., 2007. Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environ. Pollut.*, 145(2), pp. 452–458.
- Jager, T., Gudmundsdóttir, E. M., et Cedergreen, N., 2014. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.*, 48(12), pp. 7026–7033.
- Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W. M., et Kooijman, S. A. L. M., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology*, 19(2), pp. 351–361.
- Jager, T. et Zimmer, E. I., 2012. Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecol. Model.*, 225, pp. 74–81.
- Janssen, M. P. M., Glastra, P., et Lembrechts, J. F. M. M., 1996. Uptake of <sup>134</sup>Cs from a sandy soil by two earthworm species: The effects of temperature. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31(2), pp. 184–191.
- Janssen, R. P. T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H. A., Van Veen, R. P. M., et Peijnenburg, W. J. G. M., 1997. Equilibrium partitioning of heavy metals in dutch field soils. II. prediction of metal accumulation in earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(12), pp. 2479–2488.
- Jiang, G. C. T., Hughes, S., Stürzenbaum, S. R., Evje, L., Syversen, T., et Aschner, M., 2009. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicol. Sci.*, 111(2), pp. 345–354.



## Références bibliographiques

---

- Jones, J. A., Riggs, P. K., Yang, T. C., Pedemonte, C. H., Clarke, M. S. F., Feeback, D. L., et Au, W., 2007. Ionizing radiation-induced bioeffects in space and strategies to reduce cellular injury and carcinogenesis. *Aviat. Space Env. Med.*, 78(4-II), pp. A67–A78.
- Jonker, M. J., Gerhardt, A., Backhaus, T., et Van Gestel, C. A. M., 2011. Test design, mixture characterization, and data evaluation. In Van Gestel, C. A. M., Jonker, M. J., Kammenga, J. E., Laskowski, R., et Svendsen, C. (Eds.), *Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology*, pp. 121–156. Pensacola, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Jonker, M. J., Piskiewicz, A. M., Ivorra I Castellá, N., et Kammenga, J. E., 2004a. Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(6), pp. 1529–1537.
- Jonker, M. J., Svendsen, C., Bedaux, J. J. M., Bongers, M., et Kammenga, J. E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(10), pp. 2701–2713.
- Jonker, M. J., Sweijen, R. A. J. C., et Kammenga, J. E., 2004b. Toxicity of simple mixtures to the nematode *Caenorhabditis elegans* in relation to soil sorption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(2), pp. 480–488.
- Joseph, P., 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3), pp. 272–279.
- Joshi, S. R., Waite, D. T., et Platford, R. F., 1989. Vertical distribution of uranium mill tailings contaminants in Langley bay, Lake Athabasca sediments. *Sci. Total Environ.*, 87–88, pp. 85–104.
- Kammenga, J. E., Van Koert, P. H. G., Riksen, J. A. G., Korthals, G. W., et Bakker, J., 1996. A toxicity test in artificial soil based on the life-history strategy of the nematode *Plectus acuminatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(5), pp. 722–727.
- Kamunde, C. et MacPhail, R., 2011. Subcellular interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 105(3–4), pp. 518–527.
- Keith, L. S., Faroon, O. M., et Fowler, B. A., 2007. Uranium. In Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., et Friberg, F. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, pp. 881–903. Burlington, USA: Academic Press, 3<sup>rd</sup> edition.
- Khanna, N., Cressman III, C. P., Tatara, C. P., et Williams, P. L., 1997. Tolerance of the nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, salinity, and hardness in aquatic media. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32(1), pp. 110–114.
- Kiang, J. G., Fukumoto, R., et Gorbunov, N. V., 2012. Lipid peroxidation after ionizing irradiation leads to apoptosis and autophagy. In Catala, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation*, pp. 261–278. InTech.
- Kiontke, K. et Sudhaus, W., 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. In Fitch, D. H. (Ed.), *WormBook*. WormBook. [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).

- Knight, C. G., Patel, M. N., Azevedo, R. B. R., et Leroi, A. M., 2002. A novel mode of ecdysozoan growth in *Caenorhabditis elegans*. *Evol. Dev.*, 4(1), pp. 16–27.
- Konietschke, F. et Hothorn, L. A., 2012. Rank-based multiple test procedures and simultaneous confidence intervals. *Electron. J. Stat.*, 6, pp. 738–759.
- Kooijman, S., 1986. Energy budgets can explain body size relations. *J. Theor. Biol.*, 121(3), pp. 269–282.
- Kooijman, S. A. L. M., 2010. *Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation*. New York, USA: Cambridge University Press, 3<sup>rd</sup> edition.
- Kooijman, S. A. L. M. et Bedaux, J., 1996. Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Res.*, 30, pp. 1711–1723.
- Kortenkamp, A. et Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *Sci. Total Environ.*, 221(1), pp. 59–73.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., et Faust, M., 2009. The state of the art report on mixture toxicity: Final report to the Environment Directorate General of the European Commission. No. 070307/2007/485103/ETU/D.1. European Commission.
- Kortenkamp, A. and Altenburger, R., 2011. Toxicity from combined exposure to chemicals. In Van Gestel, C. A. M., Jonker, M. J., Kammenga, J. E., Laskowski, R., et Svendsen, C. (Eds.), *Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology*, pp. 95–1120. Pensacola, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- LaDeana, W. H., Coulson, A., Murray, J. I., Bao, Z., Sulston, J. E., et Waterston, R. H., 2005. Genomics in *C. elegans*: So many genes, such a little worm. *Genome Res.*, 15(12), pp. 1651–1660.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., et Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworm. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57, pp. 39–47.
- Larsson, C. M., 2008. An overview of the ERICA Integrated Approach to the assessment and management of environmental risks from ionising contaminants. *J. Environ. Radioact.*, 99(9), pp. 1364–1370.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(6), pp. 1271–1278.
- Leung, M. C. K., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., et Meyer, J. N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.*, 106(1), pp. 5–28.
- L'Hernault, S., 2006. Spermatogenesis. In Kimble, J. et Strome, S. (Eds.), *WormBook*. WormBook. [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).

## Références bibliographiques

---

- Li, Z. H., Li, P., et Randak, T., 2011. Protective roles of calcium channel blocker against cadmium-induced physiological stress in freshwater teleost *Oncorhynchus mykiss*. *Water Air Soil Pollut.*, 220(1–4), pp. 293–299.
- Liao, V. H. C., Dong, J., et Freedman, J. H., 2002. Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*: A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277(44), pp. 42049–42059.
- Lika, K., Kearney, M. R., Freitas, V., Van der Veer, H. W., Van der Meer, J., Wijsman, J. W. M., Pecquerie, L., et Kooijman, S. A. L. M., 2011. The “covariation method” for estimating the parameters of the standard Dynamic Energy Budget model I: Philosophy and approach. *J. Sea Res.*, 66(4), pp. 270–277.
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., et Krimissa, M., 2007. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Appl. Geochem.*, 22(2), pp. 249–275.
- Lind, O. C., Stegnar, P., Tolongutov, B., Rosseland, B. O., Strømman, G., Uralbekov, B., Usubalieva, A., Solomatina, A., Gwynn, J. P., Lespukh, E., et Salbu, B., 2013. Environmental impact assessment of radionuclide and metal contamination at the former U site at Kadji Sai, Kyrgyzstanno. *J. Environ. Radioact.*, 123, pp. 37–49.
- Lints, R. et Hall, D. H., 2009. The cuticule. In Herndon, L. A. (Ed.), *WormAtlas*. Worm. www.wormatlas.org.
- Liu, J., Qu, W., et Kadiiska, M. B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3), pp. 209–214.
- Llorens, I., Untereiner, G., Jaillard, D., Gouget, B., Chapon, V., et Carriere, M., 2012. Uranium interaction with two multi-resistant environmental bacteria: *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Rhodopseudomonas palustris*. *PLoS One*, 7(12), pp. e51783.
- Loewe, S. et Muischnek, H., 1926. Combined effects I announcement - implements to the problem. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 114(5–6), pp. 313–326.
- Lofts, S., Février, L., Horemans, N., Gilbin, R., Bruggeman, C., et Vandenhove, H., Subm. 2015. Assessment of co-contaminant effects on uranium and thorium speciation in freshwater using geochemical modelling. *J. Environ. Radioact.*
- Lores, E. M. et Pennock, J. R., 1999. Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 187, pp. 67–75.
- Lottermoser, B. G., Ashley, P. M., et Costelloe, M. T., 2005. Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environ. Geol.*, 48(6), pp. 748–761.
- Loureiro, S., Amorim, M. J. B., Campos, B., Rodrigues, S. M. G., et Soares, A. M. V. M., 2009. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environ. Pollut.*, 157(2), pp. 625–636.

- Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L. G., Pinheiro, C., Ribeiro, F., et Soares, A. M. V. M., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(8), pp. 1716–1726.
- Luc, M., Taylor, D. P., et Netscher, C., 1979. On *endotokia matricida* and intra-uterine development and hatching in nematodes. *Nematologica*, 25(2), pp. 268–274.
- Luoma, S. N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – a review. *Sci. Total Environ.*, 28(1–3), pp. 1–22.
- Markich, S. J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: An overview. *Scientific-WorldJournal*, 2, pp. 707–729.
- Markich, S. J., Brown, P. L., Jeffree, R. A., et Lim, R. P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquat. Toxicol.*, 51(2), pp. 155–175.
- Marr, J., Hansen, J., Meyer, J., Cacela, D., Podrabsky, T., Lipton, J., et Bergmanb, H., 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: Application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquat. Toxicol.*, 43, pp. 225–238.
- Martin, B., Jager, T., Nisbet, R., Preuss, T., Hammers-Wirtz, M., et Grimm, V., 2013. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations: A generic approach based on dynamic energy budget theory and individual-based modeling. *Ecotoxicology*, 22(3), pp. 574–583.
- Martin, H. L., Svendsen, C., Lister, L. J., Gomez-Eyles, J. L., et Spurgeon, D. J., 2009. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans*—a test of independent action. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(1), pp. 97–104.
- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., et Péry, A. R. R., 2011. Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environ. Sci. Technol.*, 45(9), pp. 4151–4158.
- Massey, R. et Jacobs, M., 2013. Trends and indicators. In Kemf, E. (Ed.), *Global Chemical Outlook - Towards Sound Management of Chemicals*, pp. 1–90. Nairobi, KEN: United Nations Environment Programme (UNEP).
- Mathews, T., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., Adam, C., et Della-Vedova, C., 2009. A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environ. Sci. Technol.*, 43(17), pp. 6684–6690.
- Maupas, É., 1900. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 8, pp. 463–624.
- McKee, P. M., Snodgrass, W. J., Hart, D. R., Duthie, H. C., McAndrews, J. H., et Keller, W., 1987. Sedimentation rates and sediment core profiles of  $^{238}\text{U}$  and  $^{232}\text{Th}$  decay chain radionuclides in a lake affected by uranium mining and milling. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44(2), pp. 390–398.

## Références bibliographiques

---

- Méplan, C., Mann, K., et Hainaut, P., 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 274(44), pp. 31663–31670.
- Mims, M. P. et Prchal, J. T., 2005. Divalent metal transporter 1. *Hematology*, 10(4), pp. 339–345.
- Mishra, B., Boyanov, M., Bunker, B. A., Kelly, S. D., Kemner, K. M., et Fein, J. B., 2010. High- and low-affinity binding sites for Cd on the bacterial cell walls of *Bacillus subtilis* and *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74(15), pp. 4219–4233.
- Moore, J. C. et de Ruiter, P. C., 1991. Temporal and spatial heterogeneity of trophic interactions within below-ground food webs. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 34(1–4), pp. 371–397.
- Morgan, A. J., Stürzenbaum, S. R., Winters, C., Grime, G. W., Aziz, N. A. A., et Kille, P., 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(1), pp. 11–19.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M., et Delmas, F., 2007. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundam. Appl. Limnol.*, 168(2), pp. 179–187.
- Moulis, J. M., 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals*, 23(5), pp. 877–896.
- Mrdakovic Popic, J., Salbu, B., et Skipperud, L., 2012. Ecological transfer of radionuclides and metals to free-living earthworm species in natural habitats rich in NORM. *Sci. Total Environ.*, 414, pp. 167–176.
- Mukherjee, J. J., Gupta, S. K., Kumar, S., et Sikka, H. C., 2004. Effects of cadmium(II) on ( $\pm$ )-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage response in human fibroblasts and DNA repair: A possible mechanism of cadmium's cogenotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 17(3), pp. 287–293.
- Narotsky, M. G., Weller, E. A., Chinchilli, V. M., et Kavlock, R. J., 1995. Nonadditive developmental toxicity in mixtures of trichloroethylene, di(2-ethylhexyl) phthalate, and heptachlor in a  $5 \times 5 \times 5$  design. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27(2), pp. 203–216.
- Neame, P. A., Dean, J. R., et Zytaruk, B. G., 1982. Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia*, 91-92, pp. 355–361.
- 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. *Environ. Pollut. B Chem. Phys.*, 1(1), pp. 3–26.
- Nies, D. H., 2007. Bacterial transition metal homeostasis. In Nies, D. H. et Silver, S. (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, vol. 6 of *Microbiology Monographs*, pp. 117–142. Springer Berlin Heidelberg.
- Nisbet, I. C. T. et LaGoy, P. K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 16(3), pp. 290–300.

- Niyogi, S. *et* Wood, C. M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.*, 38(23), pp. 6177–6192.
- Nordberg, G. F., Nogawa, K., Nordberg, M., *et* Friberg, L. T., 2007. Cadmium. In Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., *et* Friberg, L. T. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, pp. 445–486. Burlington, USA: Academic Press, 3<sup>rd</sup> edition.
- Nørhave, N. J., Spurgeon, D., Svendsen, C., *et* Cedergreen, N., 2012. How does growth temperature affect cadmium toxicity measured on different life history traits in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*? *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, pp. 787–793.
- Novillo, A., Won, S. J., Li, C., *et* Callard, I. P., 2005. Changes in nuclear receptor and vitellogenin gene expression in response to steroids and heavy metal in *Caenorhabditis elegans*. *Integr. Comp. Biol.*, 45(1), pp. 61–71.
- Odendaal, J. P. *et* Reinecke, A. J., 2004. Evidence of metal interaction in the bioaccumulation of cadmium and zinc in *Porcellio Laevis* (Isopoda) after exposure to individual and mixed metals. *Water Air Soil Pollut.*, 156(1), pp. 145–161.
- OECD/IAEA, Organisation for Economic Co-operation and Development / International Atomic Energy Agency, 2012. *Uranium 2011: Resources, Production and Demand*. OECD Publishing.
- Offermann, K., Matthäi, A., *et* Ahlf, W., 2009. Assessing the importance of dietborne cadmium and particle characteristics on bioavailability and bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(6), pp. 1149–1158.
- Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T., *et* Endou, H., 2003. Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 187(3), pp. 162–167.
- Oste, L. A., Dolfing, J., Ma, W.-c., *et* Lexmond, T. M., 2001. Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(8), pp. 1785–1791.
- Park, J. D., Cherrington, N. J., *et* Klaassen, C. D., 2002. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci.*, 68(2), pp. 288–294.
- Pearson, R. G., 1963. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 85(22), pp. 3533–3539.
- Peijnenburg, W. J. G. *et* Vijver, M. G., 2007. Metal-specific interactions at the interface of chemistry and biology. *Pure Appl. Chem.*, 79(12), pp. 2351–2366.
- Peijnenburg, W. J. G. M. *et* Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56(1), pp. 63–77.
- Peredney, C. L. *et* Williams, P. L., 2000. Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39(1), pp. 113–118.

## Références bibliographiques

---

- Pereira, R., Antunes, S. C., Marques, S. M., et Gonçalves, F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Sci. Total Environ.*, 390(2–3), pp. 377–386.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30(12), pp. 2831–2837.
- Péry, A. R. R., Brochot, C., Desmots, S., Boize, M., Sparfel, L., et Fardel, O., 2011. Predicting in vivo gene expression in macrophages after exposure to benzo(a)pyrene based on in vitro assays and toxicokinetic/toxicodynamic models. *Toxicol. Lett.*, 201(1), pp. 8–14.
- Péry, A. R. R., Ducrot, V., Mons, R., Miège, C., Gahou, J., Gorini, D., et Garric, J., 2003. Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model. *Water Res.*, 37(11), pp. 2691–2699.
- Péry, A. R. R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R., et Garric, J., 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71(3), pp. 869–873.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloche, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.-P., et Massabuau, J.-C., 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.*, 42(12), pp. 4607–4612.
- Pinot, F., Kreps, S., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., et Polla, B., 2000. Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev. Environ. Health*, 15, pp. 299–323.
- Plaire, D. 2013. *Étude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de Daphnia magna exposé à l'uranium appauvri*. Thèse de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (FR) & Université Aix-Marseille (FR), p. 180.
- Pohl, H. R., Mumtaz, M. M., Scinicariello, F., et Hansen, H., 2009. Binary weight-of-evidence evaluations of chemical interactions—15 years of experience. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 54(3), pp. 264–271.
- Popham, J. D. et Webster, J. M., 1979. Cadmium toxicity in the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Res.*, 20(1), pp. 183–191.
- Porcelli, D., Andersson, P. S., Wasserburg, G. J., Ingri, J., et Baskaran, M., 1997. The importance of colloids and mires for the transport of uranium isotopes through the Kalix River watershed and Baltic Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61(19), pp. 4095–4113.
- Posthuma, L., Baerselman, R., Van Veen, R. P. M., et Dirven-Van Breemen, E. M., 1997. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38(2), pp. 108–121.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Etehadi, H. A., et Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ. Toxicol.*, 21(4), pp. 349–354.

- Pulak, R., 2006. Techniques for analysis, sorting, and dispensing of *C. elegans* on the COPAS™ flow-sorting system. In Strange, K. (Ed.), *C. elegans Methods and Applications*, vol. 351 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 275–286. Totowa, USA: Humana Press.
- Qiu, H., Vijver, M. G., et Peijnenburg, W. J., 2011. Interactions of cadmium and zinc impact their toxicity to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30(9), pp. 2084–2093.
- Qiu, J., Zhu, G., Chen, X., Shao, C., et Gu, S., 2012. Combined effects of  $\gamma$ -irradiation and cadmium exposures on osteoblasts in vitro. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 33(2), pp. 149–157.
- Ragas, A. M. J., Teuschler, L. K., Posthuma, L., et Cowan, C. E., 2011. Human and ecological risk assessment of chemical mixtures. In Van Gestel, C. A. M., Jonker, M. J., Kammenga, J. E., Laskowski, R., et Svendsen, C. (Eds.), *Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology*, pp. 157–212. Pensacola, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Ragnarsdottir, K. V. et Charlet, L., 2000. Uranium behaviour in natural environments. In Cotter-Howells, J. D., Campbell, L. S., Valsami-Jones, E., et Batchelder, M. (Eds.), *Environmental mineralogy: microbial interactions, anthropogenic influences, contaminated land and waste management, Mineralogical Society Series 9*, pp. 245–289. The Mineralogical Society of Great Britain and Ireland.
- Rainbow, P. S., 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.*, 33(4), pp. 576–582.
- Raymond-Whish, S., Mayer, L. P., O’Neal, T., Martinez, A., Sellers, M. A., Christian, P. J., Marion, S. L., Begay, C., Propper, C. R., Hoyer, P. B., et Dyer, C. A., 2007. Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ. Health Perspect.*, 115(12), pp. 1711–1716.
- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., et Narbonne, J. F., 1996. Uranium in the environment: Occurrence, transfer, and biological effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 146, pp. 53–89.
- Ritz, C., 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(1), pp. 220–229.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., et Teh, S. J., 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci. Rep.*, 3(3263).
- Roh, J. Y., Lee, J., et Choi, J., 2006. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(11), pp. 2946–2956.
- Salbu, B., Burkitbaev, M., Strømman, G., Shishkov, I., Kayukov, P., Uralbekov, B., et Rosseland, B. O., 2013. Environmental impact assessment of radionuclides and trace elements at the Kurday U mining site, Kazakhstan. *J. Environ. Radioact.*, 123, pp. 14–27.
- Salovsky, P., Shopova, V., Dancheva, V., Marev, R., et Pandurska, A., 1993. Enhancement of the pneumotoxic effect of cadmium acetate by ionizing radiation in the rat. *Environ. Health Perspect.*, 101(S2), pp. 269–274.



