



**HAL**  
open science

# Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactif

Benoit Goussen

► **To cite this version:**

Benoit Goussen. Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactif. Sciences agricoles. AgroParis-Tech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0079 . pastel-01012072

**HAL Id: pastel-01012072**

**<https://pastel.hal.science/pastel-01012072v1>**

Submitted on 25 Jun 2014

**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.



## Doctorat ParisTech

### THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de l'environnement

*présentée et soutenue publiquement par*

**Benoit GOUSSEN**

le 27 novembre 2013

## Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactif

Directeur de thèse : **Alexandre PERY**

Co-directeurs de thèse : **Rémy BEAUDOUIN & Jean-Marc BONZOM**

### Jury

<b>M. Simon GALAS,</b>	Professeur, Université de Montpellier I, Montpellier	Président du jury
<b>M. Laury GAUTHIER,</b>	MCU (HDR), Université Paul Sabatier - Toulouse III, Toulouse	Rapporteur
<b>Mme Jeanne GARRIC,</b>	Directrice de Recherche, IRSTEA, Villeurbanne	Rapporteur
<b>M. Samuel SOUBEYRAND,</b>	Chargé de Recherche, INRA, Avignon	Examineur
<b>M. Alexandre PERY,</b>	Directeur de Recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte	Examineur
<b>M. Jean-Marc BONZOM,</b>	Chercheur, IRSN, Cadarache	Examineur
<b>Mme Marie-Agnès COUTELLEC,</b>	Chargée de Recherche, INRA, Rennes	Membre invité
<b>M. Rémy BEAUDOUIN,</b>	Chargé de Recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte	Membre invité

**INERIS, Unité Modèles pour l'écotoxicologie et la toxicologie (METO)**

Avenue du parc Alata - BP 2 - 60550 Verneuil-en-Halatte (France)

**IRSN, PRP-ENV / SERIS / Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO)**

Cadarache (France)



---

## Remerciements

---

Je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à Alexandre Péry, Rémy Beaudouin et Jean-Marc Bonzom pour votre encadrement tout au long de ces trois années de thèse. Alexandre, merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir permis d'avancer en toute liberté et de m'avoir apporté ton soutien tant théorique que pratique ou moral. Merci à toi Rémy pour toute l'aide que tu m'as apporté avec « R » ou l'analyse de sensibilité et dans la découverte commune de « JAGS ». Merci Jean-Marc pour tes nombreux conseils en écotoxicologie, en rédaction, tes encouragements et l'autonomie que tu m'as laissée pour réaliser mes expériences. Merci à vous trois pour votre disponibilité, votre optimisme, votre bonne humeur et votre confiance qui m'ont permis de m'épanouir dans ce projet.

Je remercie sincèrement Rodolphe Gilbin, Christelle Adam-Guillermin, Jacqueline Garnier-Laplace ainsi qu'Alexandre Péry et Éric Thybaud pour m'avoir accueilli au sein de vos équipes et avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de ce doctorat. Merci à l'IRSN et à l'INERIS qui ont accepté de financer ce projet.

J'adresse mes remerciements à Laury Gauthier et Jeanne Garric pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi qu'à Simon Galas, Samuel Soubeyrand et Marie-Agnès Coutellec pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci également à Marie-Agnès Coutellec, Simon Galas, Catherine Lecomte, Jean-Christophe Poggiale et Denis Réale pour m'avoir accompagné et conseillé tout au long de cette thèse lors de mes comités de pilotage.

Je tiens également à remercier tout ceux qui ont participé à la réussite de ce projet. Un merci tout particulier à Morgan (mon « co-bureau ») pour les manip communes, ton aide dans la découverte de cette petite bête qu'est *Caenorhabditis elegans*, tes discussions sérieuses ou non, les soirées et les franches parties de rigolades. Un grand merci également à Florian, que j'ai eu la chance d'encadrer, pour ton aide inestimable dans les manip et pour ta bonne humeur ! Bonne continuation à toi et bonne chance dans ta thèse. Merci à Virginie Camilleri pour son assistance dans les mesures en ICP-MS et à Cleo Tebby pour ses conseils statistiques ainsi que l'amélioration de mes manuscrits écrits dans la langue de Shakespeare. Merci également à Valérie, Magalie et Stéphanie, pour votre accueil toujours joyeux (et votre café toujours bon). J'adresse également un remerciement tout particulier à Claudine. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté durant ces trois années, pour ton efficacité sans pareil et pour ta bonne humeur permanente au boulot comme au

Tai-Chi. Merci à tous le nombreux personnel du SERIS de l'IRSN et de METO de l'INERIS.

Je ne peux pas ne pas remercier le groupe des ante-, current-, post- doctorant du LECO et de METO : Antoine T., Starrlight, Delphine, Nicolas, Guillaume, Simona, Adrien, Kevin, Antoine L., Audrey, Sandrine, Marie-Émilie, Goulwen, Antonio, Edlyn et Sophie pour les déjeuners, les pauses, les délires et les soirées qui ont maintenu une bonne ambiance tout au long de ces trois années. Merci à toi Starrlight pour ton enthousiasme sans limite, ta passion pour la recherche et toutes les discussions sur le DEB et la vie en général. Merci Antoine T. et aussi à toi, Philippe pour ces quelques mois inoubliables passés ensemble dans « La Coloc ».

Merci aussi à tout ceux qui m'ont permis d'en arriver jusque là. Merci à mes parents et à mon frère Fabien pour leur soutien, leur confiance et leur bonne humeur. Merci à mes grands-parents pour tout ce qu'ils m'ont transmis. J'ai maintes fois tenté de vous expliquer en quoi consistait un doctorat scientifique. Mamie, je pourrai enfin te montrer à quoi cela ressemble. Merci à mes beaux-parents, à Alexandre (mon Beauf) et à Karine pour ces moments passés chez vous, votre bonne humeur et le calme reposant de Vélou. Enfin, un très grand merci à Adeline, sans toi je ne serais sans doute jamais arrivé jusqu'ici. Merci pour m'avoir supporté moi et mes allers-retours fréquents durant ces trois années.

Merci enfin aux quelques 2 000 nématodes qui ont accepté de poser plus de 30 000 fois pour moi et aux quelques centaines de milliers d'autres anonymes pour avoir fait partie de mes populations d'études.

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience,  
tout le reste n'est que de l'information »*  
Albert Einstein



---

## Table des matières

---

	Page
<b>Glossaire</b>	<b>xxi</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1 État des connaissances</b>	<b>5</b>
<b>I Uranium</b>	<b>7</b>
I.1 Propriétés et utilisations . . . . .	7
I.2 L'uranium, écotoxicité . . . . .	8
<b>II Biologie de <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>15</b>
II.1 Écologie. . . . .	15
II.2 Développement . . . . .	17
II.2.1 Embryon . . . . .	19
II.2.2 Stade larvaire . . . . .	19
II.2.3 Développement en conditions défavorables . . . . .	21
II.3 Reproduction . . . . .	22
<b>III <i>Caenorhabditis elegans</i> en écotoxicologie</b>	<b>25</b>
III.1 Outils et milieux d'études . . . . .	28
III.1.1 Les matrices d'étude . . . . .	28
III.1.2 Les outils d'étude . . . . .	28
III.2 Effets et réponses de <i>C. elegans</i> aux métaux lourds. . . . .	30
III.2.1 Les effets moléculaires . . . . .	30
III.2.2 Les effets individuels . . . . .	31
III.2.3 Les effets sur les populations . . . . .	32
III.2.4 Les métaux lourds, des réponses biphasiques . . . . .	32
III.2.5 Les métaux lourds, l'importance du stade d'exposition . . . . .	33
<b>IV Étude de l'évolution</b>	<b>35</b>
IV.1 Les processus évolutifs . . . . .	35
IV.2 Évolution expérimentale . . . . .	37
IV.3 Évolution en condition de stress. . . . .	38



<b>V</b>	<b>Modélisation mécanistique au niveau individuel en écotoxicologie</b>	<b>41</b>
V.1	Modélisation des effets sur les individus : approches toxicocinétique / toxicodynamique. . .	41
V.1.1	Toxicocinétique . . . . .	41
V.1.2	Modèles toxicodynamiques en écotoxicologie . . . . .	42
V.2	Les modèles bioénergétiques . . . . .	43
V.2.1	Les théories bioénergétiques majeures : DEB et MTE . . . . .	44
V.2.2	La théorie DEB . . . . .	46
V.3	Les modèles toxicodynamiques appliqués à l'analyse des perturbations bioénergétiques . .	47
V.3.1	Méthodes basées sur le modèle DAM . . . . .	47
V.3.2	Modèle à seuil de concentration sans effet : le modèle DEBtox . . . . .	48
V.4	Modélisation DEBtox appliquée à <i>C. elegans</i> . . . . .	50
<b>Partie 2</b>	<b>Matériels et méthodes générales</b>	<b>51</b>
<b>VI</b>	<b>Origine et maintenance de notre population d'étude</b>	<b>55</b>
VI.1	Population d'intérêt et conditions de maintenance . . . . .	55
VI.1.1	Population étudiée . . . . .	55
VI.1.2	Maintenance de la population. . . . .	56
<b>VII</b>	<b>Estimation des paramètres et analyses de modèle</b>	<b>59</b>
VII.1	L'estimation des paramètres, la méthode Bayésienne . . . . .	59
VII.1.1	Les méthodes d'inférence . . . . .	59
VII.1.2	L'inférence Bayésienne . . . . .	60
VII.1.3	Distributions <i>a priori</i> . . . . .	61
VII.1.4	Méthodes d'échantillonnage en Bayésien. . . . .	62
VII.1.5	Logiciel JAGS. . . . .	63
VII.2	Analyses du modèle. . . . .	63
VII.2.1	Analyse d'incertitude. . . . .	63
VII.2.2	Analyse de sensibilité. . . . .	64
<b>Partie 3</b>	<b>Résultats</b>	<b>69</b>
<b>VIII</b>	<b>Exposition multigénérationnelle de <i>C. elegans</i> à de l'uranium</b>	<b>71</b>
VIII.1	Présentation du chapitre . . . . .	71
VIII.2	Plan expérimental succinct. . . . .	71
VIII.3	Matériel supplémentaire . . . . .	72
<b>Article I : Consequences of a multi-generation exposure to uranium on <i>Caenorhabditis elegans</i> life parameters and sensitivity</b>		<b>73</b>
VIII.4	Introduction . . . . .	74
VIII.5	Materials and Methods . . . . .	75
VIII.5.1	Test organism . . . . .	75
VIII.5.2	Multigeneration exposure . . . . .	75
VIII.5.3	Toxicity test. . . . .	76
VIII.5.4	Data analysis . . . . .	77

VIII.6	Results . . . . .	78
VIII.6.1	Actual exposure concentrations . . . . .	78
VIII.6.2	Model Fitting . . . . .	78
VIII.6.3	MGC life cycle parameters . . . . .	78
VIII.6.4	MGU life cycle parameters . . . . .	79
VIII.6.5	Dose response relationship. . . . .	81
VIII.7	Discussion . . . . .	81
VIII.8	Conclusion . . . . .	85
VIII.9	Conclusion du Chapitre VIII. . . . .	87
VIII.9.1	Principaux résultats . . . . .	87
VIII.9.2	Bilan . . . . .	88
<b>IX</b>	<b>Modélisation DEBtox appliquée à <i>C. elegans</i> exposé à de l'uranium</b>	<b>91</b>
IX.1	Présentation du chapitre . . . . .	91
IX.2	Plan expérimental succinct. . . . .	91
IX.3	Matériel supplémentaire . . . . .	92
<b>Article II : DEBtox modelling applied to <i>Caenorhabditis elegans</i>: a case study on uranium</b>		<b>93</b>
IX.4	Introduction . . . . .	94
IX.5	Materials and Methods . . . . .	95
IX.5.1	Test organism maintenance . . . . .	95
IX.5.2	Experimental conditions . . . . .	95
IX.5.3	Model description. . . . .	96
IX.5.4	Estimation of the parameters . . . . .	97
IX.5.5	Sensitivity and uncertainty analysis . . . . .	99
IX.6	Results . . . . .	100
IX.6.1	Control data fit accuracy . . . . .	100
IX.6.2	Mode of action and sensitivity analysis . . . . .	100
IX.6.3	Parameter estimations . . . . .	102
IX.7	Discussion . . . . .	102
IX.8	Conclusion . . . . .	107
IX.9	Conclusion du Chapitre IX. . . . .	108
IX.9.1	Principaux résultats . . . . .	108
IX.9.2	Bilan . . . . .	108
<b>X</b>	<b>Modélisation DEBtox multigénérationnelle de <i>C. elegans</i> exposés à de l'uranium</b>	<b>109</b>
X.1	Présentation du chapitre . . . . .	109
X.2	Plan expérimental succinct. . . . .	109
X.3	Matériel supplémentaire . . . . .	109

<b>Article III : Mechanistic modelling for in depth analysis of a multigenerational evolution study: Application to <i>Caenorhabditis elegans</i> population submitted to uranium</b>	<b>110</b>
X.4	Introduction . . . . . 111
X.5	Materials and Methods . . . . . 112
X.5.1	Experimental data . . . . . 112
X.5.2	Modelling . . . . . 113
X.6	Results . . . . . 115
X.6.1	Joint evolution of the parameters for the two populations compared with P0 . . . . . 115
X.6.2	Differential evolution of the parameters for the two populations compared with P0 . . . 115
X.6.3	Evolution of the parameters for the two populations compared with F3. . . . . 116
X.7	Discussion . . . . . 117
X.8	Conclusion . . . . . 121
X.9	Conclusion du Chapitre X . . . . . 122
X.9.1	Principaux résultats . . . . . 122
X.9.2	Bilan . . . . . 122
<b>Partie 4</b>	<b>Discussion générale et perspectives</b>
	<b>123</b>
<b>XI</b>	<b>Discussion générale</b>
	<b>125</b>
XI.1	Synthèse et cohérence des résultats . . . . . 125
XI.1.1	Les effets de l'uranium . . . . . 125
XI.1.2	Évolution des individus des populations dérivées comparée aux individus de la population ancestrale . . . . . 126
XI.1.3	Évolution des individus après estompage des effets maternels. . . . . 126
XI.2	Cadre conceptuel pour la modélisation . . . . . 127
XI.3	Apports de la modélisation. . . . . 129
XI.4	La modélisation, le changement d'échelle. . . . . 130
<b>XII</b>	<b>Perspectives</b>
	<b>133</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>135</b>
<b>Annexes</b>	<b>163</b>
<b>A</b>	<b>Exemples de code JAGS</b>
	<b>165</b>
A.1	Exemple de code JAGS : mode d'action assimilation . . . . . 165
A.2	Exemple de code JAGS : mode d'action maintenance . . . . . 167
<b>B</b>	<b>Matériel supplémentaire Article I</b>
	<b>171</b>
<b>C</b>	<b>Matériel supplémentaire Article II</b>
	<b>175</b>
<b>D</b>	<b>Matériel supplémentaire Article III</b>
	<b>179</b>
D.1	Parameters evolution relative to P0. . . . . 179
D.2	Parameters evolution relative to F3. . . . . 182
D.3	Model fit quality for each generation . . . . . 187

<b>E</b>	<b>Valorisations scientifiques de la thèse</b>	<b>197</b>
E.1	Publications scientifiques . . . . .	197
E.2	Communications orales internationales . . . . .	197
E.3	Communications orales nationales. . . . .	198
E.4	Posters spotlight. . . . .	198
E.5	Posters . . . . .	198



---

**Table des figures**


---

		<b>Page</b>
I.1	Répartition des concentrations en uranium dans les sols de surface européens . . . . .	9
I.2	Répartition des concentrations en uranium dans les cours d'eau européens . . . . .	10
II.1	Schémas de l'anatomie et du mouvement de pompage du pharynx de <i>C. elegans</i> . . . . .	18
II.2	Cycle de vie de <i>C. elegans</i> à 22 °C . . . . .	19
II.3	Photos des stades de développement de <i>C. elegans</i> au microscope à contraste interférentiel	21
III.1	Marquage à la GFP du réseau neuronal de <i>C. elegans</i> . . . . .	29
VI.1	Schéma de la dérivation de la population ancestrale fournie par Henrique Teotónio . . . . .	56
VII.1	Schéma explicatif du processus d'inférence. . . . .	60
VII.2	Exemples de méthodes d'échantillonnage. . . . .	65
VII.3	Exemples de loi de distributions de paramètres . . . . .	65
VII.4	Schéma explicatif des différences entre l'analyse de sensibilité globale et l'analyse de sensibilité locale . . . . .	66
VII.5	Grille de choix de méthode d'analyse de sensibilité . . . . .	67
VIII.1	Schematic overview of the multigeneration experimental design. . . . .	77
VIII.2	Two examples (a and b) of <i>C. elegans</i> length ( $\mu\text{m}$ ) in relation to age (hour since hatching)	78
VIII.3	Male and hermaphrodite maximal length $L_{inf}$ ( $\mu\text{m}$ ) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation . . . . .	79
VIII.4	Male and hermaphrodite hatching length $L_0$ ( $\mu\text{m}$ ) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation . . . . .	81
VIII.5	Mean fecundity ( $\pm$ Standard Deviation) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation. . . . .	82
VIII.6	Évolution de la concentration induisant une réduction de la taille ultime de 50% en fonction des générations pour les hermaphrodites des populations MGC et MGU . . . . .	87
VIII.7	Évolution de la concentration induisant une réduction de la ponte totale cumulée de 50% en fonction des générations pour les populations MGC et MGU . . . . .	88
IX.1	<i>C. elegans</i> length and cumulated reproduction in relation to age (hour since hatching) for the control conditions. . . . .	100
IX.2	Uncertainty analysis and model exploration for growth . . . . .	101

IX.3	Sensitivity analysis for the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode . . . . .	103
IX.4	Mode of action results for the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode . . . . .	105
X.1	Evolution of the parameters $L_{inf}$ , $r_B$ , $R_{Max}$ , and $k_e$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	116
X.2	Evolution of the parameters $L_{inf}$ , $r_B$ , $R_{Max}$ , and $k_e$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	118
B.1	Maximal length ( $L_{inf}$ ) for hermaphrodite individuals ( $\mu\text{m}$ ) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U . . . . .	172
B.2	Maximal length ( $L_{inf}$ ) for male individuals ( $\mu\text{m}$ ) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U . . . . .	172
B.3	Mean fecundity ( $\pm$ Standard Deviation) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U. . . . .	173
C.1	Uncertainty analysis for reproduction part of the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode . . . . .	176
C.2	Sensitivity analysis for the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode . . . . .	177
C.3	Prior and posterior distribution density for the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode . . . . .	178
D.1	Evolution of the parameter $R_M$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	179
D.2	Evolution of the parameter $L_0$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	180
D.3	Evolution of the parameter $L_p$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	180
D.4	Evolution of the parameter $NEC$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	181
D.5	Evolution of the parameter $b$ relative to P0 throughout the generations . . . . .	181
D.6	Evolution of the parameter $R_M$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	182
D.7	Evolution of the parameter $L_0$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	183
D.8	Evolution of the parameter $L_p$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	184
D.9	Evolution of the parameter $NEC$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	185
D.10	Evolution of the parameter $b$ relative to F3 throughout the generations . . . . .	186
D.11	Model fit for the growth and the reproduction of the generation P0 for each concentration of the toxicity test. . . . .	188
D.12	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F2 MGC for each concentration of the toxicity test . . . . .	189
D.13	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F2 MGU for each concentration of the toxicity test . . . . .	190
D.14	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F3 MGC for each concentration of the toxicity test . . . . .	191
D.15	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F3 MGU for each concentration of the toxicity test . . . . .	192
D.16	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F12 MGC for each concentration of the toxicity test . . . . .	193
D.17	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F12 MGU for each concentration of the toxicity test . . . . .	194
D.18	Model fit for the growth and the reproduction of the generation F16 MGC for each concentration of the toxicity test . . . . .	195

*TABLE DES FIGURES*

D.19 Model fit for the growth and the reproduction of the generation F16 MGU for each concentration of the toxicity test . . . . . 196





---

## Liste des tableaux

---

	<b>Page</b>
II.1	Développement de <i>C. elegans</i> souche N2 (en heures) pour différentes températures . . . . . 16
III.1	Exemples d'études menées sur <i>C. elegans</i> et critères d'effet mesurés. . . . . 27
V.1	Comparaison des modèles de croissance des théories MTE (Brown <i>et al.</i> , 2004) et DEB (Kooijman, 2010) . . . . . 45
V.2	Équations des modes d'action décrits dans l'approche DEBtox . . . . . 49
VI.1	Composition du Nematode Growth Medium et du M9 modifié pour 1 litre . . . . . 57
VIII.1	Anova results for maximal length ( $L_{inf}$ ), hatching length ( $L_0$ ), growth rate ( $a$ ), and fecundity with Population (P), Generation (G), and Concentration (C) as factors . . . . . 80
VIII.2	EC <sub>50</sub> values relative to estimated maximal length ( $L_{inf}$ ) and fecundity, as a function of generation and population . . . . . 83
IX.1	<i>C. elegans</i> DEBtox equations . . . . . 98
IX.2	Comparison of the fit quality between evaluated models . . . . . 102
IX.3	Estimates of the model parameters using the DEBtox <i>assimilation</i> model for nematode with the control data only or with all data. . . . . 104
X.1	Prior parameters values used for the model calibration. . . . . 115
X.2	Parameters comparison with P0 for each generation of the two populations MGC (control) and MGU (uranium). . . . . 117
X.3	Parameters comparison with F3 for each generation of the two populations MGC (control) and MGU (uranium). . . . . 119
XI.1	Synthèse des résultats et de leur concordance. . . . . 128
XI.2	Validation de la qualité du modèle DEBtox utilisé dans le cadre de ce doctorat. . . . . 129



---

## Glossaire

---

### A

**Adaptation** (*en* : *adaptation*) : processus de changement au sein d'un organisme lui permettant de mieux faire face aux (nouvelles) conditions environnementales et par lequel l'organisme (ou le groupe d'organisme) acquiert des caractéristiques (induisant des changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux) qui vont améliorer sa survie et son succès de reproduction dans l'environnement en question (Bijlsma & Loeschcke, 2005).

**Adaptation génotypique** (*en* : *genotypic adaptation*) : modification de la fréquence allélique en réponse à une pression de sélection exercée par l'environnement (Bijlsma & Loeschcke, 2005).

**Adaptation phénotypique** (*en* : *phenotypic adaptation*) : résultat de la plasticité phénotypique d'un génotype. Il s'agit de la capacité pour un génotype de modifier son phénotype en fonction des conditions environnementales (Bijlsma & Loeschcke, 2005).

**Androdioécie** (*en* : *androdioecy*) : coexistence de mâles et d'hermaphrodites au sein d'une population (voir gynodioécie).

**Anthropique** (*en* : *anthropogenic*) : qui est relatif à l'Homme, qui résulte des activités humaines.

### B

**Biocénose** (*en* : *biota*) : ensemble des êtres vivants vivant ensemble dans un espace défini (voir biotope).

**Bioessai** (*en* : *bioassay*) : procédure de laboratoire, basée sur des expérimentations sur êtres vivants, visant à étudier les effets et particularités de substances, de facteurs physiques ou de conditions potentiellement toxiques.

**Biotope** (*en* : *biotope*) : ensemble d'éléments déterminant un milieu uniforme hébergeant un ensemble d'êtres vivants spécifique (voir biocénose).

**Body bend** (*en* : *body bend*) : un body bend est égal à un changement dans la direction de la partie antérieure du vers (partie postérieure du bulbe pharyngien incluse) le long d'un axe Y perpendiculaire à l'axe X le long duquel se déplace le vers (Dutilleul *et al.*, 2013; Tsalik & Hobert, 2003).

### C

**Concentration d'Effet (CE<sub>X</sub>)** (*en* : *Effect Concentration (EC<sub>X</sub>)*) : dose d'exposition à un composé induisant X% d'effet.

**Chimiotactisme** (*en* : *chemiotactism*) : effet d'attraction ou de répulsion exercé par une substance sur une cellule ou un organisme capable de se déplacer afin de s'approcher ou s'éloigner de cette substance.

**Concentration Létale (CL<sub>X</sub>)** (*en* : *Lethal Concentration (LC<sub>X</sub>)*) : dose d'exposition à un composé induisant X% de mortalité.

### D

**Budget d'Énergie Dynamique (DEB)** (*en* : *Dynamic Energy Budget*) : théorie décrivant les règles mécanistiques d'assimilation et d'utilisation de l'énergie pour un organisme. Cette théorie est concurrente de la théorie Metabolic Theory of Ecology (MTE).

**Dynamique Adaptative** (*en* : *adaptive Dynamic*) : approche théorique visant à étudier certains changements phénotypiques apparaissant dans l'évolution des populations (Waxman & Gavrillets, 2005).

### E

**Écosystème** (*en* : *ecosystem*) : Ensemble formé par l'association d'une biocénose et d'un biotope (voir biocénose, biotope).

**Écotoxicologie** (*en* : *ecotoxicology*) : discipline qui vise à étudier les effets et le devenir des polluants sur les écosystèmes. L'écotoxicologie est à l'interface entre l'écologie et la toxicologie. Elle évalue les modalités par lesquelles les polluants sont introduits et circulent dans les écosystèmes (Ramade, 2010).

**Évaluation des Risques Écologiques (ERE)** (*en : Ecological Risk Assessment*) : méthodologie visant à appréhender de manière scientifique (Munns Jr., 2006) la probabilité d'apparition d'effets écologiques néfastes en analysant et organisant les données, hypothèses et incertitudes (Hope, 2006).

## F

**Facteur de bioconcentration** (*en : bioconcentration factor (BCF)*) : ratio entre la concentration interne d'un toxique ( $C_i$ ) et la concentration du toxique dans le milieu ( $C$ ) lorsque cette dernière est constante. Dans le cas d'un modèle de cinétique à un compartiment, le BCF est égal au ratio entre le taux d'absorption ( $k_a$ ) et le taux d'élimination ( $k_e$ ) (Péry *et al.*, 2001).

## G

**Gynodioécie** (*en : gynodioecy*) : coexistence d'hermaphrodites et de femelles au sein d'une population (voir androdioécie).

## I

**Isotope** (*en : isotope*) : se dit d'atomes possédant le même nombre de proton mais un nombre de neutrons différents (voir proton, neutron).

## L

**Lowest-Observed Effect Concentration (LOEC)** (*en : Lowest-Observed Effect Concentration*) : plus petite concentration d'un composé induisant des effets observés.

## M

**Macroévolution** (*en : macroevolution*) : changements génétiques apparaissant sur des échelles de temps géologiques à des niveaux d'organisation supérieurs à l'espèce (tel que le clade) et émergent généralement de mutations génétiques.

**Microévolution** (*en : microevolution*) : changements apparaissant au sein d'une même population ou d'une même espèce sur une échelle de temps relativement courte.

**Metabolic Theory of Ecology (MTE)** (*en : Metabolic Theory of Ecology*) : théorie décrivant les taux métaboliques dans un organisme. Cette théorie est concurrente de la théorie Budget Énergétique Dynamique (DEB).

## N

**No-Effect Concentration (NEC)** (*en : No-Effect Concentration*) : concentration d'un composé n'induisant pas d'effets sur toute la durée de vie d'un organisme. Ce critère est indépendant du temps de mesure.

**Neutron** (*en : neutron*) : particule subatomique qui ne porte pas de charge élémentaire. Le neutron peut être liée avec un proton dans le noyau d'un atome (voir isotope).

**Nematode Growth Medium (NGM)** (*en : Nematode Growth Medium*) : milieu d'élevage des nématodes.

**No-Observed Effect Concentration (NOEC)** (*en : No-Observed Effect Concentration*) : plus haute concentration d'un composé n'induisant pas d'effets observés.

## P

**Phénomène épigénétique** (*en : epigenetic phenomena*) : phénomène quasi héréditaires correspondant à une adaptation structurelle des régions chromosomiques sans modification de la séquence nucléotidique (Bird, 2007).

**Proton** (*en : proton*) : particule subatomique qui porte une charge élémentaire positive. Le proton peut être liée avec un neutron dans le noyau d'un atome (voir isotope).

## S

**Spéciation allopatrique** (*en : allopatric speciation*) : apparition d'une nouvelle espèce dans une aire de répartition géographique isolée de celle de l'espèce d'origine (voir spéciation sympatrique).

**Spéciation sympatrique** (*en : sympatric speciation*) : apparition d'une nouvelle espèce dans une aire de répartition géographique chevauchant celle de l'espèce d'origine (voir spéciation allopatrique).

## T

**Toxicocinétique** (*en : toxicokinetic*) : description des temps de passage d'un composé au sein d'un organisme (*e.g.* par l'utilisation de taux d'absorption et d'élimination) (Ashauer *et al.*, 2006).

**V**

**Valeur sélective** (*en : fitness*) : capacité d'un individu à vivre, se reproduire et *in fine* à transmettre son génotype.



# Introduction générale





LES ÉCOSYSTÈMES sont régulièrement exposés à des pollutions ponctuelles ou chroniques liées aux activités anthropiques. Dans de nombreux cas, la durée d'exposition des populations aux polluants dépasse la durée de vie des organismes qui les composent. Cette exposition peut ainsi entraîner l'apparition d'une force de sélection susceptible d'impacter les structures phénotypiques et génétiques des populations exposées (Bickham, 2011; Bijlsma & Loeschcke, 2005; Coutellec & Barata, 2011; Coutellec *et al.*, 2011; Nisbet *et al.*, 1989). Ces impacts peuvent conduire à une adaptation locale des organismes. Ces derniers sont alors caractérisés par des particularités génétiques et phénotypiques permettant aux individus de présenter de meilleures valeurs sélectives face aux conditions de l'environnement local (Hedrick, 2006; Hendry & Gonzalez, 2008). Néanmoins cette adaptation locale est le plus souvent la conséquence de phénomènes de sélection qui peuvent induire une réduction de la diversité génétique de la population, et une difficulté à répondre à des pollutions ultérieures par d'autres composés (Hoffmann & Merilä, 1999; Reed & Frankham, 2003; Schulte *et al.*, 2010; Shirley & Sibly, 1999; Ward & Robinson, 2005). La compréhension des mécanismes adaptatifs est une étape fondamentale pour l'analyse des conséquences écologiques d'une exposition à long terme à des pollutions (Chapman *et al.*, 2003). Plus précisément, selon Medina *et al.* (2007), il est nécessaire d'acquérir des connaissances sur les changements phénotypiques et génétiques apparaissant dans une population exposée à un stress durant plusieurs générations, et ce afin d'évaluer les effets à long terme de cette exposition sur le maintien de la biodiversité et l'extinction potentielle de la population.

L'évaluation des effets à long terme des expositions passe donc par la réalisation d'études à des échelles biologiquement et écologiquement pertinentes. Ce type d'étude nécessite des plans expérimentaux s'intéressant au minimum à des populations exposées chroniquement à un stress durant plusieurs générations — les effets maternels s'estompant fortement au delà de la troisième génération (Dodenhoff *et al.*, 1999; Kawecki *et al.*, 2012). Cela permet de s'affranchir des effets d'acclimatation pour se concentrer sur les effets d'adaptation qui pourraient apparaître au sein des populations stressées (Gagliano & McCormick, 2007; Mousseau & Fox, 1998; Muysen & Janssen, 2004; Räsänen & Kruuk, 2007; Scheiner, 1993). L'écotoxicologie évolutive est une discipline, ayant émergé il y a peu, à la confluence de deux domaines auparavant peu associés : l'évolution des populations et l'écotoxicologie. Dès 1994, Bickham & Smolen (1994) ont prédit le développement de ce nouveau domaine. Il s'agit, selon ces auteurs, d'un champ de recherche qui s'intéresse à l'étude des altérations génétiques pouvant apparaître au sein des populations stressées. Ce champ de recherche est devenu une discipline d'intérêt croissant, notamment depuis les années 2010, comme en atteste les numéros spéciaux parus dans le journal *Ecotoxicology* (Shugart, 2011, 2013) et les sessions dédiées à ce sujet lors de conférences internationales majeures en écotoxicologie (SETAC Seville 2010; SETAC Berlin 2012; SETAC Glasgow 2013).

Les études d'écotoxicologie évolutive sont complexes à mettre en œuvre et à analyser. En effet, les mécanismes sous-jacents de l'action d'un polluant sont rarement directement observables. Un moyen de comprendre pleinement les effets des polluants sur la dynamique des populations et d'analyser les résultats des expériences d'écotoxicologie évolutive est d'utiliser un modèle mathématique mécanistique. En effet, ce

type de modèle permet d'intégrer mathématiquement des processus toxicologiques et biologiques à l'analyse des données d'écotoxicologie et d'étudier les interactions entre ces processus. Il s'agit également d'un outil de choix pour inférer des valeurs de paramètres non mesurables physiologiquement, émettre et tester différentes hypothèses, réaliser des prévisions (à une échelle de temps plus importante que le temps d'expérience), ou encore, extrapoler à d'autres conditions expérimentales ou concentrations d'exposition que celles qui ont permis de calibrer le modèle (Poggiale, 2009; Vindimian, 2000). Ce type de modèle permet donc d'inférer des paramètres biologiquement pertinents dont l'évolution peut être analysée au cours des générations.