## Références bibliographiques

---

- Sample, B. E., Suter, G. W., Beauchamp, J. J., et Efroymsen, R. A., 1999. Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(9), pp. 2110–2120.
- Schaller, J., Brackhage, C., et Dudel, E. G., 2011. Invertebrates minimize accumulation of metals and metalloids in contaminated environments. *Water Air Soil Pollut.*, 218(1–4), pp. 227–233.
- Schipper, L. A., Sparling, G. P., Fisk, L. M., Dodd, M. B., Power, I. L., et Littler, R. A., 2011. Rates of accumulation of cadmium and uranium in a New Zealand hill farm soil as a result of long-term use of phosphate fertilizer. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 144(1), pp. 95–101.
- Schwerdtle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L. H. F., et Hartwig, A., 2010. Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: Impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol.*, 23(2), pp. 432–442.
- Sharma, S. S., Schat, H., Vooijs, R., et Van Heerwaarden, L. M., 1999. Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(2), pp. 348–355.
- Shaw, J. R., Dempsey, T. D., Chen, C. Y., Hamilton, J. W., et Folt, C. L., 2006. Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to daphnids. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(1), pp. 182–189.
- Shen, L., Xiao, J., Ye, H., et Wang, D., 2009. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 28(1), pp. 125–132.
- Sheppard, S. C. et Evenden, W. G., 1992. Bioavailability indices for uranium: Effect of concentration in eleven soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23(1), pp. 117–124.
- Sheppard, S. C., Sheppard, M. I., Gallerand, M. O., et Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.*, 79(1), pp. 55–83.
- Silva, E. R., Rajapakse, N., et Kortenkamp, A., 2002. Something from “nothing” — eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.*, 36(8), pp. 1751–1756.
- Silvestre, F., Trausch, G., Péqueux, A., et Devos, P., 2004. Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 137(1), pp. 189–196.
- 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*. *J. Environ. Radioact.*, 102(8), pp. 766–773.
- Simon, O. et Garnier-Laplace, J., 2005. Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquat. Toxicol.*, 74(4), pp. 372–383.

- Slaveykova, V. I., Dedieu, K., Parthasarathy, N., et Hajdu, R., 2009. Effect of competing ions and complexing organic substances on the cadmium uptake by the soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(4), pp. 741–748.
- Smidt, G. A., Landes, F. C., Machado de Carvalho, L., Koschinsky, A., et Schnug, E., 2012. Cadmium and uranium in german and brazilian phosphorous fertilizers. In Merkel, B. et Schipek, M. (Eds.), *The New Uranium Mining Boom, Springer Geology*, pp. 167–175. Berlin, DE: Springer Berlin - Heidelberg.
- Smith, B. A., Greenberg, B., et Stephenson, G. L., 2010. Comparison of biological and chemical measures of metal bioavailability in field soils: Test of a novel simulated earthworm gut extraction. *Chemosphere*, 81(6), pp. 755–766.
- Smith, E. D., Kaeberlein, T. L., Lydum, B. T., Sager, J., Welton, L. K., Kennedy, B. K., et Kaeberlein, M., 2008. Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Dev. Biol.*, 8(1), pp. 49.
- Song, Y., Salbu, B., Heier, L. S., Teien, H.-C., Lind, O.-C., Oughton, D., Petersen, K., Rosseland, B. O., Skipperud, L., et Tollefsen, K. E., 2012. Early stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium. *Aquat. Toxicol.*, 112-113, pp. 62–71.
- Sørensen, H., Cedergreen, N., et Streibig, J. C., 2010. A random effects model for binary mixture toxicity experiments. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.*, 15(4), pp. 562–577.
- Souza, J. P., Melo, D. C., Lombardi, A. T., et Melão, M. G. G., 2014. Effects of dietborne cadmium on life history and secondary production of a tropical freshwater cladoceran. *Ecotoxicology*, 23(9), pp. 1764–1773.
- Spurgeon, D. J., Jones, O. A. H., Dorne, J. L. C. M., Svendsen, C., Swain, S., et Stürzenbaum, S. R., 2010a. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ.*, 408(18), pp. 3725–3734.
- Spurgeon, D. J., Pohl, H. R., Loureiro, S. and Lokke, H., et Van Gestel, C. A., 2010b. Exposure. In Van Gestel, C. A. M., Jonker, M. J., Kammenga, J. E., Laskowski, R., et Svendsen, C. (Eds.), *Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology*, pp. 1–46. Pensacola, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Staunton, S., 2004. Sensitivity analysis of the distribution coefficient,  $K_d$ , of nickel with changing soil chemical properties. *Geoderma*, 122(2–4), pp. 281–290.
- Stearns, D. M., Yazzie, M., Bradley, A. S., Coryell, V. H., Shelley, J. T., Ashby, A., Asplund, C. S., et Lantz, R., 2005. Uranyl acetate induces *hprt* mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis*, 20(6), pp. 417–423.
- Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans*. In Fay, D. et Ambros, V. (Eds.), *WormBook*. WormBook. [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., et Thomson, J. N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 100(1), pp. 64–119.

## Références bibliographiques

---

- Sunda, W. G., Engel, D. W., et Thuotte, R. M., 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: Importance of free cadmium ion. *Environ. Sci. Technol.*, 12(4), pp. 409–413.
- Svendsen, C., Jager, T., Haddad, S., Yang, R. S. H., Dorne, J. L. C. M., Broerse, M., et Kramarz, P., 2011. Toxicokinetics and toxicodynamics. In Van Gestel, C. A. M., Jonker, M. J., Kammenga, J. E., Laskowski, R., et Svendsen, C. (Eds.), *Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology*, pp. 47–93. Pensacola, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Svendsen, C., Siang, P., Lister, L. J., Rice, A., et Spurgeon, D. J., 2010. Similarity, independence, or interaction for binary mixture effects of nerve toxicants for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(5), pp. 1182–1191.
- 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 Syst. Biol.*, 4(32).
- Swain, S. C., Keusekotten, K., Baumeister, R., et Stürzenbaum, S. R., 2004. *C. elegans* metallothioneins: New insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J. Mol. Biol.*, 341(4), pp. 951–959.
- Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., et Forbes, V., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 69(3), pp. 428–436.
- T. C. S. C., The *C. elegans* Sequencing Consortium., 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), pp. 2012–2018.
- Tabak, H. H., Lens, P., Van Hullebusch, E. D., et Dejonghe, W., 2005. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1. microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 4(3), pp. 115–156.
- Tallkvist, J., Bowlus, C. L., et Lönnerdal, B., 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol. Lett.*, 122(2), pp. 171–177.
- Tan, Q.-G. et Wang, W.-X., 2008. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(7), pp. 1605–1613.
- Taylor, D., 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 7(1), pp. 33–42.
- Taylor, H. E., Antweiler, R. C., Roth, D. A., Alpers, C. N., et Dileanis, P., 2012. Selected trace elements in the Sacramento River, California: Occurrence and distribution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 62(4), pp. 557–569.
- Taylor, M. D., 2007. Accumulation of uranium in soils from impurities in phosphate fertilisers. *Landbau-forsch. Völk.*, 2(57), pp. 133–139.

- Teotónio, H., Carvalho, S., Manoel, D., Roque, M., et Chelo, I. M., 2012. Evolution of outcrossing in experimental populations of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 7(4), pp. e35811.
- Thévenod, F., 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals*, 23(5), pp. 857–875.
- Trenfield, M. A., McDonald, S., Kovacs, K., Leshner, E. K., Pringle, J. M., Markich, S. J., Ng, J. C., Noller, B., Brown, P. L., et Van Dam, R. A., 2011a. Dissolved organic carbon reduces uranium bioavailability and toxicity. 1. Characterization of an aquatic fulvic acid and its complexation with uranium[VI]. *Environ. Sci. Technol.*, 45(7), pp. 3075–3081.
- Trenfield, M. A., Ng, J. C., Noller, B. N., Markich, S. J., et Van Dam, R. A., 2011b. Dissolved organic carbon reduces uranium bioavailability and toxicity. 2. Uranium[VI] speciation and toxicity to three tropical freshwater organisms. *Environ. Sci. Technol.*, 45(7), pp. 3082–3089.
- Tyne, W., Lofts, S., Spurgeon, D. J., Jurkschat, K., et Svendsen, C., 2013. A new medium for *Caenorhabditis elegans* toxicology and nanotoxicology studies designed to better reflect natural soil solution conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32(8), pp. 1711–1717.
- UNEP, United Nation Environment Programme, 2010. Final review of scientific information on cadmium. UNEP, New-York, United Nations.
- Uralbekov, B. M., Smadis, B., et Burkitbayev, M., 2011. Uranium in natural waters sampled within former uranium mining sites in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 289(3), pp. 805–810.
- US-EPA, U.S. Environmental Protection Agency, 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. No. EPA/630/R-00/002. US-EPA, Washington, USA.
- Van Der Geest, H. G., Greve, G. D., Boivin, M. E., Kraak, M. H. S., et Van Gestel, C. A. M., 2000. Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(12), pp. 2900–2905.
- Van Gestel, C. A. M., 2012. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *ZooKeys*, 176, pp. 275–296.
- Van Gestel, C. A. M. et Hensbergen, P. J., 1997. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6), pp. 1177–1186.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Wannijn, J., Bujanic, A., Vangronsveld, J., et Cuypers, A., 2010. Study of oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana* following mixed exposure to uranium and cadmium. *Plant Physiol. Biochem.*, 48(10-11), pp. 879–886.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Real, A., Bradshaw, C., et Stark, K., 2012. A review of multiple stressor studies that include ionising radiation. *Environ. Pollut.*, 168, pp. 177–192.

## Références bibliographiques

---

- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Sundaram, M. V., *et* Rea, P. A., 2005. CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 280(25), pp. 23684–23690.
- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T., *et* Rea, P. A., 2002. Worms take the ‘phyto’ out of ‘phytochelatins’. *Trends Biotechnol.*, 20(2), pp. 61–64.
- Viñuela, A., Snoek, L. B., Riksen, J. A. G., *et* Kammenga, J. E., 2010. Genome-wide gene expression analysis in response to organophosphorus pesticide chlorpyrifos and diazinon in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 5(8).
- Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O., *et* Quéméneur, E., 2005. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem. Res. Toxicol.*, 18(6), pp. 946–953.
- Vieira, R. S. *et* Beppu, M. M., 2008. Chitosan as adsorbent for heavy metal ions: Performance and adsorption mechanism. In Robinson, L. N. (Ed.), *Water Resources Research Progress, Water Resource Planning, Development and Management*, pp. 149–175. New York, USA: Nova Science Publishers.
- Vijver, M. G., Elliott, E. G., Peijnenburg, W. J., *et* de Snoo, G. R., 2011. Response predictions for organisms water-exposed to metal mixtures: A meta-analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30(6), pp. 1482–1487.
- Vijver, M. G., Vink, J. P. M., Miermans, C. J. H., *et* Van Gestel, C. A. M., 2003. Oral sealing using glue: A new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biol. Biochem.*, 35(1), pp. 125–132.
- Volkov, A. G., Paula, S., *et* Deamer, D. W., 1997. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42(2), pp. 153–160.
- Walter, H., Consolaro, F., Gramatica, P., Scholze, M., *et* Altenburger, R., 2002. Mixture toxicity of priority pollutants at No Observed Effect Concentrations (NOECs). *Ecotoxicology*, 11(5), pp. 299–310.
- Wang, J. *et* Pantopoulos, K., 2011. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, 434(3), pp. 365–381.
- Ward, S. *et* Carrel, J. S., 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 73(2), pp. 304–321.
- Warne, M. S. J. *et* Van Dam, R. A., 2008. NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. *Aust. J. Ecotoxicol.*, 14(1), pp. 1–5.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., *et* Brenner, S., 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 314(1165), pp. 1–340.
- WHO, World Health Organization, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. No. WHO/SDE/PHE/01.1. WHO, Geneva, CH.
- Williams, P. L., Anderson, G. L., Johnstone, J. L., Nunn, A. D., Tweedle, M. F., *et* Wedeking, P., 2000. *Caenorhabditis elegans* as an alternative animal species. *J. Toxicol. Environ. Health A Curr. Iss.*, 61(8), pp. 641–647.

- Williams, P. L. *et* Dusenbery, D. B., 1988. Using the nematode *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicol. Ind. Health*, 4(4), pp. 469–478.
- Williams, T. D., Diab, A. M., George, S. G., Godfrey, R. E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S. D., Watts, P. C., *et* Chipman, J. K., 2006. Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environ. Sci. Technol.*, 40(20), pp. 6479–6488.
- 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), pp. 397–408.
- Xu, X., Li, Y., *et* Wang, Y., 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicol. in Vitro*, 25(1), pp. 294–300.
- 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). *Chem. Res. Toxicol.*, 16(4), pp. 524–530.
- Yeates, G. W. *et* Bongers, T., 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74(1–3), pp. 113–135.
- Zalups, R. K. *et* Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186(3), pp. 163–188.
- Zeman, F. 2008. *Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie Daphnia magna - Etude des effets biologiques de l'uranium et du sésénium seuls et en mélange*. Thèse de Doctorat : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (FR) & Université Montpellier 2 (FR), p. 199.
- 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*. *Aquat. Toxicol.*, 86(3), pp. 370–378.
- Zidar, P., Van Gestel, C. A. M., *et* Štrus, J., 2009. Single and joint effects of Zn and Cd on *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) exposed to artificially contaminated food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(8), pp. 2075–2082.



## Déroulement du projet de thèse



Ce projet de thèse a été initié dans le cadre du *work package* 4 (WP4) du réseau européen d'excellence en radioécologie STAR. Le WP4, centré sur la problématique de la radioprotection dans des contextes de contaminations multiples, avait pour objectif l'étude des effets de mélanges binaires combinant un contaminant/stresseur radioactif (parmi l'U et l'irradiation- $\gamma$ ) et un contaminant stable (parmi le Cd et le fluoranthène) sur des organismes appartenant à différents phylum, au moyen des modèles d'étude des mélanges les plus récents. Le présent projet s'est focalisé sur l'étude de la toxicité de ces mélanges sur la croissance et la reproduction du nématode du sol *Caenorhabditis elegans*.

Dans cette annexe, nous présentons le déroulement des différents travaux conduits ainsi que les choix réalisés afin de mener à bien le projet de thèse sur une durée de  $\approx$  3 ans (février 2012 - mai 2015).

## Travail préparatoire

Le premier semestre 2012 a été consacré aux recherches bibliographiques préparatoires du projet ainsi qu'à l'apprentissage des méthodes expérimentales avec le nématode *C. elegans*. Une petite partie du temps a également été consacrée à la prise en main du langage de traitement de texte L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X en vue d'une rédaction facilitée du manuscrit de thèse.

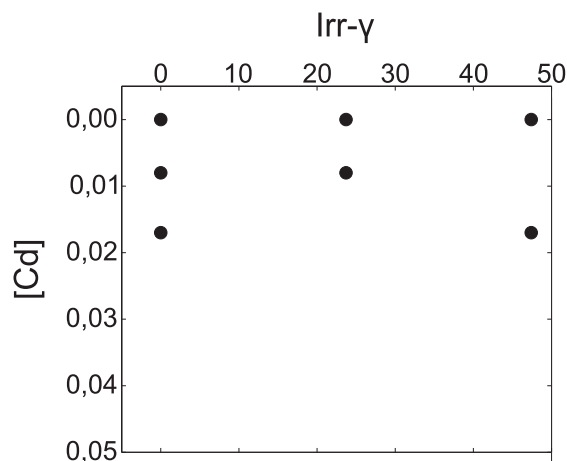
Une rencontre auprès de D. Spurgeon et W. Tyne au centre d'écologie et d'hydrologie (CEH, Wallingford, Angleterre) a été réalisée afin d'évaluer l'intérêt que pouvait représenter le milieu d'eau interstitielle reconstituée, mis au point dans ce laboratoire, pour les études avec *C. elegans*. Cette méthode d'exposition permet de réaliser des tests écotoxicologiques sous différentes conditions chimiques et peut faciliter les calculs de spéciation des éléments traces métalliques. Elle n'a cependant pas été retenue en raison d'une difficulté accrue pour le suivi journalier des paramètres de croissance et de reproduction des individus, par rapport à une exposition par la gélose.<sup>1</sup>

Deux formations à la modélisation des effets de substances seules ou en mélange ont été réalisées : une formation abordant la modélisation descriptive MixTox et le choix de plans expérimentaux adaptés et une formation abordant la modélisation mécaniste toxicocinétique/toxicodynamique d'effets létaux et sublétaux.<sup>2</sup> Cette dernière a notamment permis un apprentissage de la résolution d'équations différentielles (fonctions *ODE*) et de la recherche du minimum de fonctions par ajustement de paramètres (fonction *fminsearch*) à l'aide du logiciel Matlab<sup>®</sup>. Ces deux formations ont été concrétisées par la transcription de

---

1. Voir section 1.2.5 (p. 37).

2. Voir annexe *Communications scientifiques et formations suivies* (p. 255).



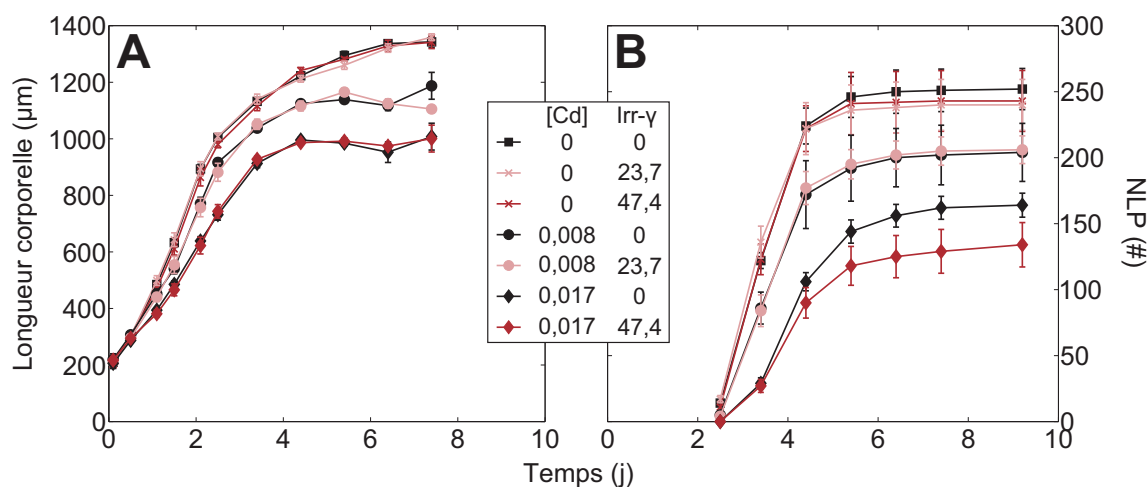
**FIGURE S.1** Plan expérimental simplifié utilisé dans le cadre de l'étude des effets du mélange irradiation- $\gamma$ /Cd sur *C. elegans*. Sept duplicatas ont été utilisés par condition. [Cd] : concentration de Cd en  $\text{mmol L}^{-1}$  ; Irr- $\gamma$  : débit de dose d'irradiation- $\gamma$  ( $\text{mGy h}^{-1}$ ) ; ● : combinaisons d'Irr- $\gamma$  et de Cd testées.

l'outil MixTox et le codage du modèle DEBtox pour mélange sous Matlab<sup>®</sup>.