L'objectif principal de ce doctorat était d'étudier les apports de la modélisation mécanistique, par rapport à une analyse statistique classique (*i.e.* non mécanistique), dans l'analyse de données d'évolution expérimentale suite à l'exposition sur le long terme à un contaminant.

Une stratégie en trois étapes a été développée pour répondre à cet objectif. Dans un premier temps, une acquisition de données multigénérationnelles sur deux populations – une soumise à une force de sélection et une seconde non soumise à cette force – dérivées d'une population présentant une forte diversité génétique (construite à partir de 16 isolats sauvages; Teotónio *et al.*, 2012) du nématode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) a été effectuée. *C. elegans* est un métazoaire, ubiquiste ayant un cycle de vie de trois jours, une durée de vie de 21 jours à 20°C, une forte fécondité et pouvant être retrouvé en population de plusieurs milliers d'individus (Byerly *et al.*, 1976; Félix & Duvéau, 2012). Ces caractéristiques font de ce nématode un organisme modèle pour la réalisation d'études d'évolution expérimentale (Hoffmann & Merilä, 1999; Kawecki *et al.*, 2012; Reed & Frankham, 2003; Reed *et al.*, 2003). Dans ce projet de recherche, la force de sélection appliquée était représentée par une concentration d'un métal lourd radioactif, l'uranium, induisant une réduction de la ponte de près de 60% chez *C. elegans* (Dutilleul, 2013). S'en est suivie une première analyse statistique non mécanistique des données obtenues (Article I, page 73). Dans un second temps, un modèle d'effet mécanistique s'appuyant sur une théorie bioénergétique a été mis au point à partir d'une génération d'intérêt de la population contrôle. Un tel modèle avait déjà été mis au point sur nématode par Jager *et al.* (2005). Néanmoins, du fait des faiblesses que nous avons identifiées dans ce modèle, une modification a été proposée afin d'améliorer à la fois la pertinence physiologique vis-à-vis du nématode et les techniques d'estimation des paramètres (Article II, page 93). Enfin, dans un troisième temps le modèle développé a été appliqué à l'ensemble des données acquises pour chaque génération afin d'inférer les valeurs des paramètres et d'étudier leur évolution pour les deux populations (Article III, page 110).

Ce manuscrit de doctorat se présente en quatre parties. La première correspond à un état des connaissances sur les différents thèmes abordés lors de ce travail de recherche. La seconde partie reprend les matériels et méthodes utilisés et en précise certains points. La troisième partie développe la stratégie appliquée sous la forme de trois articles scientifiques qui reprennent les trois temps présentés précédemment. Enfin, dans la quatrième partie, l'ensemble des résultats obtenus et la pertinence de la réalisation d'une analyse mécanistique en plus d'une analyse statistique classique sont discutés.

## Première partie

# État des connaissances



---

## Uranium

---

### I.1 Propriétés et utilisations

L'URANIUM (U) est un métal lourd radioactif présent naturellement dans notre environnement (IRSN, 2012). L'uranium (U) est l'élément naturel le plus lourd du tableau de Mendeleïev. Cet élément du groupe des actinides a un numéro atomique ( $Z$ ) égal à 92. Il possède trois isotopes principaux qui sont  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ . L'uranium se désintègre principalement via l'émission de particules alpha ( $\alpha$ ) et dans une moindre mesure bêta ( $\beta$ ), mais aussi via une faible émission de rayonnement électromagnétique (rayons X et gamma ( $\gamma$ ))(IRSN, 2012). Sa demi-vie est de l'ordre de 4,5 milliards d'années pour  $^{238}\text{U}$  et 700 millions d'années pour  $^{235}\text{U}$ .

Dans l'environnement, l'uranium n'est jamais retrouvé à l'état pur. Dans cet état, l'uranium solide est un métal gris-blanc, malléable et ductile. Il se retrouve principalement combiné à des éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre ou l'oxygène. Avec ce dernier élément, par exemple, l'uranium se combine pour donner des oxydes uraneux ( $\text{UO}_2$ ). Les ions uranyles ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) se dissolvent facilement dans l'acide nitrique ou fluorhydrique afin de donner des sels d'uranyle (*e.g.* nitrate d'uranyle). L'uranium naturel peut être extrait sous forme de minerai composé à 99,275% de  $^{238}\text{U}$ , 0,719% de  $^{235}\text{U}$  et 0,006% de  $^{234}\text{U}$  (Colle *et al.*, 2001).

L'uranium, depuis la découverte de ses propriétés physico-chimiques, est largement utilisé dans de nombreuses activités anthropiques tant militaires (*e.g.* bombe A larguée sur Hiroshima, munitions anti-char) que civiles (*e.g.* production d'énergie). En particulier, après enrichissement — visant à accroître la capacité de fission nucléaire via une augmentation du nombre d'atomes d' $^{235}\text{U}$  — l'uranium est utilisé comme combustible dans de nombreuses centrales nucléaires de production d'électricité. Au cours du processus d'enrichissement, un sous-produit est créé, appelé uranium appauvri car sa composition est réduite en  $^{234}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$ . Il se compose généralement de 99,8% de  $^{238}\text{U}$ , 0,2% de  $^{235}\text{U}$  et 0,0006% de  $^{234}\text{U}$  (WHO, 2001). Il possède les mêmes propriétés chimiques que l'uranium naturel mais est 60% moins radioactif. L'uranium appauvri est

fortement utilisé du fait de sa forte densité, notamment avec des applications civiles telles que la réalisation de boucliers de protection contre les rayonnements issus de dispositifs médicaux, la réalisation de ballasts de navires ou d'aéronefs, et des applications militaires telles que la fabrication de munitions anti-blindages ou le renforcement de véhicules blindés (WHO, 2001).

Cette utilisation est responsable de l'augmentation de la concentration en uranium dans certains écosystèmes aquatiques et terrestres (Hart *et al.*, 1986; Jurgens *et al.*, 2010; Lottermoser *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2000; UNSCEAR, 2000; Uralbekov *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs études ont mesuré des concentrations dans les sols de 0,008 mM ( $\approx 2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) et jusqu'à 4,2 mM U ( $\approx 1\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dans les milieux fortement contaminés (Ribera *et al.*, 1996; Salminen, 2005; UNSCEAR, 2000). La Figure I.1 (page 9), par exemple, illustre les concentrations en uranium retrouvées dans les sols de surface en Europe. Le potentiel d'oxydoréduction du milieu peut fortement influencer le comportement de l'uranium dans les écosystèmes terrestres (Gueniot *et al.*, 1988). Ainsi, en milieu oxydant, l'uranium se trouve sous sa forme la plus stable (valence +VI, ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$ ). En condition aérobie, la formation d'un complexe entre l'uranium et des composés plus ou moins solubles tels que la matière organique, les carbonates, les phosphates ou les sulfates, va fortement influencer sa mobilité et créer une accumulation d'uranium dans les horizons à forte composition en matière organique (IRSN, 2012). En ce qui concerne l'écosystème aquatique, l'uranium se retrouve majoritairement sous forme  $\text{UO}_2^{2+}$  lorsque le pH est inférieur à 6. Lorsque le pH augmente, des formes hydroxylées vont apparaître, puis au delà de pH 8, des formes carbonatées (IRSN, 2012). La concentration en uranium dans les bassins océaniques est quasiment homogène et atteint les  $3 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  (IRSN, 2012). En revanche, celle-ci est plus variable dans les cours d'eau. Ainsi, la médiane des concentrations relevées dans les cours d'eau d'Europe par exemple est de  $0,32 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , mais les concentrations peuvent atteindre des valeurs allant de moins de 0,002 à  $21,4 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  (Cf. Figure I.2, page 10) (Salminen, 2005).

## I.2 L'uranium, écotoxicité

L'uranium peut présenter une toxicité à la fois en tant que métal lourd et en tant que radioélément. Son activité spécifique étant relativement faible ( $2,57 \cdot 10^4 \text{ Bq g}^{-1} \text{ U}$ ), sa radiotoxicité, même si elle ne doit pas être négligée *a priori*, est plus faible que sa chimiotoxicité. Différentes études l'ont ainsi confirmé. Ainsi, dans une revue sur les seuils d'écotoxicité de l'uranium, Sheppard *et al.* (2005) rapporte des travaux réalisés sur l'Homme, en conclut que la toxicité chimique de l'uranium est la principale source d'effets chez l'Homme et que cette prépondérance de la chimiotoxicité devrait se retrouver pour les biotopes non humains. Ce résultat a également été retrouvé chez plusieurs autres espèces. Zeman *et al.* (2008) ont comparé leurs résultats, obtenus lors de l'exposition de *Daphnia magna* à de l'uranium appauvri, avec ceux obtenus par Alonzo *et al.* (2006) (exposition de *D. magna* à de l'américium 241). Ces auteurs ont observé que les effets de l'uranium — émetteur  $\alpha$  tout comme l' $^{241}\text{Am}$  — sur l'ingestion et la fécondité des organismes étaient obtenus pour des débits de dose beaucoup plus faibles pour l'uranium que pour l'américium ( $2,1$  à  $13 \text{ }\mu\text{Gy h}^{-1}$  pour l'uranium contre  $7,9 \text{ mGy h}^{-1}$  pour l' $^{241}\text{Am}$ ) ce qui suggère que les effets de l'uranium ne

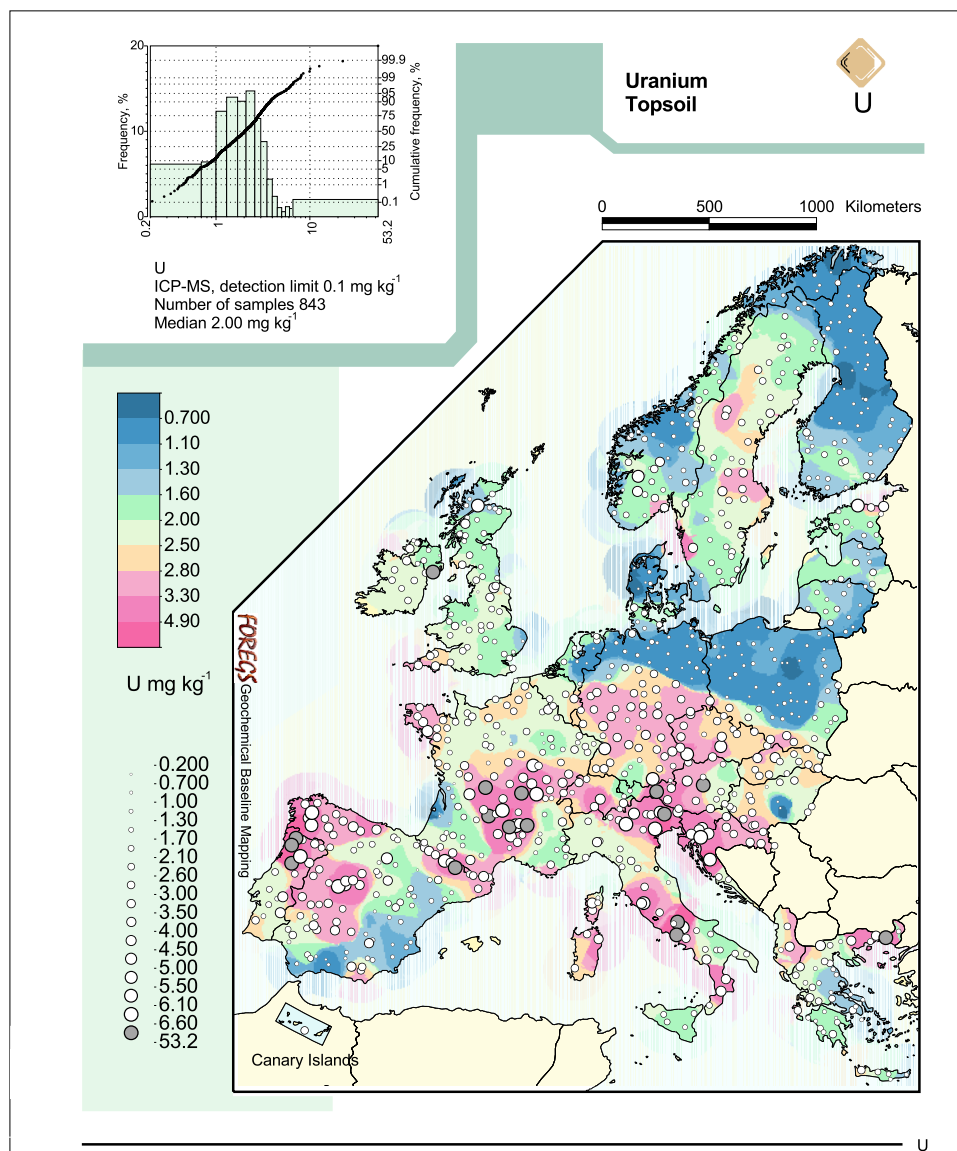


FIGURE I.1 – Répartition des concentrations en uranium dans les sols de surface européens (en mg kg<sup>-1</sup>) (Salminen, 2005)



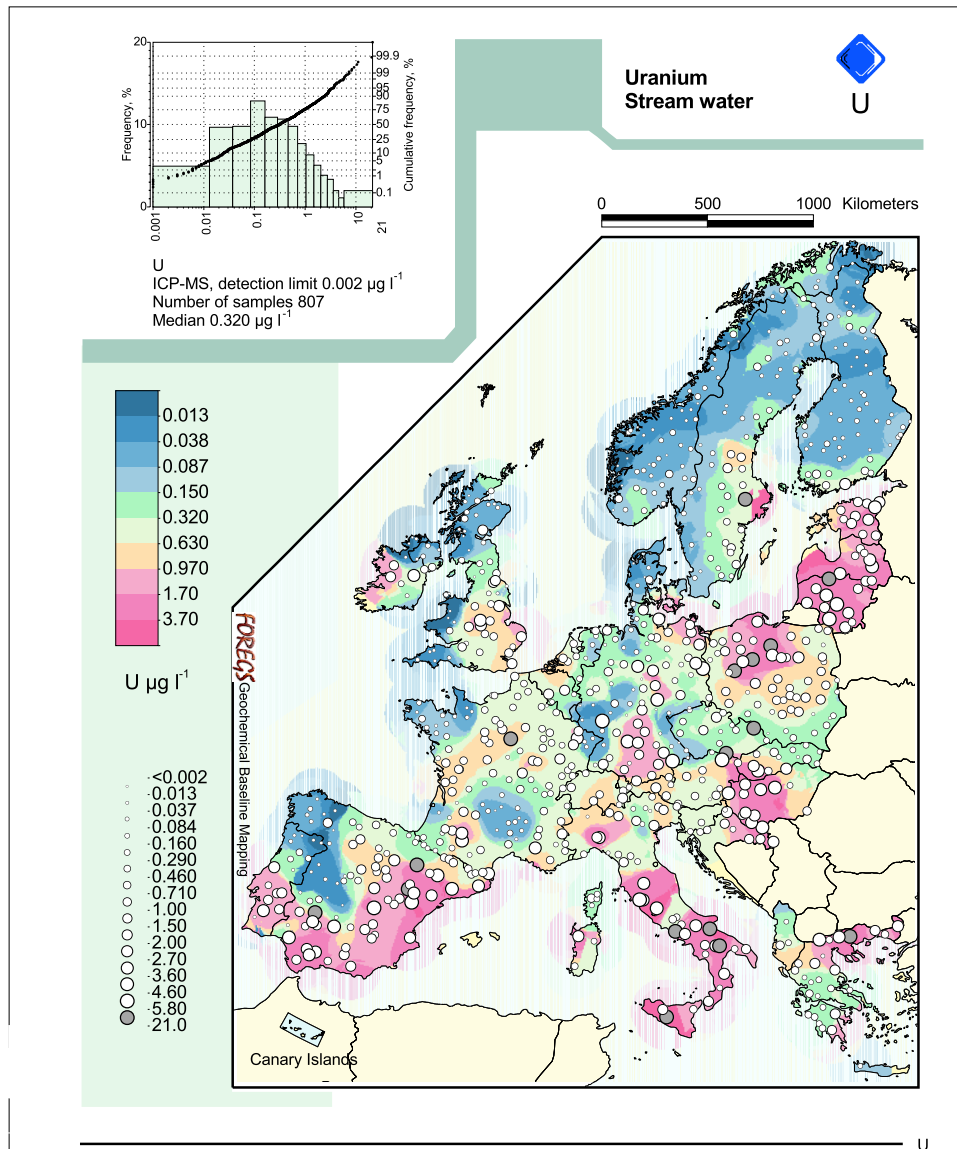


FIGURE I.2 – Répartition des concentrations en uranium dans les cours d'eau européens (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Salminen, 2005)

sont pas liés seulement à l'émission  $\alpha$ . Des mesures mettant en avant sa chimiotoxicité ont également été effectuées chez des poissons zèbres (*Danio rerio*) exposés à de l'uranium appauvri ou à de l'uranium 233 — présentant une activité spécifique 14 000 fois supérieure à celle de l'uranium appauvri — (Bourrachot, 2009). La bioaccumulation de l'uranium étant indépendante de sa composition isotopique (Barillet *et al.*, 2007), les différences d'effets qui auraient pu être observées lors d'une exposition à de l' $^{233}\text{U}$  ou à de l' $^{235}\text{U}$  à des concentrations d'exposition identiques seraient dues à l'effet radiotoxique de l'uranium. Bourrachot (2009) a mis en évidence une différence d'effet à faible concentration ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) mais n'a pas retrouvé de différence significative d'effet à des doses de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Ils ont donc conclu à la prépondérance de la chimiotoxicité de l'uranium sur sa radiotoxicité.

La toxicité de l'uranium est fortement liée à sa biodisponibilité et par conséquent, à sa spéciation chimique. Ainsi, selon Fortin *et al.* (2004) et Markich *et al.* (1996), la bioaccumulation ainsi que la toxicité de l'uranium seraient proportionnelles à la concentration et à la biodisponibilité en ion uranyle ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) libre dans le milieu. L'ion uranyle peut se retrouver sous forme libre dans le milieu via la dissolution de composés solubles tels que le nitrate d'uranyle ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ), le chlorure d'uranyle ( $\text{UO}_2\text{Cl}_2$ ) ou encore l'acétate d'uranyle ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) par exemple (WHO, 2001). Différentes études ont montré que la toxicité de l'uranium diminuait d'une manière générale avec l'augmentation du pH, de la dureté, de la concentration en carbonate et en phosphate du milieu. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la toxicité de l'uranium sur les plantes est dépendante de la concentration en phosphate du milieu (Misson *et al.*, 2009; Tailliez *et al.*, 2013). Ces résultats sont concordants avec ceux observés lors d'expériences préliminaires sur *C. elegans* exposé à de l'uranium sur un milieu riche en phosphate (Dutilleul *et al.*, 2013). De même, Zeman *et al.* (2008) ont démontré que la toxicité de l'uranium sur *D. magna* diminue fortement avec l'augmentation du pH ( $\text{CL}_{50}$  plus faible à pH 7 qu'à pH 8). Ces résultats sont concordants avec ceux de Fournier *et al.* (2004) qui avaient mis en évidence une diminution de la sensibilité du bivalve *Corbicula fluminea* à l'uranium avec l'augmentation du pH. Cette diminution de la toxicité en fonction de l'augmentation du pH serait due à une augmentation de la complexation des ions uranyles par les carbonates et les hydroxydes du milieu (Fortin *et al.*, 2004).

Les effets de l'uranium sur l'environnement ont été étudiés à plusieurs reprises, tant sur les organismes aquatiques, que sur des organismes inféodés au sol ou des vertébrés terrestres. Sheppard *et al.* (2005) ont ainsi établi des PNEC (predicted no-effect concentrations) à partir de la littérature existante. Ces auteurs ont établi une PNEC pour les plantes terrestre à  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , une PNEC pour les autres biotopes du sol à  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , une PNEC pour les plantes et les invertébrés d'eau douce à  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$  et une PNEC pour les organismes benthiques à  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de sédiment sec. Zeman *et al.* (2008) ont étudié l'effet de l'uranium sur *D. magna* pour deux valeurs de pH différentes. Ces auteurs ont trouvé, à 48 h, une  $\text{CL}_{50} = 390 \pm 40 \mu\text{g L}^{-1}$  à pH 7 et une  $\text{CL}_{50} = 7,8 \pm 3,2 \text{ mg L}^{-1}$  à pH 8. Ces résultats sont concordants avec ceux de Poston *et al.* (1984) qui ont trouvé, à 48 h, une  $\text{CL}_{50} = 5,3 \text{ mg L}^{-1}$  à pH 7,6 et une  $\text{CL}_{50} = 7,6 \text{ mg L}^{-1}$  à pH 8,1. Sur le nématode de type sauvage *C. elegans* souche N2, Jiang *et al.* (2009) ont mis en évidence une  $\text{CL}_{50} = 66,9 \pm 30,9 \mu\text{M U}$  ( $\approx 15 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$ ) à 24 h et Dutilleul *et al.* (2013) une  $\text{CL}_{50} = 1,71 \text{ mM U}$  ( $\approx 407 \text{ mg L}^{-1}$ ) à 48 h (IC 95%

= 1,62-1,80 mM U). Concernant ces études, la différence dans le niveau de réponse pourrait être expliquée par une biodisponibilité différente de l'uranium, liée à la physico-chimie des matrices d'exposition. En effet, Jiang *et al.* (2009) ont exposé leurs individus durant 30 minutes en milieu liquide alors que les individus étudiés par Dutilleul *et al.* (2013) ont été exposés sur un milieu gélosé. L'uranium affecte donc la survie des organismes tant aquatiques que terrestres dans des gammes allant des microgrammes aux milligrammes par litre en milieu liquide et pouvant atteindre plusieurs centaines de milligramme par litre en milieu solide (gésolle par exemple). Il est néanmoins possible de retrouver des effets précoces à des concentrations bien plus faibles. Ainsi, des essais de courte durée (5 heures), réalisés sur le bivalve *Corbicula fluminea* ont mis en évidence une concentration entraînant 50% de fermeture de la valve (EC<sub>50</sub>) de 0,05 µM U ( $\approx 11 \mu\text{g L}^{-1}$ ) à pH 5,5 et de 0,13 µM U ( $\approx 31 \mu\text{g L}^{-1}$ ) à pH 6,5 (Fournier *et al.*, 2004).

Les effets de l'uranium ont également été analysés lors d'expositions chroniques. Poston *et al.* (1984) ont étudié les effets de l'uranium sur la reproduction de *D. magna* sur 21 jours et ont mis en évidence une réduction de la reproduction à partir de 0,52 mg L<sup>-1</sup>. Ce résultat a été affiné par Zeman *et al.* (2008) qui, lors d'une étude comparable, ont observé 10% de mortalité à 100 µg L<sup>-1</sup> et 10% d'effets sur la reproduction à  $14 \pm 7 \mu\text{g L}^{-1}$ . Une réduction significative de la masse des individus a également été retrouvée par ces mêmes auteurs à partir de 25 µg L<sup>-1</sup>. Bourrachot *et al.* (2008) ont observé des résultats concordants sur le poisson zèbre *Danio rerio* (LOEC reproduction à 20 µg L<sup>-1</sup>). Une étude sur le macroinvertébré benthique *Chironomus tentans* a également révélé un impact sur la croissance de ce diptère avec, après 10 jours d'exposition au stade larvaire, une NOEC de 39 µg L<sup>-1</sup> et une LOEC de 157 µg L<sup>-1</sup> (Muscatello & Liber, 2009). Cette même étude n'a, en revanche, pas mis en évidence d'effet sur la reproduction à des concentrations d'exposition allant jusqu'à 835 µg L<sup>-1</sup>. Dias *et al.* (2008) ont, quant à eux, observé à 10 jours une LOEC de 2,97 µg g<sup>-1</sup> de sédiment sec sur la survie, le temps de développement et la croissance de larves de *C. riparius*. Une influence de l'uranium sur la survie du macroinvertébré benthique *Tubifex tubifex* a également été démontrée par Lagauzère *et al.* (2009) dès 599 µg g<sup>-1</sup> de sédiment sec à 12 jours d'exposition. Cette diminution de la survie s'accompagnait d'une diminution de la biomasse totale, de l'activité de bioturbation ainsi que de l'apparition de malformations. En revanche, aucun effet sur la survie ou le poids du ver du fumier *Eisenia fetida* exposé durant 28 jours à 600 µg g<sup>-1</sup> de poids sec de sol n'a été mis en évidence par Giovanetti *et al.* (2010). Ces auteurs ont néanmoins observé l'apparition de désorganisations tissulaires de l'épithélium intestinal dès 300 µg g<sup>-1</sup> pour des individus exposés durant 7 jours. Enfin, de rares études, se sont intéressées aux effets de l'uranium sur des populations exposées durant plusieurs générations. Ainsi, Plaire *et al.* (2013) ont examiné les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la sensibilité de *D. magna* à l'uranium au cours des générations. Ces auteurs ont analysé l'accumulation des dommages à l'ADN au cours des générations par utilisation d'une technique de RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA et PCR en temps réel). Ils ont mis en évidence une transmission des dommages accumulés à la descendance concomitante avec une augmentation de la sévérité des effets sur les traits d'histoire de vie (survie, croissance, fécondité) au cours des générations. Beaudouin *et al.* (2012a) ont, quant à eux, étudié la réponse évolutive

de populations de *C. riparius* exposés durant huit générations à une gamme de concentrations en uranium (de 0 à 128  $\mu\text{g g}^{-1}$  de sédiment sec). Les auteurs ont mis en évidence une NEC de 28,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  de sédiment sec ainsi que l'apparition d'effets sur la croissance et la reproduction impliquant une sélection phénotypique au sein de la population via une survie différentielle. De même, Dutilleul (2013) a exposé des populations de *C. elegans* à 1,1 mM (262  $\text{mg L}^{-1}$ ) d'uranium durant 22 générations. Cette expérience d'écotoxicologie évolutive a permis de démontrer que la stratégie d'évolution mise au point par *C. elegans* en présence d'uranium implique une sélection d'individus présentant une fertilité élevée, une croissance plus rapide, ainsi qu'un temps de génération plus court. Cette sélection a aussi induit une réduction de la valeur sélective de la population exposée à l'uranium (via une réduction de la diversité génétique par élimination des génotypes les plus sensibles). Ainsi, une forte réduction de la variance génétique, et par conséquent de l'héritabilité des caractères, a également été mise en évidence par Dutilleul (2013) en appliquant la technique des lignées isofemelles (Cf. revue par David *et al.* 2005) à *C. elegans* exposé à de l'uranium. Une exposition chronique à des doses sublétales d'uranium entraîne donc l'apparition d'effets indésirables à des concentrations de l'ordre du micro-gramme par litre pour les écosystèmes aquatiques (à partir d'environ 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour les organismes aquatiques et environ 3  $\mu\text{g g}^{-1}$  de sédiment sec pour les organismes inféodés au sédiment). Les organismes inféodés au sol présentent, quant à eux, une sensibilité plus faible à l'uranium avec une apparition d'effets à partir de plusieurs centaines de micro-gramme par gramme.



---

## Biologie de *Caenorhabditis elegans*

---

### II.1 Écologie

LES NÉMATODES sont des organismes phytophages, bactériophages, fungivores et/ou prédateurs (Yeates, 1979). Il s'agit d'un embranchement composé d'espèces cosmopolites, pouvant être présentes dans le sol à de fortes densités en fonction de la teneur en matières organiques (environ 1 000 à 10 000 ind kg<sup>-1</sup> de sol). Il s'agit, selon Yeates (2001), d'un organisme multicellulaire, ubiquiste, parmi les plus abondants sur terre. La présence des nématodes dans les sols est importante pour le bon fonctionnement de l'écosystème. Ainsi, ces organismes participent pour la plupart — il existe de rares nématodes pathogènes — à la régulation des populations de bactéries et de champignons dans les sols et sont de fait inféodés au cycle des nutriments (Ingham *et al.*, 1985; Yeates, 1979, 2001). Du fait de leur forte abondance, de leur diversité et de leur participation à des processus indispensables au bon fonctionnement des écosystèmes, les nématodes sont de bons indicateurs de l'état des écosystèmes (Yeates, 2001).

Les nématodes bactériophages sont parmi les plus grands contributeurs de la chaîne des décomposeurs du sol (Yeates, 1979, 1999). *Caenorhabditis elegans* est un nématode (Règne : Metazoa, Embranchement : Nematoda, Classe : Secernentea, Ordre : Rhabditida, Famille : Rhabditidae) bactériophage facilement élevable en laboratoire découvert par Maupas (1900) et mesurant en moyenne 1,2 mm de long pour 70 µm de diamètre à l'âge adulte. À sa température de référence en laboratoire (20 °C), son cycle de vie est de trois jours et sa longévité atteint 21 jours (pour la souche N2) (Byerly *et al.*, 1976). Bien que vivant librement dans les sols, il peut être retrouvé, majoritairement sous sa forme de résistance, en association phorétique voire commensale, nécroménique (*i.e.* se nourrit sur la carcasse de l'hôte) ou parasitique dans certains cas avec d'autres organismes (Barrière & Félix, 2005a; Félix & Braendle, 2010; Kiontke & Sudhaus, 2006). *C. elegans* est une espèce ubiquiste qui peut se retrouver à la fois dans les zones chaudes (*e.g.* Californie, États-Unis), froides (*e.g.* Québec, Canada), ou dans de nombreuses îles isolées (*e.g.* Hawaï, Madère) du globe (Barrière & Félix, 2005b; Félix & Braendle, 2010). En effet, Félix & Braendle (2010) nous indiquent que le

développement de *C. elegans* peut se produire dans une large gamme de température (de 8°C à 27°C), même si les températures non optimales induisent des effets (Cf. Tableau II.1, page 16) tels qu'une réduction de la fécondité ou du taux de ponte. De même, ce nématode peut être retrouvé dans des environnements ayant des valeurs de pH ou de salinité compris dans une gamme étendue. Ainsi, Khanna *et al.* (1997) ont mis en évidence la possibilité d'élever *C. elegans* à des valeurs de pH comprises entre  $\approx 3$  et  $\approx 12$  et des valeurs de salinité inférieures à 15 g L<sup>-1</sup> sans effets néfastes sur sa survie. *C. elegans* est le plus souvent retrouvé dans des habitats anthropogéniques (*e.g.* compost, sols de jardin) (Kiontke & Sudhaus, 2006). Selon Barrière & Félix (2005a), les différentes souches de ce nématode se retrouvent essentiellement au stade de résistance (dauer) en milieu naturel. Néanmoins, différentes études indiquent que *C. elegans* peut également être retrouvé au stade de prolifération (non dauer) sur des matières organiques en décomposition (Félix & Braendle, 2010; Félix & Duveau, 2012). *C. elegans* serait ainsi un organisme colonisateur d'habitats présentant une forte richesse en bactéries.

TABLE II.1 – Développement de *C. elegans* souche N2 (en heures) pour différentes températures (d'après Byerly *et al.*, 1976)

	16 °C $\pm 0,3$	20 °C $\pm 0,5$	25 °C $\pm 0,2$
Ponte	0 h	0 h	0 h
Éclosion	16–18 h	10–12 h	8–9 h
Première mue	36,5 h	26 h	18 h
Seconde mue	48 h	34,5 h	25,5 h
Troisième mue	60 h	43,5 h	31 h
Quatrième mue	75 h	56 h	39 h
Début de ponte	$\approx 90$ h	$\approx 65$ h	$\approx 47$ h
Ponte maximale	$\approx 140$ h	$\approx 96$ h	$\approx 62$ h
Fin de ponte	$\approx 180$ h	$\approx 128$ h	$\approx 88$ h
Taille à la première mue	360 $\mu\text{m}$	370 $\mu\text{m}$	380 $\mu\text{m}$
Taille à la seconde mue	490 $\mu\text{m}$	480 $\mu\text{m}$	510 $\mu\text{m}$
Taille à la troisième mue	650 $\mu\text{m}$	640 $\mu\text{m}$	620 $\mu\text{m}$
Taille à la quatrième mue	900 $\mu\text{m}$	850 $\mu\text{m}$	940 $\mu\text{m}$
Taille au début de la ponte	1150 $\mu\text{m}$	1060 $\mu\text{m}$	1110 $\mu\text{m}$
Taux maximal de ponte	5,4 h <sup>-1</sup>	9,1 h <sup>-1</sup>	8,1 h <sup>-1</sup>
Nombre total d'œufs pondus	275	280	170

*C. elegans* possède un système chimiosensoriel très développé. Ainsi, la plupart de son système nerveux et près de 5% de son génome sont dédiés à la reconnaissance des chimiques environnementaux (Bargmann, 2006). Cette caractéristique permet la mise en place de plusieurs comportements tels que la régulation du passage en stade de résistance (Cf. section II.2.3, page 21), la régulation des phénomènes de chimiotactisme, la mise en place de comportements d'évitement ou encore la recherche de nourriture.

*C. elegans* dispose de la capacité de choisir sa source de nourriture afin d'opter pour une nourriture de qualité (Abada *et al.*, 2009; Avery & You, 2012). Une étude menée par Abada *et al.* (2009) a analysé les préférences alimentaires de *C. elegans*. Il ressort de cette étude qu'un grand nombre de bactéries, indifférem-

ment Gram positives ou négatives, est préféré à la souche standard de laboratoire *Escherichia coli*. Ainsi, lui sont préférées les souches de *Bacillus mycoides*, *Bacillus soli* et *Erwinia sp.* D'autres souches de bactéries, telles que *Bacillus azotoformans* ou *Pseudomonas corrugata* sont en revanche évitées. De plus, ces mêmes auteurs ont mis en évidence le fait que la préférence alimentaire était positivement corrélée avec la durée de vie du nématode. L'ingestion de nourriture chez *C. elegans* se fait via une contraction rythmique du pharynx. Il s'agit d'une pompe neuromusculaire, joignant la bouche à l'intestin, qui transporte la nourriture en deux étapes : (i) pompage de la nourriture et (ii) vague de contraction du muscle postérieur de l'isthme (péristaltisme) générant une forte pression forçant les bactéries à entrer dans l'intestin et par conséquent les disloquant (Avery & Shtonda, 2003; Avery & You, 2012; Fang-Yen *et al.*, 2009). Plus précisément, le muscle pharyngien (Cf. Figure II.1, page 18) est un muscle tubulaire divisé en trois parties que sont le corpus, l'isthmus et le bulbe terminal (Avery & Shtonda, 2003; Fang-Yen *et al.*, 2009). Le mouvement de pompage s'effectue via une contraction quasi-simultanée de ces trois parties. La contraction du corpus et de la partie antérieure de l'isthmus va créer une aspiration du milieu et des bactéries s'y trouvant alors que la contraction du bulbe terminal va casser les bactéries et les expulser vers l'intestin (Avery & Shtonda, 2003; Avery & You, 2012; Fang-Yen *et al.*, 2009). Enfin, une seconde étape de relaxation quasi simultanée du muscle pharyngien va entraîner une fermeture de la lumière du corpus, une expulsion du milieu — les bactéries restant prisonnières du pharynx —, et un déplacement postérieur des bactéries grâce à un mouvement péristaltique de la partie postérieure de l'isthmus (Avery & Shtonda, 2003; Avery & You, 2012; Fang-Yen *et al.*, 2009). Le diamètre estimé du corpus — de 1,8  $\mu\text{m}$  au premier stade de développement à 4,9  $\mu\text{m}$  au stade adulte — et de l'isthmus — de 1  $\mu\text{m}$  à 3,9  $\mu\text{m}$  — (Avery & Shtonda, 2003) permet le passage d'une large gamme de bactéries de tailles variables. Fang-Yen *et al.* (2009) ont estimé la taille de *E. coli* à  $0,99 \pm 0,34 \mu\text{m}$  de long pour  $0,52 \pm 0,07 \mu\text{m}$  de large. Les bactéries d'une taille supérieure à 4,5  $\mu\text{m}$  ne sont que difficilement ingérées par *C. elegans* au stade adulte du fait de la limitation de la taille de la cavité buccale et de l'isthmus (Avery & Shtonda, 2003; Fang-Yen *et al.*, 2009).

## II.2 Développement

Le développement de *C. elegans*, présenté dans la Figure II.2 (page 19), s'effectue en deux grandes phases : embryonnaire et post embryonnaire. *C. elegans* possède un tégument transparent dans l'ensemble de son développement. Cette caractéristique permet une bonne observation de ses stades de développement et des effets des différents stress sur l'organisme (*e.g.* par observations de marqueurs fluorescents tels que la GFP, cf. section III, page 25). Le développement de *C. elegans* est invariant et le lignage, tout comme sa généalogie cellulaire, sont entièrement déterminés (Brenner, 1974; Byerly *et al.*, 1976; Sulston *et al.*, 1983). Chez l'hermaphrodite adulte, 1 090 cellules sont produites et 131 sont destinées à l'apoptose (Altun & Hall, 2009), alors que chez le mâle adulte, 1 031 cellules sont produites (Lints & Hall, 2009). *C. elegans* possède six paires de chromosomes dont cinq paires d'autosomes et une paire de gonosomes de type XX pour l'hermaphrodite et XO pour le mâle (Araiz *et al.*, 2008).



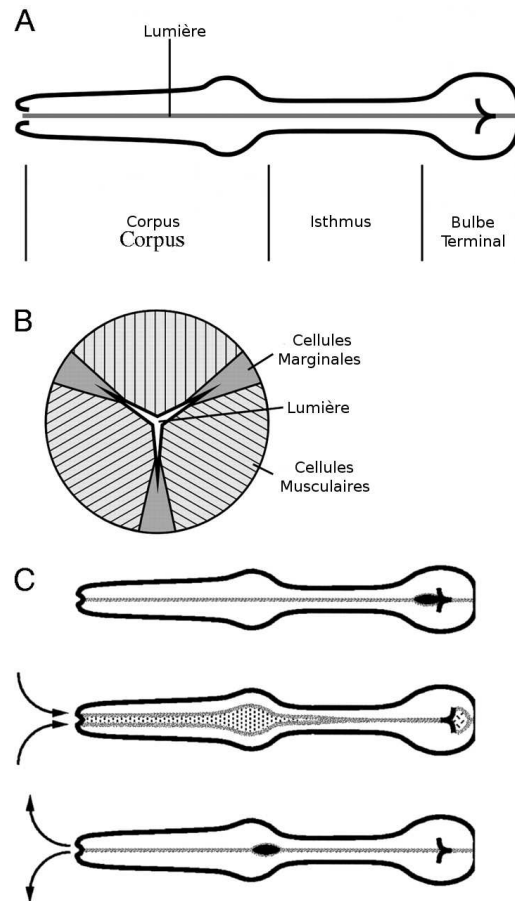


FIGURE II.1 – Schémas de l'anatomie et du mouvement de pompage du pharynx de *C. elegans*. (A) Le pharynx est un muscle tubulaire divisé en trois régions (corpus, isthmus et bulbe terminal). (B) Schéma simplifié d'une coupe de pharynx. La lumière du pharynx est quasi fermée. Les bandes hachurées représentent l'orientation des fibres musculaires. (C) Vision schématique du mouvement de pompage pharyngien (de haut en bas : phase terminale - fin du mouvement péristaltique, phase de contraction simultanée de tous les muscles, phase de relaxation simultanée). Adapté de Avery & Shtonda (2003).



**Stade L1**

À l'éclosion, la larve est en stade L1. Elle mesure alors environ 250  $\mu\text{m}$  de long, possède 558 cellules et commence à s'alimenter. Le développement post embryonnaire de l'organisme est plus la résultante d'évènements d'organogenèse et de modifications de la masse cellulaire que de mitoses (Araiz *et al.*, 2008).

En fonction des conditions environnementales, propices ou non, la larve L1 se retrouve face à trois alternatives : (i) arrêt de la croissance et mort, (ii) passage en stade de résistance ou (iii) passage au stade L2. La première alternative est la résultante d'une absence quasi-totale de nourriture (Cassada & Russell, 1975). En effet, le passage en stade de résistance se réalise en fin de stade L1 (Hu, 2007) (Cf. section II.2.3, page 21). Enfin, dans le cas où les conditions environnementales sont favorables, la larve continue sa croissance.

**Stade L2**

Selon Altun & Hall (2009), peu de divisions cellulaires se produisent durant le stade L2. Cet auteur indique que les cellules germinales font partie des rares cellules à se diviser durant ce stade et qu'elles quadruplent leur nombre.

**Stade L3**

Selon Alda Álvarez *et al.* (2005), la fin du troisième stade larvaire est caractérisée par un changement dans la production des gamètes chez l'hermaphrodite. Ainsi, les gamètes mâles situées dans la partie proximale de la gonade deviennent matures. Cela entraîne un changement dans le type de gamète mûré dans la partie distale de la gonade. Désormais, seules des ovocytes seront mûrées.

**Stade L4**

Le stade L4 est marqué par la fin du processus de gonadogénèse et par la génération des cellules terminales de la vulve et de l'utérus (Altun & Hall, 2009).

**Stade Adulte**

À environ 48 h (à 22 °C) après l'éclosion, un hermaphrodite mature commence à pondre ses premiers œufs (Byerly *et al.*, 1976). L'hermaphrodite adulte pond alors jusqu'à épuisement de sa réserve de sperme (soit environ quatre jours). Il vit ensuite pendant encore 10 à 15 jours. L'hermaphrodite peut aussi être fécondé par des mâles. Dans un tel cas, la ponte peut se poursuivre jusqu'à épuisement du stock d'ovocytes (Alda Álvarez *et al.*, 2005). Il semblerait néanmoins qu'un hermaphrodite fécondé par un mâle aura une durée de vie plus courte à cause de dommages physiques directs ou de transmission de parasites sexuels (Gems & Riddle, 1996).

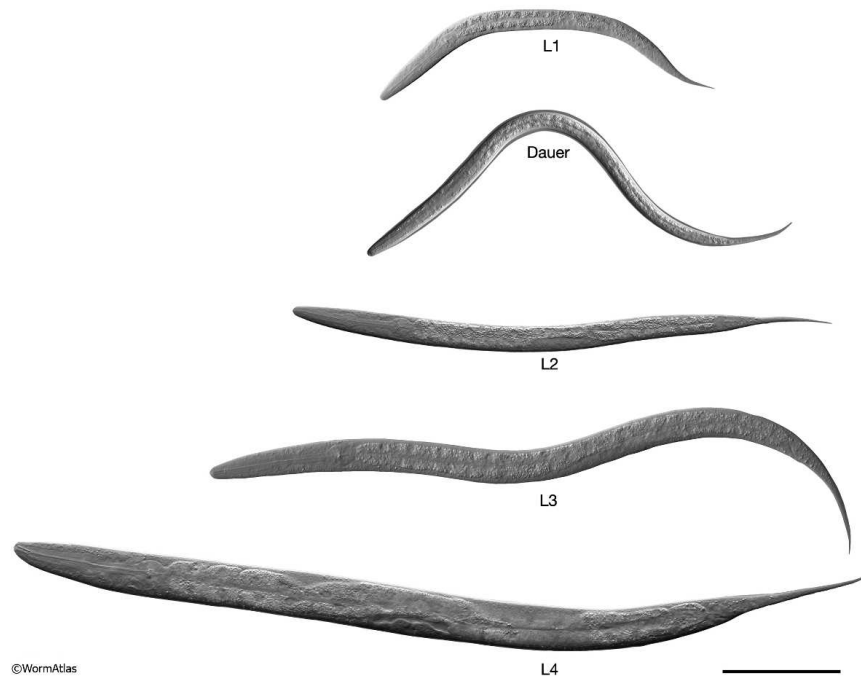


FIGURE II.3 – Photos des stades de développement de *C. elegans* au microscope à contraste interférentiel. La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$  (adapté de Altun & Hall, 2009)

### II.2.3 Développement en conditions défavorables

#### Stade dauer

Le stade dauer est un stade de résistance — pouvant durer plusieurs mois — durant lequel *C. elegans* ne s'alimente pas (Cassada & Russell, 1975; Félix & Braendle, 2010). À la fin du stade L1, l'organisme peut entrer en stade dauer si les conditions environnementales — faible quantité de nourriture, forte densité de population ou forte température — ne sont pas favorables à sa croissance (Cassada & Russell, 1975; Hu, 2007). Ainsi, Félix & Duveau (2012) ont systématiquement retrouvé des individus en stade dauer ou pré-dauer lorsque la densité de population dépassait les 1 000 individus. Le passage en stade de résistance implique alors la formation d'une larve de stade pré-dauer (L2d) (Altun & Hall, 2009; Hu, 2007) qui peut se transformer en dauer ou reprendre un cycle normal en devenant une larve L3. Le passage en stade dauer est régulé grâce aux récepteurs chimiosensoriels de *C. elegans* (Bargmann, 2006) qui vont lui permettre de déterminer si les conditions environnementales (*i.e.* disponibilité de la nourriture, température, densité de population, toxicité du milieu) lui sont favorables.

Dans le cas où les conditions environnementales ne se sont pas améliorées lors du stade L2d, la larve passe dans un état de non vieillissement (stade dauer). En effet, le temps passé en stade dauer n'influe pas sur le temps de vie de la larve post-dauer. Durant ce stade de résistance, la larve ne se nourrit pas et a tendance à se déplacer très peu (Cassada & Russell, 1975; Félix & Braendle, 2010; Gaglia & Kenyon, 2009; Hu, 2007). La larve dauer peut survivre plusieurs mois dans l'attente d'une amélioration des conditions environnementales (Altun & Hall, 2009).

Le stade dauer prend fin lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables. Ainsi, en moins de trois heures après la détection de nourriture, l'organisme quitte le stade dauer et commence à manger. Moins de 10 heures plus tard, il mue en L4 (Altun & Hall, 2009; Hu, 2007).

### Autres formes de résistance

Félix & Braendle (2010) décrivent d'autres formes de résistance qui peuvent être mises en place par *C. elegans* lors de ses autres stades de vie. Ainsi, une larve de stade L4 en situation de faible quantité de nourriture pourra faire entrer sa reproduction en diapause. Dans le cas où le nématode est au stade de vie adulte, la production d'ovocytes s'arrêtera. Néanmoins, les ovocytes déjà fécondés seront retenus dans le corps de l'hermaphrodite où ils vont éclore. Selon Félix & Braendle (2010), cela permettrait d'assurer la présence de nourriture à travers le cannibalisme du corps de l'hermaphrodite et par conséquent la survie d'un petit nombre de descendants.

## II.3 Reproduction

*C. elegans* se reproduit selon un système dit d'androdioecie, c'est à dire à travers l'existence d'hermaphrodites et de mâles au sein de la même population. Les hermaphrodites peuvent se reproduire par autofécondation. La présence de mâle est optionnelle dans la population et est issue d'une non disjonction des chromosomes sexuels ou d'une fécondation croisée — dans ce cas, 50% de la descendance sera mâle (Anderson *et al.*, 2010).

La taille de ponte d'un hermaphrodite sera limitée par sa réserve de sperme en conditions favorables (nourriture *ad libitum*), celle-ci étant produite avant les ovocytes. Lorsque l'hermaphrodite se trouve en restriction calorique, sa taille de ponte serait limitée, non plus par le nombre de cellules spermatiques, mais par la production d'ovocytes (Goranson *et al.*, 2005). Lorsqu'une fécondation croisée (hermaphrodite - mâle) existe, la taille de ponte de l'individu hermaphrodite augmente sensiblement. La fécondation croisée favorise l'existence de mâles au sein de la population. En effet, en l'absence de ce type de fécondation, l'apparition d'un mâle ne peut se faire qu'à travers la non disjonction d'un chromosome X lors de la méiose. La fréquence de cette non disjonction est faible dans les conditions de laboratoire (moins de 0,1% des cas) (Barrière & Félix, 2005a; Teotónio *et al.*, 2006). Dans la souche standard de laboratoire (souche N2), la fréquence des mâles est égale à celle de la non disjonction des chromosomes sexuels (soit  $\approx 0,1\%$ ). Selon Barrière & Félix (2005a), la fréquence de mâles de type N2, même après introduction d'un grand nombre de mâle N2 dans une population N2 ( $\approx 50\%$  de mâles), tendrait à s'équilibrer rapidement autour de la fréquence de la non disjonction des chromosomes sexuels. Cela s'expliquerait par la faible capacité de ces mâles à s'accoupler et par l'absence d'avantages évolutifs de la fécondation croisée dans cette souche. Néanmoins, ces mêmes auteurs indiquent que cette conclusion n'est pas à généraliser aux autres souches de *C. elegans*. En effet, plusieurs études ont suggéré que le maintien des mâles dans les populations androdioéciques serait un trait adaptatif permettant une facilitation des processus d'adaptations — via la fécondation croisée — et la persistance

de l'espèce — qui risquerait de s'éteindre à cause d'une accumulation de mutations délétères — (Anderson *et al.*, 2010; Morran *et al.*, 2009a; Teotónio *et al.*, 2012).



## CHAPITRE III

*Caenorhabditis elegans* en écotoxicologie

L'ÉTENDUE des connaissances sur la physiologie et la biologie de *C. elegans*, associée à sa simplicité et facilité d'élevage, font de ce nématode un organisme modèle particulièrement utilisé dans de nombreux domaines scientifiques (*e.g.* génétique, biologie du développement, biologie moléculaire, neurophysiologie, toxicologie, écotoxicologie). Bien qu'il ait été isolé par Maupas (1900), *C. elegans* a réellement émergé en tant que modèle expérimental avec la publication des travaux de Brenner (1974) (Leung *et al.*, 2008). Brenner a commencé à utiliser cet organisme pour tenter de relier le code génétique au développement des cellules, c'est à dire à la mise en place d'un organisme pluricellulaire. Brenner a été à l'origine de la souche expérimentale N2 — largement utilisée dans de nombreux laboratoires du monde entier — et à la mise au point de plans expérimentaux utilisant un milieu de croissance pour nématode, appelé NGM, largement employé. Cette publication a engendré l'utilisation croissante de *C. elegans* dans les travaux sur la biologie du développement et la génétique avec notamment des travaux sur l'ADN de *C. elegans* (Sulston & Brenner, 1974), le vieillissement (Klass, 1977), le lignage cellulaire et le développement (post-)embryogénique (Sulston, 1976; Sulston & Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983) et le mécanisme de l'apoptose (Horvitz *et al.*, 1982). Ces différents travaux sur le lignage cellulaire et les mécanismes génétiques impliqués dans l'apoptose ont été à l'origine de l'attribution du prix Nobel de Physiologie ou de Médecine à Brenner, Horvitz et Sulston en 2002 (Nobelprize.org, 2013). Ce n'est que plus tardivement que *C. elegans* a été utilisé pour analyser les effets des polluants (Boyd *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Sochová *et al.*, 2006, 2007; Swain *et al.*, 2004, 2010) ou des réponses évolutives aux polluants (Dutilleul, 2013; Dutilleul *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2008; Morran *et al.*, 2009a,b; Stewart & Phillips, 2002).

*C. elegans* a ainsi été utilisé dans un grand nombre d'études sur les effets de stressés variés tels que les polluants organiques (*e.g.* hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides) (Anderson & Wild, 1994; Dhawan *et al.*, 1999; Donkin & Williams, 1995; Gomez-Eyles *et al.*, 2009; Höss *et al.*, 2009; Stringham & Candido, 1994), les rayonnements (*e.g.* UV, radiations ionisantes) (Anderson & Wild, 1994; David *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2008), la température (David *et al.*, 2003; Dutilleul, 2013; McMullen *et al.*, 2012), les composés



pharmaceutiques (Dengg & van Meel, 2004; Williams *et al.*, 2000), les relargages de substances industrielles (Hitchcock *et al.*, 1997) ou les métaux lourds (Cioci *et al.*, 2000; Dutilleul, 2013; Mutwakil *et al.*, 1997; Stringham & Candido, 1994; Swain *et al.*, 2010; Tvermoes & Freedman, 2008). *C. elegans* est également utilisé dans le cadre d'un programme américain, le programme WormTox, d'analyse des effets toxiques de milliers de composés chimiques à l'aide de méthodes de criblage à haute fréquence (Boyd *et al.*, 2007, 2010a,b, 2009; Smith *et al.*, 2009).

Seule les études sur métaux lourds seront présentées dans cette section. En effet, notre polluant d'intérêt, l'uranium (Cf. Chapitre I, page 7) est un métal lourd radioactif. *C. elegans* peut être utilisé pour étudier les effets des métaux lourds à différentes échelles d'organisation : (i) échelle sub-individuelle (génétique, moléculaire, tissulaire), (ii) échelle individuelle (survie, croissance, reproduction...), ou (iii) échelle populationnel (taux de croissance de la population, mécanismes d'évolution...). Une synthèse de différents types d'études sur métaux lourds retrouvées dans la littérature est présentée dans le Tableau III.1 (page 27).

TABLE III.1 – Exemples d'études menées sur *C. elegans* et critères d'effet mesurés.

Milieu	Type d'étude	Agent toxique	Critère d'effet	Référence
Liquide	Sublétale	Cd, Cu, Pb	CE <sub>50</sub> 24 h (croissance, alimentation, mouvement), CE <sub>50</sub> 72 h (reproduction)	Anderson <i>et al.</i> (2001)
Sols ASTM	Survie	Cd, Cu, Pb, Zn	CL <sub>50</sub> 24 h	Boyd & Williams (2003a)
Sols autres	Survie	Cd, Cu, Pb, Zn	CL <sub>50</sub> 24 h	Boyd & Williams (2003a)
Sédiments	Sublétale	Cu	LOEC 72 h (croissance)	Höss <i>et al.</i> (1997)
Liquide	Survie	Cu	CL <sub>50</sub> 24 h	Boyd & Williams (2003b)
Liquide	Sublétale	Cu	CE <sub>50</sub> 24 h (mouvement), CE <sub>50</sub> 72 h (reproduction)	Boyd & Williams (2003b)
Liquide	Survie	Al	CL <sub>50</sub> 24 h, LOEC 24 h (survie)	Dhawan <i>et al.</i> (2000)
Liquide	Sublétale	Al, Cd, Cu, Pb, Zn	CE <sub>50</sub> 24 h (mouvement), LOEC 24 h (mouvement)	Dhawan <i>et al.</i> (2000)
Liquide	Sublétale	Cd, Cu, Hg, Pb	LOEC 96 h (développement et reproduction)	Donkin & Williams (1995)
Liquide	Survie	U	CL <sub>50</sub>	Jiang <i>et al.</i> (2009)
Liquide	Sublétale	Pb, Hg, Cd, Cr	LOEC (reproduction ou temps de génération pour une exposition de 4 h des larves L1, L2, L3, L4 ou adultes)	Guo <i>et al.</i> (2009)
Liquide	Génotoxicité	Cd, Hg, Ni, Zn	CE <sub>50</sub> 24 h, LOEC 24 h (induction <i>mtl-2</i> )	Cioci <i>et al.</i> (2000)
Agar	Survie	U	CL <sub>50</sub> 48 h	Dutilleul (2013)
Agar	Sublétale	Cd, Cu	CE <sub>50</sub> (croissance)	Harada <i>et al.</i> (2007)
Agar	Sublétale	Fe	LOEC (croissance, temps de génération, reproduc- tion, mouvement, durée de vie)	Hu <i>et al.</i> (2008)

## III.1 Outils et milieux d'études

### III.1.1 Les matrices d'étude

Les études sur *C. elegans* peuvent être réalisées sur trois types de matrices différentes : une matrice liquide, une gélosée et une composée de sol ou de sédiment.

Les travaux avec des sols ou sédiments sont les moins représentés dans la littérature du fait des difficultés inhérentes à l'utilisation de ce type de matrice (difficulté de suivre des critères tels que la croissance ou la reproduction, risque de non récupération de vers, difficulté de comparaison des études...) (Graves *et al.*, 2005). Par exemple, Boyd *et al.* (2003) ont démontré que la capacité de sorption du sol jouait fortement sur les effets toxiques des métaux et que les sols normalisés tels que celui conseillé par l'ASTM (2002), par exemple, présentait systématiquement des valeurs de CL<sub>50</sub> plus élevées que celles des sols naturels. De plus, l'utilisation de ce type de matrice rend nécessaire l'extraction des organismes avant toute mesure. Cette extraction, outre le fait qu'elle peut être incomplète (perte d'individus), limite la faisabilité de mesures de dynamiques dans le temps. Ainsi, des études sur sols, même si elles peuvent paraître plus pertinentes d'un point de vue écologique (Freeman *et al.*, 1999; Peredney & Williams, 2000), n'en restent pas moins difficilement utilisables et comparables.

En revanche, les études sur matrice liquide ont été fortement utilisées tant pour réaliser des études au niveau moléculaire, cellulaire ou individuel. Ce type de milieu est généralement utilisé pour des études de courtes durées (moins de 96 h en général) et sur des critères d'effets tels que les effets génotoxiques, la survie, la reproduction, la locomotion et le stade de développement à un temps donné (Anderson *et al.*, 2001, 2004; Boyd & Williams, 2003b; Cioci *et al.*, 2000; Dhawan *et al.*, 2000; Donkin & Williams, 1995; Guo *et al.*, 2009; Tataru *et al.*, 1998). Il est néanmoins plus difficile d'effectuer des mesures continues dans le temps en milieu liquide et les mesures sur la croissance nécessitent soit un changement de milieu (montage sur lame ou passage en milieu gélosé), soit l'utilisation d'appareillage coûteux tels que le COPAS™ (Pulak, 2006) qui permet le tri à haute vitesse des nématodes en fonction de leur taille ou de l'expression d'un gène rapporteur.

Les matrices gélosées, milieu décrit par Brenner (1974), ont également été utilisées pour l'étude des effets des métaux lourds sur *C. elegans*. Ce type de matrice permet également le suivi de critères d'effets de type génotoxiques, comportementaux, liés à la survie, la croissance, la reproduction ou le stade de développement au niveau individuel ou populationnel (Alda Álvarez *et al.*, 2005; Dutilleul, 2013; Dutilleul *et al.*, 2013; Harada *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). L'utilisation de ce type de matrice permet également un suivi dynamique facile des critères d'effets dans le temps et au cours des générations.

### III.1.2 Les outils d'étude

Selon Leung *et al.* (2008), *C. elegans* est un organisme clé pour étudier les effets sub-individuels et génotoxiques du fait du nombre important d'outils disponibles (*e.g.* souches mutantes ou transgéniques, génome

séquencé, cycle cellulaire connu). Un grand nombre d'études tirent partie de ces possibilités notamment en utilisant des souches transgéniques présentant, par exemple, l'ajout d'une partie de gène codant pour la GFP (green fluorescence protein, cf. Figure III.1, page 29) ou pour le gène *lacZ*, codant pour l'expression de la  $\beta$ -galactosidase, deux protéines facilement mesurables. Ce type de marqueurs a ainsi été utilisé pour mettre en évidence les effets précoces de métaux tels que le cadmium (David *et al.*, 2003). Le mécanisme apoptotique de *C. elegans* ainsi que son développement cellulaire étant connu (Horvitz *et al.*, 1982; Sulston, 1976; Sulston & Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983), *C. elegans* permet également l'étude de l'induction de modifications au niveau cellulaire, telles que la diminution du nombre de cellules germinales produites ou l'induction de cellules apoptotiques (Wang *et al.*, 2008).

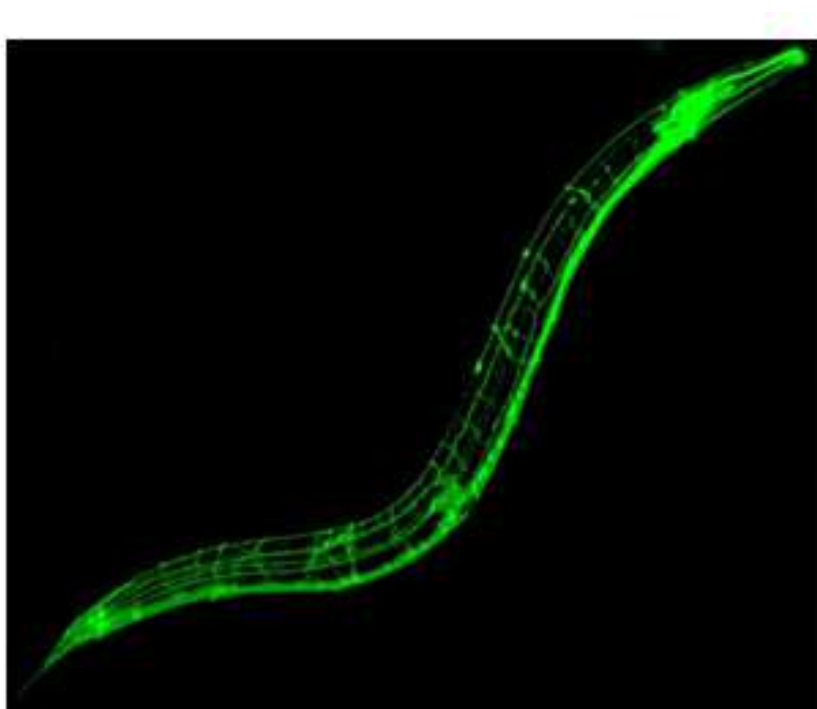


FIGURE III.1 – Marquage à la GFP du réseau neuronal de *C. elegans* (source : Inserm & ENS, 2011)

Rankin *et al.* (1990) ayant démontré l'existence d'un mécanisme d'apprentissage sensori-dépendant chez *C. elegans*, il est possible d'analyser les altérations de ce mécanisme d'apprentissage au niveau individuel en effectuant des expériences de chimiotactisme. Ainsi par exemple, des individus élevés à une température donnée dans un environnement avec nourriture ( $T_1$ ) vont, une fois transférés dans des nouvelles plaques sans nourriture avec gradient de température ( $T_{i \rightarrow j}$ ), retrouver et se déplacer vers la zone correspondant à la température d'alimentation ( $T_1$ ), grâce au fonctionnement du système apprentissage thermosensitif et à son réseau mémoriel (Mori *et al.*, 2007). Une altération de ce comportement permettrait d'obtenir des informations sur les circuits neuronaux affectés par les métaux lourds.

Les effets des métaux lourds ont également été étudiés sur des critères d'effets individuels chez *C. elegans*. Dans ce cadre, les critères d'effets les plus régulièrement retrouvés dans la littérature sont liés à la survie, la locomotion, la croissance et la reproduction des organismes. Néanmoins, certains critères d'effets moins

courant, tels que la capacité d'absorption de la nourriture ou le stade de développement à un temps donné sont également étudiés. Ces études ont été réalisées en milieu liquide, gélosé ou à l'aide de sols (naturel ou artificiel).

## III.2 Effets et réponses de *C. elegans* aux métaux lourds

### III.2.1 Les effets moléculaires

Les études utilisant des outils moléculaires ont permis de mettre en évidence la sur-expression de certains gènes protecteurs (*e.g.* gènes *numr-1*, *kel-8*, *mtl-1*, *mtl-2*, *mtl-3*) en réponse à une exposition à des métaux tels que l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le fer (Fe), le mercure (Hg), le nickel (Ni) ou le zinc (Zn) (Cioci *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007a,b; Kurz *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2008; Mutwakil *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 2007; Tvermoes & Freedman, 2008). Par exemple, la protéine KEL-8 est une protéine centrale dans le mécanisme de lutte contre les métaux de part ses interactions avec : (i) des protéines composant la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (Cui *et al.*, 2007a,b; Koga *et al.*, 2000) et (ii) les gènes *mtl-x* promoteurs des métallothionéines, protéines synthétisées dans la lutte contre les contaminations métalliques (Cioci *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2009; Swain *et al.*, 2004). Ainsi, plus d'une centaine de gènes seraient exprimés différemment (sur- ou sous-exprimés) en présence de métaux lourds (Cui *et al.*, 2007b; Freedman *et al.*, 2006).

Ye *et al.* (2008) ont démontré que l'exposition des individus à des métaux lourds tels que l'aluminium (Al) et le plomb (Pb) pouvait perturber les mécanismes d'apprentissage sensori-dépendant de *C. elegans*. Ces auteurs ayant démontré que l'ajout d'un anti-oxydant (vitamine E) tendait à réduire les effets de l'exposition à l'aluminium et au plomb, ils en ont déduit que les effets neurotoxiques de ces métaux sont liés au stress oxydant. Cette information est concordante avec l'expérience menée par Liao & Yu (2005). Ces auteurs ont exposé des nématodes *C. elegans* type sauvage et *C. elegans* présentant une mutation du gène *gcs-1* — gène de la glutamylcystéine synthétase, étape limitante dans la synthèse de l'anti-oxydant glutathion, GSH — à de l'arsenic (As) et ont démontré une plus forte sensibilité du nématode mutant *gcs-1*, confirmant une implication des enzymes anti-oxydantes dans la lutte contre les effets délétères des métaux lourds.

Certaines études ont, en revanche, conclu sur l'absence d'effets des métaux lourds au niveau sub-individuel sur *C. elegans*. Ainsi, Jiang *et al.* (2007) n'ont observé aucune dégénérescence neuronale lors d'une étude analysant la perturbation d'expression de protéines neuronales — grâce à l'utilisation de protéines couplées avec la GFP — chez des individus exposés à 1 mM d'acétate d'uranyle (<sup>app</sup>U). Neher & Stürzenbaum (2006) ont observé qu'une exposition de *C. elegans* durant deux générations à 20 µg g<sup>-1</sup> de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) n'entraînait pas l'apparition d'adduits à l'ADN.