En raison des difficultés d'expérimentation avec le composé organique fluoranthène, constatées au cours d'une expérience pilote lors du déplacement au CEH (caractère hydrophobe, difficulté de son dosage chimique, etc.), la priorité du projet de thèse a été placée sur l'utilisation du Cd comme contaminant stable. Au début du second semestre 2012, une première expérience a été réalisée afin de vérifier si la toxicité du Cd dans nos conditions expérimentales était similaire à celle reportée dans la littérature. Une fois cette étape validée, l'étude des effets combinés du Cd et de l'irradiation- $\gamma$  (Irr- $\gamma$ ) a été envisagée dans un premier temps et son exécution a été réalisée avant la fin du second semestre.

## Étude de la toxicité du mélange Cd/irradiation- $\gamma$

L'Irr- $\gamma$  est source de contraintes expérimentales non négligeables. Étant donné que le débit de dose reçu par un organisme est déterminé par la distance de l'organisme par rapport à la source et qu'il diminue avec le carré de la distance, des essais ont été réalisés en collaboration avec A. Buisset, C. Lecomte et N. Dubourg afin d'identifier un contenant d'exposition permettant de (i) minimiser la variabilité de débit de dose reçu par les nématodes et (ii) maximiser le nombre de duplicatas possible dans les irradiateurs. L'exposition sur plaque 96 puits a un temps été envisagée avant d'être abandonnée car celle-ci conduisait à la perte d'un trop grand nombre d'individus. Une exposition sur boîtes de Petri 3,5 cm inclinées à 90° a été préférée.



**FIGURE S.2** Effets combinés du Cd et de l'irradiation- $\gamma$  sur la croissance (A) et la reproduction (B) de *C. elegans*. La moyenne des données de longueur corporelle ou du nombre cumulé de larve produites (NLP)  $\pm$  l'erreur type ( $n = 7$ ) sont représentées en fonction du temps (j après éclosion). [Cd] : concentration de Cd en  $\text{mmolL}^{-1}$  ; Irr- $\gamma$  : débit de dose d'irradiation- $\gamma$  ( $\text{mGy h}^{-1}$ ).

Les effets d'une exposition chronique (10 j) à l'Irr- $\gamma$  et/ou au Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* a été réalisée en suivant un protocole semblable à celui présenté dans le chapitre 3. En raison de la dimension des chambres d'irradiation et des contraintes liées au débit de dose, seul un plan expérimental modeste a pu être utilisé (Fig. S.1). Deux concentrations de Cd ont été utilisées, l'une proche des  $\text{EC}_{50}$  du Cd (augmentation de longueur maximale et le nombre de larves produites total) et l'autre correspondant à la moitié de cette valeur. Deux débits de dose d'Irr- $\gamma$  ont été utilisés, l'un correspondant au débit de dose maximal pouvant être atteint à partir des sources de  $^{137}\text{Cs}$  disponibles au laboratoire et l'autre correspondant à la moitié de cette valeur.

Les résultats obtenus pour la croissance et la reproduction sont présentés dans la figure S.2. Aucun effet significatif de l'Irr- $\gamma$  n'a été constaté sur la croissance. Au niveau de la reproduction, les résultats suggèrent que l'Irr- $\gamma$  pourrait induire une potentialisation des effets de la plus forte concentration de Cd. Une modélisation non linéaire à effet mixte, réalisée à partir du package *nlme* du logiciel R, n'a cependant pas permis d'identifier cette différence comme significative.

Ainsi, en raison de la limitation des niveaux de dose atteints par le dispositif d'irradiation alors en place au laboratoire mais également en raison de sa faible disponibilité, l'exploration des effets combinés de l'Irr- $\gamma$  et du Cd n'a pas été poursuivie. Le projet de thèse a été recentré sur l'étude des effets du mélange U/Cd car la toxicité de l'U seul sur *C. elegans* avait déjà été caractérisée au préalable (Dutilleul *et al.*, 2013 ; Goussen *et al.*, 2015, 2013).

---

## Étude de la toxicité du mélange U/Cd

L'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* a été au cœur de ce projet de thèse, il s'est étalé sur les deux années restantes.

Comme mentionné précédemment, l'acquisition d'un jeu de données exploitable a nécessité la réalisation de deux expériences d'exposition chronique (11 j) des nématodes suivant un plan expérimental étendu ainsi que la vérification des concentrations d'exposition par dosage chimique. Les observations expérimentales ainsi que l'analyse MixTox a permis de mettre en évidence un antagonisme conséquent au niveau des effets combinés de ces deux ETM. Cette interaction pouvait théoriquement se produire soit dans le milieu d'exposition, soit au niveau des organismes, durant les phases toxicocinétiques ou toxicodynamiques. Étant donné que la toxicité du Cd semblait réduite en présence d'U et que la concentration molaire d'exposition de l'U était largement supérieure à celle du Cd, nous avons fait l'hypothèse d'une inhibition de l'internalisation du Cd par compétition avec l'U. Nous avons alors fait le choix de réaliser d'une part une expérience de bioaccumulation, afin de vérifier que l'internalisation du Cd par *C. elegans* était effectivement réduite en présence d'U, et d'autre part une expérience de caractérisation des concentrations d'U et de Cd dans le tapis bactérien, afin de vérifier si l'interaction pouvait provenir du milieu d'exposition. La réalisation de l'expérience de bioaccumulation a nécessité la mise en place au laboratoire d'une procédure de culture liquide pour la production de grosses quantités de nématodes, d'une procédure de manipulation des nématodes limitant les pertes d'individus dû à leur adsorption sur le plastique ainsi que d'une procédure pour l'homogénéisation des individus afin de réaliser les dosages protéiques et chimiques.

Ces expériences complémentaires nous ont permis de vérifier que la bioaccumulation du Cd par *C. elegans* était effectivement réduite lors d'une coexposition avec l'U mais que celle-ci n'était pas liée à une interaction au niveau toxicocinétique mais plutôt à une interaction dans le milieu d'exposition (réduction du transfert du Cd de la gélose vers le tapis bactérien).

Les données d'effet ont ensuite été réanalysées sur la base des concentrations dans le tapis bactérien afin de déterminer si d'autres interactions pouvaient avoir lieu au niveau des individus durant la phase toxicocinétique ou toxicodynamique. En utilisant les concentrations réellement mesurées (par opposition aux concentrations nominales), nous avons pu montrer qu'une interaction antagoniste plus modérée mais significative était identifiée pour la croissance et que les effets combinés tendaient à diminuer globalement au cours du temps, par rapport à l'additivité.

Des incohérences ont cependant été constatées par la suite entre les concentrations d'exposition et le niveau d'effet observé. Ces incohérences ont été attribuées à l'erreur inhérente à la procédure de dosage pour la vérification des concentrations d'exposition. Les analyses MixTox ont été reconduites sur la base des concentrations nominales. De meilleurs ajustements ont ainsi été obtenus et, même si des interactions significatives de faible amplitude ont encore été identifiées, les effets combinés semblent globalement suivre l'additivité.

Pour finir, les derniers mois du projet ont été consacrés à la modélisation DEBtox des données notamment dans le but de comparer l'intérêt de cette approche mécaniste par rapport à l'approche descriptive MixTox pour l'analyse de nos données.

Les résultats de l'étude de la toxicité du mélange U/Cd sur *C. elegans* ont fait l'objet de communications scientifiques, sous différents formats, dont le détail est présenté dans l'annexe *Communications scientifiques et formations suivies*<sup>1</sup>. Une valorisation de l'analyse DEBtox des résultats sous forme d'article est également en projet pour 2015.

Un peu en marge de cette étude, une expérience de caractérisation des effets de l'U et du Cd sur des mutants *C. elegans* KO pour le transporteur de métaux bivalents (DMT) a été réalisée par C. Dubois (dans le cadre d'un stage de Master 2) afin de déterminer si ce transporteur pouvait être impliqué dans l'internalisation de ces ETM. Comme nous l'avons vu<sup>2</sup>, les voies d'internalisation restent encore mal caractérisées pour le Cd et restent méconnues pour l'U. Le transporteur DMT est suspecté de jouer un rôle dans l'internalisation de l'U et du Cd dans l'intestin. L'expérience n'a cependant pas pu aboutir car trop de pertes d'individus (sous la gélose ou en dehors des boîtes de Petri) ont affecté la qualité des résultats. Néanmoins, l'EC<sub>50</sub> de l'U et du Cd sur l'augmentation de longueur corporelle maximale des individus mutants semble relativement proche de celle des individus de la souche N2, ce qui suggère que ce transporteur n'est pas uniquement responsable de l'internalisation de ces ETM.

## Étude de la toxicité du mélange U/fluoranthène

L'étude des effets combinés de l'U et du fluoranthène (FL) sur la reproduction de *C. elegans* a été réalisée au cours du stage de Dubois (2013).

La précipitation du FL dans la gélose aux fortes concentrations, malgré l'utilisation d'acétone comme solvant, n'a pas permis l'obtention d'une courbe dose-réponse complète. La modélisation MixTox a cependant permis de mettre en évidence que le modèle d'addi-

---

1. p. 255.

2. Voir sections 1.3.1.6 (p. 47) et 1.3.2.5 (p. 56).

---

tion des concentrations (CA) décrit mieux les données d'effet que le modèle d'addition des réponses (RA) ( $R^2$  : 0,79 vs 0,75). Avec l'additivité CA pour référence, aucune interaction significative n'a été identifiée. Dans les conditions expérimentales testées, les effets de l'U et du FL sur le nombre de larves produites total sont donc additifs.

## **Finalisation du projet**

Les derniers mois du projet de thèse ont été consacrés, en parallèle avec la modélisation DEBtox des effets combinés U/Cd, à la rédaction et à la correction du manuscrit de thèse.



## Support au chapitre 4

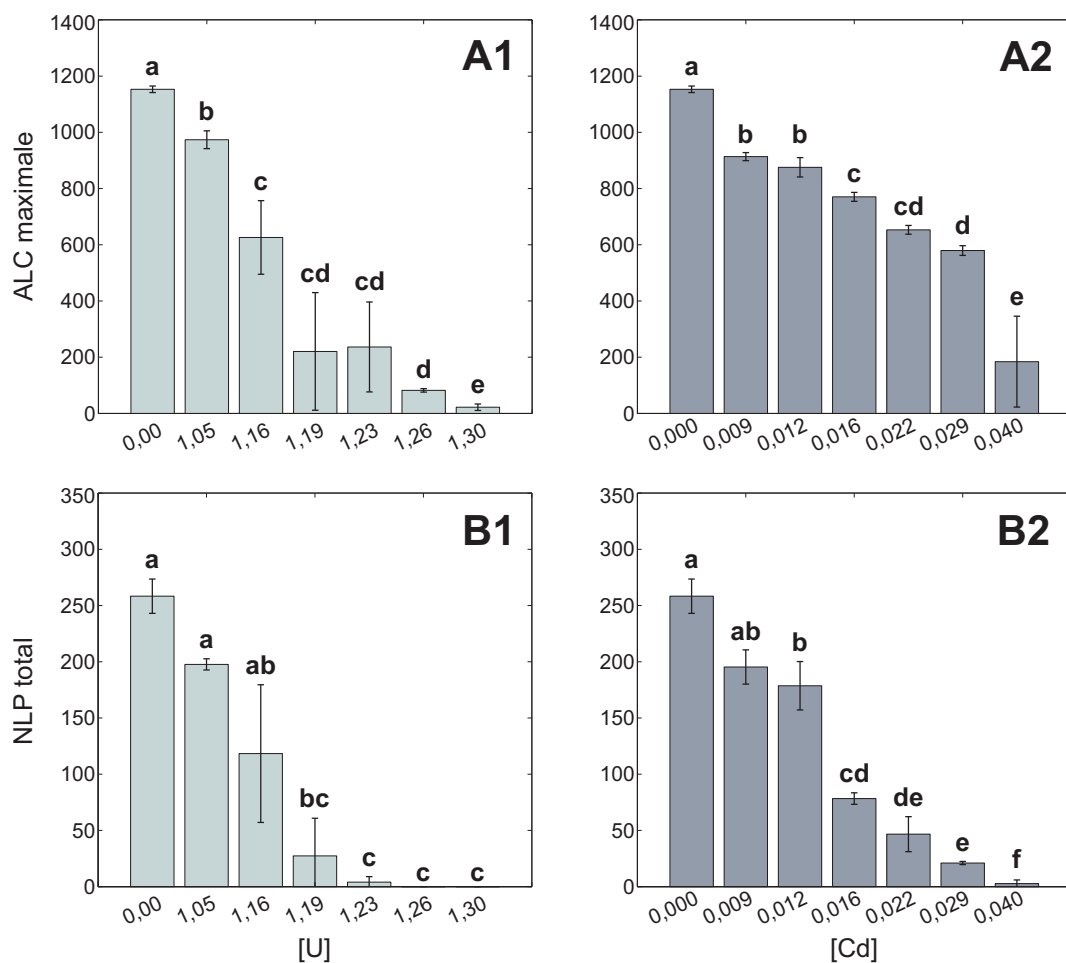


**Tableau S.1** Estimation des paramètres pour les modèles MixTox significatifs les plus parcimonieux, obtenus pour l'augmentation de longueur maximale (**A**) et pour le nombre de larves produites total (**B**) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations en U et Cd dans la gélose.<sup>a</sup>

Paramètre	CA (DR)		RA (DL)	
	Valeur	CI <sub>95</sub>	Valeur	CI <sub>95</sub>
<b>A</b> <i>max</i>	1027	999 : 1143	1112	1087 : 1140
<i>β<sub>Cd</sub></i>	2,8	0,1 : 3,5	1,2	0,9 : 1,5
<i>β<sub>U</sub></i>	39,4	22,9 : 155,3	31,0	23,9 : 49,6
<i>EC<sub>50Cd</sub></i>	0,032	0,030 : 22,938	0,027	0,024 : 0,034
<i>EC<sub>50U</sub></i>	1,17	1,15 : 1,19	1,16	1,14 : 1,17
<i>a</i>	0,3	-12,7 : 3,7	-1,5	-2,4 : -0,4
<i>b<sub>Cd/DL</sub></i>	4,6	-1308,2 : 952,6	3,2	2,8 : 5,1
Paramètre	CA (DR)		RA (DR)	
	Valeur	CI <sub>95</sub>	Valeur	CI <sub>95</sub>
<b>B</b> <i>max</i>	225	208 : 244	233	216 : 260
<i>β<sub>Cd</sub></i>	4,2	3,5 : 4,9	2,5	1,9 : 3,5
<i>β<sub>U</sub></i>	95,4	31,1 : ∞	79,2	20,8 : 175,5
<i>EC<sub>50Cd</sub></i>	0,018	0,016 : 0,019	0,014	0,012 : 0,015
<i>EC<sub>50U</sub></i>	1,16	1,10 : 1,18	1,16	1,10 : 1,17
<i>a</i>	-0,1	-0,4 : 0,2	-6,0	-12,1 : -1,3
<i>b<sub>Cd</sub></i>	4,9	4,2 : 5,5	12,9	5,7 : 23,7

a. **CA** : addition des concentrations ; **RA** : addition des réponses ; **DL** : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose ; **DR** : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; **CI<sub>95</sub>** : intervalle de confiance 95% estimé par bootstrap. *max* : niveau de réponse des contrôles (μm ou #) ; *EC<sub>50<sub>i</sub></sub>* : concentration efficace 50 % (mmolL<sup>-1</sup>) ; *β<sub>i</sub>* : pente de la courbe dose-réponse à l'*EC<sub>50<sub>i</sub></sub>* ; *a*, *b<sub>Cd</sub>* et *b<sub>DL</sub>* : paramètres de déviation des modèles DR et DL.

★ Dans cette table, l'amplitude des intervalles de confiance des paramètres des modèles basés sur l'additivité CA suggère que ces modèles s'ajustent mal aux données expérimentales. L'intervalle de confiance des paramètres de déviation comprend à la fois des valeurs négatives et positives ce qui rend l'interprétation des effets combinés peu fiable.

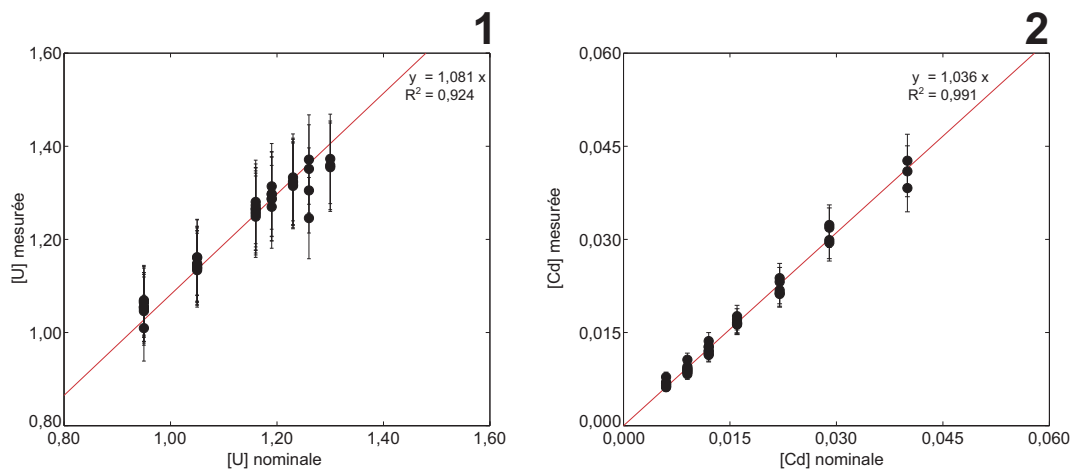


**FIGURE S.3** Analyse statistique classique des données d'augmentation de longueur corporelle (ALC) maximale ( $\mu\text{m}$ , **A**) et du nombre de larves produites (NLP) total (**B**) chez les individus *C. elegans* exposés à l'U (**1**) ou au Cd (**2**) durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose ( $\text{mmolL}^{-1}$ ). Pour chaque condition, les données moyennées ( $n \geq 3$ )  $\pm$  erreur type sont représentées. Les lettres en minuscule identiques désignent les conditions non statistiquement différentes ( $p \leq 0,05$ ).

★ L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R (v. 3.0.3). Les données ont été analysées par une ANOVA suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, lorsque les conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk) et d'homoscédasticité (test de Bartlett) étaient vérifiées. Une transformation BoxCox a été utilisée pour les données d'ALC maximale et une transformation par la racine carrée a été utilisée pour les données de NLP total. Lorsque les conditions de normalité et d'homoscédasticité n'étaient pas vérifiées (*i.e.* pour l'U), l'analyse a été réalisée à partir d'une ANOVA non paramétrique (test de Kurskal-Wallis) suivie du test de comparaisons multiples proposé dans le *package nparcomp* (v. 2.6, [Konietzschke et Hothorn, 2012](#)). Un seuil de significativité de 5 % a été utilisé.



## Support au chapitre 6



**FIGURE S.4** Relations entre les concentrations nominales et mesurées dans la gélose pour l'U (1) et le Cd (2). Les concentrations sont exprimées en  $\text{mmolL}^{-1}$ . ● : données expérimentales ; Traits rouges : relation linéaire ; Barres d'erreur verticales : erreurs estimées pour les dosages d'U par ICP-AES et de Cd par ICP-MS.

## Support 1 au chapitre 7

**Tableau S.2** Temps de mesure de la longueur corporelle et de comptage du nombre de larves produites par les nématodes durant leur exposition à l'U et au Cd. <sup>a</sup>

Longueur corporelle	Temps de mesure (j)														
	0,2	0,6	1,2	1,6	2,2	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,4	9,2	10,2	–
Nombre de larves	–	–	–	–	2,2	2,6	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5	10,8

a. Le temps est en j après éclosion.

**Tableau S.3** Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle (**A**) et le nombre de larves produites total (**B**) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien. <sup>a</sup>

		Addition des concentrations				Addition des réponses			
		Add	S/A	DR	DL	Add	S/A	DR	DL
<b>A</b>	RSS ( $10^6$ )	3,43	2,99	<u>2,91</u>	2,94	<u>3,03</u>	3,02	2,99	2,92
	R <sup>2</sup>	0,79	0,82	<u>0,82</u>	0,82	<u>0,82</u>	0,82	0,82	0,82
	p [ $\chi^2$ ]	$2 \times 10^{-48}$	$6 \times 10^{-6}$	<u>0,04</u>	0,1	<u><math>3 \times 10^{-52}</math></u>	0,5	0,2	0,06
<b>B</b>	RSS ( $10^5$ )	1,56	1,19	<u>1,16</u>	1,18	1,23	1,19	1,18	<u>1,15</u>
	R <sup>2</sup>	0,84	0,88	<u>0,88</u>	0,88	0,88	0,88	0,88	<u>0,88</u>
	p [ $\chi^2$ ]	$3 \times 10^{-57}$	$2 \times 10^{-10}$	<u>0,04</u>	0,3	$1 \times 10^{-64}$	0,02	0,3	<u>0,03</u>

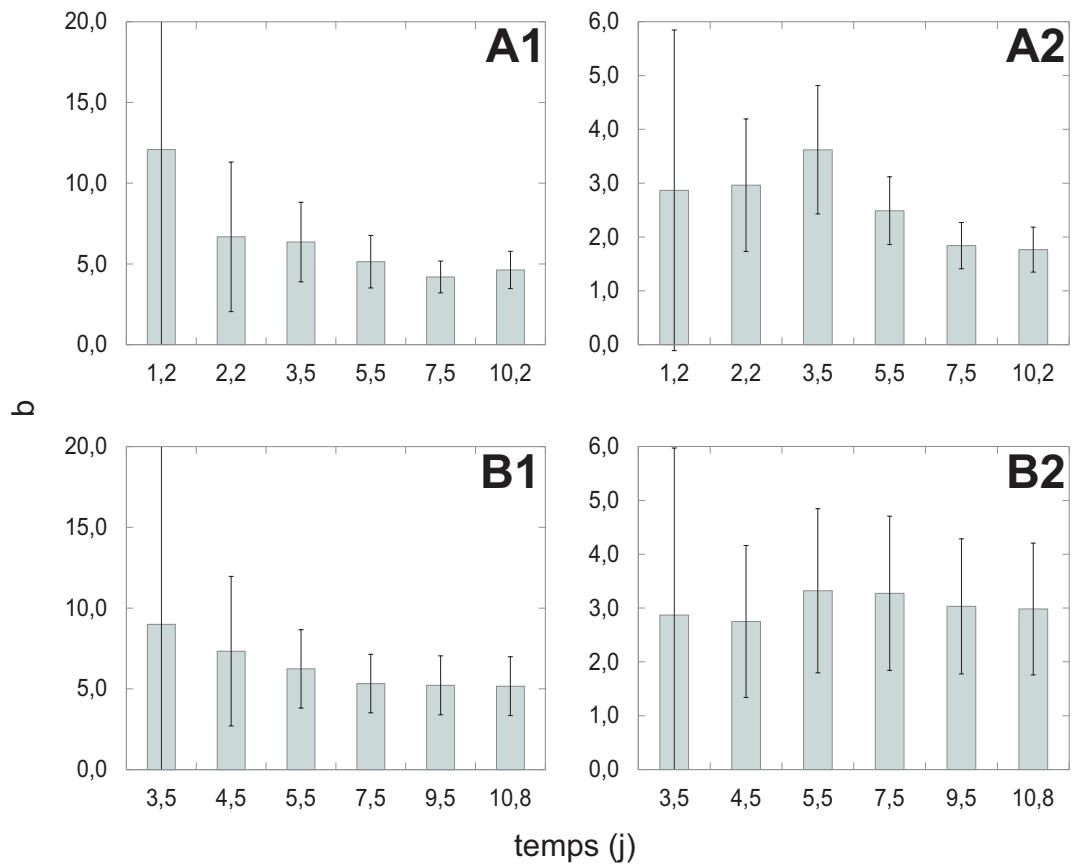
a. **RSS** : Somme des carrés des résidus ; **p** [ $\chi^2$ ] : p-value du test du ratio de vraisemblance ; **Add** : Modèle d'additivité de référence ; **S/A** : modèle d'interaction synergie/antagonisme simple ; **DR** : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; **DL** : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose ; Les valeurs soulignées correspondent aux valeurs des modèles significatifs les plus parcimonieux.

**Tableau S.4** Estimation des paramètres pour les modèles MixTox significatifs les plus parcimonieux, obtenus pour l'augmentation de longueur maximale (**A**) et pour le nombre de larves produites total (**B**) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien.<sup>a</sup>

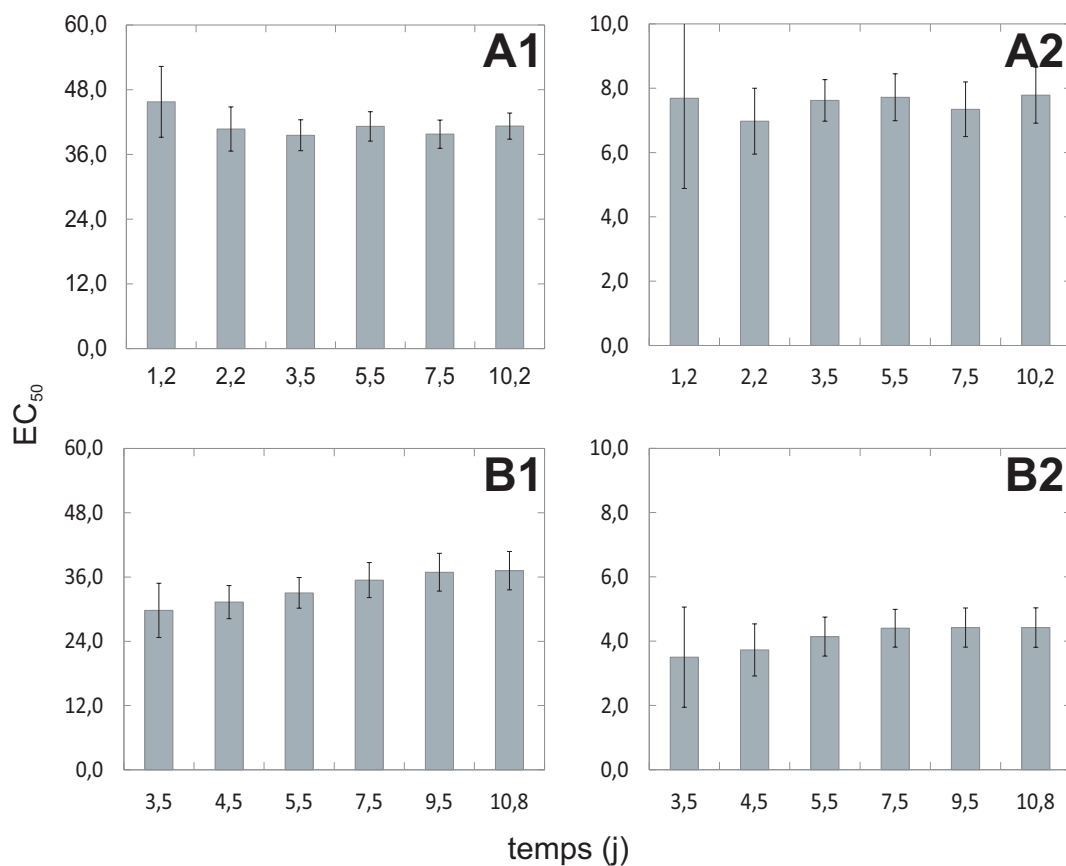
Paramètre	CA (DR)		RA (Add)	
	Valeur	CI <sub>95</sub>	Valeur	CI <sub>95</sub>
<b>A</b> <i>max</i>	1148	1116 : 1172	1127	1090 : 1159
<i>β<sub>Cd</sub></i>	1,6	1,2 : 2,0	1,6	1,0 : 2,2
<i>β<sub>U</sub></i>	3,6	3,1 : 4,5	3,3	2,9 : 3,8
<i>EC<sub>50Cd</sub></i>	7,8	7,2 : 9,2	8,3	7,7 : 10,1
<i>EC<sub>50U</sub></i>	42,5	39,4 : 47,3	42,1	40,6 : 44,3
<i>a</i>	0,3	-0,6 : 1,2	-	-
<i>b<sub>Cd</sub></i>	2,5	0,9 : 4,1	-	-
Paramètre	CA (DR)		RA (DL)	
	Valeur	CI <sub>95</sub>	Valeur	CI <sub>95</sub>
<b>B</b> <i>max</i>	249	220 : 273	248	219 : 276
<i>β<sub>Cd</sub></i>	2,9	2,1 : 3,7	2,9	2,2 : 4,2
<i>β<sub>U</sub></i>	5,3	4,6 : 17,6	5,7	4,7 : 9,2
<i>EC<sub>50Cd</sub></i>	4,5	3,9 : 5,0	4,5	3,8 : 5,1
<i>EC<sub>50U</sub></i>	38,2	33,7 : 44,9	38,3	34,5 : 43,2
<i>a</i>	0,5	-0,4 : 1,4	-3,2	-5,3 : -1,6
<i>b<sub>Cd / DL</sub></i>	1,6	0,1 : 2,7	1,0	0,6 : 1,5

*a.* **CA** : addition des concentrations ; **RA** : addition des réponses ; **Add** : modèle d'additivité ; **DL** : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose ; **DR** : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; **CI<sub>95</sub>** : intervalle de confiance à 95 % estimé par bootstrap ; *max* : niveau de réponse des contrôles (µm ou #) ; *EC<sub>50<sub>i</sub></sub>* : concentration efficace 50 % (mmolL<sup>-1</sup>) ; *β<sub>i</sub>* : pente de la courbe dose-réponse à l'*EC<sub>50<sub>i</sub></sub>* ; *a*, *b<sub>Cd</sub>* et *b<sub>DL</sub>* : paramètres de déviation des modèles DR et DL.

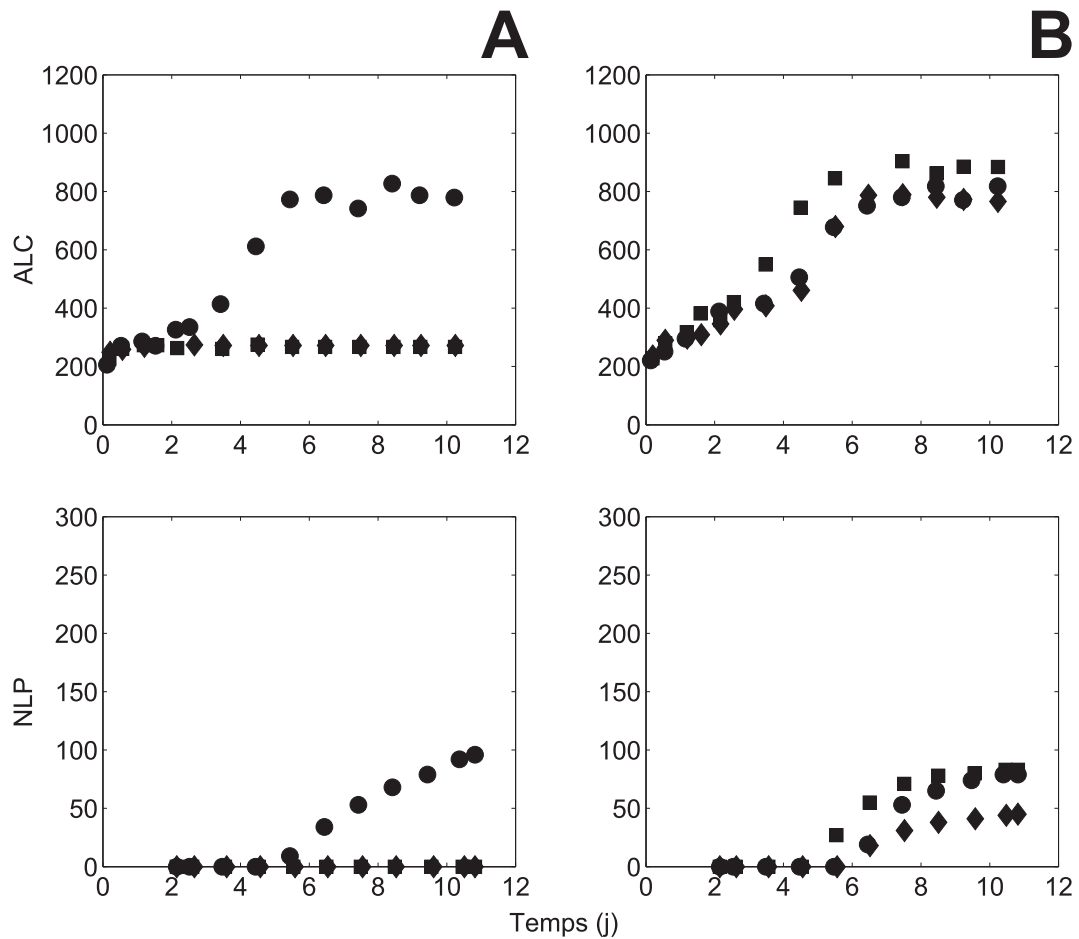




**FIGURE S.5** Évolution de la pente  $b$  des courbes dose-réponse de l'U (1) et du Cd (2) au cours du temps ( $j$  après éclosion) pour l'augmentation de la longueur corporelle (A) et le nombre de larves produites (B) de *C. elegans*, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien. Valeurs  $\pm$  l'intervalle de confiance à 95 %.



**FIGURE S.6** Évolution de l' $EC_{50}$  (nmol  $mg_{dw}^{-1}$ ) des courbes dose-réponse de l'U (1) et du Cd (2) au cours du temps (j après éclosion) pour l'augmentation de la longueur corporelle (A) et le nombre de larves produites (B) de *C. elegans*, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien (nmol  $mg_{dw}^{-1}$ ). Valeurs  $\pm$  l'intervalle de confiance à 95 %.



**FIGURE S.7** Exemple de cinétiques de croissance et de reproduction tardives chez des nématodes *C. elegans* exposés à des concentrations modérées à fortes d'U, seules (A, 49,4 nmol<sub>U</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>) ou en présence de concentrations modérées à faibles de Cd (B, 49,4 nmol<sub>U</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup> + 0,9 nmol<sub>Cd</sub> mg<sub>dw</sub><sup>-1</sup>). Le temps est en j après éclosion. Chez, les individus contrôles, un développement conséquent se produit à partir du premier jour.

## Support 2 au chapitre 7

Dans le chapitre 7, l'analyse des données de toxicité a été réalisée sur la base des concentrations U/Cd dans le tapis bactérien, estimées à partir des concentrations nominales en U et de Cd dans la gélose, car ces valeurs permettent d'expliquer une grande part de la variation des données. Mais l'analyse des données de toxicité a également été réalisée sur la base des concentrations U/Cd dans le tapis bactérien, estimées à partir des mesures directes d'U et de Cd dans la gélose. Des interprétations différentes ont été obtenues :

Les modèles significatifs les plus parcimonieux<sup>1</sup> identifiés sur la base des additivités CA et RA ont abouti à une description des données de qualité équivalente ( $R^2$  similaires) pour les deux critères d'effet (Tab. S.5). Des effets combinés contrastés ont été identifiés en fonction du modèle d'additivité de référence (CA ou RA), du critère d'effet ainsi que du temps d'exposition considéré.

Pour l'ALC maximale, une déviation significative de l'additivité CA a été mise en évidence. Le modèle le plus parcimonieux identifié est le modèle de déviation DL, décrivant différents niveaux d'antagonisme en fonction du niveau de dose du mélange ( $p[\chi^2] = 0,0006$ ; Tab. S.5, A, à  $t = 10,2j$ ; Fig. S.8, gauche). Par exemple, pour un niveau de dose modéré, l'additivité CA prédit une  $EC_{73}$ , tandis qu'un effet de  $\approx 38\%$  a été observé. Pour un niveau de dose plus élevé, l'additivité CA prédit une  $EC_{92}$ , tandis qu'un effet de  $\approx 48\%$  a été observé. Ce modèle prédit également un passage de l'antagonisme à l'additivité puis à la synergie pour des niveaux de dose inférieur à l' $EC_{19}$ . Ce changement se produit cependant dans une région de la surface de réponse non couverte par les données expérimentales ; il n'a donc pas été considéré.

Au cours du temps, un antagonisme simple et déviant significativement de l'additivité CA a été identifié après 0,6j d'exposition. Une interaction antagoniste globale a également été identifiée pour les temps suivants, mais celle-ci passa d'un antagonisme simple, à différents niveaux d'antagonisme dépendants du ratio de substance, puis à différents niveaux d'antagonisme dépendants du niveau de dose du mélange, observé jusqu'au dernier point de mesure (Tab. S.5, A).

En comparaison à l'additivité RA, le modèle significatif le plus parcimonieux pour l'ALC maximale est également un modèle DL ( $p[\chi^2] = 0,006$ , Tab. S.5, A). Mais à l'inverse du modèle identifié sur la base de l'additivité CA, celui-ci indique l'additivité pour les mélanges à l' $EC_{41}$ , une légère synergie pour les mélanges en dessous de l' $EC_{41}$  et un antagonisme d'intensité croissante pour les mélanges au-dessus de l' $EC_{41}$  (Fig. S.8, droite). Par exemple, l'additivité RA sous-estime légèrement la toxicité du mélange à un faible niveau de dose : une  $EC_{29}$  est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 34\%$  a été observé. Mais pour

---

1. Correspondant à des modèles d'additivité ou de déviation.

---

un niveau de dose plus élevé, l'additivité RA surestime la toxicité du mélange : une  $EC_{69}$  est prédite, tandis qu'un effet de  $\approx 46\%$  a été observé.

L'analyse cinétique des données révèle que les effets combinés suivent principalement l'additivité aux premiers temps de mesure puis le type de déviation DL décrit au-dessus, à partir de  $t = 5,5$  j.

Pour le NLP total, le modèle significatif le plus parcimonieux, déviant de l'additivité CA, est un modèle DR décrivant différents niveaux d'antagonisme en fonction du ratio des substances en mélange ( $p[\chi^2] = 0,01$  ; Tab. S.5, B, à  $t = 10,8$  j ; Fig. S.9, gauche). En effet, pour des ratios U/Cd élevés, les effets observés sont correctement décrits par l'additivité CA. Mais pour des ratios plus faibles, l'additivité CA surestime les effets combinés observés : par exemple, pour un ratio U/Cd de 13, une  $EC_{95}$  est prédite tandis qu'un effet de  $\approx 64\%$  a été observé.