### III.2.2 Les effets individuels

Parmi les quelques études menées sur sols, Freeman *et al.* (1999) ont mis en évidence une  $CL_{50}$  de 12,98 à 13,96 mM Cu à 24 h sur un sol de type argileux et Boyd & Williams (2003b) une  $CL_{50}$  de 2,81 mM Cu à 24 h sur un sol de type sableux. Höss *et al.* (2009) ont, quant à eux, étudié la toxicité de 22 sols contaminés à des niveaux divers par des métaux, des HAP et des huiles minérales (sols issus de lieux de contaminations historiques). Leurs résultats ont mis en évidence une inhibition de la reproduction supérieure à 40% pour 17 sols et une inhibition de la croissance supérieure à 10% pour 14 sols. La croissance était particulièrement négativement corrélée à la concentration en cuivre et en mercure des sols. Des études sur sédiment ont montré des effets du cuivre à 72 h sur la croissance à partir de 0,18 mM Cu (sédiment artificiel) ou 1 mM Cu (sédiment naturel) (Höss *et al.*, 1997) et du cadmium à 72 h sur la croissance à partir de 100 à 400 mg Cd kg<sup>-1</sup> poids humide (eaux interstitielles) ou 400 à 800 mg Cd kg<sup>-1</sup> poids humide (sédiment total) en fonction de la concentration en matières organiques (Höss *et al.*, 2001).

De nombreuses études ont été menées sur *C. elegans* exposé en milieu liquide ou gélosé. Ainsi, Anderson *et al.* (2001) ont analysé la croissance, la locomotion et l'absorption de nourriture à 24 h et la reproduction à 72 h chez *C. elegans* exposé à du cuivre, du plomb ou du cadmium en milieu liquide. Il ressort de ces expériences que le plomb présente une toxicité proche de celle du cuivre ( $CE_{50}$  reproduction = 30 et 39  $\mu$ M Pb et Cu respectivement) alors que celle du cadmium est moins élevée ( $CE_{50}$  reproduction = 151  $\mu$ M Cd). Ces résultats sont concordants avec ceux de Boyd & Williams (2003b) qui mettent en évidence, en milieu liquide, une  $CE_{50}$  reproduction à 72 h et une  $CE_{50}$  locomotion à 24 h de  $\approx 30$   $\mu$ M Cu et ceux de Dhawan *et al.* (2000) qui ont mesuré une  $CE_{50}$  locomotion à 24 h de  $\approx 50$   $\mu$ M Cu,  $\approx 40$   $\mu$ M Pb et de  $\approx 220$   $\mu$ M Cd (également mesuré  $\approx 110$   $\mu$ M Al et  $\approx 270$   $\mu$ M Zn). De la même manière, Anderson *et al.* (2004) ont observé une diminution dose dépendante de la locomotion de *C. elegans* en fonction de la concentration d'aluminium ou de plomb. Harada *et al.* (2007) ont, quant à eux, mis en évidence une diminution dose dépendante de la croissance, de la reproduction et de la durée de vie de *C. elegans* exposé à une gamme de concentration en cadmium ou en cuivre en milieu gélosé (NGM, cf. VI.1.2 page 56 et Brenner 1974). Ils ont mesuré une réduction de la taille de ponte de près de 40% à 1 mM de cadmium ou de cuivre ainsi qu'une diminution significative de la taille des individus exposés durant trois jours à 0,1 mM Cu et une inhibition totale de la croissance des individus exposés au delà de 0,3 mM Cd. Enfin, Tatara *et al.* (1998) ont analysé l'effet d'une vingtaine de métaux sur la survie de *C. elegans* en milieu liquide et ont mesuré des  $CL_{50}$  allant de  $\approx 0,3$  mM pour le fer et le plomb à près de 400-500 mM pour des métaux essentiels tels que le potassium (K) ou le sodium (Na).

Il est également intéressant de noter que selon une étude menée par Jones & Candido (1999), *C. elegans* serait capable de diminuer les effets délétères d'une substance toxique en diminuant, voir en arrêtant, son mouvement de pompage pharyngien. Ce comportement, qui conduirait à une diminution de l'ingestion de la substance toxique, serait induit pour un grand nombre de substances dont les métaux lourds.

### III.2.3 Les effets sur les populations

Peu d'études se sont intéressées à l'analyse des effets d'une pollution métallique sur une population ou sur des individus exposés durant plusieurs générations.

Dutilleul *et al.* (2013) ont analysé les changements phénotypiques apparaissant lors d'une exposition de populations *C. elegans* à de l'uranium appauvri ( $^{app}U$ ) durant trois générations. Ces auteurs ont ainsi observé l'apparition d'effets néfastes de l'uranium sur la survie, le temps de génération, la taille de ponte, la taille de l'organisme et la fréquence de body bend (changement de direction de la partie antérieure du corps) lors de la première génération d'exposition. Ces effets étaient réduits pour les faibles concentrations d'exposition aux générations deux et trois alors qu'ils étaient amplifiés (notamment en ce qui concerne la diminution de la taille de ponte) pour les fortes concentrations ( $\approx 1,1$  mM U). Une autre étude s'est intéressée à l'évolution d'une population de *C. elegans* exposée durant 22 générations à 1,1 mM d'uranium (Dutilleul, 2013). Cet auteur a mis en évidence l'apparition d'une stratégie d'évolution permettant de limiter la durée de contact avec le polluant durant les premières phases de vie (et par conséquent les effets) et d'augmenter la probabilité d'apparition d'individus génétiquement adaptés à vivre dans l'environnement pollué grâce à la sélection d'individus ayant une fertilité élevée, un temps de génération plus court et une croissance plus rapide.

D'autres études multigénérationnelles se sont intéressées à la transmission d'effets à la descendance. Ainsi, Hu *et al.* (2008) ont analysé les effets d'une exposition au sulfate de fer ( $FeSO_4$ ) sur la progéniture de *C. elegans*. Pour ce faire, des individus ont été exposés durant trois jours (P0) sur du NGM et leur progéniture (F1) a été récupérée et déposée sur des plaques non contaminées. Les générations F2 et F3 étaient également dans un environnement non contaminé. Cette étude a démontré la transmission des effets à la progéniture avec, par exemple, des effets sur la taille dose dépendant pour P0 (à partir de 2,5  $\mu M$  Fe), pour F1 (pour des P0 exposés à plus de 75  $\mu M$  Fe) et pour F3 (pour des P0 exposés à 200  $\mu M$  Fe). En ce qui concerne le temps de génération, la taille de ponte et la locomotion, des effets dose dépendant ont été mesurés à partir de 2,5  $\mu M$  Fe (P0 exposé et F1 non exposé) et 200  $\mu M$  Fe (F3 non exposé, 75  $\mu M$  Fe pour locomotion). Enfin, cette étude met en évidence une diminution de la durée de vie à partir de 75  $\mu M$  Fe (P0 exposé, F1 et F3 non exposés).

### III.2.4 Les métaux lourds, des réponses biphasiques

Certains métaux peuvent aussi induire une réponse biphasique en fonction notamment de la concentration d'exposition. Cioci *et al.* (2000) ont mis en évidence une sur-expression du gène *mtl-2* pour des concentrations faibles de cadmium ( $< 100 \mu M$ ), mercure ( $< 1 \mu M$ ), nickel ( $< 50 \mu M$ ) et zinc et une sous-expression de ce gène au-delà de ces concentrations (sauf pour le zinc). Lagido *et al.* (2009) ont étudié les effets d'une exposition chronique (19 h) en milieu liquide de *C. elegans* à des concentrations sub-létales de cadmium en utilisant une luciférase bioluminescente permettant une quantification directe du statut métabolique de l'organisme.

Ces auteurs ont mis en évidence une diminution de la bioluminescence ( $CE_{20} = 11,8 - 13 \mu\text{M Cd}$ ) liée à une réduction du niveau d'ATP pour des concentrations inférieures à  $15 \mu\text{M Cd}$  (que les auteurs attribuent à un dysfonctionnement mitochondrial) et une diminution de la bioluminescence liée à une réduction concomitante du niveau d'ATP et de la production de luciférase pour des concentrations comprises entre 15 et  $30 \mu\text{M Cd}$ . D'autres études se sont intéressées aux effets des métaux au niveau cellulaire. Ainsi, il a été démontré l'induction de corps apoptotiques dans la lignée germinale de façon concentration dépendante à partir de  $10 \mu\text{M Cd}$  (à 12 h d'exposition en milieu liquide) lors d'une exposition de jeunes adultes de *C. elegans* (Wang *et al.*, 2008). En revanche, le nombre de corps apoptotiques diminuait pour des concentrations supérieures à  $50 \mu\text{M Cd}$ . Ce résultat est expliqué par Wang *et al.* (2008) comme étant lié à une diminution drastique du nombre de noyaux mitotiques ( $\approx 40\%$  de réduction à  $100 \mu\text{M Cd}$ ) et de cellules germinales dans les gonades des individus exposés.

### III.2.5 Les métaux lourds, l'importance du stade d'exposition

Une étude a également analysé l'effet d'une exposition aux différents stades de développement sur le développement final de *C. elegans*. Les auteurs ont exposé des larves depuis les stades juveniles L2-L3, L4 ou adulte à des gammes de concentrations en cadmium, cuivre, mercure ou plomb (Donkin & Williams, 1995). Aucune influence du stade de début d'exposition n'a été mise en évidence sur la survie à 24 h ou sur la présence d'une reproduction et le stade de développement à 96 h. Au contraire, Guo *et al.* (2009), qui ont exposé des larves de *C. elegans* de stade L1, L2, L3, L4 ou des jeunes adultes durant quatre heures à des gammes de concentrations en cadmium, chrome, mercure ou plomb, ont mis en évidence une plus forte sensibilité des stades L1 à L4 que des jeunes adultes. Il est à souligner que ces auteurs ont mesuré qu'une exposition de quatre heures au stade L1 induisait une toxicité sur la reproduction comparable à une exposition d'un jour au stade adulte.

Il apparaît donc que les métaux entraînent plusieurs effets au niveau sub-individuel qui sont caractérisés par une expression différentielle de gènes (sur- ou sous-expression) liée aux mécanismes de détoxification de l'organisme, un effet sur les circuits neuronaux entraînant des perturbations des mécanismes d'apprentissage et des effets au niveau cellulaire, avec une augmentation du nombre de cellules en situation d'apoptose au niveau des gonades. Les métaux lourds induisent également des effets visibles au niveau de l'individu pour des concentrations allant de l'ordre du micromolaire au millimolaire avec, notamment, des impacts négatifs sur la taille, la reproduction, l'alimentation et la locomotion des individus. Enfin, il apparaît que les populations de *C. elegans* sont impactées par les métaux lourds avec une transmission possible des effets à la descendance et une persistance — voire une augmentation — des effets au cours des générations ainsi qu'une sélection d'individus au sein de la population.





---

## Étude de l'évolution

---

### IV.1 Les processus évolutifs

LES ORGANISMES vivants sont continuellement soumis à des processus évolutifs qui leur permettent d'adapter leur valeur sélective à leur environnement. Les phénomènes d'évolution sont observables selon deux échelles de temps et d'organisation. La première s'intéresse aux changements génétiques apparaissant sur des échelles de temps géologiques à des niveaux d'organisation supérieurs à l'espèce (tel que le clade) et émergeant généralement de mutations génétiques (Barrett & Schluter, 2008). Il s'agit de processus dits macroévolutifs, qui sont en particulier étudiés dans le domaine de la paléontologie à travers les phénomènes de spéciations et d'évolution des espèces dans le temps. À l'opposé, la microévolution s'intéresse aux changements apparaissant au sein d'une même population ou d'une même espèce sur une échelle de temps relativement courte (moins de 100 générations). Au sein d'une population, les processus microévolutifs conduisent à des changements phénotypiques des individus qui sont le résultat de bouleversements dans la fréquence allélique de certains allèles d'un ou plusieurs gènes. Il s'agit de processus qui, selon Barrett & Schluter (2008) et Reed & Frankham (2003) nécessitent la présence d'une variabilité génétique (*i.e.* présence de plus d'un allèle sur un locus) préexistante au sein de la population. Néanmoins, sur une échelle de temps courte, les processus microévolutifs ne sont pas la seule cause à l'origine des modifications phénotypiques observables qui peuvent résulter de (i) processus d'acclimatation (ou adaptation phénotypique), (ii) de processus microévolutifs (ou adaptation génétique), de (iii) dérive génétique ou (iv) de mutations (neutres ou à valeur adaptative). La dérive génétique est un processus intervenant lorsque la taille de la population est réduite du fait, par exemple, d'accidents ou de forces de sélection. En effet, la maintenance de la diversité génétique d'une population est liée à sa taille sur le long terme (Reed *et al.*, 2003; Willi & Hoffmann, 2009). Les processus d'adaptation sont des processus de changements des individus au sein d'une population leur permettant de mieux faire face aux conditions environnementales et par lesquels les individus vont acquérir des traits phénotypiques qui vont améliorer leur survie et leur succès reproducteur dans l'environnement en

question (Bijlsma & Loeschcke, 2005; Cole, 1954). Les changements induits peuvent être le résultat de la plasticité phénotypique des organismes (*i.e.* capacité pour un génotype de modifier son phénotype en fonction des conditions environnementales). On parle alors d'adaptation phénotypique (Bijlsma & Loeschcke, 2005; Pigliucci, 2005; Scheiner, 1993). Cette influence de l'environnement sur les traits phénotypiques était déjà reconnue du temps de Darwin, ce dernier la présentant comme étant une difficulté à comprendre pour discriminer la part de changement phénotypique liée à la sélection et celle liée à l'environnement (Darwin, 1859). Le recours à la plasticité phénotypique n'est pas toujours favorisé par rapport aux autres stratégies d'évolution existantes. En effet, la plasticité phénotypique peut se révéler coûteuse pour l'organisme (contraintes liées aux coûts de maintenance de la plasticité, à l'acquisition d'informations environnementales, contraintes fonctionnelles, physiologiques, etc ; DeWitt *et al.*, 1998). Les modifications phénotypiques liées aux processus d'adaptations génétique vont, quant à eux, résulter d'une modification de la fréquence des allèles en réponse à une pression de sélection exercée par l'environnement (Bijlsma & Loeschcke, 2005), il s'agit de la sélection naturelle.

La sélection naturelle est reconnue comme étant une des causes de la mise en œuvre des processus d'adaptation génétique des populations (Dias, 2010; Hendry *et al.*, 2008; Hendry & Kinnison, 2001; Hendry *et al.*, 2007; Miaud & Merilä, 2001). En effet, les processus adaptatifs liés à la sélection naturelle sont plus rapides à mettre en œuvre du fait de la préexistence d'allèles bénéfiques avec une fréquence plus ou moins élevée au sein de la population (Innan & Kim, 2004) alors que l'adaptation liée à l'acquisition de nouvelles mutations bénéfiques nécessite que cette mutation se répande dans la population à partir d'un seul individu (West-Eberhard, 2003). Selon MacArthur & Wilson (1967), l'évolution, en lien avec les fluctuations environnementale, conduit les espèces à deux stratégies d'évolution : (i) la stratégie de type  $r$  et la stratégie de type  $K$ . La première (sélection  $r$ ) sera caractérisée par des individus présentant un développement rapide, une fertilité précoce, une petite taille, une durée de vie courte et une production élevée, alors que la seconde (stratégie  $K$ ) se caractérise par des individus présentant un développement lent, une reproduction tardive, une plus grande taille, une durée de vie longue et une productivité efficace et stable (Dajoz, 2006). La sélection naturelle peut intervenir au niveau local entraînant alors une adaptation locale. L'adaptation locale est une cause de différenciation génétique et phénotypique des populations soumises à des pressions de sélection liées à un environnement délimité au cours de l'évolution (Williams, 1966). Ainsi, une population localement adaptée sera déterminée par un ensemble de caractéristiques génétiques et phénotypiques qui vont lui permettre d'avoir une valeur sélective plus élevée face aux conditions environnementales locales que des populations originaires d'autres habitats (Hedrick, 2006; Hendry & Gonzalez, 2008; Sotka, 2005). La sélection naturelle qui intervient dans le milieu naturel agit directement sur des phénotypes polygéniques complexes tels que les traits d'histoire de vie et entraîne des modifications dans la fréquence de nombreux allèles (Dias, 2010; Falconer & Mackay, 1996). Cela risque d'amener les populations dans des compromis évolutifs, via notamment des phénomènes de pléiotropie (locus affectant au moins deux traits phénotypiques). Lorsqu'un tel compromis évolutif existe, la modification d'un trait induisant un effet bénéfique sur la valeur sélective

des individus composant la population peut être concomitante avec la modification d'un trait entraînant un effet délétère (Roff, 2007). Il en résulte une diminution de la capacité des individus à évoluer.

## IV.2 Évolution expérimentale

Le début des études d'évolution expérimentale date des années 1930 avec les travaux de Gause (Gause, 1932, 1935) qui visaient à vérifier les modèles de croissance de population de Lotka et Volterra (Dajoz, 2006). Selon Garland Jr (2003), une étude d'évolution expérimentale vise à analyser l'évolution en conditions contrôlées, reproductibles et réalistes. L'étude permet d'observer, en un nombre suffisant de générations, les éventuelles modifications des architectures phénotypiques et génétiques d'une population d'intérêt. Ce type d'expérience, réalisée en laboratoire ou en milieu naturel, fait appel à de la sélection naturelle et vise à soumettre une population à une altération de son environnement susceptible d'entraîner une réponse adaptative et à mesurer les modifications de traits phénotypiques d'intérêts afin de comprendre les processus de sélection et les conséquences éventuelles sur les populations (Fuller *et al.*, 2005; Kawecki *et al.*, 2012). Il s'agit, selon Reznick & Ghalambor (2005) du meilleur plan d'expérience permettant d'appréhender les mécanismes de la sélection naturelle. Ce type d'expérience diffère de la sélection artificielle, qui vise, quant à elle, à forcer la sélection sur un trait précis en sélectionnant les individus reproducteurs en fonction du trait phénotypique d'intérêt afin de le propager à la génération suivante (Fuller *et al.*, 2005; Garland Jr, 2003).

La réalisation d'expériences d'évolution expérimentale nécessite de prendre en compte plusieurs caractéristiques décrites par Kawecki *et al.* (2012). Ainsi, (i) il est nécessaire de travailler sur un organisme présentant un cycle de vie court et qui soit facilement manipulable en laboratoire. (ii) La population d'origine utilisée devra aussi présenter une diversité génétique élevée afin de permettre une évolution sur un nombre de générations raisonnable — souvent inférieur à 100 générations — en fonction de la durée du cycle de vie de l'organisme (de quelques heures pour les microbes à plusieurs mois pour les plantes). À noter que certaines études d'évolution expérimentale, dites à long terme, sont en cours depuis plus de 20 ans, notamment sur *Escherichia coli*, représentant plusieurs dizaines de milliers de générations d'études (Blount *et al.*, 2008). (iii) La population étudiée doit présenter une taille de population suffisante pour éviter l'apparition de phénomènes de dérive génétique et éviter de biaiser, de ce fait, l'interprétation faite sur le processus de sélection (Willi & Hoffmann, 2009). (iv) Il est enfin nécessaire de dériver au minimum deux populations depuis la population ancestrale, dont une sera conservée en environnement contrôlé non soumise à la sélection afin de permettre des comparaisons liées à la pression de sélection étudiée. Néanmoins, la population contrôlée étant susceptible d'évoluer durant l'expérience du fait de facteurs non contrôlés, il est nécessaire d'analyser les résultats obtenus sur les populations dérivées en regard de ceux obtenus sur la population ancestrale.

Les études d'évolution expérimentale doivent faire face à plusieurs contraintes et limites. Il est ainsi nécessaire de prendre en compte l'existence des autres forces de sélection tels que les mutations, la dérive génétique ou encore le flux de gènes (*i.e.* échange de gènes ou d'allèles entre populations apparentées) et de les contrôler en laboratoire afin de pouvoir étudier les phénomènes de sélection naturelle (Cooper & Lenski,

2000; Dutilleul, 2013; Kawecki & Ebert, 2004; Rundle & Nosil, 2005). L'expérimentateur va aussi apporter sa propre force de sélection, ne serait-ce que du fait des variations accidentelles ou aléatoires des conditions environnementales, ou du protocole expérimental qui est susceptible d'entraîner des sélections non désirées et non contrôlées (Beaudouin *et al.*, 2012a; Dias, 2010; Goussen *et al.*, 2013b). Cette force de sélection sera néanmoins prise en compte par la population témoin. Enfin, d'autres phénomènes doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats d'une étude d'évolution expérimentale. Il s'agit, par exemple, des phénomènes épigénétiques (*i.e.* modifications génétiques sans modification de la séquence nucléotidique) ou des effets maternels (*i.e.* influence de l'environnement maternel sur l'expression phénotypique de la descendance) qui peuvent altérer à la fois la dynamique et les résultats d'une évolution (Day & Bonduriansky, 2011; Räsänen & Kruuk, 2007).

### IV.3 Évolution en condition de stress

Les stress environnementaux sont des forces d'adaptation majeures qui peuvent significativement impacter les processus écologiques et évolutifs et par conséquent, les structures génétiques, l'évolution des populations et le fonctionnement des écosystèmes (Bijlsma & Loeschcke, 2005; Medina *et al.*, 2007). Selon Bijlsma & Loeschcke (2005), une augmentation des études concernant l'évolution adaptative des populations est perceptible depuis les années 1990, essentiellement en réponse à une prise de conscience grandissante de la société de l'impact des activités anthropiques qui causent dans de nombreux cas des changements rapides, stressant et détériorant sur les populations. Selon Medina *et al.* (2007), les microévolutions dues à des pollutions peuvent altérer différentes propriétés de la population exposée à cause de coûts liés à l'évolution (*e.g.* perte de diversité génétique, modifications physiologiques). Cet auteur a listé plusieurs types d'effets liés à l'évolution en condition de stress pouvant impacter directement et durablement la structure des communautés et le fonctionnement des écosystèmes : (i) élimination des espèces sensibles ou leur remplacement par d'autres espèces du fait des phénomènes de compétition entre espèces, (ii) modification de la chaîne alimentaire du fait d'un changement dans la densité des prédateurs et/ou des producteurs primaires. L'impact sur les communautés et les écosystèmes peut enfin découler des phénomènes (iii) d'acclimatation ou (iv) d'adaptation génétique. L'évolution engendrée par un stresser est souvent considérée comme étant liée à une sélection directionnelle (Coutellec & Barata, 2011; Morgan *et al.*, 2007). Il s'agit d'un mode de sélection où un phénotype particulier sera favorisé, entraînant une modification des fréquences alléliques dans une direction unique (augmentation ou diminution) indépendamment du niveau de dominance de l'allèle.

Posthuma & Straalen (1993) ont effectué une revue des travaux ayant mis en évidence une adaptation d'invertébrés à des milieux terrestres pollués. Ils ont mis en évidence le fait qu'une pression de sélection élevée liée à un stresser favoriserait une augmentation de la résistance aux polluants. Cette évolution en condition de stress peut être très rapide. Ainsi, Klerks & Levinton (1989) ont mesuré une augmentation, en moins de quatre générations au laboratoire, de la résistance d'un invertébré benthique, *Limnodrilus hoffmeisteri*, exposé à une forte pression de sélection en cadmium et en nickel. De la même manière, Shirley

& Sibly (1999) ont mesuré une amélioration de la valeur sélective de *Drosophila melanogaster* exposée à du cadmium en moins de 20 génération. Dutilleul *et al.* (2013) ont, quant à eux, mis en évidence l'apparition de modifications phénotypiques chez des populations de *C. elegans* exposées à de l'uranium durant trois générations et une adaptation à l'uranium et au NaCl en moins de 22 générations (Dutilleul, 2013). Ces travaux ont mis en évidence le choix d'une stratégie d'évolution de type  $r$  pour les individus exposés à de l'uranium avec l'apparition d'une fertilité élevée, d'un temps de génération court et d'une croissance plus rapide. Au contraire, les individus exposés au NaCl présentaient un temps de génération plus long, une fertilité réduite ainsi qu'une survie plus importante avant la maturité sexuelle, ce qui pourrait correspondre à une stratégie d'évolution de type  $K$ .



---

## Modélisation mécanistique au niveau individuel en écotoxicologie

---

LA MODÉLISATION mécanistique permet d'intégrer mathématiquement des processus toxicologiques et biologiques à l'analyse des données d'écotoxicologie et d'étudier les interactions entre ces processus. Elle est également un outil de choix pour inférer des valeurs de paramètres non mesurables physiologiquement, émettre et tester différentes hypothèses, réaliser des prévisions (à une échelle de temps plus importante que le temps d'expérience), ou encore, extrapoler à d'autres conditions expérimentales ou concentrations d'exposition que celles qui ont permis de calibrer le modèle (Poggiale, 2009; Vindimian, 2000).

### V.1 Modélisation des effets sur les individus : approches toxicocinétique / toxicodynamique

La modélisation des effets d'un toxique sur un organisme nécessite généralement deux étapes : une première prenant en compte la dynamique d'internalisation du composé (toxicocinétique) et une seconde décrivant la dynamique des dommages causés par le composé et des éventuelles réparations de l'organisme (toxicodynamique) (Ashauer *et al.*, 2006; Ashauer & Brown, 2008; Péry *et al.*, 2001), partant du principe que l'effet est relié à la concentration interne et non à la concentration d'exposition.

En l'absence de la prise en compte de la cinétique d'internalisation, les sorties des modèles sont inféodées aux temps de mesure. Ainsi, une concentration d'effet ( $CE_x$ ) calculée pour une exposition à  $t_i$  ne sera pas forcément identique à une  $CE_x$  calculée pour une exposition à  $t_j$ . Le couplage toxicocinétique / toxicodynamique (TKTD) permet de relier ces mesures à des temps différents avec un même jeu de paramètres.

#### V.1.1 Toxicocinétique

Selon Ashauer *et al.* (2006), l'approche standard pour modéliser la toxicocinétique d'un toxique dans un organisme pose l'hypothèse que l'effet du toxique n'altère pas les cinétiques d'entrée et de sortie du toxique. L'équation communément utilisée dans cette approche est la suivante :



$$\frac{dC_i}{dt} = k_a C - k_e C_i \quad (\text{V.1})$$

avec  $C_i$  la concentration en toxique internalisée,  $C$  la concentration en toxique présente dans le milieu et  $k_a$  et  $k_e$  respectivement les taux d'absorption et d'élimination du toxique. Ce modèle de toxicocinétique est un modèle simple à un compartiment qui a pour avantage d'avoir (i) des taux d'absorption et d'élimination mesurables et (ii) des méthodes disponibles d'estimation des paramètres (Ashauer *et al.*, 2006; Péry, 2006). Néanmoins, ce type de modèle ne prend pas en compte le phénomène de dilution de la concentration interne liée à la croissance de l'individu. Pour ce faire, une équation prenant en compte cette dilution a été proposée (Kooijman & Bedaux, 1996a,c) :

$$\frac{dc_q}{dt} = C \frac{k_e f}{l} - c_q \left( \frac{k_e f}{l} + \frac{d \ln l^3}{dt} \right) \quad (\text{V.2})$$

avec  $c_q$  la concentration interne normalisée par le facteur de bioconcentration (BCF),  $f$  le taux d'ingestion actuel divisé par le taux d'ingestion maximal pour la taille actuelle et  $l$  la taille normalisée par la taille maximale de l'individu.

Une autre approche modélisant la toxicocinétique fait appel aux modèles pharmacocinétiques physiologiques (physiologically based pharmacokinetic, PBPK). Ce type de modèle est capable de prédire quatre processus pharmacocinétiques que sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) de substances chez un organisme (Bois *et al.*, 2010). Il s'agit de modèles mécanistiques reposant sur une description physiologique et anatomique des différents compartiments de l'organisme étudié et des interactions entre ces compartiments grâce aux fluides de l'organisme (Andersen *et al.*, 2005; Bois *et al.*, 2010; Gerlowski & Jain, 1983). Néanmoins, les modèles de type PBPK nécessitent souvent l'utilisation d'un grand nombre de paramètres (Gelman *et al.*, 1996) qui sera fonction du nombre de compartiments décrits.

### V.1.2 Modèles toxicodynamiques en écotoxicologie

La prise en compte des effets d'un toxique peut être faite selon deux approches majeures. La première va s'intéresser aux récepteurs cibles du toxique et la seconde à l'impact du toxique sur le cycle de l'énergie.

Les modèles basés sur l'équation de Hill (Hill, 1910) sont des modèles partant d'hypothèses mécanistiques robustes (Vindimian, 2000) qui posent l'hypothèse que l'effet est proportionnel à la proportion de récepteurs moléculaire liés à un toxique. En effet, l'équation de Hill s'écrit de la manière suivante :

$$p = \frac{C_i^{nH}}{k_d + C_i^{nH}} \quad (\text{V.3})$$

avec  $p$  la proportion de récepteurs liés à un toxique,  $k_d$  la constante de dissociation et  $nH$  le nombre de Hill (correspondant, dans le contexte écotoxicologique, à la pente au point d'inflexion de la relation dose-réponse ; Adam *et al.*, 2009). Ce type de modèle permet de calculer des amplitudes d'effet ( $CE_x$ ) en fournissant une justification biologique aux modèles de régression statistique utilisés en routine (Péry, 2006; Vindimian, 2000). Selon Ritz (2010), le modèle de Hill est souvent comparé aux modèles log-logistiques à trois paramètres (*i.e.* asymptote inférieure fixée à 0, soit un effet fixé à 100% pour les fortes concentrations) communément utilisés dans la détermination des courbes de dose-réponse en (éco)toxicologie. Les modèles basés sur l'équation de Hill sont des modèles qui s'ajustent généralement bien aux données (éco)toxicologiques (Adam *et al.*, 2009; Vindimian, 2000). Néanmoins, ce type de modèle ne parvient que difficilement à prendre en compte les critères d'effets complexes (*e.g.* modification des taux de croissance, de reproduction ou de pente de l'effet). La simplicité de mise en œuvre de ce type d'analyse permet d'effectuer des analyses préliminaires rapides et comportant une certaine pertinence biologique, qui devront être complétées par des analyses mécanistiques plus poussées.

Les modèles d'effets basés sur des perturbations bioénergétiques sont parmi les modèles d'analyse des données d'écotoxicologie les plus aboutis et les plus pertinents biologiquement. Ces modèles présentent des avantages importants tels qu'une base physiologique solide (Brown *et al.*, 2004; Kooijman, 2010), un ajustement possible simultanément sur des données de reproduction et de croissance (Jager *et al.*, 2004) ainsi que des critères d'effets intégrables lors de l'analyse des effets au niveau de la population (Beaudouin *et al.*, 2012a). Les principaux modèles bioénergétiques sont développés dans la section suivante, puis les modèles dose-réponse pouvant être couplés aux modèles bioénergétiques seront ensuite abordés.

## V.2 Les modèles bioénergétiques

Selon Jørgensen (2008), les modèles de type biogéochimique et bioénergétique utilisent généralement des systèmes d'équations différentielles pour exprimer les dynamiques et les changements dans les variables d'état sont exprimés comme étant les processus entrants moins les processus sortants. Ces modèles sont en effet basés sur des principes de conservation de la masse ou de l'énergie.

À l'heure actuelle, deux théories bioénergétiques dominent. Il s'agit de la Metabolic Theory of Ecology (théorie métabolique de l'écologie : MTE) (Brown *et al.*, 2004) et de la théorie Dynamic Energy Budget (budget d'énergie dynamique : DEB) (Kooijman, 2010). Ces deux théories sont fondées sur des descriptions mécanistiques simples mais réalistes de l'acquisition et de l'utilisation de l'énergie par les organismes (van der Meer, 2006b). Une comparaison des deux théories est présentée dans le Tableau V.1 (page 45).

D'autres modèles bioénergétiques ont été proposés. Il s'agit notamment des modèles de croissance ontogénétique proposés par West *et al.* (2001) et Gillooly *et al.* (2002). Ces modèles constituent un cadre général décrivant le développement ontogénétique d'un organisme. Néanmoins, selon Makarieva *et al.* (2004), ces modèles présentent plusieurs inconsistances dont (i) une violation des lois de conservation de l'énergie, l'incapacité de prédire ou d'expliquer (ii) le budget d'énergie des organismes durant la phase de développement embryonnaire, (iii) les changements de taux métaboliques durant la transition de phase embryonnaire à phase post-embryonnaire ainsi que (iv) les différences entre les paramètres de la croissance embryonnaire des différents taxa. Un autre type de modèle bioénergétique avait été proposé par Lika & Nisbet (2000) et Nisbet *et al.* (2004). Ces modèles, proches de la théorie DEB, diffèrent de celui proposé par Kooijman (2010) car ils posent l'hypothèse que les coûts de maintenance sont soustraits des produits de l'assimilation avant l'allocation aux autres processus métaboliques (van der Meer, 2006a). Kooijman (2000, pp. 365) souligne divers points théoriques contredisant ce type de modèle. Ainsi, selon cet auteur, les individus ne se nourrissant pas (*e.g.* embryons ou organismes en restriction calorique forte) doivent quant même payer des coûts de maintenance, ce qui nécessite un stockage préalable de l'énergie.

### V.2.1 Les théories bioénergétiques majeures : DEB et MTE

La MTE se concentre sur la compréhension de l'interface entre la physiologie, l'écologie et l'évolution, le tout basé sur les variations des taux métaboliques de l'organisme (Allen & Gillooly, 2009; Brown *et al.*, 2004). Selon Brown *et al.* (2004), la MTE peut prédire comment le taux métabolique contrôle les processus écologiques à tous les niveaux d'organisation — de l'individu à la biosphère — en prenant en compte les taux d'ingestion de ressources ainsi que leurs allocations à la survie, à la croissance et à la reproduction. Selon ces mêmes auteurs, cette théorie montre explicitement comment de nombreuses structures et dynamiques écologiques peuvent être expliquées en prenant en compte la façon dont la taille d'un organisme, sa cinétique chimique et son approvisionnement en ressources affectent son métabolisme. Van der Meer (2006b) indique que la MTE pose l'hypothèse du transport des ressources à travers un réseau ramifié de type fractal, ce qui conduit à un taux d'approvisionnement des cellules à une puissance  $\frac{3}{4}$  de la masse corporelle. Selon ce même auteur, le noyau de la théorie est basé sur la façon dont les taux métaboliques d'un organisme varient avec la température et la taille dudit organisme. Brown *et al.* (2004) posent l'hypothèse que les effets de la taille de l'organisme et de la température sur les taux métaboliques d'un organisme individuel régissent les caractéristiques au niveau des populations, communautés et écosystèmes. Selon Price *et al.* (2012), de nombreuses extensions à la MTE ont été publiées, néanmoins, certaines d'entre elles correspondraient plus à de nouvelles théories qu'à une réelle confirmation de la théorie existante.

La théorie DEB (Kooijman, 1986, 1993, 2000, 2010) est développée depuis les années 1980 et s'intéresse à l'allocation de l'énergie au sein de l'organisme. Cette théorie vise à relier les processus physiologiques d'un organisme dans un même cadre conceptuel. La théorie DEB décrit les principales fonctions biologiques d'un organisme (nutrition, assimilation, croissance, reproduction, maintenance et vieillissement) à l'aide de

modèles mathématiques mécanistiques. L'objectif de cette théorie est de démontrer la possibilité de dériver de nombreuses variables écologiques et physiologiques à partir d'hypothèses sur les aspects quantitatifs des budgets d'énergie (Kooijman, 1986). Un modèle suivant la théorie DEB va, par conséquent, décrire les taux auxquels un organisme assimile et utilise de l'énergie pour sa maintenance, sa croissance et sa reproduction (van der Meer, 2006a). Cette théorie suppose l'existence d'une loi dite loi  $\kappa$  (kappa) (Péry, 2006; van der Meer, 2006a). Ainsi, une fraction  $\kappa$  de l'énergie serait allouée à la maintenance somatique et à la croissance, et une fraction  $1 - \kappa$  serait allouée à la maturité et à la reproduction. La théorie DEB pose l'hypothèse que les taux des processus physiologiques basiques d'un organisme sont de type allométrique (*e.g.* :  $y = ax^b$ ) et sont proportionnels à la surface ou au volume de l'organisme (Kooijman, 1986, 2011b; van der Meer, 2006b). Selon ces mêmes auteurs, la théorie DEB prédit de nombreux types de relations d'échelle intra- et inter-spécifique et aussi du niveau individuel à la population et au-delà.

Dans le cadre de ce projet, un modèle basé sur la théorie DEB a été choisi. En effet, bien que l'utilisation de la MTE soit grandissante, cette théorie présente encore de nombreuses inconsistances internes, hypothèses non testées — voire pour certaines non validées par les données — et présente des difficultés à expliquer les variations pouvant exister entre les espèces (Price *et al.*, 2012). *A contrario*, la théorie DEB est développée depuis 1986 et a été éprouvée depuis.

TABLE V.1 – Comparaison des modèles de croissance des théories MTE (Brown *et al.*, 2004) et DEB (Kooijman, 2010) (d'après van der Meer 2006b)

	MTE	DEB
Variables d'état	Masse corporelle	Taille structurelle et réserves
Module d'alimentation (rend la croissance sensible à la disponibilité de la nourriture)	Non	Oui
Taux d'assimilation	$\propto W^{\frac{3}{4}}$ (au sein de l'espèce)	$\propto V^{\frac{2}{3}}$
Taux de maintenance	$\propto W$ (au sein de l'espèce)	$\propto V$ (au sein de l'espèce)
Taux d'assimilation taille dépendant	Ne s'adapte pas avec la taille finale (entre les espèces)	S'adapte avec $V_{\infty}^{\frac{1}{3}}$ (entre les espèces)
Taux de maintenance taille dépendant	S'adapte avec $W_{\infty}^{-\frac{1}{4}}$ (entre les espèces)	Ne s'adapte pas avec la taille finale (entre les espèces)
Coût de croissance	Contenu en énergie du tissu néoformé	Somme du contenu en énergie du tissu néoformé et des coûts supplémentaires nécessaires à cette production
Paramètre d'échelle intra-spécifique pour les taux métaboliques	1	Entre $\frac{2}{3}$ et 1
Paramètre d'échelle inter-spécifique pour les taux métaboliques	$\frac{3}{4}$	Entre $\frac{2}{3}$ et 1

W représente la masse corporelle et V le volume structurel

### V.2.2 La théorie DEB

La théorie DEB repose sur cinq concepts fondamentaux d'homéostasie (Kooijman, 2010, 2011b).

**Homéostasie forte :** constance stricte de la composition chimique des réservoirs (contrainte stœchiométrique de la synthèse des composés généralisés),

**Homéostasie faible :** constance de la composition chimique d'un organisme tant que la disponibilité du substrat (*i.e.* type de nourriture) demeure constante dans l'environnement, et ce, même si la croissance de l'organisme continue. L'homéostasie faible implique une contrainte sur la dynamique des réservoirs.

**Homéostasie structurelle :** constance de la forme de l'individu au cours de la croissance (Surface  $\propto V^{\frac{2}{3}}$ ),

**Homéostasie thermique :** constance de la température du corps,

**Homéostasie d'acquisition :** constance du taux d'alimentation (indépendamment de la disponibilité de la nourriture).

Les équations des modèles DEB utilisent une notation particulière. Ainsi un terme surmonté d'un point (*e.g.*  $\dot{\nu}$ ) indique un taux (par dimension de temps), un terme entouré de crochets (*e.g.*  $[E]$ ) indique une quantité par unité de volume structurel et un terme entouré d'accolades (*e.g.*  $\{E\}$ ) indique une quantité par unité de surface structurelle. À noter que les modèles DEB peuvent utiliser des paramètres composés afin de simplifier le modèle et de réduire le nombre de paramètres différents à estimer. Ainsi, par exemple, le paramètre  $g = \frac{[E_G]}{\kappa \frac{\{p_{Am}\}}{\dot{\nu}}}$ . L'ensemble des paramètres et paramètres composés du DEB sont présentés dans Kooijman (2010, pp. 498–503).

La théorie DEB fait appel à deux variables d'état qui sont la *structure* ( $V$ ) et la *réserve énergétique* (densité d'énergie  $[E] = \frac{V}{E}$ ). Cette partition de la biomasse entre réserve et structure est rendue nécessaire afin de prendre en compte certaines hypothèses (Kooijman, 2010, 2011b). Ainsi, ces auteurs indiquent que cette partition permet d'inclure une mémoire métabolique dans la théorie, de lisser les fluctuations dans la disponibilité des ressources et de prendre en compte la dépendance entre la composition chimique d'un individu et son taux de croissance. Selon eux, la partition de la biomasse permet également d'obtenir plusieurs points de compréhension et d'explication de mécanismes intrinsèques aux individus. Ainsi, avec cette partition, il devient possible de comprendre pourquoi les flux de masse sont la somme linéaire de trois flux d'énergie de base (assimilation, dissipation, croissance), d'expliquer les tendances observées dans la respiration et dans les relations liées à la taille du corps normalisée, et de comprendre comment les cellules « décident » d'utiliser un substrat en tant que source d'énergie ou de construction.

Il est important de noter que si la structure doit être maintenue, ce n'est pas le cas de la réserve.

En plus de ces deux variables d'état, la théorie DEB utilise douze paramètres primaires (Kooijman, 2010; van der Meer, 2006a) :

1. taux de recherche surface spécifique  $\{\dot{F}_m\}$ ,

2. efficacité d'assimilation  $\kappa_X$ ,
3. taux d'assimilation maximal surface-spécifique  $\{\dot{p}_{Am}\}$ ,
4. conductance de l'énergie  $\dot{\nu}$ ,
5. fraction allouée au soma  $\kappa$ ,
6. efficacité de la reproduction  $\kappa_R$ ,
7. taux de maintenance somatique volume-spécifique  $[\dot{p}_M]$ ,
8. taux de maintenance somatique surface-spécifique  $\{\dot{p}_T\}$ ,
9. coefficient du taux de maintenance de la maturité  $\dot{k}_J$ ,
10. coûts énergétiques de la croissance par unité de croissance dans le volume structurel  $[E_G]$ ,
11. maturité à la naissance  $E_H^b$ ,
12. maturité à la puberté  $E_H^p$ .

L'étude de ces paramètres indique que cette théorie prend en compte la maturité à la naissance et à la puberté. Ainsi, la théorie DEB décrit trois grandes phases de la vie. La phase embryonnaire où l'organisme ne se nourrit pas et ne se reproduit pas, la phase juvénile où l'organisme se nourrit mais ne se reproduit pas et la phase adulte où l'organisme se nourrit et se reproduit. Ces phases sont respectivement séparées par les étapes de la naissance (embryon  $\rightarrow$  juvénile) et de la puberté (juvénile  $\rightarrow$  adulte).

Le modèle DEB standard issu de la théorie s'intéresse aux organismes isomorphes composés d'une réserve, d'une structure et se nourrissant sur un type de nourriture (Kooijman, 2010, 2011b). Ce type de modèle s'applique, en théorie, à une grande partie des animaux. Il peut néanmoins ne pas être approprié pour des organismes qui peuvent nécessiter plusieurs réserves et/ou plusieurs structures (*e.g.* plantes) ou ne pas avoir une croissance de type isomorphe (*e.g.* bactéries).

### V.3 Les modèles toxicodynamiques appliqués à l'analyse des perturbations bioénergétiques

Les modèles dose-réponse pourront être appliqués sur un paramètre en particulier du modèle bioénergétique, ce qui permet de déterminer le mode d'action du toxique. En effet, il sera possible de mesurer un critère de qualité d'ajustement qui permettra de choisir le type d'effet s'ajustant le mieux aux données.

#### V.3.1 Méthodes basées sur le modèle DAM

Les modèles de type « Damage Assessment Model » (Lee & Landrum, 2006; Lee *et al.*, 2002) posent l'hypothèse que les effets sont proportionnels aux dommages accumulés avec le temps et que la vitesse d'apparition de l'effet est proportionnelle à la concentration internalisée (Péry, 2006). L'équation de base de ce type de modèle se présente sous la forme :

$$\frac{dD}{dt} = k_a C_i - k_r D \quad (\text{V.4})$$

où  $D$  représente les dommages accumulés avec le temps,  $k_a$  le taux d'accumulation des dommages et  $k_r$  le taux de réparation des dommages.

L'avantage des modèles de type DAM est qu'ils ne posent intrinsèquement pas d'hypothèse quant à la possible réversibilité des effets. Ainsi, un  $k_r$  supérieure à 0 permettra une possible réversibilité d'effet alors qu'un  $k_r$  de 0 sera indiqué si les effets sont réputés irréversibles.

Bien que ce type de modèles soit bien adapté à l'analyse des effets d'un toxique, il présente quelques inconvénients. Ainsi, selon Péry (2006), les modèles DAM, tout comme les modèles basés sur l'équation de Hill, modélisent mécanistiquement les effets au niveau cellulaire — voire moléculaire — et supposent une relation linéaire avec les effets au niveau individuel. Or les organismes vivants ont la capacité de gérer les perturbations cellulaires et moléculaires de faible intensité sans impacts sur les grandes fonctions physiologiques de l'organisme (Kooijman & Bedaux, 1996c; Kooijman, 2000, 2010, Chap. 6). Pour ces raisons, les modèles de type DAM sont peu utilisés dans la littérature.

### V.3.2 Modèle à seuil de concentration sans effet : le modèle DEBtox

Les modèles DEB appliqués à l'étude des données d'(éco)toxicologie (modèles DEBtox) ont été mis au point par Kooijman & Bedaux (1996a,b,c) et corrigés par Billoir *et al.* (2008b). Ce type de modèle pose l'hypothèse que l'effet sur un paramètre du modèle DEB apparaît lorsque la concentration interne en toxique dépasse un seuil appelé concentration sans effets (NEC, no-effect concentration).

L'utilisation des modèles de type DEBtox est une méthode pertinente pour l'analyse des effets d'un toxique sur les organismes. En effet, les modèles DEBtox permettent la prise en compte simultanée de plusieurs critères d'effets — tels que la croissance et la reproduction — et les paramètres estimés sont indépendants du temps d'exposition au toxique (Billoir *et al.*, 2008b; Jager *et al.*, 2004). De plus, les modèles de type DEBtox, qui permettent généralement une bonne représentation des effets, font partie des modèles les plus aboutis pour l'étude des effets toxiques (Ashauer *et al.*, 2006; Péry, 2006) et peuvent prendre en compte des variations de la concentration d'exposition (Péry *et al.*, 2002a). Ces modèles ont enfin été utilisés sur des organismes provenant de plusieurs niveaux trophiques et d'écosystèmes différents tels que les crustacés et micro-invertébrés (Billoir *et al.*, 2008a, 2007; Kooijman & Bedaux, 1996a; Massarin, 2010; Péry *et al.*, 2003a, 2002a,b), les mollusques (Bourlès *et al.*, 2009; Cardoso, 2007; Ducrot *et al.*, 2010; Pouvreau *et al.*, 2006; Zimmer *et al.*, 2012; Zimmer, 2013), les poissons (Augustine, 2012; Augustine *et al.*, 2011; Einarsson *et al.*, 2011; Pecquerie *et al.*, 2009) ou les nématodes (Alda Álvarez *et al.*, 2006a, 2005, 2006b; Jager *et al.*, 2005; Swain *et al.*, 2010; Wren *et al.*, 2011).

Les modèles DEBtox peuvent être mis en œuvre pour étudier plusieurs types d'effets tels que des modifications physiologiques (*e.g.* modification des taux de croissance, des taux de reproduction, de la taille maximale ou de la taille à la puberté) (Augustine *et al.*, 2012a; Billoir *et al.*, 2008a; Massarin *et al.*, 2011; Péry *et al.*, 2003a) ou l'analyse de la réponse à un toxique d'organismes ayant sélectionné des stratégies d'histoire de vie différentes (Alda Álvarez *et al.*, 2005). Pour ce faire, les modèles DEBtox décrivent cinq modes d'action des toxiques dont deux avec un impact direct sur la reproduction : (i) surcoût à la création d'un œuf et (ii) mortalité durant l'ovogenèse et trois avec un impact indirect à la fois sur la reproduction et sur la croissance des individus : (iii) augmentation des coûts de maintenance, (iv) diminution de l'assimilation d'énergie depuis la nourriture et (v) surcoût à la création d'une unité de croissance (Cf. équations Table V.2, page 49).

TABLE V.2 – Équations des modes d'action décrits dans l'approche DEBtox (d'après Billoir *et al.*, 2008b).

Assimilation :

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{g+f(1-s(c_q))} [f(1-s(c_q)) - l] \quad (\text{V.5a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ \frac{g+l}{g+f(1-s(c_q))} f(1-s(c_q)) l^2 - l_p^3 \right] \quad (\text{V.5b})$$

Maintenance :

$$\frac{dl}{dt} = r_B [f - (1+s(c_q))l] \quad (\text{V.6a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} (1+s(c_q)) \left[ fl^2 \frac{g(1+s(c_q))^{-1} + l}{g+f} - l_p^3 \right] \quad (\text{V.6b})$$

Croissance :

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{f+g}{f+g(1+s(c_q))} (f-l) \quad (\text{V.7a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \frac{g(1+s(c_q)) + l}{g(1+s(c_q)) + f} - l_p^3 \right] \quad (\text{V.7b})$$

Mortalité durant ovogenèse :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (\text{V.8a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \frac{g+l}{g+f} - l_p^3 \right] \exp^{-s(c_q)} \quad (\text{V.8b})$$

Surcoût à la création d'un œuf :

$$\frac{dl}{dt} = r_B (f-l) \quad (\text{V.9a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ fl^2 \frac{g+l}{g+f} - l_p^3 \right] (1+s(c_q))^{-1} \quad (\text{V.9b})$$

Les modèles de budget énergétique dynamique peuvent être utilisés comme des briques de base dans la construction des modèles de dynamique de population (Metz & Diekmann, 1986) et s'intégrer dans des modèles plus complexes s'intéressant au devenir d'une population au cours des générations (*e.g.* couplage



DEB-matrice de Leslie, modèles individu-centrés basés sur le DEB) (Beaudouin *et al.*, 2012a; Lopes *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2013).

Du fait de ces nombreux avantages — pertinence physiologique, inférence de paramètres physiologiques et toxiques, étude simultanée de différents critères d’effet, modèles éprouvés —, les modèles utilisés dans cette thèse sont de type DEBtox.

## V.4 Modélisation DEBtox appliquée à *C. elegans*

Un modèle de type DEBtox pour *C. elegans* a été développé par Jager *et al.* (2005). *C. elegans* ayant une courbe de croissance de type sigmoïdale (Byerly *et al.*, 1976), il a été nécessaire d’adapter le modèle DEB général qui prédit une courbe de croissance de von Bertalanffy en condition *ad libitum*. Selon Knight *et al.* (2002), la cavité buccale de *C. elegans* ne grandit que lors des mues alors que le reste de l’organisme grandit de manière linéaire entre les mues. Jager *et al.* (2005) ont posé l’hypothèse que ce processus de croissance induisait une limitation de l’ingestion de nourriture durant les premières phases de vie, entraînant une croissance initiale plus faible que la croissance tardive. Ces auteurs ont alors introduit une nouvelle fonction posant l’hypothèse que le taux d’ingestion de *C. elegans* était taille-dépendant. Ils ont ainsi proposé l’équation DEB pour *C. elegans* suivante :

$$s_f(l) = 1 - \left(1 + \frac{l_f^3}{l^3}\right)^{-1} \quad (\text{V.10a})$$

$$\frac{dl}{dt} = r_B [(1 - s_f) f - l] \quad (\text{V.10b})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ \frac{g + l}{g + (1 - s_f) f} (1 - s_f) f l^2 - l_p^3 \right] \quad (\text{V.10c})$$

avec  $s_f$  la fonction de limitation de l’ingestion de nourriture taille-dépendant,  $r_B$  le taux de croissance de von Bertalanffy,  $R_M$  le taux de reproduction maximum,  $R_{Max}$  la reproduction cumulée maximale et  $g$  le ratio d’investissement en énergie.  $L$  représente la taille de l’organisme au temps  $t$ ,  $L_0$  la taille à la naissance (*i.e.* le début de l’alimentation selon la théorie DEB),  $L_f$  la taille à laquelle le taux d’ingestion est à la moitié du taux d’ingestion maximal et  $L_p$  la taille à la puberté. Ces différentes tailles sont normalisées par la taille maximale ( $L_{inf}$ ) résultant dans les paramètres  $l$ ,  $l_0$ ,  $l_f$ , et  $l_p$ .

Ce modèle a été utilisé à plusieurs reprises pour analyser les effets de toxiques sur *C. elegans* (Alda Álvarez *et al.*, 2006a, 2005; Swain *et al.*, 2010; Wren *et al.*, 2011). Néanmoins, ce modèle présente certaines inconsistances en posant intrinsèquement l’hypothèse qu’un nématode de petite taille ne sera pas capable de s’alimenter en cas de faible restriction calorique (Cf. Article II, page 93).

## Deuxième partie

# Matériels et méthodes générales



Les matériels et méthodes utilisés dans le cadre de cette thèse sont présentés en détail au sein des Articles I (page 75), II (page 95) et III (page 112). L'article I détaille le design expérimental utilisé et l'article II détaille le modèle mis au point. L'article III détaille la mise en œuvre du modèle sur plusieurs générations. Cette partie approfondit les choix et méthodes utilisés. Il y sera tout d'abord présenté la population de nématodes utilisée ainsi que son mode de maintenance. Dans un second temps, les méthodes d'inférence des paramètres et de calibration des modèles, ainsi que les méthodes d'analyses de ces modèles seront abordées.



## CHAPITRE VI

---

**Origine et maintenance de notre population d'étude**

---

**VI.1 Population d'intérêt et conditions de maintenance****VI.1.1 Population étudiée**

L'APPARITION de phénomènes d'adaptation nécessite la présence d'une diversité génétique suffisante au sein de la population étudiée. La souche de référence en laboratoire est la souche de type sauvage N2. Cette dernière a été isolée en 1957 par Staniland (1957) sur de l'humus utilisé pour la culture de champignons. Bien que cette souche soit plébiscitée en écotoxicologie (Anderson *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 1999, 2000; Dutilleul *et al.*, 2013), du fait notamment de sa culture en laboratoire depuis plus de 50 ans, sa diversité génétique est très faible. De plus, cette longue conservation en laboratoire a amené la souche N2 à différer significativement des souches naturelles (Barrière & Félix, 2005b; Félix & Braendle, 2010). Elle n'a par conséquent pas été retenue pour nos expérimentations. Celle que nous utilisons dans le cadre des expériences de cette thèse nous a été fournie par Henrique Teotónio (Institut Gulbenkian de Sciences, Portugal). Cette population est construite à partir de 16 isolats sauvages en utilisant une stratégie d'entonnoir transverse (Teotónio *et al.*, 2012). Ainsi, Henrique Teotónio et son équipe ont croisé par paires chacun des isolats sauvages afin d'obtenir des hybrides de deux isolats. Ces hybrides ont alors été eux mêmes croisés afin d'obtenir des hybrides de quatre isolats. L'hybridation par paires a continué jusqu'à obtenir des hybrides de 16 isolats (Cf. Figure VI.1 page 56). La population a ensuite été maintenue dans des conditions de laboratoire durant plus de 100 générations et aucune perte significative de diversité génétique n'a été observée après que l'équilibre recombinaison-sélection ait été atteint (Teotónio *et al.*, 2012). Cette population maintient donc une diversité génétique élevée soutenue par un taux de mâle d'environ 20 à 30% (Teotónio *et al.*, 2012). Ce taux élevé de mâle — à titre de comparaison, il est de 0,1% pour la souche N2 — permet en effet d'obtenir une dynamique de population caractérisée par un taux constant de 50% de fécondation croisée estimé par Teotónio *et al.* (2012). Chez *C. elegans*, ce taux de fécondation croisée est fonction du nombre de mâles

présents, les hermaphrodites ne pouvant pas s'accoupler entre eux, et serait égal à deux fois la fréquence des mâles (Anderson *et al.*, 2010; Cutter *et al.*, 2003; Stewart & Phillips, 2002). Cela permet, par conséquent, un maintien de la diversité génétique de la population. De plus, la possibilité d'effectuer des fécondations croisées facilite la mise en place de phénomènes d'adaptation à de nouveaux environnements (Burt, 2000; Morran *et al.*, 2009b).

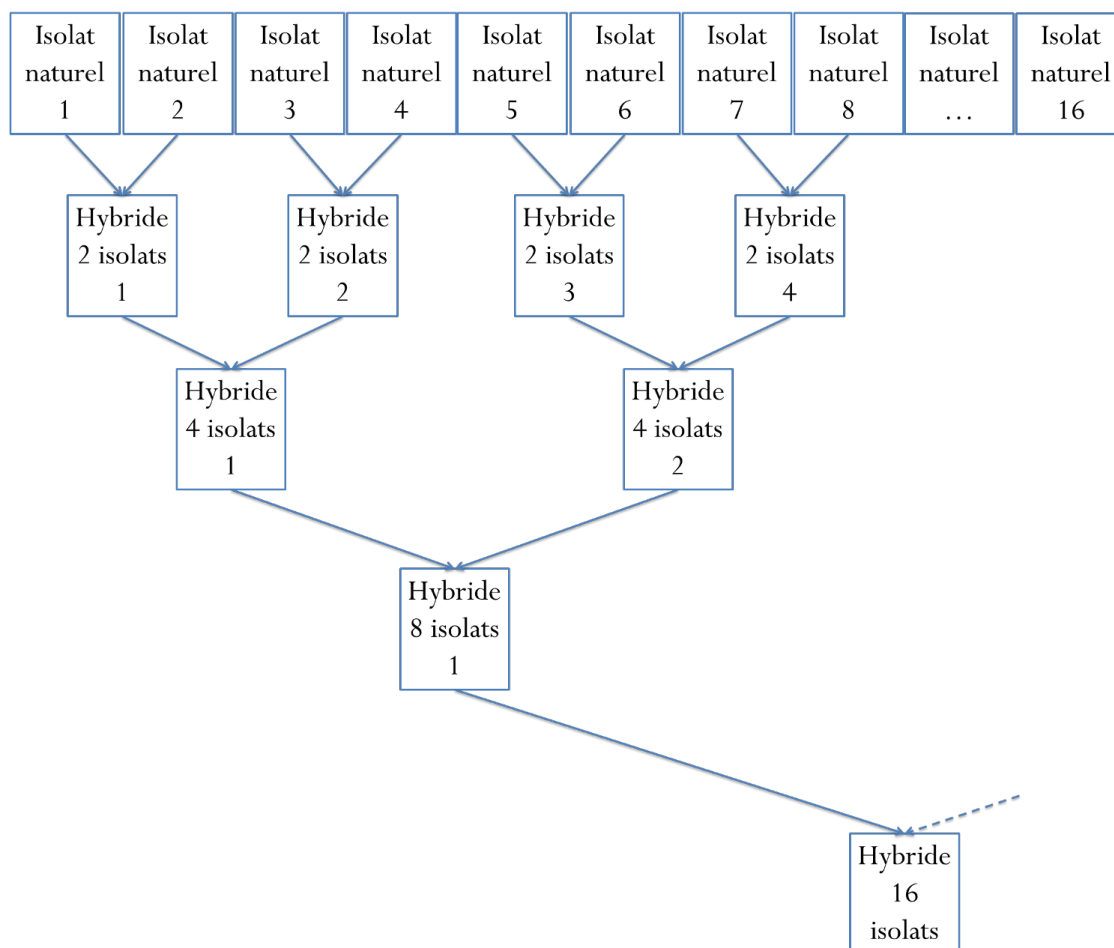


FIGURE VI.1 – Schéma de la dérivation de la population ancestrale fournie par Henrique Teotónio. Cette dérivation utilise une stratégie d'entonnoir afin de fournir une population hybride basée sur 16 isolats sauvages.

### VI.1.2 Maintenance de la population

La maintenance de la population au sein du laboratoire, ainsi que les expérimentations, ont été réalisées en boîtes de Petri sur un milieu gélosé, le Nematode Growth Medium (NGM), décrit par Brenner (1974), et selon un protocole adapté de Stiernagle (2006). Ce type de milieu a été préféré à d'autres milieux couramment utilisés lors d'étude avec *C. elegans* que sont les milieux aqueux ou les milieux constitués de sols naturels ou artificiels (Sochová *et al.*, 2006) qui ne permettent pas d'observation rapide de certains critères d'effets. Par exemple, l'observation de la longueur ou du succès reproducteur sont plus difficiles en milieux aqueux ou constitués de sol qu'en milieu composé de gélose (agar, translucide).

Le NGM que nous avons utilisé a été modifié afin de répondre à nos besoins expérimentaux (Cf. Dutilleul

*et al.*, 2013, Article I page 73 et Tableau VI.1). Nous avons remplacé le tampon phosphate ( $\text{KPO}_4$ ) par un tampon HEPES. En effet, la biodisponibilité ainsi que la toxicité de l'uranium, notre polluant d'intérêt, diminuent très fortement en présence de phosphate inorganique du fait de la création de complexes phosphate-uranyle (Misson *et al.*, 2009; Mkandawire *et al.*, 2007). Afin d'éviter toute contamination du NGM (stérile de par son mode de fabrication), et par conséquent des populations de nématodes, par des champignons ou des bactéries non désirés, les préparations de boîtes de Petri et de plaques de culture ont été réalisées sous hotte à flux laminaire, à l'aide de matériel préalablement stérilisé.

TABLE VI.1 – Composition du Nematode Growth Medium et du M9 modifié pour 1 litre

Composé	NGM modifié	M9 modifié
$\text{H}_2\text{O}$	975 mL	975 mL
Pastagar (Biorad)	17 g	—
NaCl	3 g	5 g
HEPES pH 5,5	25 mL	25 mL
$\text{MgSO}_4$ 1M	1 mL	1 mL
$\text{CaCl}_2$ 1M	1 mL	—
Cholestérol ( $5 \text{ g L}^{-1}$ )	1 mL	—

Une fois le NGM solidifié dans les boîtes et plaques de culture, il a étéensemencé avec des bactéries, la nourriture de base de *C. elegans*. Les bactéries utilisées étaient issues d'une souche d'*Escherichia coli* (souche OP50) auxotrophe à l'uracile. Cela permet de limiter le développement bactérien, et par conséquent, d'éviter la création d'une couche épaisse de bactéries qui entraverait les mesures (Brenner, 1974). À noter que, d'après une étude réalisée par Abada *et al.* (2009), bien que *E. coli* soit la source de nourriture la plus couramment utilisée lors d'études en laboratoire avec *C. elegans*, ce dernier lui préfère les bactéries naturellement présentes dans son milieu naturel. Un jour avant l'ensemencement des boîtes, une culture de *E. coli* était réalisée à partir de bactéries issues d'une seule colonie préalablement isolée (Stiernagle, 2006; Sutphin & Kaeberlein, 2009). Ces bactéries étaient cultivées dans d'un bouillon lysogène (lysogeny broth, LB) disposé dans un agitateur incubateur ( $37^\circ\text{C}$ , 120 rpm) durant 24 heures ( $\text{DO}_{600} = 3$ ). Les bactéries étaient ensuite lavées deux fois avec une solution de NaCl à  $5 \text{ g L}^{-1}$  afin de retirer le LB qui contient des ions phosphates. Pour ce faire, les bactéries étaient centrifugées à  $3\,500 \text{ g}$  durant 15 minutes, le surnageant (LB) était retiré, puis les bactéries étaient remises en suspension dans la solution de NaCl. Cette opération était répétée deux fois. Une étape supplémentaire de centrifugation pouvait également être utilisée afin de concentrer les bactéries dans un volume plus faible. Les boîtes de Petri et les plaques de culture pouvaient alors êtreensemencées avec ces bactéries lavées et concentrées à raison de 1 mL concentré 20 fois pour les boîtes 9 cm et 75  $\mu\text{L}$  concentré cinq fois pour les plaques 12 puits. Les bactéries étaient ensuite tuées via une exposition aux ultraviolets durant 15 minutes (Bio-Link Crosslinker,  $\lambda = 254 \text{ nm}$ ; intensité =  $200 \mu\text{watt m}^{-2}$ ). Cette étape, tuant les bactéries, permettait d'éviter une croissance inégale des bactéries entre les différentes boîtes de Petri, et par conséquent, l'apparition d'une hétérogénéité de la nourriture entre expériences.

Les populations de nématodes étaient maintenues à  $20^\circ\text{C}$  et 80% d'humidité relative, dans des boîtes de



Petri de 9 cm. Les expositions étaient réalisées dans des plaques de culture cellulaire 12 puits. Les nématodes étaient transférés sur de nouveaux milieux tous les trois jours afin de les conserver dans des conditions de nourriture *ad libitum*. Le transfert était réalisé en milieu liquide (M9 modifié, remplacement du tampon phosphate par un tampon HEPES, Cf. Tableau VI.1) pour les boîtes de Petri 9 cm afin de conserver un échantillon de 500 individus représentatifs de la population maintenue. En ce qui concerne les plaques 12 puits, le transfert des nématodes était réalisé individuellement à l'aide d'un fil de platine stérilisé monté sur une pipette Pasteur (Stiernagle, 2006).