Ce même type de déviation de l'additivité CA a été identifié pour tous les temps de mesures intermédiaires (Tab. S.5, B).

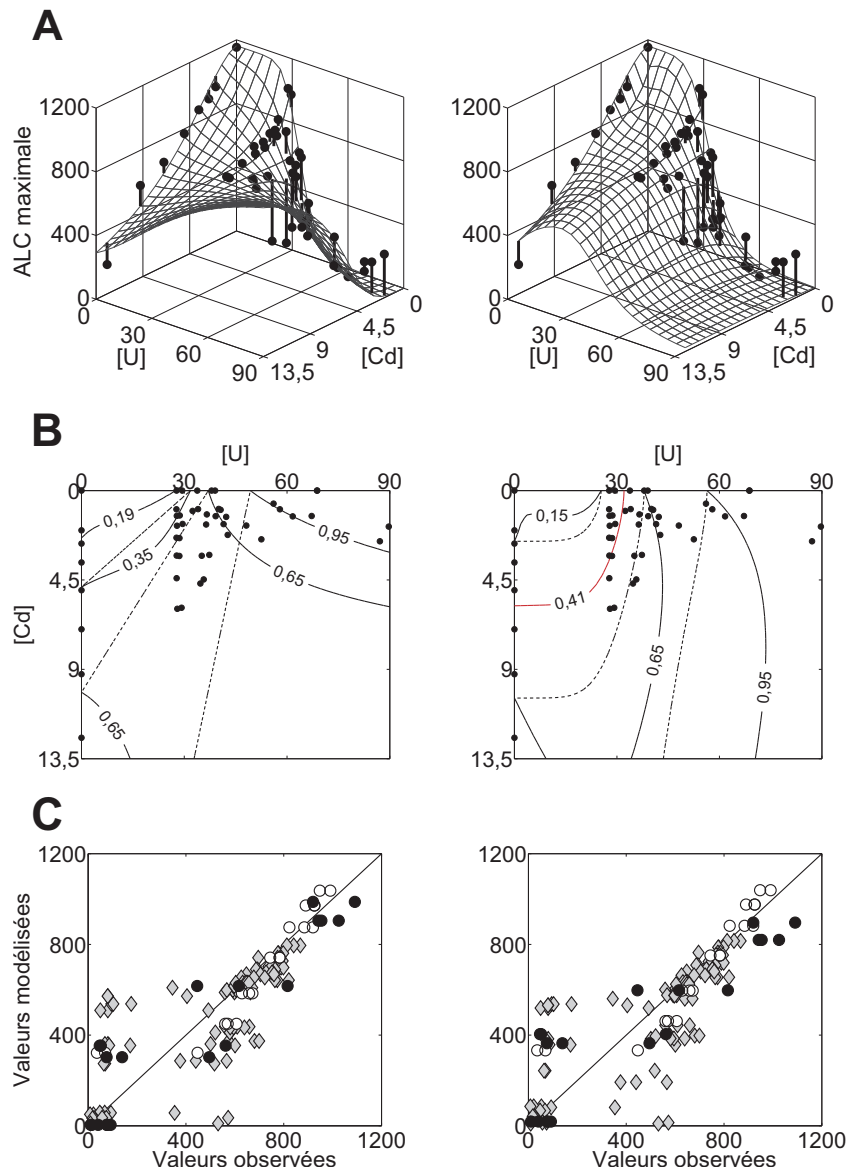
Enfin, avec l'additivité RA comme référence, l'ajout des différents paramètres de déviation n'a pas permis d'améliorer significativement la description des données de NLP total. Le modèle significatif le plus parcimonieux est donc le modèle d'additivité RA, indiquant l'absence d'interaction (Tab. S.5, B, à  $t = 10,8$  j ; Fig. S.9, droite).

Pour les premiers temps de mesure (entre 3,5 et 7,5 j), des déviations de l'additivité RA, de type synergie simple ou synergie pour les mélanges inférieurs à l' $EC_{85-97}$  ; changeant pour de l'additivité puis de l'antagonisme au-delà de ce seuil, sont identifiées. Pour les derniers temps de mesure ( $t = 9,5$  et  $10,8$  j), les effets combinés correspondent globalement à l'additivité RA (Tab. S.5, B).

**Tableau S.5** Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle (**A**) et le nombre de larves produites (**B**) de *C. elegans* pour différents temps d'exposition après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose.<sup>a</sup>

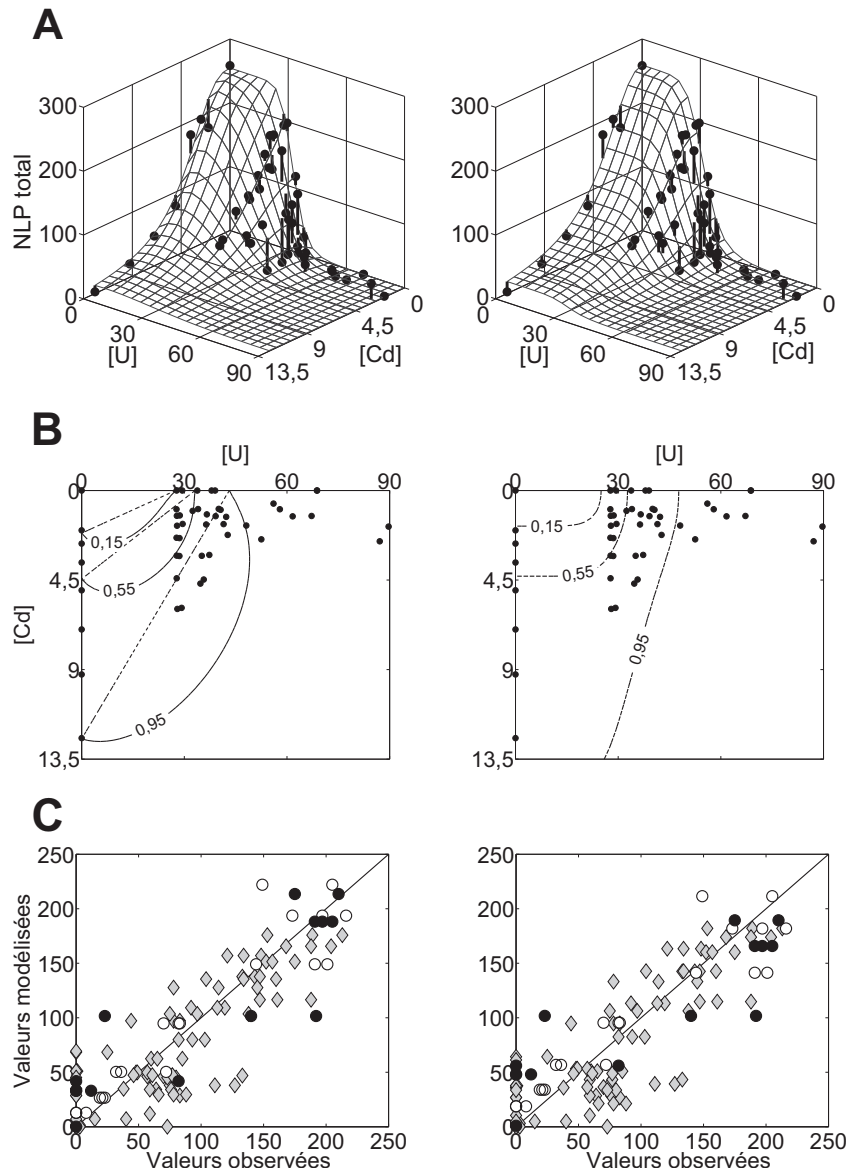
Temps	Addition des concentrations				Addition des réponses				
	Modèle	R <sup>2</sup>	p [ $\chi^2$ ]	Conclusion	Modèle	R <sup>2</sup>	p [ $\chi^2$ ]	Conclusion	
<b>A</b>	0,6	S/A	0,54	$5 \times 10^{-8}$	Antagonisme	Add	0,54	$2 \times 10^{-23}$	-
	1,2	DR	0,73	0,03	Antagonisme	S/A	0,73	0,02	Antagonisme
	2,2	DR	0,84	0,003	Antagonisme	Add	0,84	$2 \times 10^{-53}$	-
	3,5	DR	0,84	0,004	Antagonisme	Add	0,84	$2 \times 10^{-53}$	-
	5,5	DL	0,78	0,003	Antagonisme	DL	0,78	0,01	Synergie (< EC <sub>38</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>38</sub> )
	7,5	DL	0,77	0,03	Antagonisme	DL	0,76	0,02	Synergie (< EC <sub>37</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>37</sub> )
	10,2	DL	0,75	0,0006	Antagonisme	DL	0,73	0,006	Synergie (< EC <sub>41</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>41</sub> )
	3,5	DR	0,90	0,004	Antagonisme	S/A	0,90	0,001	Synergie
	4,5	DR	0,92	0,001	Antagonisme	DL	0,92	0,001	Synergie (< EC <sub>96</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>96</sub> )
	5,5	DR	0,91	0,0008	Antagonisme	DL	0,91	0,001	Synergie (< EC <sub>97</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>97</sub> )
<b>B</b>	7,5	DR	0,87	0,006	Antagonisme	DL	0,87	0,02	Synergie (< EC <sub>85</sub> ) Antagonisme (> EC <sub>85</sub> )
	9,5	DR	0,84	0,01	Antagonisme	Add	0,83	$1 \times 10^{-54}$	-
	10,8	DR	0,83	0,01	Antagonisme	Add	0,82	$2 \times 10^{-52}$	-

<sup>a</sup>. Le temps est en j après éclosion. Les informations en orange correspondent aux données d'augmentation de longueur corporelle maximale et du nombre de larves produites total. **Modèle** : modèles d'effets combinés significatifs les plus parcimonieux, identifiés sur la base de l'addition des concentrations ou de l'addition des réponses ; Add : additivité ; S/A : modèle d'interaction simple (synergie ou antagonisme) ; DR : modèle d'interaction dépendant du ratio des concentrations ; DL : modèle d'interaction dépendant du niveau de dose du mélange ; **R<sup>2</sup>** : coefficient de corrélation ; **p [ $\chi^2$ ]** : p-value du test du ratio de vraisemblance ; **Conclusion** : interprétations des déviations de l'additivité identifiées.



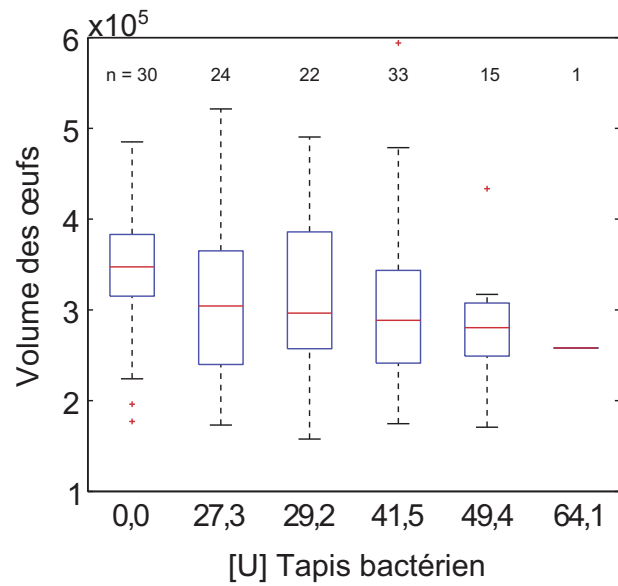
**FIGURE S.8** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle (ALC) maximale ( $\mu\text{m}$ ) de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d'antagonisme dépendant du niveau de dose, déviant de l'addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle de synergie/antagonisme dépendant du niveau de dose, déviant de l'addition des réponses (basculement :  $\text{EC}_{41}$ ). **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (grilles). **B.** Isobologrammes des surfaces de réponse; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux; la *ligne rouge* indique la zone de basculement; les *valeurs* indiquent les niveaux d'effet des isoboles (e.g. 0,5 représente l'isobole 50%); ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l'U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇); *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).



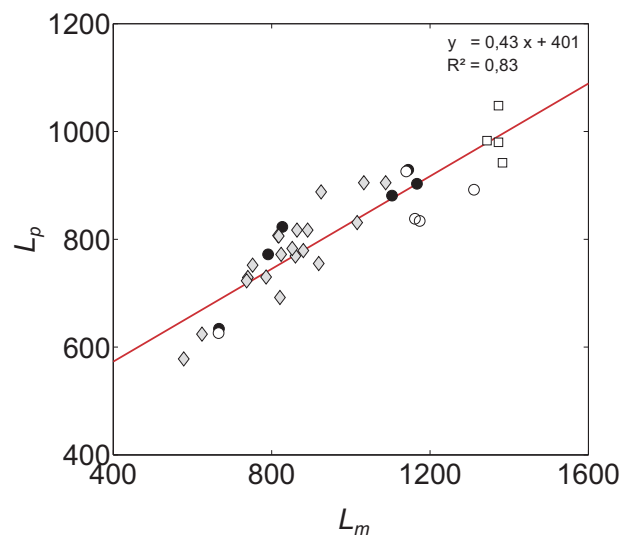


**FIGURE S.9** Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites (NLP) total de *C. elegans* exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). La partie de gauche représente le modèle d'antagonisme dépendant du ratio des concentrations, déviant de l'addition des concentrations. La partie de droite représente le modèle de non-interaction suivant l'addition des réponses. **A.** Surfaces de réponse des données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ , ●) projetées sur les surfaces de réponse prédites par les modèles sélectionnés (*grilles*). **B.** Isobogrammes des surfaces de réponse ; les *lignes en pointillés* représentent les isoboles du modèle additif, les *lignes pleines*, celles du modèle le plus parcimonieux ; les *valeurs* indiquent les niveaux d'effet des isoboles (*e.g.* 0,5 représente l'isobole 50 %) ; ● : concentrations testées expérimentalement. **C.** Valeurs modélisées représentées en fonction des valeurs expérimentales pour l'U (○), le Cd (●) et les mélanges (◇) ; *Diagonale* : ajustement idéal des données (droite  $y = x$ ).

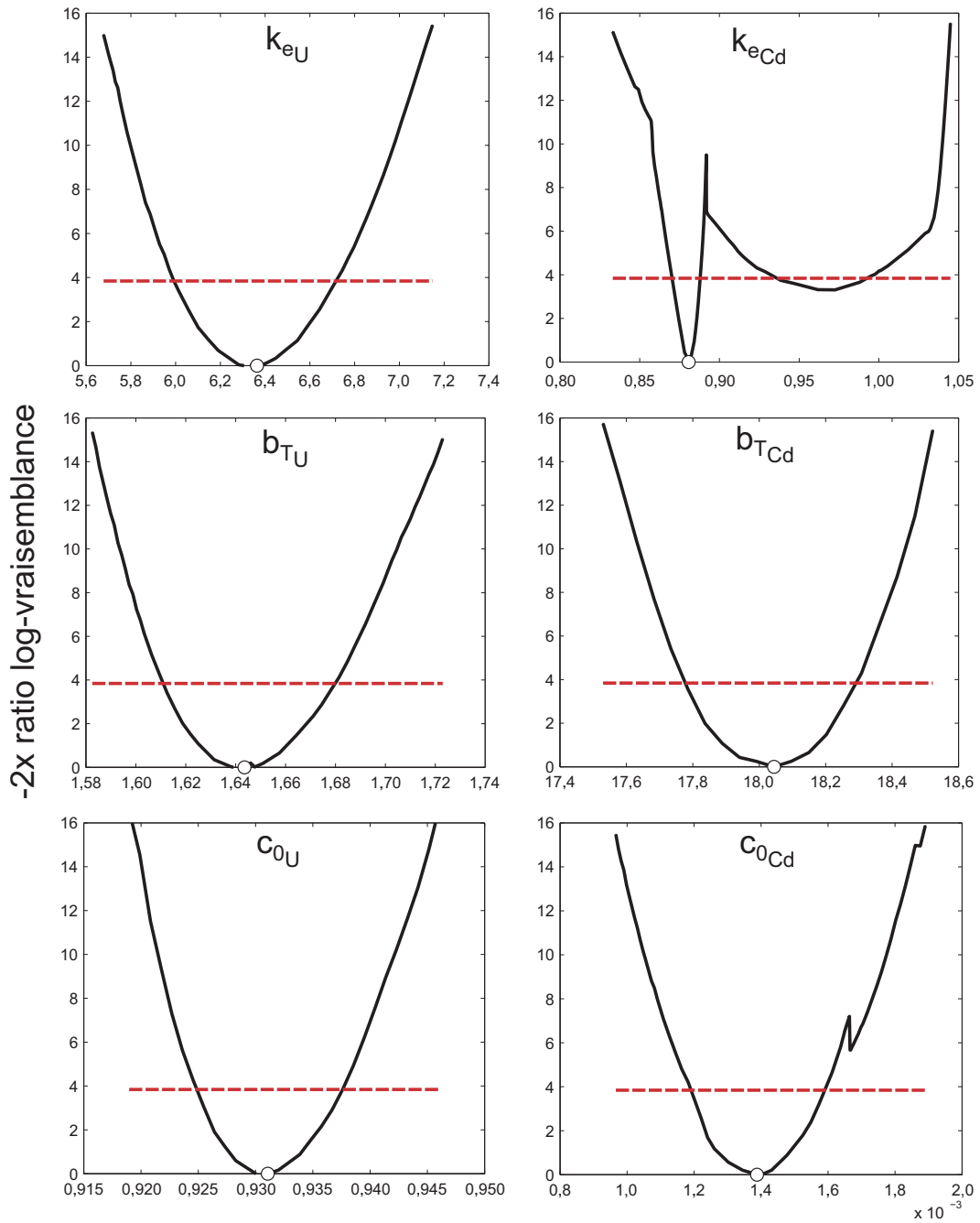
## Support au chapitre 8



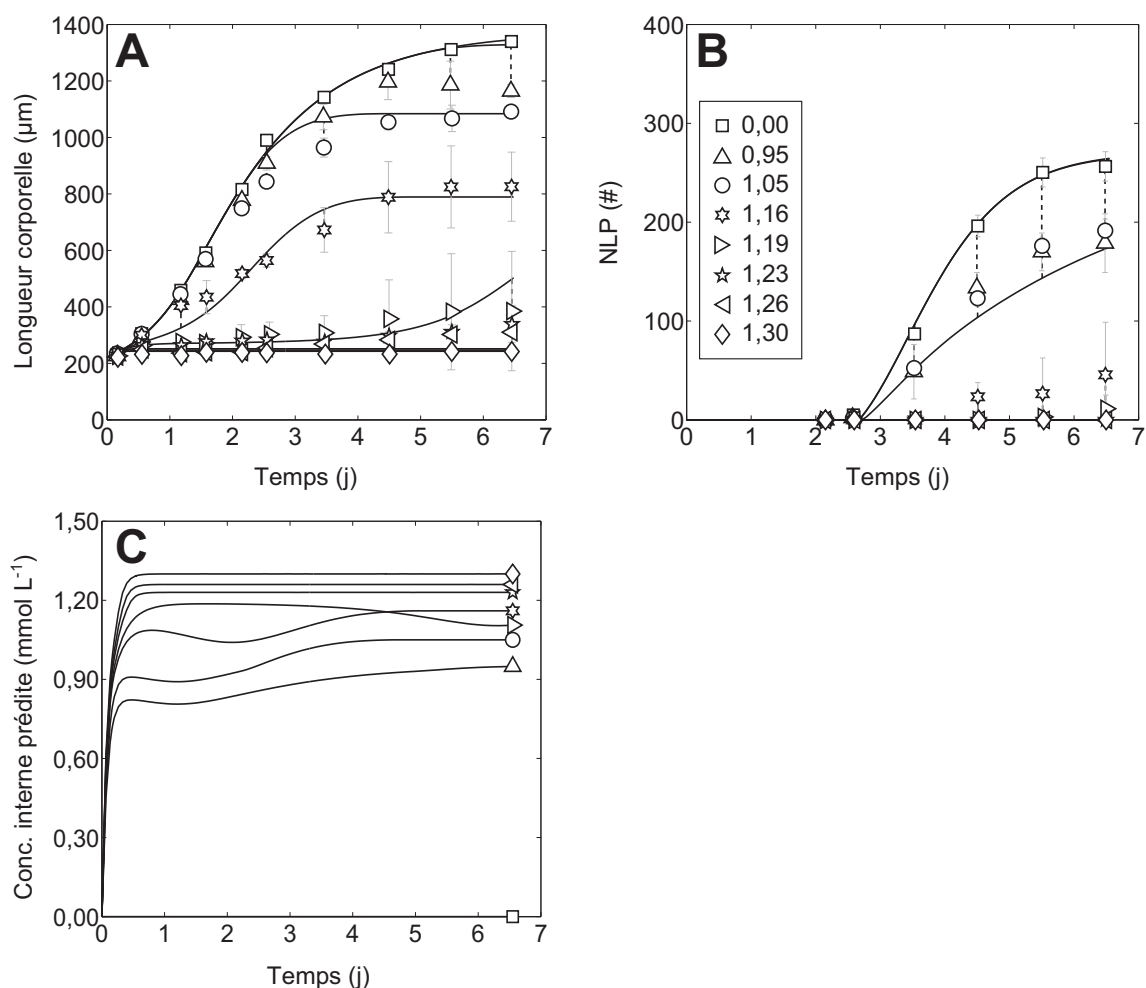
**FIGURE S.10** Représentation en boîte à moustache des données d'effet de l'U ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ) sur le volume des œufs ( $\mu\text{m}^3$ ) de *C. elegans*. *Trait rouge* : médiane ; *Barre bleue* : quartile supérieur et inférieur ; *Trait noir* : pivot supérieur et inférieur (écart interquartile maximal de 1,5) ; + : valeur extérieure.



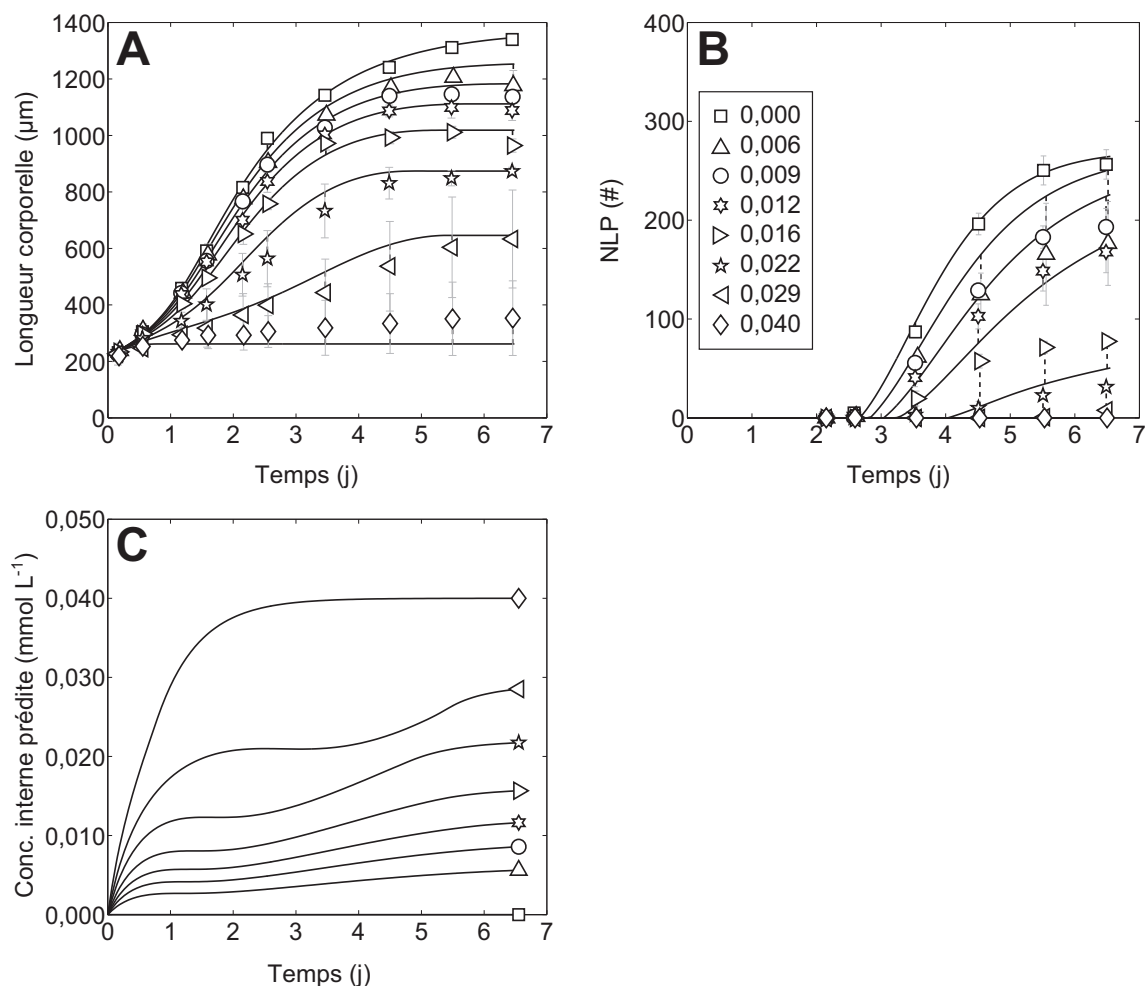
**FIGURE S.11** Corrélation entre la longueur à la puberté ( $L_p$ ) et la longueur maximale ( $L_m$ ) de *C. elegans*. Les longueurs sont en  $\mu\text{m}$ .  $\square$  : contrôles ;  $\circ$  : U seul ;  $\bullet$  : Cd seul ;  $\diamond$  : mélanges U/Cd.



**FIGURE S.12** Exemple de l'estimation des intervalles de confiance de paramètres DEBtox ajustés par la méthode du profil de vraisemblance.  $\circ$  : valeur optimale du paramètre ; *Courbe noire* : profil de vraisemblance ; *Tirets rouges* : seuil de significativité à 95 % ; La section du seuil de significativité avec la courbe du profil identifie les bornes de l'intervalle de confiance du paramètre. Les ajustements ont été réalisés sur les données d'exposition à l'U et au Cd seuls, sur la base des concentrations dans la gélose et pour  $t \leq 6,5j$ .  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $L\text{mmol}^{-1}$ ) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $\text{mmolL}^{-1}$ ).



**FIGURE S.13** Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle (**A**) et du nombre de larves produites (NLP) (**B**) des nématodes exposés à l'U au cours du temps (j après éclosion), sur la base des concentrations dans la gélose (mmol<sub>U</sub>L<sup>-1</sup>). □ [...] ◇ : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n = 3$ )  $\pm$  erreur type ; *Trait plein* : prédictions du modèle ; *Tirets* : écart entre les deux. **C** : concentrations internes (pondérées par le facteur de bioaccumulation, *i.e.* exprimées en mmolL<sup>-1</sup>) prédites par le modèle pour les différentes concentrations d'exposition à l'U.



**FIGURE S.14** Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle (A) et du nombre de larves produites (NLP) (B) des nématodes exposés au Cd au cours du temps (j après éclosion), sur la base des concentrations dans la gélose ( $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ ). □ [...] ◇ : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n = 3$ )  $\pm$  erreur type; *Trait plein* : prédictions du modèle; *Tirets* : écart entre les deux. C : concentrations internes (pondérées par le facteur de bioaccumulation, *i.e.* exprimées en  $\text{mmol L}^{-1}$ ) prédites par le modèle pour les différentes concentrations d'exposition au Cd.

**Tableau S.6** Réestimation des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd à partir de l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange), selon les modes d'action combinés « réduction de l'assimilation de nourriture » / « effet direct sur la réserve de spermatozoïdes », et/ou avec la prise en compte de l'effet sur la longueur à la puberté de manière descriptive.<sup>a</sup>

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>CI<sub>95</sub>(E)</b>
			(MoA <sub>2</sub> )	(L <sub>p</sub> )	(MoA <sub>2</sub> /L <sub>p</sub> )	
$\ell_U$	-27487	-27361	-27315	-27075	-26943	
$k_{eU}$	1,94	1,46	1,44	1,47	2,26	2,11 : 2,56
$b_{TU}$	0,014	0,015	0,015	0,013	0,013	0,013 : 0,014
$c_{0U}$	16,18	15,52	16,08	13,30	16,52 <sup>b</sup>	16,00 : 17,00
$\ell_{Cd}$	-27138	-27052	-26882	-27343	-26635	
$k_{eCd}$	0,95	0,86	0,94	0,93	0,27	0,24 : 0,28
$b_{TCd}$	0,054	0,050	0,052	0,051	0,093	0,088 : 0,097
$c_{0Cd}$	0,48	$1 \times 10^{-5}$	0,39	$3 \times 10^{-5}$	0,002 <sup>c</sup>	0,000 : 0,019

a. Ajustements réalisés sur la base des concentrations en U ou Cd dans le tapis bactérien. CI<sub>95</sub> : intervalles de confiance 95 % ;  $\ell_i$  : maximum de log-vraisemblance obtenu pour  $i$  ;  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $\text{mg}_{\text{dw}} \text{nmol}^{-1}$ ) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). Le meilleur ajustement est souligné.

**A** : paramètres TK/TD obtenus pour  $t \leq 6,5\text{j}$  non réajustés.

**B** : paramètres **A** réajustés pour  $t \leq 10,8\text{j}$  sans modification du modèle.

**C** : paramètres **A** réajustés pour  $t \leq 10,8\text{j}$  en ajoutant au modèle le mode d'action supplémentaire : « effet direct sur la réserve de spermatozoïdes » (MoA<sub>2</sub>).

**D** : paramètres **A** réajustés pour  $t \leq 10,8\text{j}$  en ajoutant au modèle une relation descriptive prenant en compte l'effet des ETM sur la longueur à la puberté (L<sub>p</sub>).

**E** : paramètres **A** réajustés pour  $t \leq 10,8\text{j}$  en ajoutant au modèle les deux modifications précédentes.

b. La correspondance en concentration dans la gélose ne peut pas être rétablie avec précision car  $c_{0U}$  est inférieure à la borne inférieure de l'intervalle à partir duquel est construit la relation entre la concentration d'U dans le tapis bactérien et celle dans la gélose (Fig. 6.1, A, p. 117).

c. Correspondance en concentration dans la gélose :  $6 \times 10^{-6}$  [ $0; 6 \times 10^{-5}$ ]  $\text{mmol}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ .

**Tableau S.7** Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et du paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans le tapis bactérien. <sup>a</sup>

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
			$(ak_{eU})$	$(ak_{eCd})$	$(ab_{TU})$	$(ab_{TCd})$	$(ac_{0U})$	$(ac_{0Cd})$
$\ell$	-58 884	-58 342	-58 159	-58 218	<u>-58 123</u>	-58 156	-58 179	-58 257
$k_{eU}$	1,94	2,05	2,29	2,29	2,06	2,10	1,96	2,10
$b_{TU}$	0,014	0,013	0,013	0,012	0,014	0,012	0,013	0,013
$c_{0U}$	16,18	15,85	16,22	15,41	16,46	14,61	14,83	15,12
$k_{eCd}$	0,95	0,95	0,94	0,95	0,97	0,94	0,93	0,92
$b_{TCd}$	0,054	0,047	0,046	0,050	0,044	0,052	0,046	0,048
$c_{0Cd}$	0,48	0,30	0,07	0,30	0,03	0,39	0,02	0,15
$a$	-	-	0,78*	0,62*	<u>0,93*</u>	0,61*	1,13*	4,01*

<sup>a</sup>. L'ajustement est réalisé à partir du mode d'action DEBtox « réduction de l'assimilation de nourriture » pour l'U et le Cd et selon l'additivité  $RA_{Dt}$  pour  $t \leq 6,5j$ .  $\ell$  : maximum de log-vraisemblance ;  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $mg_{dw} nmol^{-1}$ ) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $nmol mg_{dw}^{-1}$ ) ;  $a$  : paramètre d'interaction affectant l'un des paramètres précédents (u.a.). Le meilleur ajustement est souligné ; \* : indique que l'ajout de  $a$  améliore significativement l'ajustement des données ( $p[\chi^2] < 0,05$ ).

**A** : paramètres TK/TD non réajustés.

**B** : paramètres TK/TD réajustés sur l'ensemble des données (ETM seuls et en mélange).

**C-D** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $k_{eU}$  ou  $k_{eCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**E-F** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $b_{TU}$  ou  $b_{TCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**G-H** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $c_{0U}$  ou  $c_{0Cd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.



**Tableau S.8** Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et du paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans le tapis bactérien et en utilisant le modèle le plus complexe, avec  $t \leq 10,8j$ .<sup>a</sup>

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
			( $ak_{eU}$ )	( $ak_{eCd}$ )	( $ab_{TU}$ )	( $ab_{TCd}$ )	( $ac_{0U}$ )	( $ac_{0Cd}$ )
$\ell$	-98337	-96969	-96854	<u>-96494</u>	-96756	<u>-96486</u>	-96920	-96898
$k_{eU}$	2,26	2,08	2,74	2,43	2,32	2,14	2,16	2,19
$b_{TU}$	0,013	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,011
$c_{0U}$	16,52	14,65	13,74	12,36	14,59	11,82	13,26	12,92
$k_{eCd}$	0,27	0,24	0,29	0,20	0,26	0,22	0,22	0,28
$b_{TCd}$	0,093	0,091	0,082	0,111	0,088	0,105	0,097	0,084
$c_{0Cd}$	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
$a$	-	-	0,60*	<u>0,61*</u>	0,89*	<u>0,69*</u>	1,08*	66,56*

a. L'ajustement est réalisé à partir des modes d'action combinés « réduction de l'assimilation de nourriture » et « effet direct sur la réserve de spermatozoïdes » pour l'U et le Cd et avec un module descriptif des effets sur la longueur à la puberté, selon l'additivité  $RA_{Dt}$ .  $\ell$  : maximum de log-vraisemblance obtenu ;  $k_{e_i}$  : taux d'élimination de  $i$  ( $j^{-1}$ ) ;  $b_{T_i}$  : pente de la fonction de stress de  $i$  ( $mg_{dw} nmol^{-1}$ ) ;  $c_{0_i}$  : concentration sans effet de  $i$  ( $nmol mg_{dw}^{-1}$ ) ;  $a$  : paramètre d'interaction affectant l'un des paramètres précédents (u.a.). Le meilleur ajustement est souligné ; \* : indique que l'ajout de  $a$  améliore significativement l'ajustement des données ( $p [\chi^2] < 0,05$ ).

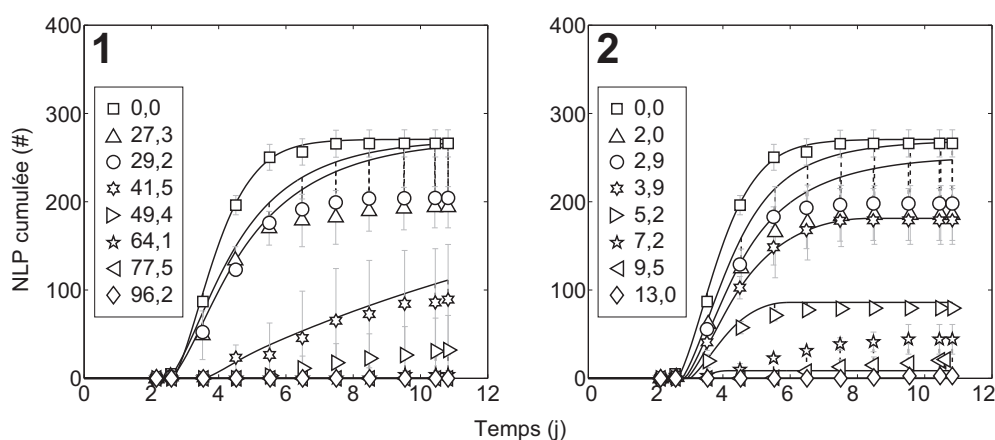
**A** : paramètres TK/TD non réajustés.

**B** : paramètres TK/TD réajustés sur l'ensemble des données (ETM seuls et en mélange).

**C-D** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $k_{eU}$  ou  $k_{eCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**E-F** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $b_{TU}$  ou  $b_{TCd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.

**G-H** : paramètres **B** réajustés avec l'ajustement du paramètre  $a$  affectant  $c_{0U}$  ou  $c_{0Cd}$ , respectivement, pour les conditions d'exposition aux mélanges.



**FIGURE S.15** Ajustements du nombre de larves produites (NLP) des nématodes exposés à l'U **(1)** ou au Cd **(2)** à partir du mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » non combiné avec un mode d'action à effet direct sur la réserve de spermatozoïdes et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol}_U \text{mg}_{dw}^{-1}$ ).  $\square$  [...]  $\diamond$  : données moyennées pour les différentes concentrations indiquées ( $n = 3$ )  $\pm$  erreur type ; *Trait plein* : prédictions du modèle ; *Tirets* : écart entre les deux.

**Tableau S.9** Comparaison des ajustements des données d'augmentation de longueur corporelle maximale et du nombre de larves produites total de nématodes exposés à l'U et/ou au Cd à partir de l'addition des réponses (RA) du modèle MixTox modifié et sur la base des concentrations dans la gélose.<sup>a</sup>

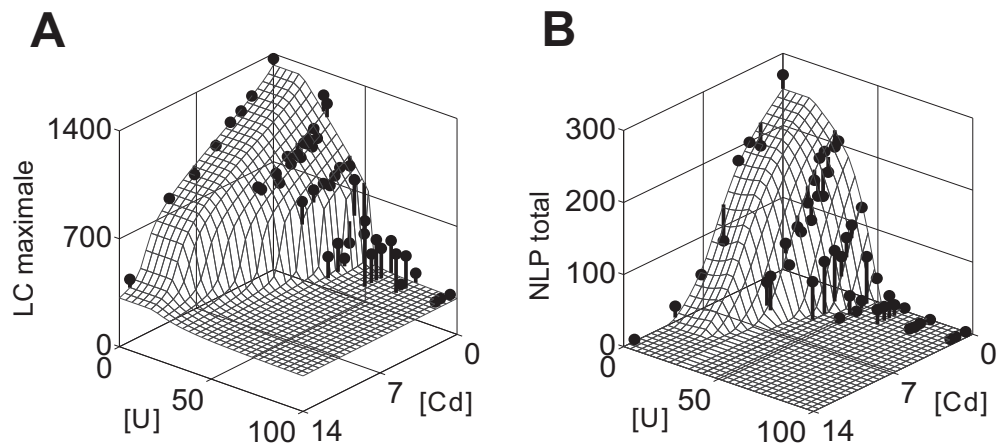
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
			$(aC_{eU})$	$(aC_{eCd})$
<b>ALC</b>	RSS ( $10^6$ )	3,53	<u>3,32</u>	3,41
<b>maximale</b>	<i>a</i>		0,96	0,65
<b>NLP</b>	RSS ( $10^5$ )	1,48	1,47	<u>1,41</u>
<b>total</b>	<i>a</i>		0,99	0,76

*a.* Le modèle MixTox a été adapté afin de permettre l'ajustement d'un paramètre d'interaction ( $a$ , u.a.) affectant les concentrations d'exposition des nématodes à l'U ou au Cd ( $C_{e_i}$ ), à la place des fonctions d'interaction descriptives (interaction synergie/antagonisme simple, etc.). *RSS* : Somme des carrés des résidus.