## CHAPITRE VII

---

**Estimation des paramètres et analyses de modèle**

---

**VII.1 L'estimation des paramètres, la méthode Bayésienne****VII.1.1 Les méthodes d'inférence**

Le concept d'inférence en statistique est une démarche consistant à estimer les valeurs des paramètres d'un modèle à partir des observations. Pour ce faire l'inférence va chercher à minimiser l'écart existant entre les données simulées ( $Y_{sim}$ ) et les données observées ( $Y_{obs}$ ) à l'aide d'approches qui vont utiliser des méthodes tels que les moindres carrés ou le maximum de vraisemblance par exemple (Figure VII.1, page 60). L'estimation des valeurs des paramètres d'un modèle peut être réalisée à l'aide de plusieurs méthodes dont l'inférence fréquentiste et l'inférence Bayésienne. L'inférence fréquentiste pose l'hypothèse que les paramètres à estimer sont des valeurs fixes inconnues pour lesquelles la notion de distribution de probabilité n'a pas de sens (Reichert & Omlin, 1997; Rivot, 2003). Ce type d'approche ne prend en compte que les données, n'utilise pas d'*a priori*, se base sur l'utilisation d'échantillons statistiques de la population et utilise des outils tels que l'estimation du maximum de vraisemblance afin d'inférer les paramètres (Ellison, 1996; Rivot, 2003). Une estimation des valeurs des paramètres utilisant l'inférence fréquentiste donnera une valeur par paramètre. Ainsi, les seules probabilités considérées sont les probabilités d'échantillonnage conditionnelles aux paramètres  $P(x|\theta)$  (Lecoutre, 2005).

L'inférence Bayésienne quant à elle, pose l'hypothèse que les paramètres à estimer ont des distributions fixes inconnues (Reichert & Omlin, 1997; Rivot, 2003). L'approche Bayésienne permet donc de mettre à jour les connaissances sur les distributions pour chaque paramètre. Basée sur les règles du théorème de Bayes (Bayes & Price, 1763), cette approche se base sur l'idée que l'expérimentateur dispose de connaissances *a priori* sur le système étudié et que ces connaissances sont révisées sur la base des données observées. La théorie Bayésienne permet donc, à partir d'un état d'incertitude initial sur les paramètres et une fois les données observées obtenues, d'obtenir une nouvelle incertitude sur les valeurs des paramètres, exprimant

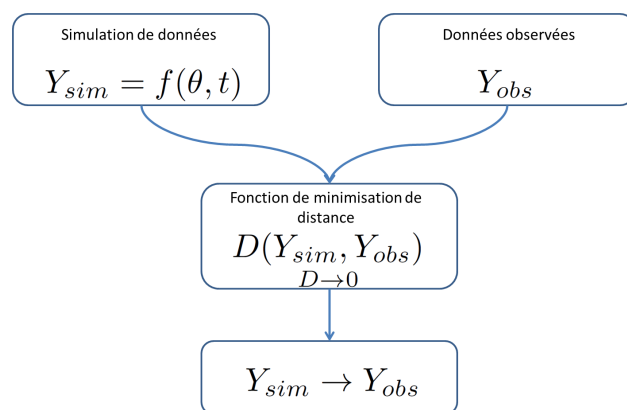


FIGURE VII.1 – Schéma explicatif du processus d’inférence. Les données simulées  $Y_{sim}$  par un modèle de paramètres  $\theta$  et les données observées  $Y_{obs}$  sont injectées dans une fonction de minimisation de la distance  $D$  qui testera plusieurs jeux de paramètres  $\theta$  afin d’obtenir des valeurs de données simulées tendant vers les valeurs des données observées

ainsi directement l’incertitude sur la valeur du paramètre conditionnellement aux données observées  $P(\theta|x)$  (Albert, 2007; Gelman *et al.*, 2003; Lecoutre, 2005). Selon Rivot (2003), lorsque la taille de l’échantillon analysé augmente, l’analyse Bayésienne converge vers l’analyse fréquentiste car l’influence de la vraisemblance devient prépondérante par rapport à l’influence de la distribution *a priori*.

## VII.1.2 L’inférence Bayésienne

Selon Billoir *et al.* (2008a), l’inférence Bayésienne est bien adaptée à la prise en compte simultanée de données pour des critères d’effets différents. Ainsi, il est possible d’analyser simultanément des données de reproduction cumulée et des données de croissance afin d’estimer les paramètres, le poids des deux jeux de données provenant des choix de modèles d’erreurs de chacun des critères. Un second avantage de l’inférence Bayésienne est qu’il permet d’obtenir un intervalle de crédibilité déterminé à partir de la distribution *a posteriori*. Cet intervalle de crédibilité permet ainsi de conclure légitimement que, pour un IC de 95%, il y a 95% de chances que le paramètre se trouve dans cet intervalle de crédibilité. Cette notion est souvent utilisée à tort en statistique fréquentiste où elle est appelée intervalle de confiance (avec  $1 - \alpha = 95\%$  par exemple) (Billoir, 2008; Billoir *et al.*, 2008a; Lecoutre, 2005). Ainsi, en statistique fréquentiste, l’intervalle de confiance à 95% correspond en réalité au fait que « 95% des intervalles de confiance calculés sur l’ensemble des échantillons possibles contiennent la vraie valeur du paramètre » (Lecoutre, 2005). Cette notion est bien moins intuitive que l’intervalle de crédibilité Bayésien. Elle nécessite en effet d’imaginer que l’expérience est répétée une infinité de fois, permettant d’obtenir une infinité d’intervalle de confiance qui contiendront alors la vraie valeur du paramètre avec une probabilité de  $1 - \alpha$  (Ellison, 1996; Rivot, 2003). De nombreux auteurs ont mis en évidence les avantages de l’utilisation de l’inférence Bayésienne dans les domaines de l’écologie, de la conservation de la biodiversité, de l’écotoxicologie (Billoir, 2008; Billoir *et al.*, 2008a; Dorazio & Johnson, 2003; Ellison, 1996; Johnson *et al.*, 2013; Ludwig, 1996; Rivot, 2003; Wade, 2000) dont :

- la prise en compte simultanée de différents types de données, en limitant le biais lié à un poids différent des données,

- la prise en compte d’une expertise antérieure (*e.g.* observations, mesures, connaissances générales liées au paramètre) ne nécessitant pas de fixer le paramètre pour lequel des informations sont connues,
- la prise en compte des facteurs d’incertitude non contrôlables dans les processus d’inférence,
- la disponibilité immédiate d’un degré de crédibilité du paramètre inféré,
- la possibilité de réduire la taille des échantillons et/ou de limiter le nombre de réplicats.

C’est pour ces différentes raisons, et car des *a priori* sur les paramètres du modèle pour le nématode sont disponibles — de par la littérature et des expériences préliminaires —, que l’inférence Bayésienne a été préférée à l’inférence fréquentiste dans le cadre de cette thèse.

La distribution de probabilité du paramètre conditionnellement aux données (ou distribution *a posteriori*) est fournie par le théorème de Bayes :

$$P(\theta|x) = \frac{P(\theta)P(x|\theta)}{P(x)} \quad (\text{VII.1})$$

avec  $P(\theta)$  la distribution de probabilité du paramètre non conditionnellement aux données (ou distribution *a priori*) et  $P(x)$  la distribution non conditionnelle des données.

### VII.1.3 Distributions *a priori*

Selon Lecoutre (2005), le choix des distributions *a priori* est « la pierre d’achoppement de l’inférence Bayésienne ». Ce choix dépend de résultats d’expériences antérieures (réalisées au sein du laboratoire ou tirées de la littérature) et d’avis d’expert. Le choix des distributions *a priori* reflétant ce qui est connu avant d’obtenir les données expérimentales (Billoir *et al.*, 2008a; Rivot, 2003), il doit être effectué à partir de données n’étant pas incluses dans les données à étudier. Le rôle des distributions *a priori* étant de refléter un état de connaissances, ces distributions peuvent être informatives dans le cas où des informations pertinentes et indépendantes des données étudiées ont été obtenues préalablement à l’étude, ou non informatives dans le cas où peu ou pas d’information est disponible. Dans ce dernier cas, l’inférence des paramètres sera fondée sur les seules données disponibles (Rivot, 2003). L’intérêt de l’utilisation de distributions *a priori* réside aussi dans la possibilité de réduire les incertitudes sur les distributions *a posteriori* et d’inférer les paramètres clés d’un modèle qui ne pourraient être identifiés par les seules données (Reichert & Omlin, 1997). *A contrario*, en présence d’un grand nombre de données expérimentales, les distributions *a priori* ont généralement peu d’effet sur l’estimation des distributions *a posteriori*. Selon Chen *et al.* (2000), le choix de la distribution *a priori* peut influencer sensiblement les sorties du modèle. Il est donc nécessaire de faire preuve de prudence lors de ces choix, de les baser sur de sérieuses connaissances *a priori* et de prendre en compte cette possible influence lors de l’interprétation des résultats.

Les distributions *a priori* utilisées dans les travaux présentés ici proviennent essentiellement de la littérature. Ainsi, ces distributions sont basées sur les informations fournies par Jager *et al.* (2005) qui a utilisé une méthode fréquentiste pour inférer les paramètres d’un modèle DEB à partir de données sur *C. elegans*

fournies par Byerly *et al.* (1976). Un coefficient de variation de 20% a été appliqué à ces distributions afin de refléter un avis d'expert sur la connaissance tirée de ces *a priori*. Le choix de la loi de distribution des paramètres a aussi été effectué sur avis d'expert. Ainsi les paramètres ayant une signification biologique nette (*e.g.* taux de croissance, taille à la naissance, taille ultime) ont été distribués selon une loi normale tronquée positive. Les distributions des paramètres pour lesquels peu ou pas d'information était disponible ont été traitées en utilisant des *a priori* non informatifs (loi uniforme). En ce qui concerne les paramètres d'erreur standard, leur distribution a été déterminée en utilisant une distribution *a priori* non informative uniforme de forte gamme tel que recommandé par Gelman (2006). De plus amples informations quant aux distributions utilisées sont disponibles dans l'Article II (page 93).

#### VII.1.4 Méthodes d'échantillonnage en Bayésien

Les méthodes de Monte Carlo par chaînes de Markov (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) permettent d'obtenir des tirages d'une variable aléatoire dont la loi de distribution est connue à une variable près (Billoir, 2008). Il s'agit d'une manière classique de simuler une distribution *a posteriori* de modèles complexes en Bayésien (Albert, 2007; Rivot, 2003). Les tirages effectués à l'aide d'une chaîne de Markov ne dépendent que du pas de temps précédent et l'état stable de ces chaînes correspond à la distribution *a posteriori*  $P(\theta|x)$  (Billoir, 2008; Rivot, 2003). Ainsi, selon le processus Markovien, un échantillon  $\{\theta_1 \dots \theta_n\}$  sera tiré dans lequel deux tirages successifs  $\theta_{i-1}$  et  $\theta_i$  seront autocorrélés. Lorsque les chaînes MCMC auront convergé vers leur état stationnaire, les caractéristiques d'intérêt de la loi *a posteriori* (*e.g.* moyenne, variance, quantiles) pourront être estimées directement à partir de l'échantillon (Rivot, 2003). Les tirages peuvent être effectués à l'aide de plusieurs types d'algorithmes dont les deux principaux sont l'algorithme Metropolis-Hastings (Hastings, 1970; Metropolis *et al.*, 1953) et l'algorithme Gibbs, ce dernier étant un cas particulier du premier (Casella & George, 1992; Geman & Geman, 1984). L'algorithme de Metropolis-Hastings va converger vers une distribution *a posteriori* des paramètres en favorisant les valeurs de paramètres les plus probables en fonction des données observées. En effet, à chaque itération, l'algorithme va proposer un point paramètre candidat ( $\theta^*$ ) à partir du tirage en cours ( $\theta_{i-1}$ ) dans une distribution conditionnelle ( $P(\theta^*|\theta_{i-1})$ ). Ce point candidat sera accepté ou refusé selon une probabilité calculée par l'algorithme. Si le point est accepté,  $\theta_i = \theta^*$ , sinon  $\theta_i = \theta_{i-1}$ . Cet algorithme contient une composante aléatoire permettant un parcours de l'ensemble de l'espace des paramètres. Néanmoins, d'après Billoir (2008), si le paramètre est de grande dimension, il peut être difficile d'assurer une bonne convergence de l'algorithme. L'algorithme de Gibbs a été proposé comme étant un cas particulier de l'algorithme de Metropolis-Hastings acceptant toujours les points paramètres candidats successifs. Cette particularité rend la mise en œuvre de l'inférence Bayésienne plus pratique. Les échantillonnages réalisés dans le cadre de cette thèse ont donc été effectués en utilisant l'algorithme de Gibbs. Pour ce faire, le logiciel JAGS a été utilisé.

### VII.1.5 Logiciel JAGS

Le logiciel JAGS (pour Just Another Gibbs Sampler) a été mis au point par Plummer (2003). Ce logiciel, clone compatible du logiciel — désormais non maintenu — BUGS (Bayesian inference Using Gibbs Sampling), est un logiciel multi-plateforme qui présente l'avantage d'être interfaçable avec le logiciel de statistique R (R Core Team, 2012) à travers l'utilisation du package *rjags*. JAGS est donc un programme permettant d'inférer des paramètres en utilisant une méthode Bayésienne via l'utilisation de MCMC et de l'algorithme de Gibbs. Le logiciel permet de lancer simultanément plusieurs chaînes de Markov, ce qui permet d'obtenir des informations sur la convergence des chaînes. En effet, il devient alors possible de vérifier que chaque chaîne a bien convergé et que l'ensemble des chaînes converge vers une même limite. Le fonctionnement de JAGS nécessite cinq étapes : (i) définition du modèle, (ii) compilation du modèle, (iii) initialisation, (iv) adaptation et burn-in et (v) monitoring. Les autres étapes, telles que l'analyse de convergence ou la réalisation de graphiques d'ajustement sont à réaliser en dehors de JAGS, en utilisant le package *coda* de R. Lors de la phase d'adaptation, les échantillonneurs utilisés par le modèle peuvent modifier leur comportement afin d'améliorer l'efficacité générale de l'algorithme (un test interne permet de vérifier si l'efficacité optimale est atteinte). La phase de burn-in correspond, quant à elle, à un run initial qui ne sera pas conservé. Cela permet de rapprocher l'algorithme du point de convergence avant la phase de monitoring. Une estimation des paramètres avec le modèle JAGS nécessite trois types d'informations, à savoir : le modèle avec ses distributions *a priori*, les données à étudier et enfin des valeurs initiales. À noter que les valeurs initiales peuvent être déterminées par JAGS dans le cas où elles ne seraient pas implémentées (utilisation de valeurs « typique » de la distribution *a priori* choisi ; Plummer, 2012). Des scripts JAGS de modèles nématode sont présentés en Annexe A (page 165).

## VII.2 Analyses du modèle

Les modèles DEB et DEBtox comportent un grand nombre de paramètres. Ainsi, dans le cas des modèles utilisés dans cette thèse, 13 paramètres sont utilisés dont trois liés à l'effet du toxique. Une optimisation de ce nombre de paramètres permet d'améliorer la vitesse des estimations. Il est par conséquent important d'analyser les incertitudes pouvant se propager au sein du modèle et d'identifier les paramètres les plus influents sur les sorties du modèle. Pour ce faire, deux méthodes peuvent être utilisées. Il s'agit de l'analyse d'incertitude et de l'analyse de sensibilité. Ce type d'analyse a été effectué dans le cadre de l'Article II (page 93).

### VII.2.1 Analyse d'incertitude

L'analyse d'incertitude d'un modèle permet d'obtenir des informations sur l'incertitude associée aux prédictions du modèle et si possible de réduire cette incertitude. Les incertitudes existantes sur un modèle peuvent avoir plusieurs origines et, ainsi, être liées aux équations du modèle, aux variables d'entrée ou aux

paramètres. Ces incertitudes peuvent également être de différents types tels qu'un manque de connaissance, des erreurs de mesure ou d'échantillonnage ou liées à l'incertitude intrinsèque du modèle (*e.g.* liée à l'algorithme, aux incertitudes de calcul). Une analyse d'incertitude nécessite plusieurs étapes. La première étape consiste à définir les distributions des paramètres et des variables d'entrée ( $z_i$ ). Cette étape est réalisée de la même manière que pour la définition des distributions *a priori* utilisées dans l'inférence Bayésienne. Ainsi, les distributions des paramètres sont tirées de la littérature, de données préalablement acquises, ainsi que d'avis d'expert. La seconde étape de l'analyse d'incertitude consiste en la génération d'échantillons à partir des distributions définies. Cette phase a pour objectif de générer un nombre de paramètres et de variables ( $z_i$ ) suffisant pour couvrir l'espace de manière dense. Diverses méthodes d'échantillonnage peuvent être employées (*e.g.* échantillonnage stratifié, hypercube latin, échantillonnage aléatoire, Figure VII.2, page 65). Le choix de la méthode d'échantillonnage est souvent lié au temps de calcul disponible. La troisième étape est liée au calcul des sorties  $y(z)$  pour chaque série de  $z_i$ . La durée de cette étape, fortement consommatrice de temps de calcul, dépend de la complexité du modèle et de la stratégie d'échantillonnage choisie. La dernière étape consiste à analyser les distributions des sorties.

Dans le cadre de l'analyse d'incertitude menée dans cette thèse, le temps de calcul n'étant pas un facteur limitant, une méthode d'échantillonnage aléatoire par Monte Carlo a été utilisée. À noter qu'une distribution triangle a été utilisée dans le cadre de l'analyse d'incertitude là où une distribution normale était utilisée lors de l'inférence Bayésienne. Cette distribution triangle, présentant un *a priori* moins fort sur la moyenne de l'échantillon permet de parcourir un espace plus vaste, résultant en une analyse d'incertitude plus robuste. Les autres paramètres étaient distribués selon une loi uniforme non informative. La Figure VII.3 (page 65) présente des représentations graphiques des loi utilisées.

## VII.2.2 Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité, quant à elle, vise à identifier les paramètres et les variables qui influencent le plus les sorties du modèle afin d'améliorer les connaissances et la précision de ces derniers, et en parallèle, d'identifier les paramètres et variables qui influencent le moins les sorties du modèle afin de pouvoir les fixer si nécessaire (Saltelli *et al.*, 2008). L'analyse de sensibilité peut être soit locale (*i.e.* analyse de la variation de la sortie lorsque le paramètre d'entrée varie autour d'une valeur de référence) soit globale (*i.e.* analyse de la variation de la sortie lorsque le paramètre d'entrée varie sur toute sa plage de variation) (Figure VII.4, page 66). L'analyse de sensibilité reprend sensiblement les mêmes étapes que l'analyse d'incertitude. Les différences se situent à la première étape, où des sorties discrètes à analyser seront définies en plus des distributions, et à la dernière étape où un calcul des indices de sensibilité sera réalisé (Saltelli *et al.*, 2008). L'analyse de sensibilité peut être réalisé au moyen de nombreuses méthodes telles que l'analyse de variance, la méthode de Sobol (Saltelli, 2002; Sobol', 1993), la méthode FAST (Saltelli *et al.*, 1999) ou la méthode de Morris (Morris, 1991). Le choix d'une méthode est le plus souvent lié à un compromis entre l'exploration de l'espace souhaité, le nombre de paramètres du modèle et le temps de calcul disponible. La Figure VII.5

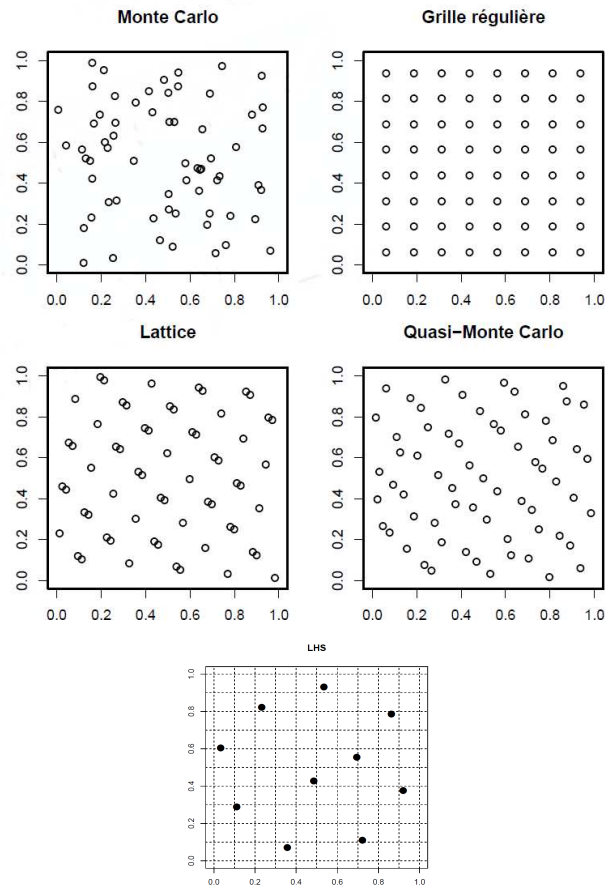


FIGURE VII.2 – Exemples de méthodes d'échantillonnage (selon Monod 2013)

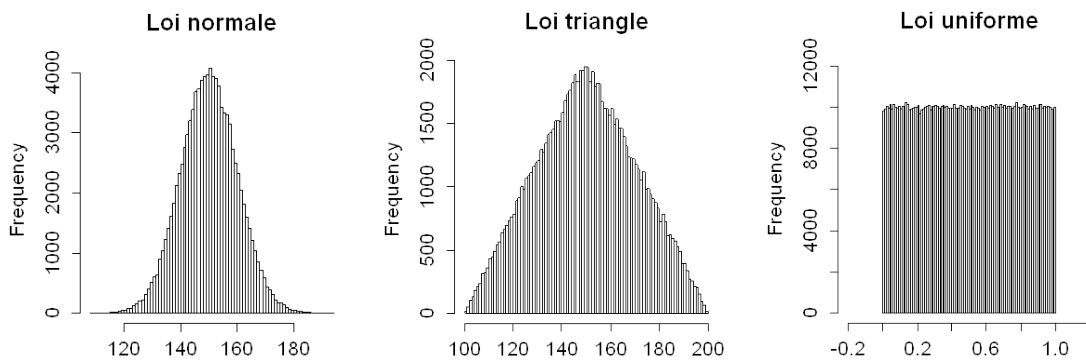


FIGURE VII.3 – Exemples de loi de distributions de paramètres. Sont présentées des lois triangle (de moyenne  $\mu$  et bornes  $a$  et  $b$ ), normale ( $\mathcal{N}(\mu, \sigma)$ ) et uniforme ( $U[a, b]$ )



(page 67) présente un choix de la méthode à utiliser en fonction du nombre de paramètres et du nombre de simulations disponibles. Du fait du nombre important de simulations disponibles et du nombre de paramètres des modèles DEBtox, la méthode choisie pour réaliser l'analyse de sensibilité du modèle présenté dans l'Article II (page 93) est la méthode de Sobol. Cette méthode, globale et indépendante du modèle, quantifie la contribution de la variance de chaque paramètre du modèle à la variance totale des sorties du modèle. La méthode de Sobol permet le calcul de l'indice de sensibilité de premier ordre ( $S_i$ ) et de l'indice de sensibilité total ( $TS_i$ ) d'un paramètre. Ce dernier correspond à la somme de tous les indices de sensibilité impliqués dans le paramètre en question. Ainsi, dans le cas d'un modèle à trois paramètres  $i, j$  et  $k$ , l'indice de sensibilité total est calculé comme suit :  $TS_i = S_i + S_{ij} + S_{ik} + S_{ijk}$  (Saltelli *et al.*, 2008, pages 174–180). Dans le cadre des travaux de cette thèse, une analyse globale a été menée car elle permet l'exploration de l'ensemble de l'espace de variation possible des paramètres et permet, par conséquent, une meilleure compréhension de l'influence des paramètres. En effet, selon Faivre *et al.* (2013), une analyse de sensibilité locale n'est pas indiquée pour étudier les effets de facteurs incertains qui peuvent varier sur un domaine important.

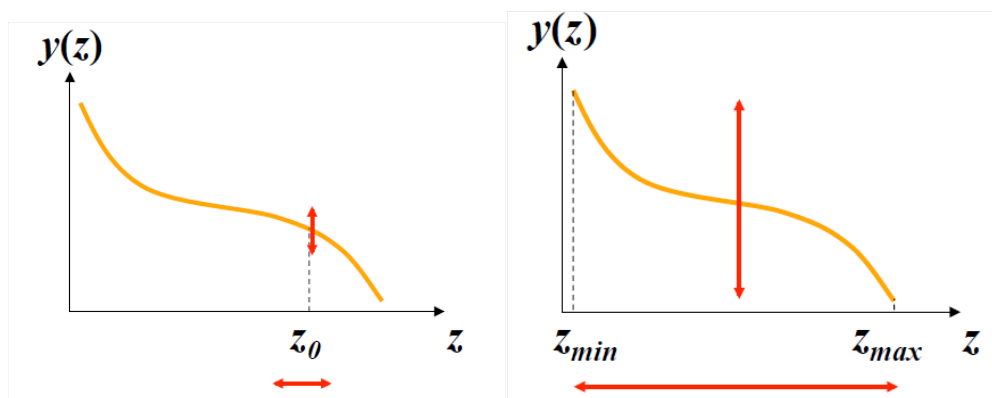


FIGURE VII.4 – Schéma explicatif des différences entre l'analyse de sensibilité globale et l'analyse de sensibilité locale. Dans le cas de l'analyse locale, il s'agit d'une analyse de la variation de la sortie ( $y(z)$ ) lorsque le paramètre d'entrée ( $z$ ) varie autour d'une valeur de référence ( $z_0$ ). Dans le cas de l'analyse globale, il s'agit d'une analyse de la variation de la sortie ( $y(z)$ ) lorsque le paramètre d'entrée ( $z$ ) varie sur toute sa plage de variation (selon Makowski 2013)

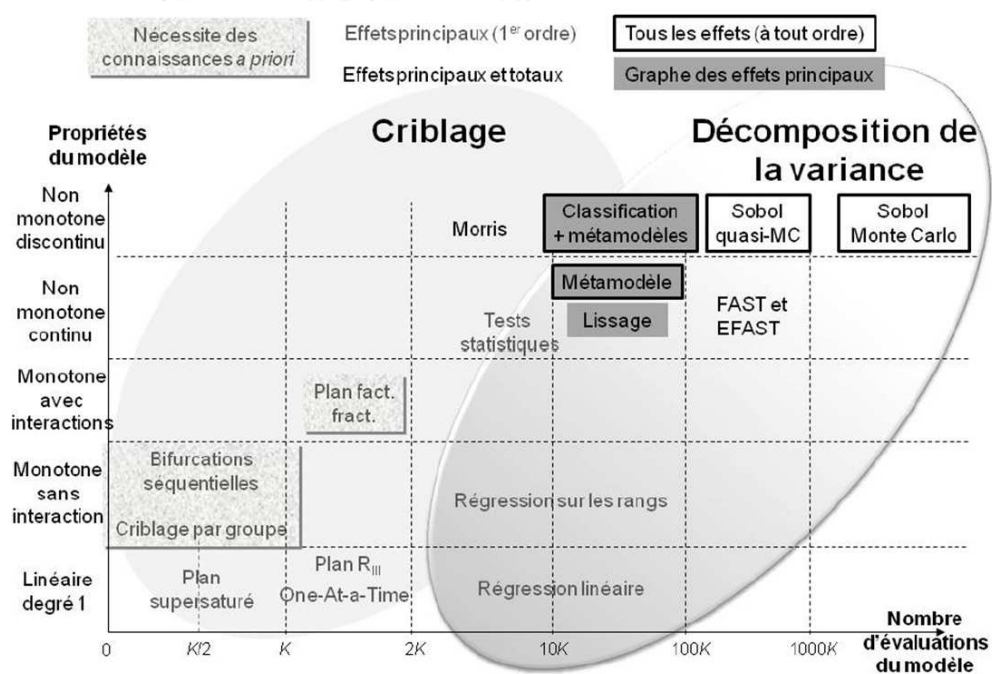


FIGURE VII.5 – Grille de choix de méthode d'analyse de sensibilité (selon Mahévas 2013)



## Troisième partie

# Résultats



## CHAPITRE VIII

---

### Exposition multigénérationnelle de *C. elegans* à de l'uranium

---

#### VIII.1 Présentation du chapitre

L'EXPOSITION chronique de populations naturelles à des conditions stressantes peut induire l'apparition de pressions de sélection nouvelles qui, s'ajoutant aux forces de sélection naturelles, peuvent conduire à la mise en place de processus d'évolution adaptatifs (Bickham, 2011; Coutellec & Barata, 2011; Coutellec *et al.*, 2011). Afin de mieux comprendre et de quantifier la réponse des populations de nématodes stressées, une étude d'écotoxicologie évolutive a été menée. Pour ce faire, nous avons analysé l'évolution des traits d'histoire de vie et de la relation dose-réponse de deux populations de nématodes en fonction de la présence ou non d'une forte pression de sélection par une exposition durant 16 générations. Cet article présente une analyse statistique non mécanistique des effets de l'uranium sur les traits d'histoire de vie d'une population de *C. elegans*. Une partie des données produites sera utilisée afin de mettre au point un modèle mécanistique permettant une analyse biologiquement plus pertinente (Cf. Article II, page 93). Ce dernier sera alors appliqué à l'ensemble des générations d'étude afin d'évaluer l'évolution des paramètres physiologiques et toxicologiques du modèle produit (Cf. Article III, page 110). Enfin, les analyses non mécanistiques effectuées dans l'Article I serviront de référentiel pour les deux autres articles.

#### VIII.2 Plan expérimental succinct

Afin d'étudier les effets à long terme d'une exposition à l'uranium sur *C. elegans*, le design expérimental consistait en la dérivation de deux populations issues de la population d'élevage maintenue au laboratoire et en l'étude de l'évolution de ces populations. La première était maintenue dans un environnement non contaminé (population MGC) et la seconde était exposée à une concentration nominale en uranium de 1,1 mM (population MGU). Ce niveau d'exposition correspond à une force de sélection forte induisant une réduction de la fécondité de *C. elegans* de plus de 60% (Dutilleul, 2013). Les deux populations ont été maintenues durant 16 générations. À certaines générations d'intérêt (générations 0, 2, 3, 6, 12, et 16), des

individus provenant des deux populations ont été exposés à une gamme de concentration en uranium. Un suivi quotidien et individuel de la croissance, de la reproduction et de la survie était effectué.

### VIII.3 Matériel supplémentaire

Cet article contient des figures supplémentaires qui sont présentées en annexe B (page 171).

# Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity

Benoit GOUSSEN<sup>1,2</sup>, Florian PARISOT<sup>2</sup>, Rémy BEAUDOUIN<sup>1</sup>, Morgan DUTILLEUL<sup>2</sup>, Adeline  
BUISSET-GOUSSEN<sup>2</sup>, Alexandre R.R. PÉRY<sup>1</sup>, and Jean-Marc BONZOM<sup>2</sup>

**1** Unité Modèles pour l'Écotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement  
Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

**2** Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire  
d'ÉCOtoxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

2013

Ecotoxicology, 22(5):869–878

## Abstract

The assessment of toxic effects at biologically and ecologically relevant scales is an important challenge in ecosystem protection. Indeed, stressors may impact populations at much longer term than the usual timescale of toxicity tests. It is therefore important to study the evolutionary response of a population under chronic stress. We performed a 16-generation study to assess the evolution of two populations of the ubiquitous nematode *Caenorhabditis elegans* in control conditions or exposed to 1.1 mM of uranium. Several generations were selected to assess growth, reproduction, survival, and dose-responses relationships, through exposure to a range of concentrations (from 0 to 1.2 mM U) with all endpoints measured daily. Our experiment showed an adaptation of individuals to experimental conditions (increase of maximal length and decrease of fecundity) for both populations. We also observed an increase of adverse effects (reduction of growth and fertility) as a function of uranium concentration. We pointed out the emergence of population differentiation for reproduction traits. In contrast, no differentiation was observed on growth traits. Our results confirm the importance of assessing environmental risk related to pollutant through multi-generational studies.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans* — Multi-generations experiment — Evolutionary ecotoxicology — Uranium



## VIII.4 Introduction

Ecological risk assessment relies directly on the ability to assess risk at biologically and ecologically relevant scales. When targeting ecosystems protection, the relevant ecological timescales would be at least four generations of exposed populations in order to neglect acclimation effects (Gagliano & McCormick, 2007; Mousseau & Fox, 1998; Muysen & Janssen, 2004; Räsänen & Kruuk, 2007; Scheiner, 1993). However, until recent years and the emergence of the concept of evolutionary ecotoxicology, most of the ecotoxicological studies do not even cover one full generation, as only partial life cycle tests are more common than full life cycle ones. Consequently there are only a few datasets and models that account for adaptive processes which may appear in a population submitted to stressful conditions for several generations. However, if chronically applied, a stressful condition may constitute a selective pressure in natural populations (Bickham, 2011; Coutellec *et al.*, 2011), leading to evolutionary adaptive processes (Coutellec & Barata, 2011). As also noted by Dutilleul *et al.* (2013), modifications in the environment such as the apparition of pollutants can lead a population to three types of responses. Whereas the first two, *i.e.* within-individual phenotypic plasticity (Scheiner, 1993) and cross-generation phenotypic plasticity (Räsänen & Kruuk, 2007) can be detected during the first two generations of the experiment, the third type, local adaptation (Hendry & Gonzalez, 2008) can only be detected by studying more generations (Hoffmann & Merilä, 1999).

The free living nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) is a relevant biological model for evolutionary ecotoxicology assessments because of its short life span, short life cycle, small size, high fecundity and ease to culture in laboratory conditions (Brenner, 1974; Byerly *et al.*, 1976). This nematode is therefore widely used in the assessment of pollutant effects (Boyd *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Sochová *et al.*, 2007; Swain *et al.*, 2004, 2010) and of evolutionary responses (Lopes *et al.*, 2008; Morran *et al.*, 2009a,b). *C. elegans* reproduces by androdioecy (hermaphrodites can self-fertilize, the presence of male is optional) and according to Morran *et al.* (2009a), facultative outcrossing may facilitate adaptation to stress.

Our study focused on uranium as pollutant of interest. It is a radioactive heavy metal naturally found in the environment. Uranium is both a chemical and radiological toxicant. Nevertheless, its chemical toxicity is considered to be dominant over its radiotoxicity (Sheppard *et al.*, 2005; Zeman *et al.*, 2008). The soil concentration of natural uranium is around 0.008 mM (2 mg kg<sup>-1</sup>) but it can reach up to 0.2 to 4.2 mM U (50 to 1000 mg kg<sup>-1</sup>) in contaminated areas (Ribera *et al.*, 1996; UNSCEAR, 2000).

In the present study, in order to better evaluate the effects of a long-term exposure to uranium on a nematode population, we compared the evolution of growth, reproduction, survival, and dose-response relationships for uranium in two populations of *C. elegans* (a control population and a population exposed to a sublethal concentration of uranium) exposed over 16 generations. The aim of this study is to better evaluate the modification of the response to uranium throughout the generations. Preliminary studies showed a decrease of fecundity by over 60% for *C. elegans* individuals exposed to 1.1 mM U (data not shown). Due

to this strong selection pressure, only 40% of the individuals are selected for the next generation. This would induce a selection of around 2.5% of the individuals at the fourth generation. Regarding this background, we expected a rapid evolution of the exposed population in less than four generations followed by stabilization.

## VIII.5 Materials and Methods

### VIII.5.1 Test organism

*Caenorhabditis elegans* is an ubiquitous free nematode. It measures 250  $\mu\text{m}$  long at hatching and up to 1.4 mm at adult stage. This nematode is a powerful model in evolutionary ecotoxicology experiments because of its short life cycle (*C. elegans* breeds in three days at 20°C), its short life span (21 days at 20°C), and its high fecundity (Byerly *et al.*, 1976).

The *C. elegans* population EEV-A<sub>0</sub> used in this study was created by Teotónio *et al.* (2012) from a mixture of 16 wild isolates. These authors derived their androdioecious population through a funnel cross strategy. Briefly, two-isolate hybrids were obtained by crossing, in a pair-wise fashion, each of the wild isolate. Then four-isolate hybrids were obtained by intercrossing in a pair-wise fashion the two-isolate hybrids. Hybridizations continued until the 16-isolate hybrids were created. The population was then maintained over 140 generations. They did not observe significant loss of genetic diversity after recombination-selection equilibrium was mostly reached. As the EEV-A<sub>0</sub> population is genetically highly diverse, adaptation processes may be expected to occur. Indeed, such kind of adaptive response can only be observed when genetic variation is sufficient in the studied population. This population is composed of around 30% of males.

In the present study, two populations were derived from this strain. Nematode populations were maintained at 20°C, 80% RH in 9 cm Petri dishes filled with nematode growth medium (NGM) seeded with *Escherichia coli* strain OP50 (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006).

### VIII.5.2 Multigeneration exposure

Two populations were derived from the EEV-A<sub>0</sub> population. Nematodes were washed off the Petri-dishes of the EEV-A<sub>0</sub> population with a M9-modified buffer (use of HEPES buffer instead of potassium phosphate buffer). The nematodes we picked up were then pooled in a 15 mL falcon tube and the number of individuals in the tube was estimated based on three sample drops of 5  $\mu\text{L}$  (Teotónio *et al.*, 2012). Then volumes corresponding to 500 individuals were transferred to three new 9 cm Petri dishes for each population. Two populations were followed over 16 generations on 9 cm Petri dishes. One population was the control population (thereafter called MGC), the other was exposed to a nominal concentration of 1.1 mM of uranium (thereafter called MGU). The Petri dishes were filled with NGM which had to be modified compared to the experimental conditions by Teotónio *et al.* (2012). We replaced 25 mM of potassium phosphate buffer (pH 6) by 25 mM of HEPES buffer (pH 5.5, Sigma-Aldrich, France). Indeed, in presence of inorganic phosphate, uranium bioavailability and toxicity decrease due to the formation of an uranyl phosphate complex (Misson

*et al.*, 2009; Mkandawire *et al.*, 2007). The uranium stock solution was obtained by a dilution of uranyl nitrate ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, France). Uranium solution was added to the modified NGM just before flowing the plates. 100  $\mu\text{L}$  of NGM samples were collected for each treatment and stored at 4°C. The samples were digested with a combination of 1 mL  $\text{HNO}_3$  and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 90°C prior to measurement with ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA; detection limit 0.04  $\mu\text{M}$ ).

*E. coli* OP50 cultures were grown overnight in L-Broth rich medium at 37°C. Then cultures ( $\text{OD}_{600} = 3$ ) were washed twice with a 5 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl solution in order to remove LB medium, since it contains phosphate. Petri dishes were seeded with 1 mL of a 20:1 mixture and left overnight to allow the bacterial culture to dry. Petri dishes were then exposed to UV doses (Bio-Link Crosslinker,  $\lambda = 254$  nm; intensity = 200  $\mu\text{watt m}^{-2}$ ) for 15 minutes to stop bacterial growth and to avoid uncontrolled heterogeneity in food availability between populations. Indeed, Boyd *et al.* (2003) showed that *C. elegans* responses to heavy metal toxicant can be function of the food availability. The nematodes were assumed to be fed *ad libitum*.

Every three days, nematodes were washed off the Petri dishes with a M9-modified solution. Nematodes picked up from all Petri dishes of one population were pooled in a 15 mL falcon tube in order to avoid increasing the number of groups to be followed which permitted to match our technical facilities. The number of individuals in a tube was estimated based on three sample drops of 5  $\mu\text{L}$  (Teotónio *et al.*, 2012). Then the volume corresponding to 500 individuals was transferred to three new Petri dishes.

### VIII.5.3 Toxicity test

At generations 0, 2, 3, 6, 12, and 16, individuals from both populations were exposed to a range of 7 concentrations of uranium: 0 (control), 0.1, 0.3, 0.5, 0.9, 1.1, 1.2 mM U. For this purpose 12-well tissue-plates were used. Contamination protocol was the same as for 9 cm Petri dishes. Around 60 gravid hermaphrodites were randomly picked up from respectively MGC and MGU population plates. These individuals were placed on two set of new plates (one set by population) and allowed to lay eggs for 90 minutes. Eggs were then deposited in the 12-well tissue-plates. One egg was deposited per well and at least 12 wells were used for each concentration and each population. Survival, growth, and egg laying were monitored individually for 8 days. Survival was measured by stimulating each worm with a platinum transfer pick. The nematode was scored as dead if no head or body movement was triggered by three repeated stimulations (Sutphin & Kaeberlein, 2009; Swain *et al.*, 2004). Nematodes were photographed daily using a stereomicroscope (ZEISS SteREO Discovery V20, x240 and x160 magnification respectively for juveniles and adults) coupled with a computer-connected camera (Nikon D5000). Body length was measured using ImageJ software (Rasband, 2012) and a micrometer scale measure. Egg laying was recorded by visual scoring. The few worms that were lost by crawling off the plate or desiccating on the sides of the plates were removed from data. Similarly, individuals that could not be sexed were discarded. As all individuals exposed at a nominal concentration of 1.1 mM U for the generation 0 did not grow enough to be sexed and since we did not observed any sexual differences for individuals of this length, we decided to include them as both male and hermaphrodite in the

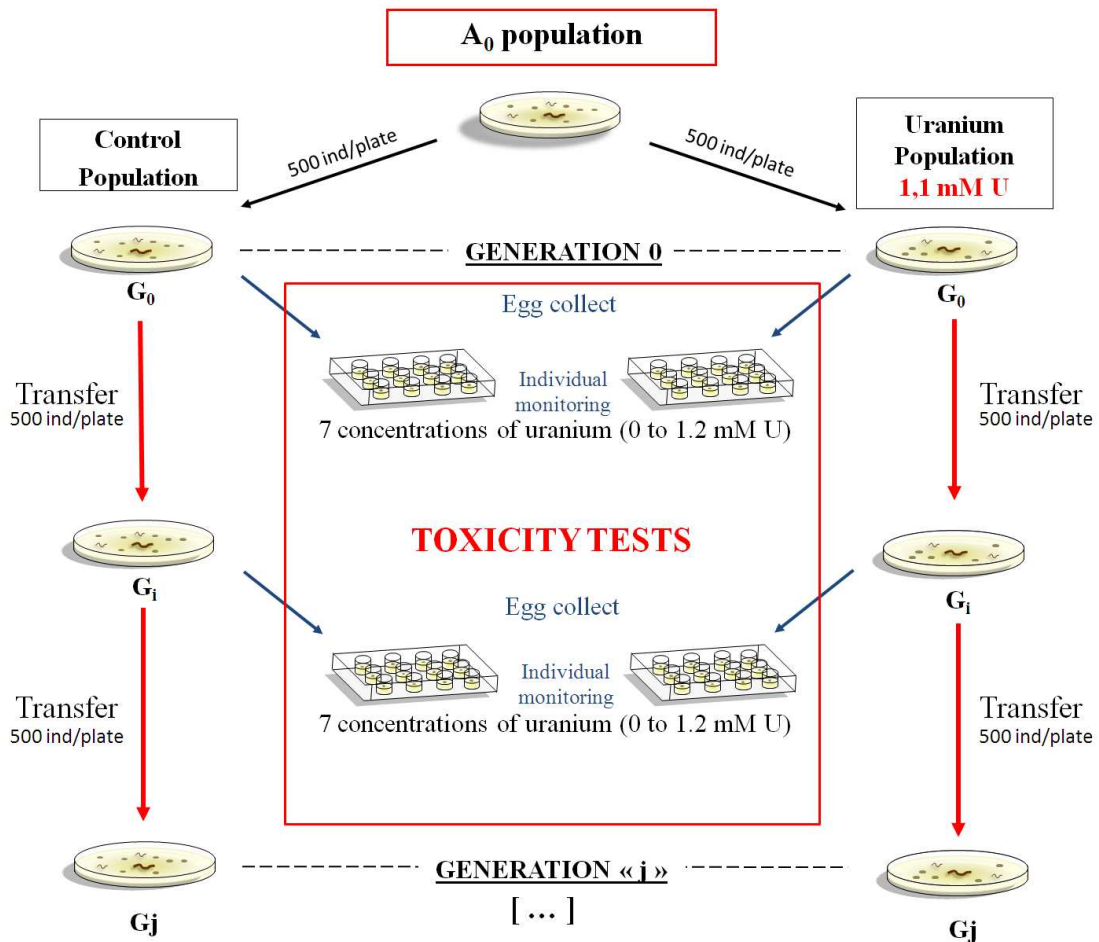


Figure VIII.1: Schematic overview of the experimental design. The A<sub>0</sub> population is the original population. Uranium population (MGU) was exposed to 1.1 mM U during all the experiment. Uranium population (MGU) and Control population (MGC) were transferred in new dishes every three days. For selected generations, eggs were collected in MGC and MGU and were respectively submitted to toxicity tests

analysis. The experimental design is presented in Figure VIII.1.

#### VIII.5.4 Data analysis

Growth data were modelled thanks to a Gompertz model:

$$L = L_{inf} \times \exp \left( \frac{L_0}{L_{inf}} \right) \times \exp^{-at} \quad (\text{VIII.1})$$

where  $L_{inf}$  is the maximal length,  $L_0$  is the hatching length and  $a$  is a constant related to growth rate. Cumulated egg laying at 126 hours post hatching was assumed to be total egg laying (called fecundity thereafter) as we observed no egg laying after this period in all preliminary experimentations in the laboratory.

Effects of uranium on  $L_{inf}$ ,  $L_0$ ,  $a$  and fecundity were tested through an analysis of variance with Dunnett's and Tukey's all-pair comparison tests as post hoc comparison tests. Model adjustment and statistical analysis were performed with the statistical computing software R 2.15 (R Core Team, 2012).

Dose-responses and half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) were calculated using a logistic model fitted with least squares optimization method using the "drc" R-package (Ritz & Streibig, 2005). Results

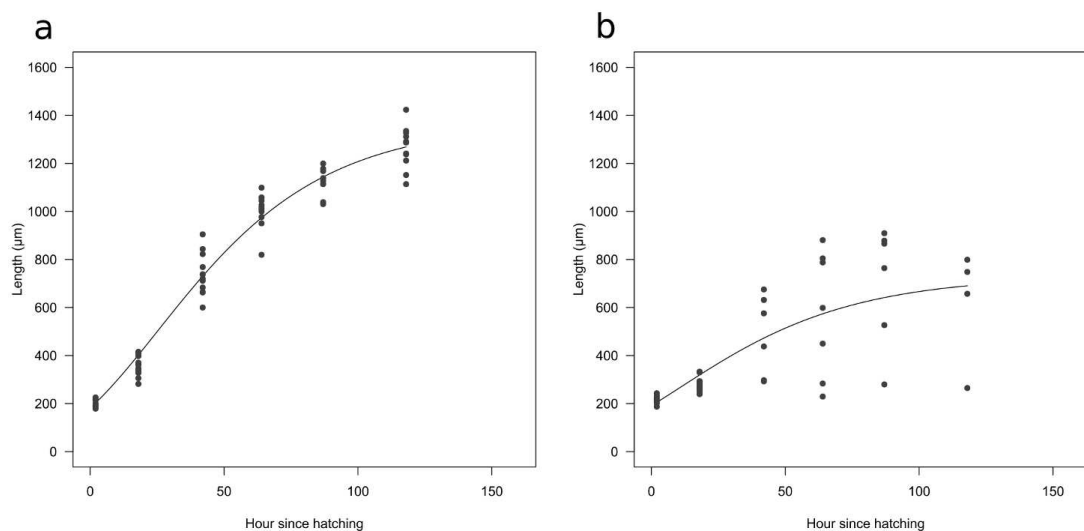


Figure VIII.2: Two examples (a and b) of *C. elegans* length ( $\mu\text{m}$ ) in relation to age (hour since hatching). Observed data are represented by points, the Gompertz model (Eq. VIII.1) is represented by the regression line. “a” corresponds to data obtained with individuals exposed to control conditions with the following estimated parameters values: maximal length ( $L_{inf}$ ) = 1370  $\mu\text{m}$ , hatching length ( $L_0$ ) = 182  $\mu\text{m}$ , and growth rate ( $a$ ) = 0.028. “b” corresponds to data obtained with individuals exposed to 1.2 mM U with the following estimated parameters values maximal length ( $L_{inf}$ ) = 731  $\mu\text{m}$ , hatching length ( $L_0$ ) = 191  $\mu\text{m}$ , and growth rate ( $a$ ) = 0.027

are considered as statistically significant if the *p-value* is less than 0.05.

## VIII.6 Results

### VIII.6.1 Actual exposure concentrations

Initial uranium concentrations in the NGM obtained by ICP-AES were close to nominal concentration. We observed less than 10% of differences in 82% of the cases and less than 15% in 94.6%. The most important difference was observed on the toxicity test at 1.1 mM U for the generation 0 (measured at 1.48 mM U). In order to facilitate the reading of this study, nominal concentrations are used in figures and in the text.

### VIII.6.2 Model Fitting

The Gompertz model we used (Eq. VIII.1) provided a relevant fit of the growth data we obtained either for male or hermaphrodite individuals. Indeed, the  $R^2$  value was greater than 0.8 in 81% of the cases ( $> 0.9$  in 61%) for males and greater than 0.8 in 77% of the cases ( $> 0.9$  in 56%) for hermaphrodites. As illustrated by Figure VIII.2, all the cases with a  $R^2$  below 0.8 were caused by scattered data (Fig.VIII.2b). The parameters estimates were consistent with physiological data and literature (Altun & Hall, 2009; Araiz *et al.*, 2008; Byerly *et al.*, 1976).

### VIII.6.3 MGC life cycle parameters

For maximal length, male maximal length was constant throughout the generations (Anova  $F_{5,30} = 1.001, p = 0.434$ , Fig. VIII.3A). In contrast, hermaphrodite individuals showed a significant increase until

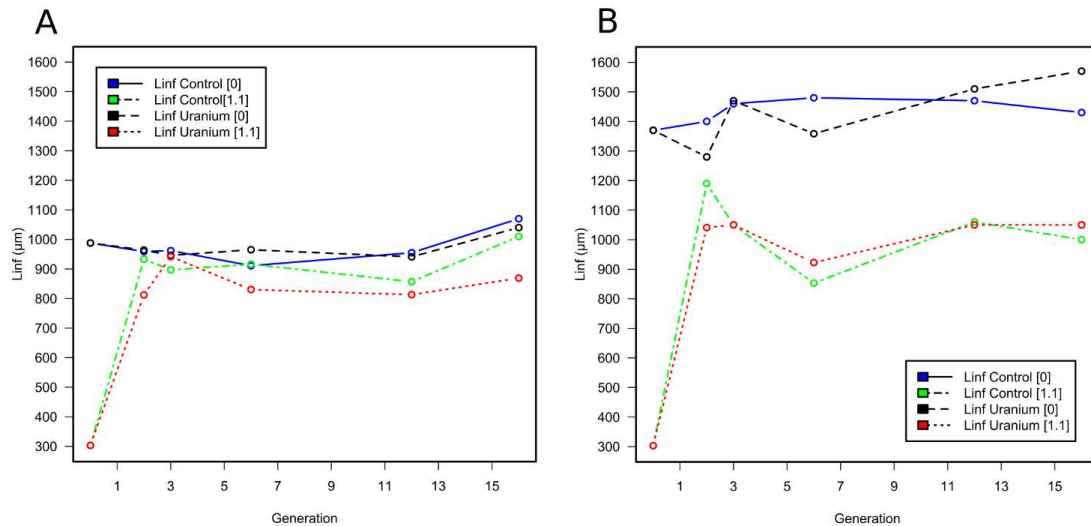


Figure VIII.3: Male (A) and hermaphrodite (B) maximal length  $L_{inf}$  ( $\mu\text{m}$ ) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation. Each point represents the  $L_{inf}$  value of the model (Eq. VIII.1) fitted using all the replicates for each treatment.  $L_{inf}$  Control [0] represents maximal length for MGC exposed to control conditions,  $L_{inf}$  Control [1.1] represents maximal length for MGC exposed to 1.1 mM U,  $L_{inf}$  Uranium [0] represents maximal length for MGU exposed to control conditions, and  $L_{inf}$  Uranium [1.1] represents maximal length for MGU exposed to 1.1 mM U.

generation six and remained constant afterwards (Anova  $F_{5,30} = 3.521, p = 0.013$ , Fig. VIII.3B). The hatching length oscillated throughout the generations in males and hermaphrodites (Anova Table VIII.1, Fig. VIII.4). Fecundity showed a significant decrease until generation three and remained constant afterwards (Anova  $F_{4,244} = 34.56, p < 0.001$ , Fig. VIII.5).

#### VIII.6.4 MGU life cycle parameters

The male hatching length ( $L_0$ ) was positively impacted by the uranium concentration (Anova Table VIII.1) starting from 1.1 mM U (Dunnnett post-hoc test  $p < 0.001$ ). The hermaphrodite hatching length ( $L_0$ ) was impacted by the uranium concentration for 1.1 mM U (Anova Table VIII.1, Dunnnett post-hoc test  $p = 0.02$ ). For all generations and both populations, there was a significant decrease of maximal length as a function of uranium exposure (Anova Table VIII.1, Fig. VIII.3, B.1, and B.2) starting from 1.1 mM U for both male and hermaphrodite individuals (Dunnnett post-hoc test  $p < 0.001$ ). In the same way, fecundity was decreased as a function of uranium exposure concentration (Anova Table VIII.1, Fig. VIII.5, and B.3) starting from 0.9 mM U (Dunnnett post-hoc test  $p < 0.001$ ). Under conditions of constant exposure (*i.e.* MGU population and toxicity test at 1.1 mM U) maximal length and fecundity were smaller than in control conditions (*i.e.* MGC population and toxicity test at 0 mM U) by over 20% and 60% whatever the generation. For both populations and both males and hermaphrodites, the third Gompertz parameters ( $a$ ) were not impacted by uranium concentration (Anova Table VIII.1).

Statistical analysis in Table VIII.1 show that growth parameters ( $L_0$ ,  $L_{inf}$ ,  $a$ ) did not differ between the two populations (MGC and MGU). In contrast, fecundity was clearly decreased in MGU population compared to MGC population (Anova Table VIII.1, Fig. VIII.5, and B.3).

Table VIII.1: Anova results for maximal length ( $L_{inf}$ ), hatching length ( $L_0$ ), growth rate ( $a$ ), and fecundity with Population (P), Generation (G), and Concentration (C) as factors.

Observed traits	Variable	d.f.	F value	$p$ value	
$L_0$ for male	Population	1	0.893	0.352	
	Generation	5	54.240	< 0.001	***
	Concentration	6	11.490	< 0.001	***
	PxG	5	1.603	0.191	
	PxC	6	2.229	0.069	
	GxC	30	4.836	< 0.001	***
	Residuals	29			
$L_0$ for hermaphrodite	Population	1	0.722	0.403	
	Generation	5	33.370	< 0.001	***
	Concentration	6	4.011	0.005	**
	PxG	5	0.550	0.737	
	PxC	6	0.275	0.944	
	GxC	30	1.802	0.058	
	Residuals	29			
$L_{inf}$ for male	Population	1	0.087	0.770	
	Generation	5	12.280	< 0.001	***
	Concentration	6	45.610	< 0.001	***
	PxG	5	0.432	0.822	
	PxC	6	1.459	0.227	
	GxC	30	10.430	< 0.001	***
	Residuals	29			
$L_{inf}$ for hermaphrodite	Population	1	1.988	0.169	
	Generation	5	32.650	< 0.001	***
	Concentration	6	159.400	< 0.001	***
	PxG	5	0.653	0.662	
	PxC	6	0.213	0.970	
	GxC	30	6.771	< 0.001	***
	Residuals	29			
$a$ for male	Population	1	1.556	0.222	
	Generation	5	0.892	0.499	
	Concentration	6	1.054	0.412	
	PxG	5	1.045	0.411	
	PxC	6	1.243	0.314	
	GxC	30	0.883	0.632	
	Residuals	29			
$a$ for hermaphrodite	Population	1	0.599	0.445	
	Generation	5	1.377	0.262	
	Concentration	6	0.633	0.703	
	PxG	5	0.241	0.941	
	PxC	6	0.843	0.547	
	GxC	30	0.810	0.715	
	Residuals	29			
Fecundity	Population	1	5.335	0.021	*
	Generation	4	80.870	< 0.001	***
	Concentration	6	231.200	< 0.001	***
	PxG	4	1.409	0.230	
	PxC	6	0.315	0.929	
	GxC	23	3.192	< 0.001	***
	PxGxC	22	0.754	0.782	
Residuals	462				

Main effects and first-order interaction are presented for both male and hermaphrodite for the estimated parameters  $L_{inf}$ ,  $L_0$ , and  $a$ . Main effects, first-order, and second-order interactions are presented for fecundity. d.f. represents the number of degrees of freedom, and F value represents the value of the Fisher statistic. \* =  $p$  value < 0.05, \*\* =  $p$  value < 0.01, and \*\*\* =  $p$  value < 0.001.

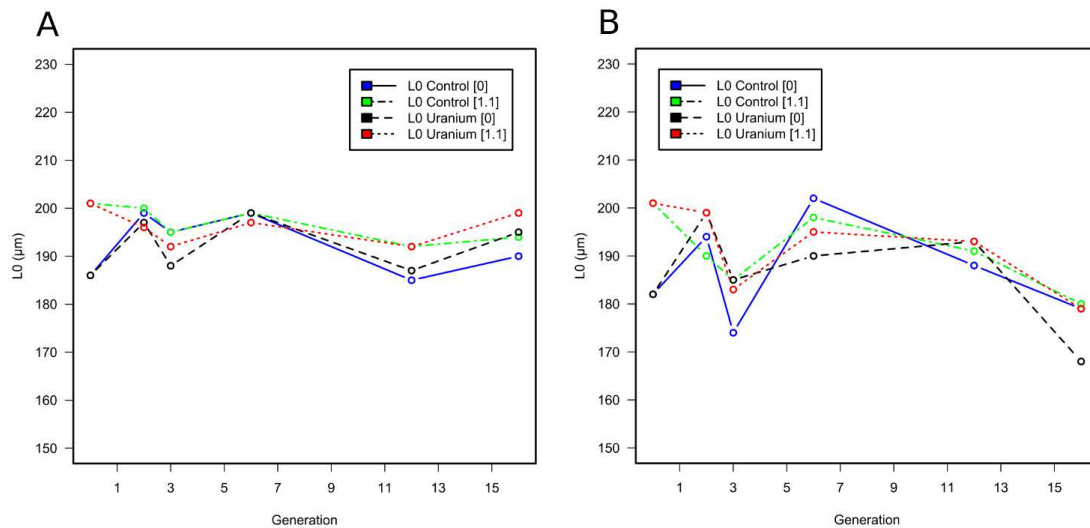


Figure VIII.4: Male (A) and hermaphrodite (B) hatching length  $L_0$  ( $\mu\text{m}$ ) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation. Each point represents the  $L_0$  value of the model (Eq. VIII.1) fitted using all the replicates for each treatment.  $L_0$  Control [0] represents hatching length for MGC exposed to control conditions,  $L_0$  Control [1.1] represents hatching length for MGC exposed to 1.1 mM U,  $L_0$  Uranium [0] represents hatching length for MGU exposed to control conditions, and  $L_0$  Uranium [1.1] represents hatching length for MGU exposed to 1.1 mM U.

### VIII.6.5 Dose response relationship

Our data showed that dose-responses for  $L_{inf}$  and fecundity hardly varied whatever the population throughout the generations for hermaphrodite individuals (Table VIII.2). Dose-responses for  $L_{inf}$  for male individuals were irrelevant due to a lack of power at some toxicity test concentrations.

## VIII.7 Discussion

In this study, the effects of uranium on growth, reproduction, survival, and evolution of dose-responses of individuals from two populations (control and exposed) of *C. elegans* were assessed.

In our experiment, we found at all generations effects of uranium on maximal length and fecundity. The NOEC for growth of hermaphrodites and male was 0.9 mM U. The NOEC for reproduction was 0.5 mM U. Muscatello & Liber (2009) found effects on *Chironomus tentans* growth at concentrations above  $157 \mu\text{g L}^{-1}$  and a NOEC of  $39 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\approx 0.6 \mu\text{M U}$  and  $\approx 0.1 \mu\text{M U}$ ), but no effect on reproduction for exposure concentrations up to  $835 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\approx 3.5 \mu\text{M U}$ ). Moreover, they showed a similar trend in growth reduction for exposed organisms and for unexposed organisms originated from adult males and females exposed to uranium during their immature life stages. Beaudouin *et al.* (2012a) showed effects of uranium on both growth and reproduction of *Chironomus riparius* and also showed that exposure to uranium during eight generations led to a phenotypic selection via a differential survival characterized by longer time to emergence and smaller larval maximal size. They estimated a long-term No Effect Concentration (NEC) of  $28.3 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight of sediment. There are only a few studies on the consequences of exposure to uranium during many successive generations although the uranium half-life can reach up to  $4.5 \times 10^9$  years ( $^{238}\text{U}$ ). Moreover,



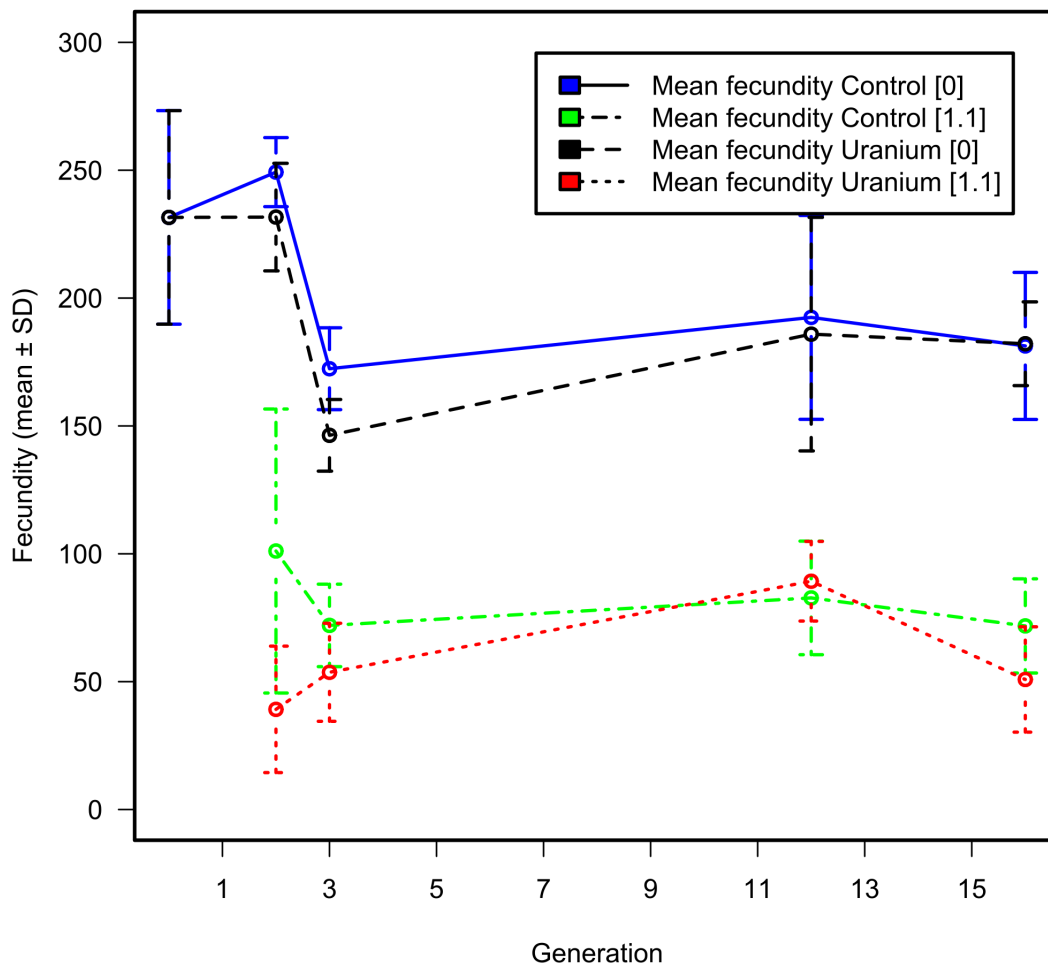


Figure VIII.5: Mean fecundity ( $\pm$  Standard Deviation) for individuals issued from MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to control conditions or 1.1 mM U, as a function of the generation. Mean fecundity Control [0] represents fecundity for MGC exposed to control conditions, Mean fecundity Control [1.1] represents fecundity for MGC exposed to 1.1 mM U, Mean fecundity Uranium [0] represents fecundity for MGU exposed to control conditions, and Mean fecundity Uranium [1.1] represents fecundity for MGU exposed to 1.1 mM U.

Table VIII.2: EC<sub>50</sub> values relative to estimated maximal length ( $L_{inf}$ ) and fecundity, as a function of generation and population.

Observed traits	G	EC <sub>50</sub>	SE	Lower	Upper
$L_{inf}$	0	1.21	0.01	1.18	1.25
Hermaphrodite	3	1.36	0.05	1.25	1.47
Control Population	2	1.36	0.07	1.22	1.51
	6	1.14	0.03	1.08	1.20
	12	1.52	0.11	1.29	1.74
	16	1.26	0.03	1.20	1.32
$L_{inf}$	0	1.22	0.03	1.16	1.27
Hermaphrodite	3	1.28	0.15	0.96	1.60
Uranium Population	2	1.38	0.10	1.16	1.59
	6	1.25	0.07	1.10	1.39
	12	1.39	0.11	1.16	1.63
	16	1.32	0.08	1.15	1.50
Fecundity	0	0.98	0.02	0.93	1.03
Control Population	2	1.06	0.03	0.99	1.12
	3	1.05	0.05	0.96	1.15
	12	1.08	0.02	1.02	1.13
	16	1.06	0.04	0.98	1.14
Fecundity	0	0.98	0.02	0.93	1.03
Uranium Population	2	0.84	0.10	0.65	1.03
	3	1.05	0.04	0.97	1.13
	12	1.07	0.07	0.93	1.22
	16	0.97	0.03	0.90	1.04

EC<sub>50</sub> was calculated based on the regression of the dose-response curve relating endpoint value to the concentration, fitted with a logistic model. Estimates of the EC<sub>50</sub>, standard error (SE), and the lower and upper bounds of the 95% confidence interval are presented for each generation (G).

according to Klerks & Levinton (1989), a differential survival may appear in contaminated environments as least sensitive individuals may survive better. This may induce adaptation to the stressful environment. Such adaptation of individuals to a specific environment may lead to a decrease of the population fitness in a new environment or in an environment without the stressor (Jansen *et al.*, 2011a,b; Lenormand *et al.*, 1999; Salice *et al.*, 2010; Ward & Robinson, 2005).