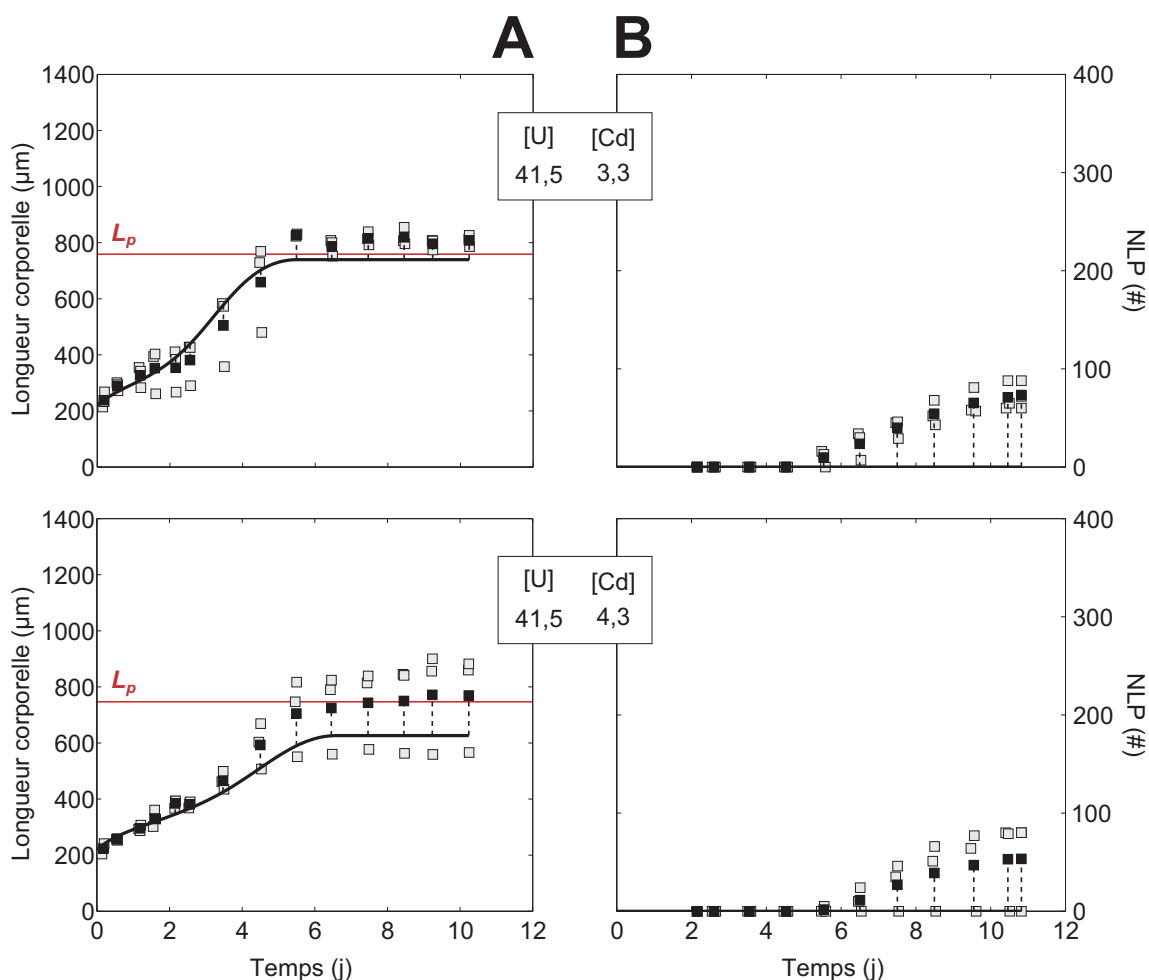
**A** : Ajustement du modèle d'additivité RA sans interaction.

**B** : Ajustement du modèle d'additivité RA avec  $a$  affectant  $C_{eU}$ .

**C** : Ajustement du modèle d'additivité RA avec  $a$  affectant  $C_{eCd}$ .



**FIGURE S.16** Surfaces de réponse prédites par le modèle DEBtox pour la longueur corporelle (LC) maximale ( $\mu\text{m}$ , **A**) et le nombre de larves produites (NLP) total (**B**), où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentration dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). ● : données expérimentales moyennées ( $n \geq 3$ ) ; Grille : valeurs modélisées ; Barres verticales : distance entre les deux.



**FIGURE S.17** Exemples de prédictions du modèle DEBtox pour les données de longueur corporelle ( $\mu\text{m}$ , **A**) et du nombre de larves produites (NLP, **B**) au cours du temps ( $t \leq 10,8\text{j}$  après éclosion), où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien ( $\text{nmol mg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). ■ : données moyennées ( $n = 3$ ); □ : données individuelles; *Trait plein noir* : prédiction du modèle; *Tirets noir* : écart entre données moyennées et prédictions; *Trait plein rouge* : longueur à la puberté ( $L_p$ ) estimée en fonction des concentrations d'exposition à l'U et au Cd.



# Communications scientifiques et formations suivies

## Articles

- Margerit, A., Lecomte-Pradines, C., Svendsen, C., Frelon, S., Gomez, E. et Gilbin, R., 2014. Nested interactions in the combined toxicity of uranium and cadmium to the nematode *C. elegans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 118, pp. 139–148.
- Energy-based modeling of uranium and cadmium joint toxicity to *Caenorhabditis elegans* using DEBtox. En prép.

## Communications lors de congrès ou ateliers (nationaux et internationaux)

- STAR final meeting. Juin 2015. Aix-en-Provence, France.  
Poster : Margerit, A., Gomez, E., Gilbin, R. An energy-based modeling of the uranium and cadmium sublethal mixture toxicity to *C. elegans* using DEBtox.
- SETAC North America 35<sup>th</sup> Annual Meeting. Novembre 2014. Vancouver, Canada.  
Présentation orale : Margerit, A., Lecomte-Pradines, C., Svendsen, C., Frelon, S., Gomez, E., Gilbin, R. Combined effect of uranium and cadmium on physiological parameters of the nematode *C. elegans*.
- ICRER 3<sup>rd</sup> International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity. Septembre 2014. Barcelone, Espagne.  
Poster : Margerit, A., Lecomte-Pradines, C., Svendsen, C., Frelon, S., Gomez, E., Gilbin, R. Nested interactions in the uranium and cadmium combined toxicity to the nematode *C. elegans*.
- STrategy for Allied Radioecology meeting (WP4). Avril 2014. Stockholm, Suède.  
Présentation orale : Margerit, A., Lecomte-Pradines, C., Svendsen, C., Frelon, S., Gomez, E., Gilbin, R. Predictive ecotoxicology as a tool to assess risks of radionuclides on non-human biota in a multi-contamination context. Modelling U/Cd mixture effects on *C. elegans* with DEBtox ?
- Séminaire ToxNuc. Septembre 2013. Paris, France.  
Présentation orale : Margerit, A., Lecomte-Pradines, C., Svendsen, C., Frelon, S., Gomez, E., Gilbin, R. Étude expérimentale et modélisation des effets combinés de

---

l'uranium et du cadmium, en mélange, sur la croissance et la fécondité du nématode *C. elegans*.

- Journées des thèses de l'IRSN. Septembre 2012. Le Croisic, France.  
Poster : Margerit, A., Gomez, E., Gilbin, R. Évaluation des effets de mélanges de contaminants stables et radioactifs sur le nématode *C. elegans* à l'aide d'outils d'écotoxicologie prédictive.

## Formation suivies

- ECSplcité : Language training by phone (English) (20 h). 2013. Formation à distance.
- Belimed : Habilitation à la conduite d'autoclave (7 h). 2013. Cadarache, France.
- CNRS/Université Paul Cézanne Aix-Marseille : Journées d'analyse statistique des données sur R (9 h). 2012. Aix-en-Provence, France.
- Université de Copenhague : Dynamic Modelling of Toxic Effects (120 h). 2012. Copenhague, Danemark.
- Center for Ecology and Hydrology : Concepts of mixture toxicity - Deviations from CA & IA (8 h). 2012. Formation à distance.
- IRSN : Formation initiale à la Radioprotection, Hygiène - Sécurité - Environnement (26 h). 2012. Cadarache, France.





# Liste des figures

1.1	Exemple d'un modèle de courbe dose-réponse logistique à 3 paramètres ajusté sur des données expérimentales . . . . .	13
1.2	Exemple de surface de réponse pour le mélange des substances A et B . . . .	14
1.3	Exemple d'isobole 50 % d'effet pour un mélange arbitraire de deux substances	15
1.4	Exemple d'isobole 50 % d'un mélange de substances A et B où les effets observés sont supérieurs à ceux attendus (synergie) . . . . .	16
1.5	Exemple d'interprétations contrastées possibles des effets d'un mélange binaire sur la base des modèles additifs de référence : l'addition des concentrations (CA) et l'addition des réponses (RA) . . . . .	19
1.6	Exemples de plans expérimentaux pour l'étude de la toxicité de mélanges binaires . . . . .	23
1.7	Schématisation des flux d'énergie considérés dans le modèle DEB standard et modes d'actions du modèle DEBtox simplifié . . . . .	26
1.8	Schématisation de l'implémentation des effets combinés de deux substances à travers le modèle DEBtox simplifié . . . . .	31
1.9	Cycle de vie de <i>C. elegans</i> . . . . .	35
1.10	Schématisation des liens entre la présence d'une substance toxique dans une matrice environnementale et la fraction toxique internalisée par un organisme	46
1.11	Mécanisme de réaction en chaîne radicalaire de la peroxydation des acides gras insaturés . . . . .	51
1.12	Schématisation des flux de Cd dans les entérocytes . . . . .	57
2.1	Schématisation de la démarche d'étude des effets du mélange U/Cd sur <i>C. elegans</i> . . . . .	70
3.1	Montage permettant de visualiser et de photographier les nématodes . . . .	78

3.2	Observation de nématodes et détail d'une mesure de la longueur corporelle à partir d'une photographie . . . . .	79
3.3	Phase d'incubation de l'acide nitrique avec reflux durant la minéralisation . . . . .	80
4.1	Plan expérimental factoriel partiel utilisé dans le cadre de l'étude des effets d'une exposition chronique de <i>C. elegans</i> au mélange U/Cd . . . . .	95
4.2	Relations entre les concentrations nominales et mesurées dans la gélose pour l'U et le Cd . . . . .	96
4.3	Courbes dose-réponse de l'U et du Cd sur l'augmentation de longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations nominales dans la gélose . . . . .	97
4.4	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle maximale de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	101
4.5	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	102
4.6	Observation expérimentale de l'interaction antagoniste entre l'U et le Cd au niveau de leurs effets combinés sur la longueur corporelle de <i>C. elegans</i> . . . . .	103
5.1	Dispositif de sonication des échantillons de larves L1 <i>C. elegans</i> . . . . .	109
5.2	Internalisation cellulaire de l'U chez des larves L1 <i>C. elegans</i> exposées à l'U, en présence ou en absence de Cd . . . . .	110
5.3	Internalisation cellulaire du Cd chez des larves L1 <i>C. elegans</i> exposées au Cd, en présence ou en absence d'U . . . . .	111
6.1	Transfert gélose-tapis bactérien de l'U et du Cd . . . . .	117
7.1	Courbes dose-réponse de l'U et du Cd sur l'augmentation de longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	128

7.2	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle maximale de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	132
7.3	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	133
7.4	Comparaison des effets U/Cd combinés observés et prédits sur la base de l'additivité CA et RA (%), pour l'augmentation de longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, à partir des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien . . . . .	134
8.1	Ajustement du modèle d'addition des réponses sans interaction pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur la longueur à la puberté de <i>C. elegans</i>	146
8.2	Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites au cours du temps des nématodes non exposés . . . . .	147
8.3	Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites des nématodes exposés à l'U au cours du temps, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	151
8.4	Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites des nématodes exposés au Cd au cours du temps, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	152
8.5	Surfaces de réponse prédites pour la longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total à partir de différents jeux de paramètres DEBtox sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	157
8.6	[début] . . . . .	164
8.6	[fin] Prédications du modèle DEBtox pour les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites au cours du temps, où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	165
9.1	Schéma de synthèse des résultats de l'étude des effets combinés de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de <i>C. elegans</i> . . . . .	171

S.1	Plan expérimental simplifié utilisé dans le cadre de l'étude des effets du mélange irradiation- $\gamma$ /Cd sur <i>C. elegans</i> . . . . .	217
S.2	Effets combinés du Cd et de l'irradiation- $\gamma$ sur la croissance et la reproduction de <i>C. elegans</i> . . . . .	218
S.3	Analyse statistique classique des données d'augmentation de longueur corporelle maximale et du nombre de larves produites total chez les individus <i>C. elegans</i> exposés à l'U ou au Cd durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	225
S.4	Relations entre les concentrations nominales et mesurées dans la gélose pour l'U et le Cd . . . . .	228
S.5	Évolution de la pente <i>b</i> des courbes dose-réponse de l'U et du Cd au cours du temps pour l'augmentation de la longueur corporelle et le nombre de larves produites de <i>C. elegans</i> , sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	232
S.6	Évolution de l'EC <sub>50</sub> des courbes dose-réponse de l'U et du Cd au cours du temps pour l'augmentation de la longueur corporelle et le nombre de larves produites de <i>C. elegans</i> , sur la base des concentrations dans le tapis bactérien	233
S.7	Exemple de cinétiques de croissance et de reproduction tardives chez des nématodes <i>C. elegans</i> exposés à des concentrations modérées à fortes d'U, seules ou en présence de concentrations modérées à faibles de Cd . . . . .	234
S.8	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur l'augmentation de la longueur corporelle maximale de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose . . . . .	239
S.9	Représentation des modèles significatifs les plus parcimonieux pour décrire les effets combinés de l'U et du Cd sur le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose . . . . .	240
S.10	Représentation en boîte à moustache des données d'effet de l'U sur le volume des œufs de <i>C. elegans</i> . . . . .	242

---

S.11	Corrélation entre la longueur à la puberté et la longueur maximale de <i>C. elegans</i> . . . . .	242
S.12	Exemple de l'estimation des intervalles de confiance de paramètres DEBtox ajustés par la méthode du profil de vraisemblance . . . . .	243
S.13	Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites des nématodes exposés à l'U au cours du temps, sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	244
S.14	Modèle DEBtox ajusté sur les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites des nématodes exposés au Cd au cours du temps, sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	245
S.15	Ajustements du nombre de larves produites (NLP) des nématodes exposés à l'U ou au Cd à partir du mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » non combiné avec un mode d'action à effet direct sur la réserve de spermatozoïdes et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien .	249
S.16	Surfaces de réponse prédites par le modèle DEBtox pour la longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total, où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	250
S.17	Exemples de prédictions du modèle DEBtox pour les données de longueur corporelle et du nombre de larves produites au cours du temps, où tous les paramètres (physiologiques et toxicocinétiques/toxicodynamiques) ont été réajustés sur l'ensemble des données (individus non exposés et exposés à l'U et/ou au Cd) et sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . .	251



# Liste des tableaux

1.1	Principales caractéristiques des rejets de substances chimiques et radioactives de plusieurs centrales nucléaires françaises . . . . .	7
1.2	Classification scientifique du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .	33
1.3	Exemples de concentrations d'U et de Cd pouvant se retrouver en mélange dans des matrices issues de sites contaminés . . . . .	63
3.1	Composition des milieux NGM, M9 et S-base modifiés, utilisés pour la culture, la préparation et l'exposition de <i>C. elegans</i> . . . . .	75
3.2	Préparation de la solution pour synchronisation de <i>C. elegans</i> par « bleaching »	76
3.3	Table d'interprétation des paramètres du modèle MixTox . . . . .	84
3.4	Les différents paramètres du modèle DEBtox simplifié utilisé au cours de ce projet . . . . .	88
4.1	Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle maximale et le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations nominales ou mesurées dans la gélose	99
6.1	Résumé de la modélisation de la spéciation de l'U dans la gélose, en présence ou en absence de Cd . . . . .	118
6.2	Résumé de la modélisation de la spéciation du Cd dans la gélose, en présence ou en absence d'U . . . . .	119
7.1	Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle et le nombre de larves produites de <i>C. elegans</i> pour différents temps d'exposition après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	131



8.1	Ajustement des paramètres physiologiques du modèle DEBtox simplifié à partir des données de croissance et de reproduction des nématodes non exposés	147
8.2	Bilan des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques pour les modes d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » et « augmentation des coûts de maintenance somatique et de maturité » du modèle DEBtox sur les données d'exposition à l'U et au Cd seuls, sur la base des concentrations dans la gélose ou le tapis bactérien . . . . .	148
8.3	Estimation des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd selon le mode d'action « réduction de l'assimilation de nourriture » du modèle DEBtox avec $t \leq 6,5j$ . . . . .	149
8.4	Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et d'un paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans la gélose . . . . .	154
9.1	Récapitulatif des valeurs de toxicité de l'U et du Cd sur la croissance et la reproduction de <i>C. elegans</i> sur la base des concentrations dans la gélose et dans le tapis bactérien . . . . .	172
S.1	Estimation des paramètres pour les modèles MixTox significatifs les plus parcimonieux, obtenus pour l'augmentation de longueur maximale et pour le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations en U et Cd dans la gélose . . . . .	224
S.2	Temps de mesure de la longueur corporelle et de comptage du nombre de larves produites par les nématodes durant leur exposition à l'U et au Cd . . .	230
S.3	Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle et le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	230
S.4	Estimation des paramètres pour les modèles MixTox significatifs les plus parcimonieux, obtenus pour l'augmentation de longueur maximale et pour le nombre de larves produites total de <i>C. elegans</i> exposés durant 11 j après éclosion, sur la base des concentrations en U et Cd dans le tapis bactérien . .	231

---

S.5	Résultats des ajustements des modèles MixTox sur les données de toxicité du mélange U/Cd sur l'augmentation de longueur corporelle et le nombre de larves produites de <i>C. elegans</i> pour différents temps d'exposition après éclosion, sur la base des concentrations dans le tapis bactérien estimées directement à partir des concentrations mesurées dans la gélose . . . . .	238
S.6	Réestimation des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd à partir de l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange), selon les modes d'action combinés « réduction de l'assimilation de nourriture » / « effet direct sur la réserve de spermatozoïdes », et/ou avec la prise en compte de l'effet sur la longueur à la puberté de manière descriptive	246
S.7	Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et d'un paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans le tapis bactérien . . . . .	247
S.8	Comparaison des ajustements des paramètres toxicocinétiques/toxicodynamiques de l'U et du Cd et d'un paramètre d'interaction sur l'ensemble des données (exposition aux ETM seuls et en mélange) à partir des concentrations dans le tapis bactérien et en utilisant le modèle le plus complexe, avec $t \leq 10,8j$ . . . . .	248
S.9	Comparaison des ajustements des données d'augmentation de longueur corporelle maximale et du nombre de larves produites total de nématodes exposés à l'U et/ou au Cd à partir de l'addition des réponses du modèle MixTox modifié et sur la base des concentrations dans la gélose . . . . .	249



# Glossaire

---

## A

---

- ABC** *ATP-Binding Cassette superfamily*. Superfamille de protéines intervenant dans le transport transmembranaire de diverses substances.
- ALC** Augmentation de Longueur Corporelle. Correspond à l'accroissement de longueur corporelle d'un nématode (de l'orifice du pharynx à la queue) depuis l'éclosion. Dans la présente étude, la longueur initiale a été estimée à 220 µm.
- Antagonisme** Toxicité observée d'un mélange de contaminants inférieure à la toxicité prédite pour ce mélange à partir de la toxicité des contaminants seuls, au moyen de l'additivité CA ou RA.
- ASTM** *American Society for Testing and Materials*. Société américaine publiant des protocoles standardisés pour différents domaines dont l'écotoxicologie.

---

## B

---

- BAF** *BioAccumulation Factor*. Le facteur de bioaccumulation est le rapport entre la concentration d'un contaminant dans un organisme et la concentration du même contaminant dans la matrice environnementale d'exposition.
- BCF** *BioConcentration Factor*. Le facteur de bioconcentration est similaire au BAF mais concerne les milieux aquatiques.

<b>Bioaccumulation</b>	Processus par lequel les organismes absorbent et concentrent les substances chimiques présentes dans l'environnement.
<b>Biodisponibilité</b>	Fraction d'une substance chimique présente dans une matrice environnementale qui est potentiellement absorbable par un organisme.
<b>Biomagnification</b>	Phénomène par lequel la concentration d'un contaminant dans les organismes est amplifiée le long des chaînes trophiques.
<b>BLM</b>	<i>Biotic Ligand Model</i> . Modèles utilisés pour décrire la biodisponibilité et l'affinité de différentes espèces chimiques pour un ligand biotique. Ils reposent sur l'utilisation de données de calculs de spéciations chimiques (générées par d'autres modèles) et sur des données expérimentales de bioaccumulation ou de toxicité sur un organisme biologique.

---

C

---

<b>CA<sub>Dt</sub></b>	Modèle d'additivité CA appliqué à la modélisation DEBtox des effets de mélanges de contaminants.
<b>CI<sub>95</sub></b>	<i>95 % Confidence Interval</i> . Intervalle de confiance 95 % associé à un paramètre estimé.
<b><i>C. elegans</i></b>	<i>Caenorhabditis elegans</i> . Nématode.
<b>CA</b>	<i>Concentration Addition</i> . Addition des concentrations, un des modèles d'additivité de référence pour estimer l'effet combiné de contaminants qui n'interagissent pas.
<b>Caractérisation du risque</b>	Étape de l'évaluation des risques qui intègre les profils d'exposition et les réponses biologiques pour évaluer la probabilité de survenue d'un effet néfaste suite à une exposition aux contaminants.
<b>CGC</b>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center.
<b>CYP</b>	Cytochrome P450. Enzyme impliquée dans les processus de détoxication.

---

**D**

---

<b>dauer</b>	Larves de résistance <i>dauer</i> du nématode <i>C. elegans</i> .
<b>DCE</b>	Directive Cadre sur l'Eau. Directive européenne visant à assurer le bon état écologique des milieux aquatiques.
<b>DEB</b>	<i>Dynamic Energy Budget</i> . Théorie du budget énergétique dynamique établie par S. A. L. M. Kooijman (2010).
<b>DEBtox</b>	Modèle TKTD mécaniste pour l'écotoxicologie, basé sur la théorie DEB. Il a été mis au point par Kooijman <i>et</i> Bedaux (1996) et corrigé par la suite par Billoir <i>et al.</i> (2008b) et Jager <i>et</i> Zimmer (2012).
<b>Descriptif (modèle)</b>	Modèles mathématiques utilisés pour représenter le lien entre une variable mesurée ( <i>e.g.</i> la longueur d'un organisme) et une ou plusieurs variables explicatives ( <i>e.g.</i> une concentration d'exposition à un contaminant).
<b>DL</b>	Un des modèles de déviation des additivités de référence de l'outil MixTox pour décrire une interaction dont la nature ( <i>i.e.</i> synergie ou antagonisme) et/ou l'amplitude serait dépendante du niveau de dose du mélange.
<b>DMT</b>	<i>Divalent Metal Transporter</i> . Transporteur membranaire assurant le transport de métaux bivalents.
<b>DR</b>	Un des modèles de déviation des additivités de référence de l'outil MixTox pour décrire une interaction dont la nature ( <i>i.e.</i> synergie ou antagonisme) et/ou l'amplitude serait dépendante du ratio des substances en mélange.
<b>dw</b>	<i>dry weight</i> . Poids sec.

---

**E**

---

<b>EC<sub>x</sub></b>	<i>Effective Concentration x %</i> . Concentration d'un contaminant produisant un effet de <i>x %</i> sur un critère d'effet considéré.
-----------------------	---

***E. coli*** *Escherichia coli*. Bactérie.

***e.g.*** *exempli gratia*.

**ETM** Élément trace métallique.

**Évaluation des risques** Approche structurée qui a pour objectif de décrire et d'estimer la probabilité d'effets indésirables sur un écosystème suite à une exposition de celui-ci à un ou plusieurs contaminants.

---

**F**

**FA** Acide fluviqque.

---

**G**

**GSH** Glutathion. Tripeptide impliqué dans la régulation du stress oxydatif.

---

**H**

**HMT** *Heavy Metal Tolerance factor*. Protéines de la superfamille ABC intervenant dans l'efflux extracellulaire de métaux.

**Hormèse** Stimulation d'une réponse biologique (*e.g.* la croissance) par effet d'une faible dose d'un agent générateur de stress à forte dose (*e.g.* un composé chimique toxique).

---

**I**

***i.e.*** *id est*.

**IAEA** *International Atomic Energy Agency*. Organisation internationale sous l'égide de l'ONU et visant à promouvoir « les technologies nucléaires fiables et sûres », hors du domaine d'application militaire.

---

<b>INERIS</b>	Institut National de l'Environnement industriel et des RISques. Établissement public à caractère industriel et commercial français visant à évaluer et prévenir les risques aiguës ou chroniques liés aux installations industrielles et aux substances chimiques.
<b>IRSN</b>	Institut Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Établissement public à caractère industriel et commercial français visant à évaluer et prévenir les risques aiguës ou chroniques, nucléaires et radiologiques.
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> . Organisation internationale publiant des protocoles standardisés pour différents domaines dont l'écotoxicologie.

---

**L**

---

<b>LC<sub>x</sub></b>	<i>Lethal Concentration x %</i> . Concentration d'un contaminant produisant la mort de $x$ % des individus qui $y$ sont exposés.
<b>LOQ</b>	<i>Limit of Quantification</i> . Limite de quantification pour une méthode de dosage. Pour cette étude, la LOQ a été calculée en multipliant par 10 la valeur du bruit de fond obtenue dans les blancs de dosage.
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide.
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth medium</i> . Milieu de culture nutritif utilisé pour la culture bactérienne.

---

**M**

---

<b>MixTox</b>	Modèle descriptif de surface de réponse non linéaire. Il a été mis au point par <a href="#">Jonker et al. (2005)</a> pour l'analyse des effets combinés de substances en mélange sur la base des additivités CA et RA. Il propose différents modèles d'interaction simple (synergie/antagonisme) ou complexe (interaction dépendante des ratios de concentration des substances en mélange ou du niveau de dose du mélange).
---------------	--



<b>MoA</b>	<i>Mode of Action</i> . Mode d'action d'un contaminant chez un organisme qui y est exposé. Ensemble de signes physiologiques et comportementaux caractérisant l'intoxication.
<b>MT</b>	Métallothionéine. Protéines riches en Cystéines jouant un rôle dans la détoxification cellulaire.
<b>MTP</b>	<i>Metal Transport Protein</i> . Protéines intervenant dans le transport de métaux.
<b>Mécaniste (modèle)</b>	Modèles mathématiques utilisés pour représenter de manière simplifiée des processus ( <i>e.g.</i> internalisation d'une substance par un organisme) qui sont supposés expliquer le lien entre une ou plusieurs variables mesurées ( <i>e.g.</i> la longueur d'un organisme) et une ou plusieurs variables explicatives ( <i>e.g.</i> une concentration d'exposition à un contaminant).

---

N

---

<b>N2</b>	Dénomination d'une souche sauvage de <i>C. elegans</i> dérivée d'une culture isolée à Bristol, UK.
<b>NEC</b>	<i>No-Effect Concentration</i> . Concentration sans effet sur un organisme estimée à partir de modèles TKTD ( <i>e.g.</i> DEBtox).
<b>NFCF</b>	<i>Nuclear Fuel Cycle Facility</i> . Industries du cycle du combustible nucléaire, de l'extraction du minerai à la gestion des déchets radioactifs.
<b>NGM</b>	<i>Nematode Growth Medium</i> . Milieu de croissance pour nématodes développé par <a href="#">Brenner (1974)</a> .
<b>NLP</b>	Nombre de Larves Produites. Correspond au nombre cumulé de larves produites par un nématode, depuis le début de sa reproduction.
<b>NOEC/L</b>	<i>No-Observed-Effect Concentration/Level</i> . Concentration (testée) la plus élevée pour laquelle aucun effet statistiquement signifi-

---

tif n'est observé sur un critère donné, chez un organisme d'étude, après une certaine période d'exposition.

**NQE(p)** Norme de Qualité Environnementale (provisoire). Valeurs réglementaires seuils (provisaires) pour les différentes substances listées dans la DCE.

---

**O**

---

**OECD** *Organisation for Economic Co-operation and Development*. Organisation internationale d'études économiques. Elle publie notamment des protocoles standardisés pour l'écotoxicologie.

---

**P**

---

**PAH** *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*. Hydrocarbure aromatique polycyclique. Groupe de composés organiques comportant plusieurs cycles benzéniques

**PC** Phytochélatine. Polypeptide  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  jouant un rôle important dans la chélation de métaux chez les plantes et certains invertébrés.

**PNEC** *Predicted No-Effect Concentration*. Concentration la plus élevée d'un contaminant n'engendrant aucun effet néfaste sur le biote d'un compartiment environnemental. Celle-ci est estimée à partir de données écotoxicologiques, aiguës et chroniques, réalisées sur des espèces représentatives de ce compartiment. Il s'agit d'une valeur de référence utilisée dans le cadre des démarches d'évaluation du risque écologique.

**PUFA** *Poly-Unsaturated Fatty Acid*. Acides gras comportant plusieurs doubles liaisons carbone-carbone.

---

**R**

---

<b>RA<sub>Dt</sub></b>	Modèle d'additivité RA appliqué à la modélisation DEBtox des effets de mélanges de contaminants.
<b>RA<sub>Mt</sub></b>	Modèle d'additivité RA appliqué à la modélisation MixTox des effets de mélanges de contaminants.
<b>RA</b>	<i>Response Addition</i> . Addition des réponses (ou action indépendante), un des modèles d'additivité de référence pour estimer l'effet combiné de contaminants qui n'interagissent pas.
<b>Radionucléide</b>	Isotope radioactif d'un atome.
<b>Radioélément</b>	Atome dont tous les isotopes sont radioactifs ( <i>e.g.</i> uranium).
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> . Règlement européen harmonisant les règles concernant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des produits chimiques.
<b>RH</b>	<i>Relative humidity rate</i> . Taux d'humidité relative exprimé en pourcentage.
<b>RI</b>	Rayon ionique.
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> . Les espèces réactives de l'oxygène correspondent aux formes chimiques de l'oxygène qui sont instables et fortement réactives vis-à-vis d'autres composés. En milieu biologique, elles sont responsables du stress oxydatif.
<b>RSS</b>	<i>Residual Sum of Square</i> . Somme des écarts au carré.

---

**S**

---

<b>S/A</b>	Modèle de déviation des additivités de référence de l'outil MixTox pour décrire une interaction simple et constante pour l'ensemble de la surface de réponse ( <i>i.e.</i> synergie ou antagonisme).
------------	--

---

<b>SLRT</b>	Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle. Technique d'analyse chimique élémentaire et de spéciation.
<b>Spéciation</b>	Ensemble des formes chimiques (formes ioniques libres, formes ioniques complexées, formes sous différents niveaux d'oxydation, etc.) sous lesquelles peut se retrouver un élément dans une matrice environnementale.
<b>STAR</b>	<i>S</i> trategy for Allied Radioecology. Réseau européen d'excellence en radioécologie (Hinton <i>et al.</i> , 2013, star-radioecology.org), financé par le septième programme cadre EC-EURATOM (Fission-2010-3.5.1-269672).
<b>Synergie</b>	Toxicité observée d'un mélange de contaminants supérieure à la toxicité prédite pour ce mélange à partir de la toxicité des contaminants seuls, au moyen de l'additivité CA ou RA.

---

**T**

---

<b>TD</b>	Phase toxicodynamique du mécanisme d'action d'un toxique sur un organisme. Celle-ci comprend les différents mécanismes d'interaction du toxique avec des cibles biologiques conduisant à un effet néfaste sur l'organisme.
<b>TK</b>	Phase toxicocinétique du mécanisme d'action d'un toxique sur un organisme. Celle-ci comprend les phases d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'excrétion du toxique.
<b>TKTD</b>	<i>Toxicokinetic-Toxicodynamic Models</i> . Modèles utilisés en écotoxicologie pour décrire la cinétique d'internalisation d'un contaminant et le développement des effets qui s'ensuit chez un organisme d'étude.
<b>TU</b>	<i>Toxic Unit</i> . L'unité toxique est une unité de mesure de la toxicité qui correspond à la concentration d'une substance divisée par une valeur représentative de son potentiel de toxicité ( <i>e.g.</i> son EC <sub>50</sub> ).

---

**U**

---

**u.a.** Unité arbitraire.

**UE** Union Européenne.

**UNSCEAR** *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*. Comité scientifique de l'ONU sur les conséquences des émissions radioactives.

**US-ATSDR** *United States Agency of Toxic Substances and Disease Registry*. Agence gouvernementale des États-Unis dont l'objectif est de minimiser les risques pour la santé humaine liés à une exposition aux produits chimiques.

---

**W**

---

**WP4** *Work Package 4*. Programme de travail du réseau STAR portant sur la radioprotection dans un contexte de pollutions multiples.

---

**Z**

---

**Z** Numéro atomique des éléments chimiques.



**Résumé.** L'uranium est un radioélément naturel, généralement retrouvé à l'état de traces, mais dont la concentration peut être significativement augmentée à proximité de certaines installations du cycle du combustible nucléaire ou de zones d'agriculture intensive. En raison de son association dans les minerais avec différents éléments traces métalliques tels que le cadmium, l'U est la plupart du temps présent en mélange avec d'autres contaminants dans l'environnement. L'étude de leurs effets combinés est indispensable afin de mieux appréhender le risque engendré par les contaminations métalliques multiples pour les écosystèmes. L'évaluation de la toxicité des mélanges et l'identification des interactions synergiques ou antagonistes sont généralement réalisées sur la base de modèles d'additivité de référence intégrés à des approches descriptives, purement statistiques et sans réelles considérations biologiques. Plus récemment, des modèles mécanistes ont été proposés en alternative afin de mieux rendre compte de la dynamique des processus biologiques et des mécanismes de toxicité des contaminants. Ceux-ci n'ont cependant été mis en pratique que dans un nombre limité de cas d'étude de la toxicité des mélanges. L'objectif de ce projet de thèse a été d'étudier les effets combinés chroniques de l'U et du Cd sur les traits de vie du nématode *Caenorhabditis elegans*, en utilisant en parallèle une approche descriptive (MixTox) et une approche mécaniste (DEBtox). Pour cela, une exposition des nématodes à différentes concentrations d'U et de Cd, seuls ou en mélange, a été réalisée durant onze jours. Une interaction antagoniste importante entre l'U et le Cd a été identifiée pour les critères d'effet de croissance et de reproduction, à partir des deux approches. L'étude du transfert de l'U et du Cd du milieu vers la nourriture ainsi que de leur bioaccumulation par *C. elegans* nous a permis de montrer que la coprésence d'U diminuait la fraction de Cd disponible pour l'exposition des nématodes. Afin de déceler la présence d'une éventuelle interaction au niveau des organismes, durant les phases toxicocinétique ou toxicodynamique, les données d'effet ont été réanalysées à partir des concentrations d'U et de Cd dans la nourriture, supposées plus proches des concentrations disponibles pour *C. elegans*. Des effets combinés globalement additifs, sans interaction notable, ont été mis en évidence pour l'U et le Cd même si des conclusions légèrement contrastées ont été obtenues à partir des approches descriptives et mécanistes. La présente étude permet d'illustrer la complexité de l'étude des effets des mélanges et de l'identification des interactions entre les substances. Malgré quelques difficultés d'application, l'approche mécaniste DEBtox semble particulièrement prometteuse pour décrire la toxicité de mélanges au cours du temps et tester d'éventuels mécanismes d'interaction. À terme, le perfectionnement des outils d'analyse des effets combinés des contaminants devrait permettre une meilleure prise en compte de la problématique des mélanges dans les démarches d'évaluation des risques.

**Mots-clefs :** Mélange binaire de métaux, Addition des concentrations, Additions des réponses, MixTox, DEBtox, Antagonisme

---

**Abstract.** Uranium is a natural radioactive trace element for which elevated concentrations can be found in the vicinity of some nuclear fuel cycle facilities or of intensive farming areas. Due its co-occurrence with different trace metals, such as cadmium, in geological ores, U is generally found associated with other contaminants in the environment. The study of their combined effects on ecosystems is of interest to better characterize such multi-metallic polluted sites. The mixture toxicity assessment and the identification of synergistic or antagonistic interaction are generally performed on the basis of additive reference models integrated to descriptive and purely statistical approaches with no real biological basis. Recently, mechanistic models were proposed to better account for the dynamics of biological and toxicological processes. However, such models have only been put into practice in a few number of mixture toxicity case studies. The aim of this PhD project was to assess the chronic U/Cd combined toxicity on the life history traits of the nematode *Caenorhabditis elegans* using both a descriptive (MixTox) and a mechanistic (DEBtox) approach. To do so, nematodes were exposed during eleven days to different U and Cd concentrations, alone or in mixture. A strong antagonistic interaction between U and Cd was identified for length increase and brood size endpoints on the basis of both approaches. From the study of the U and Cd media-to-food transfer and of the U and Cd bioaccumulation by *C. elegans*, we showed that the co-presence of U reduced the available Cd fraction for nematodes. To identify a possible interaction at organism level, occurring during the toxicokinetic or toxicodynamic steps, data were re-analyzed on the basis of U/Cd concentrations in food, assumed to be more closely related to available concentrations for *C. elegans*. Overall additive effects, without interaction, were identified between U and Cd, even if slightly contrasted conclusions were obtained on the basis of the descriptive and mechanistic approaches. The present study underlines the complexity of studying mixture toxicity and identifying chemical interactions. Despite some application problems, the mechanistic approach DEBtox is particularly promising to describe the toxicity of chemical mixtures over time and to test hypothetical interaction mechanisms. In the future, the improvement of tools to analyze the combined toxicity of contaminants would allow to better address the issue of mixtures in ecotoxicological risk assessment processes.

**Keywords:** Binary metal mixture, Concentration addition, Response addition, MixTox, DEBtox, Antagonism