We did not observe any adaptation on growth as control and exposed populations were similar on each trait relative to growth. In contrast, we observed differentiations on reproduction traits. Indeed, a permanent decrease of fecundity appeared in the uranium population (MGU) compared to control population (MGC). This impact on reproductive traits may lead to adverse effects on the whole population. Indeed, Forbes & Calow (2002) demonstrated that effects on reproduction traits are significantly correlated with changes in the population growth rate — which is a robust endpoint for assessing ecological risks of pollutants (Billoir *et al.*, 2007; Forbes & Calow, 1999). Although common gardens (*i.e.* individuals from uranium population replaced in control conditions) were performed for each studied generation, we did not show any significant results. This may be explained by the fact that experimental design did not allow us to perform common gardens for more than one generation. Indeed, observed effects should have been mitigated by within-individual (Scheiner, 1993) or cross-generation (*i.e.* maternal effects (Räsänen & Kruuk, 2007)) effects. In our study, as in Beaudouin *et al.* (2012a), we showed an adaptation to experimental conditions in both exposed and unexposed populations. Indeed, an increase in maximal length and a decrease in fecundity were observed in both populations. This may be a direct consequence of differences between culture conditions and experimental conditions. We could explain these significant changes in both populations by experimental conditions. Indeed, during the experimentation, individuals were observed daily under a stereomicroscope near a flame as described in Stiernagle (2006) to ensure sterility and avoid contamination of plates. This process may have exposed individuals to a temperature of more than 20°C for several minutes each day. According to Byerly *et al.* (1976), *C. elegans* strain N2 individuals submitted to a temperature of 25°C grow faster, present a higher length at each stage and a lower fecundity than individuals cultured at 20°C.

We noted that the third parameter of the Gompertz growth model ( $a$ ), which is related to the growth rate, did not depend on the exposure concentration, contrary to maximal length or fecundity. In accordance with available energy-based models analysing growth and reproduction data, such observation would indicate an effect on food assimilation or on maintenance over-cost (Billoir *et al.*, 2008a,b). This would be consistent with other experimental and modelling studies which have also tackled the identification of the mode of action of uranium. Augustine *et al.* (2012a) showed that the mode of action on zebrafish could be either a decrease of food assimilation or an increase of maintenance energetic costs. They also reported a complementary study showing a loss of gut wall architecture, presence of large necrotic zones and an overall decrease in gut bacteria, in accordance with an effect on assimilation. In a similar way, Massarin *et al.* (2011) analysed uranium toxicity data on *D. magna* showing a likely effect on assimilation based both on modelling of the growth and reproduction responses and histological analysis of uranium induced damage to the gut

wall. The same kind of histological effects was observed on the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with uranium (Giovanetti *et al.*, 2010). In our study we can hypothesize that increase of uranium concentration causes both damages to the gut wall and decrease of food availability. Indeed, according to Boyd *et al.* (2003) and Yeates (1998) *C. elegans* cannot ingest microbeads with a diameter of 5  $\mu\text{m}$  or more and our observations suggest that some bacterial aggregates may appear at high uranium concentrations. These observations are coherent with studies assessing interactions between uranium and Gram-negative bacteria cell wall such as *E. coli* (Barkleit *et al.*, 2008; Lutke *et al.*, 2012). According to these studies, such interactions are mainly due to carboxylate and phosphate groups expressed on the outer membrane of lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria.

As the range of uranium concentration used in our study was chosen to be sublethal, we did not observe any effect of uranium on survival of *C. elegans*. To our knowledge, only two studies have assessed the effect of uranium on *C. elegans* survival. In these studies, the wild-type N2 *C. elegans* strain was used and survival was affected from 1.34 mM U and the lethal concentration for 50% of individuals (LC<sub>50</sub>) at 48 hours was 1.71 mM U (95% CI = 1.62-1.80) in NGM (Dutilleul *et al.*, 2013). In a 30 min water medium exposure, the LC<sub>50</sub> at 24 hours was found to be 66.9  $\mu\text{M}$  U  $\pm$  30.9 (Jiang *et al.*, 2009). These differences of responses as a function of the exposure media composition are known whatever the studied organism. Indeed Misson *et al.* (2009) showed that uranium effects on *Arabidopsis thaliana* greatly differ with or without the presence of inorganic-phosphate and Zeman *et al.* (2008) showed that uranium toxicity on *D. magna* varies with pH variations.

## VIII.8 Conclusion

Uranium appears to exert adverse effects on *C. elegans* growth and reproduction. In our multi-generations study, we found no adaptation regarding growth parameters. In contrast, a permanent decrease of fecundity appeared in the population exposed to uranium for several generations. Our results confirm the need of multi-generational studies for assessment of environmental risks of pollutant on long term population dynamics.

**Acknowledgements** We are especially grateful to Catherine Lecomte for discussions and suggestion on this project, Audrey Sternalski for discussion and punctual help, Virginie Camilleri for technical assistance with the ICP-AES measurements, and Cleo Tebby for linguistic corrections, statistical validation and discussion. We also thank Henrique Teotónio for providing us with his base population and for comments. The authors are also grateful to two anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions on the manuscript. This work was part of the Envirhom-Eco research program supported by the french Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and the 190 DRC-08-02 program supported by the french Ministry of Ecology.

**Ethical standard and conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest and that the experiments comply with the current law of the country in which they were performed.

**Final version:** Goussen B., Parisot F., Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Péry A.R.R., Bonzom J.-M. (2013) Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans*

life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*,22(5):869–878 DOI 10.1007/s10646-013-1078-5. The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)

## VIII.9 Conclusion du Chapitre VIII

### VIII.9.1 Principaux résultats

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent un effet de l'uranium tant sur la fécondité que sur la croissance de *C. elegans*. Les tests statistiques effectués sur ces deux critères d'effets montrent une NOEC de 0.5 mM U sur la reproduction et de 0.9 mM U sur la croissance. L'étude de l'évolution des  $EC_{50}$ , quant à elle, ne permet pas de mettre en évidence l'apparition d'une résistance ou d'une sensibilisation à l'uranium (Figure VIII.6 et VIII.7). En revanche, l'analyse de variance met en avant un effet population, avec une ponte moyenne plus faible dans la population MGU par rapport à la ponte moyenne de la population MGC.

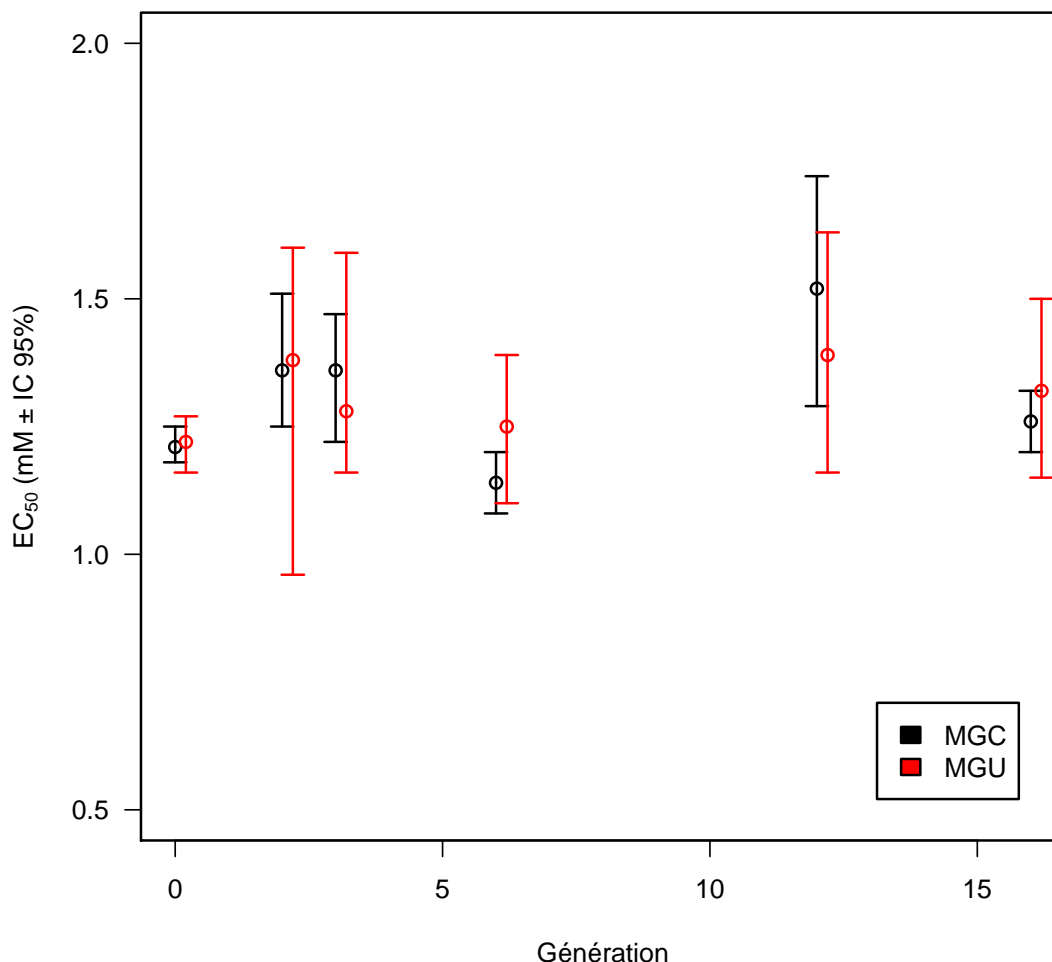


FIGURE VIII.6 – Évolution de la concentration induisant une réduction de la taille ultime de 50% en fonction des générations pour les hermaphrodites des populations MGC et MGU. L' $EC_{50}$  a été calculée à l'aide d'une régression de la courbe dose-réponse reliant le critère d'effet à la concentration, modélisée via un modèle logistique à trois paramètres ajusté par la méthode des moindres carrés (package *drc* du logiciel de statistique R).

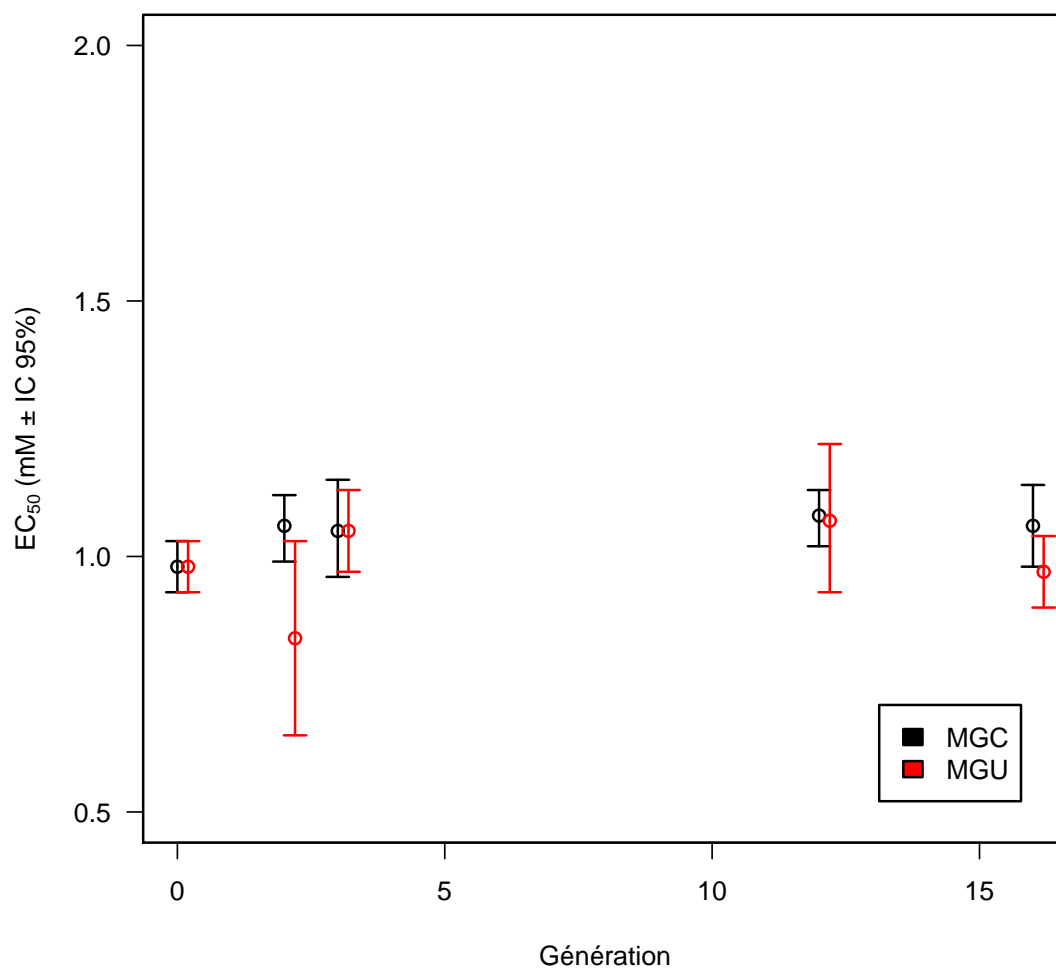


FIGURE VIII.7 – Évolution de la concentration induisant une réduction de la ponte totale cumulée de 50% en fonction des générations pour les populations MGC et MGU. L'EC<sub>50</sub> a été calculée à l'aide d'une régression de la courbe dose-réponse reliant le critère d'effet à la concentration, modélisée via un modèle logistique à trois paramètres ajusté par la méthode des moindres carrés (package *drc* du logiciel de statistique R).

### VIII.9.2 Bilan

L'évolution de populations de nématodes soumises à une contamination multigénérationnelle à l'uranium met en jeu des phénomènes complexes. De plus, les statistiques utilisées dans le cadre de ce chapitre sont des statistiques descriptives s'intéressant soit à la reproduction, soit à la croissance. Il serait intéressant d'utiliser une approche intégrée analysant ces deux critères d'effets simultanément. Pour ce faire, il paraît indispensable de s'affranchir de paramètres d'analyses des effets toxiques classiques (NOEC, LOEC ou CE<sub>X</sub>) de plus en plus sujet à caution (Jager, 2012; Landis & Chapman, 2011) afin d'utiliser des paramètres plus pertinents telle que la concentration sans effets (NEC). En effet, la NEC est un paramètre indépendant du temps (au contraire des paramètres classiques qui peuvent varier par exemple d'un facteur 20 en fonction du temps; Tew *et al.* 2009) qui peut être estimé pour des valeurs n'ayant pas été testées (Kooijman & Bedaux, 1996c; Péry *et al.*, 2001). Cela permettra de plus d'étudier la prévisibilité d'un modèle commun reproduction et

croissance avec une NEC commune. Enfin, l'interprétation biologique des paramètres biologiques et toxiques déterminés dans cet article n'est pas des plus évidente. Une étude plus fine des mécanismes sous-jacents mis en œuvre dans le cadre de l'évolution des individus de ces populations est par conséquent indiquée. L'utilisation d'un modèle mécanistique de type bioénergétique appliqué sur multigénération pourrait permettre d'étudier plus finement l'évolution de paramètres biologiques et toxicologiques ayant une interprétation biologique pertinente. La prochaine étape de ce projet de recherche est par conséquent la mise au point d'un modèle mécanistique bioénergétique de type DEBtox (Cf. Article II, page 93).





# CHAPITRE IX

---

## Modélisation DEBtox appliquée à *C. elegans* exposé à de l'uranium

---

### IX.1 Présentation du chapitre

L'ÉVALUATION précise des effets des polluants sur l'environnement est un pré-requis nécessaire à la protection des écosystèmes. Néanmoins, les études de ce type impliquent souvent l'analyse de jeux de données complexes. L'utilisation de modèle mécanistique peut permettre de répondre à cette problématique. En effet, ce type de modèle permet d'analyser les mécanismes mis en jeu par les organismes afin de répondre à la présence d'un polluant. Parmi ces modèles, les modèles de type DEBtox sont des modèles pertinents car permettant l'analyse intégrée et simultanée de plusieurs critères d'effets et présentant des paramètres physiologiques et toxiques ayant une signification biologique claire. Un tel modèle existe déjà pour le nématode (Jager *et al.*, 2005). Néanmoins, il semble ne pas prendre en compte certains aspects de la biologie des nématodes. L'objectif de cet article est donc de proposer une version améliorée de ce modèle et de l'appliquer afin d'analyser les mécanismes mis en jeu lors de l'exposition de *C. elegans* à de l'uranium durant une génération. Ce nouveau modèle sera ensuite appliqué à l'ensemble des données produites lors de l'Article I (page 73). Cela devrait permettre une analyse plus fine et une meilleure compréhension des modifications physiologiques retrouvées dans ce premier article.

### IX.2 Plan expérimental succinct

Afin d'analyser les mécanismes affectés par l'uranium sur *C. elegans*, une version améliorée du modèle DEBtox nématode est proposée et appliquée aux données de toxicité préalablement acquises. Pour ce faire, les trois modes d'action indirect décrit par les modèles DEBtox (*assimilation*, *croissance*, *maintenance*) ont été utilisés afin de modéliser les données. L'Article I (page 73) ayant démontré un effet de l'uranium à la fois sur la croissance et la reproduction, les deux modes d'action DEBtox ayant un effet direct sur la reproduction

(*surcoût* à la création d'un œuf et *mortalité* des gamètes) n'ont pas été ajustés dans l'Article II. L'inférence des paramètres a été effectuée à l'aide d'une approche Bayésienne pour chacun des modes d'action. La qualité des ajustements des différents modes d'action a alors été comparée en utilisant un critère de déviance (Deviance Information Criterium).

### IX.3 Matériel supplémentaire

Cet article contient des figures supplémentaires qui sont présentées en annexe C (page 175).

# DEBtox modelling applied to *Caenorhabditis elegans*: a case study on uranium

Benoit GOUSSEN<sup>1,2</sup>, Rémy BEAUDOUIN<sup>1</sup>, Morgan DUTILLEUL<sup>2</sup>, Adeline BUISSET-GOUSSEN<sup>2</sup>, Jean-Marc BONZOM<sup>2</sup>, and Alexandre R.R. PÉRY<sup>1</sup>

**1** Unité Modèles pour l'Écotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

**2** Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire d'ÉCOtoxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

2013

Submitted

## Abstract

The ubiquitous free-living nematode *Caenorhabditis elegans* is a powerful organism for measuring the effects of pollutant which is increasingly used in (eco)toxicological studies. Indeed, this nematode allows the rapid production of relevant data for ecological risk assessment. This data can be analysed with mathematical tools such as toxicokinetic-toxicodynamic (TKTD) modelling approaches. In this study, we assessed how a chronic exposure to a radioactive heavy metal (uranium) affects the life-cycle of *C. elegans* using a mechanistic model. In order to achieve this, we exposed individuals to a range of seven concentrations of uranium. Growth, reproduction, and survival were followed daily. These data were analysed with a TKTD model for nematodes based on the Dynamic Energy Budget theory. Parameter estimations were performed using a Bayesian framework. Our results showed that uranium affects the assimilation of energy from food with a no-effect concentration (NEC) of 0.42 mM U. Our model proved to handle a wide range of plausible biological parameters values. The sensitivity analysis allowed us to highlight some points of attention when using modelling for assessing (eco)toxicological data. In our case, the analysis showed that the main contributors to the model output were parameters linked to the feeding processes and the actual exposure concentration. This confirms that the real exposure concentration should be measured accurately and that the feeding parameters should not be fixed, but need to be reestimated during the parameter estimation process.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans* — Dynamic Energy Budget — Bayesian — Uranium

## IX.4 Introduction

The evaluation of the effects of pollutants on the environment is required for an effective protection of the ecosystems. According to Yeates & Bongers (1999), a useful bioindicator of ecosystemic stress should be the nematodes since they are abundant key decomposers in soil ecosystem. Within this phylum, a powerful organism for measuring the effects of pollutant is the ubiquitous free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. It measures 250  $\mu\text{m}$  at hatching and up to 1.4 mm at adult stage. It has several advantages for ecotoxicological assessment such as (i) a short life cycle (*C. elegans* breeds in three days at 20°C), (ii) a short life span (21 days at 20°C) and (iii) a high fecundity (Byerly *et al.*, 1976). *C. elegans* allows the assessment of physiological endpoints such as length, reproduction, or survival at various time steps during an experimentation. Therefore, this nematode is widely used to produce data for the assessment of chemical effects on the environment (Boyd *et al.*, 2003; Dutilleul *et al.*, 2013; Goussen *et al.*, 2013b; Harada *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Sochová *et al.*, 2007; Swain *et al.*, 2004, 2010).

The analysis of (eco)toxicological data has for long been mostly performed using laboratory toxicity tests. Over the past few years, such data are more and more analysed using modelling tools. Indeed, the scientific community recommends increasingly the use of modelling because it could “bring more ecology into ecological risk assessment” and it allows the assessment of complex and challenging data sets (Ashauer *et al.*, 2011; Forbes *et al.*, 2009).

The assessment of (eco)toxicological data based on the Dynamic Energy Budget (DEB) theory (Billoir *et al.*, 2008b; Kooijman & Bedaux, 1996a) is a relevant method to assess toxic compounds effects on organisms. Indeed, this method allows the simultaneous modelling of multiples endpoints (growth and reproduction) and the parameters estimated are independent of the exposure time (Billoir *et al.*, 2008b; Jager *et al.*, 2004). Such models can be used to assess physiological modifications (*e.g.* changes in growth rate, maximal length, reproduction rate, cumulated reproduction) (Augustine *et al.*, 2012a; Billoir *et al.*, 2008a; Massarin *et al.*, 2011; Péry *et al.*, 2003a), or differential life strategy responses (Alda Álvarez *et al.*, 2005) of an organism exposed to a pollutant. DEB modelling can also be adapted to other types of analysis. Thereby, survival analysis can profit from DEBtox models (Péry *et al.*, 2003b, 2002a) and individual based model (IBM) based on DEB modelling can permit to analyse population level data (Beaudouin *et al.*, 2012a; Martin *et al.*, 2013).

Uranium, a pollutant of growing interest (OECD, International Atomic Energy Agency (IAEA), 2012), is a radioactive heavy metal that can be found naturally in the environment. It is both a chemical and a radiological toxic but its chemical toxicity is considered to be dominant (Sheppard *et al.*, 2005; Zeman *et al.*, 2008). The natural uranium concentration in the soil is around 0.008 mM but it can reach up to 0.2 to 4.2 mM in contaminated areas (Ribera *et al.*, 1996; UNSCEAR, 2000).

Jager *et al.* (2005) presented a DEB model applied to the nematode. This model has been adapted to the assessment of ecotoxicological data and used several times (Alda Álvarez *et al.*, 2006a, 2005; Swain *et al.*,

2010). In the present study, in order to better assess the effect of chemicals on nematodes, we proposed an augmented version of the DEBtox equations for nematodes by Jager *et al.* (2005) based on the nematode biology. We tested the different nematode DEBtox models in order to assess the effects of the uranium on the free living nematode *Caenorhabditis elegans*. We also assessed model output robustness and sensitivity to parameters.

## IX.5 Materials and Methods

### IX.5.1 Test organism maintenance

The *C. elegans* population used in this study is the EEV-A<sub>0</sub> population created by Teotónio *et al.* (2012) from a mixture of 16 wild isolates. This androdioecious population was derived through a funnel cross strategy. Briefly, two-isolate hybrids were obtained by crossing, in a pair-wise fashion, each of the wild isolates. Then, four-isolate hybrids were obtained by inter crossing in a pair-wise fashion the two-isolate hybrids. Hybridizations continued until the 16-isolates hybrids were created. The population was then maintained over 140 generations and no significant loss of genetic diversity was observed by the authors after the recombination-selection equilibrium was mostly reached.

Prior to exposure, nematode populations were maintained at 20°C, 80% RH in 9 cm Petri dishes filled with modified nematode growth medium (NGM; use of HEPES buffer instead of potassium phosphate buffer (Goussen *et al.*, 2013b)) seeded with *Escherichia coli* strain OP50 (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006). *E. coli* OP50 cultures were grown overnight in L-Broth rich medium at 37°C. Then cultures (OD<sub>600</sub> = 3) were washed twice with a 5 g L<sup>-1</sup> NaCl solution in order to remove LB medium since it contains phosphate (Goussen *et al.*, 2013b). Petri dishes were seeded with 1 mL of a 20:1 mixture and left overnight to allow the bacterial culture to dry. Petri dishes were then exposed to UV doses (Bio-Link Crosslinker,  $\lambda = 254$  nm; intensity = 200  $\mu\text{watt m}^{-2}$ ) for 15 minutes to stop bacterial growth and to avoid uncontrolled heterogeneity in food availability between Petri dishes. To ensure nematodes were fed *ad libitum* they were transferred into new dishes every three days. To do so, nematodes were washed off the Petri dishes with a M9-modified solution (use of HEPES buffer instead of potassium phosphate buffer). Nematodes picked up were pooled in a 15 mL falcon tube and the number of individuals in a tube was estimated based on three sample drops of 5  $\mu\text{L}$  (Teotónio *et al.*, 2012). The volume corresponding to 500 individuals was then transferred into new Petri dishes.

### IX.5.2 Experimental conditions

Individuals from the maintained population were exposed to a range of seven nominal concentrations of uranium: 0 (control), 0.1, 0.3, 0.5, 0.9, 1.1, and 1.2 mM U. For this purpose, 12-well tissue-plates were used. Plates were filled with modified NGM. The uranium stock solution was obtained by dilution of uranyl nitrate (UO<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, France). Uranium solution was added to the modified NGM just before

flowing the plates. To measure actual exposure concentration, 100  $\mu\text{L}$  of NGM samples were collected for each treatment and stored at  $4^\circ\text{C}$ . The samples were digested with a combination of 1 mL  $\text{HNO}_3$  and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  at  $90^\circ\text{C}$  prior to measurement with ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA; detection limit 0.04  $\mu\text{M}$ ).

Around 60 gravid hermaphrodites were randomly picked up from the maintained population dishes, placed on new plates, and allowed to lay for 90 minutes. Eggs were then pooled and randomly deposited in the 12-well tissue-plates, and at least 12 wells were used for each treatment (one egg per well). Survival, growth, and egg laying were monitored individually for six days. Survival was measured by stimulating each worm with a platinum transfer pick. A nematode was scored as dead if no head or body movement was triggered by three repeated stimulations (Sutphin & Kaeberlein, 2009; Swain *et al.*, 2004). Nematodes were photographed daily using a stereomicroscope (ZEISS SteREO Discovery V20,  $\times 240$  and  $\times 160$  magnification respectively for juveniles and adults) coupled with a computer-connected camera (Nikon D5000). Body length was measured using the ImageJ software (Rasband, 2012) and a micrometer scale measure. Egg laying was recorded by visual scoring. The few worms that were lost by crawling off the plates or desiccating on the sides of the plates were removed from the data.

### IX.5.3 Model description

The Dynamic Energy Budget (DEB) theory (Kooijman, 2010) is based on a mathematical description of the uptake and use of energy within an organism. According to this theory, energy is taken up from food, assimilated, and stored into reserves. This energy is then dispatched between three main processes: (i) maintenance, (ii) growth, and (iii) reproduction. Models based on the DEB theory allowing the analyse of ecotoxicological data (*i.e.* DEBtox models) have been built by Kooijman & Bedaux (1996a,b,c) and corrected by Billoir *et al.* (2008b). DEBtox models describe the perturbation of energy management when an organism is exposed to a pollutant. This kind of model assumes that the effects appear when the internal concentration exceeds a threshold called the no-effect concentration (NEC).

The DEBtox models describe five modes of action of chemicals on physiological processes. Two of these have a direct effect on the reproduction (*cost* and *hazard* models). The three others have indirect effects on the reproduction in conjunction with effects on growth (*assimilation*, *maintenance*, and *growth* models).

The general DEB framework assumes that individuals' growth follows a von Bertalanffy growth curve provided feeding is *ad libitum* or at constant density (Kooijman, 2010). However as demonstrated by Byerly *et al.* (1976), *C. elegans* growth curve is a sigmoid. According to Knight *et al.* (2002), the *C. elegans* buccal cavity grows in a stepwise manner at each moult whereas the rest of the body growth is linear between the moults. Jager *et al.* (2005) assumed that this process induces a food limitation thus resulting in an initial growth slower than the latter growth. These authors dealt with this particularity assuming the *C. elegans* ingestion rate depends on a size-dependant stress factor and incorporated this in their nematode DEB model. We here propose two modifications of this set of equations in order to take into account some known biological

specificities of the nematode. (i) We took into account the *C. elegans* male gamete limitation which induces a progressive stop of the egg laying (Maupas, 1900; Ward & Carrel, 1979). (ii) We also modified the size-dependant stress factor by adding a new parameter which allows the nematode to access food whatever its length. Indeed, the approach from Jager *et al.* (2005) assumed that a small nematode would never be able to access food if food is just slightly limiting (see further in this paper). With our approach, this nematode will be able to access a small quantity of food such as little bacteria:

$$s_f(l) = \alpha \left[ 1 - \left( 1 + \frac{l_f^3}{l^3} \right)^{-1} \right] \quad (\text{IX.1a})$$

$$\frac{dl}{dt} = r_B [(1 - s_f) f - l] \quad (\text{IX.1b})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ \frac{g + l}{g + (1 - s_f) f} (1 - s_f) f l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.1c})$$

with  $s_f$  the size-dependant ingestion stress factor,  $(1 - \alpha)$  the proportion of food available whatever the length,  $r_B$  the von Bertalanffy growth rate,  $f$  the actual ingestion rate divided by the maximal ingestion rate for a body size,  $R_M$  the maximum reproduction rate,  $R_{Max}$  the maximal cumulated reproduction, and  $g$  the investment ratio.  $L$  represents the body length at time  $t$ ,  $L_0$  the body length at birth (*i.e.* the start of feeding in the DEB framework),  $L_f$  the body length at which the ingestion rate is half the maximum ingestion rate, and  $L_p$  the body length at puberty. All these length data are scaled by the maximal length  $L_{inf}$  resulting in parameters  $l$ ,  $l_0$ ,  $l_f$ , and  $l_p$ .

The internal concentration of the pollutant scaled by the bioconcentration factor,  $c_q$ , has been calculated as described by Kooijman & Bedaux (1996a) and modified with the  $s_f$  function:

$$\frac{dc_q}{dt} = C \frac{k_e (1 - s_f) f}{l} - c_q \left[ \frac{k_e (1 - s_f) f}{l} + \frac{d \ln l^3}{dt} \right] \quad (\text{IX.2})$$

where  $k_e$  is the elimination rate and  $C$  the actual exposure concentration. The toxic stress function,  $s$ , was calculated as  $s(c_q) = b(c_q - NEC)_+$  with  $b$  the slope of the effect and  $NEC$  the no-effect concentration.

Combining the equations IX.1 with the DEBtox equations rederived from the original ones by Billoir *et al.* (2008b) we obtained the set of equations presented in Table IX.1.

According to a previous study, the uranium seems to affect both the growth and the reproduction of *C. elegans* (Goussen *et al.*, 2013b). As a consequence, the modes of action that may apply to uranium on nematodes are the *growth*, *assimilation*, or *maintenance* models.

#### IX.5.4 Estimation of the parameters

Parameters estimations were performed using the statistical computing software R 2.15 (R Core Team, 2012) and the JAGS 3.3.0 (Just Another Gibbs Sampler) software, which is a program for the statistical



Table IX.1: *C. elegans* DEBtox equations

Assimilation model:

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{(1-s_f)f+g}{g+[(1-s_f)f(1-s(c_q))]} [(1-s_f)f(1-s(c_q)) - l] \quad (\text{IX.3a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ \frac{g+l}{g+(1-s_f)f(1-s(c_q))} (1-s_f)f(1-s(c_q))l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.3b})$$

Maintenance model:

$$\frac{dl}{dt} = r_B [(1-s_f)f - (1+s(c_q))l] \quad (\text{IX.4a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} (1+s(c_q)) \left[ (1-s_f)fl^2 \frac{g(1+s(c_q))^{-1}+l}{g+(1-s_f)f} - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.4b})$$

Growth model:

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{(1-s_f)f+g}{(1-s_f)f+g(1+s(c_q))} [(1-s_f)f - l] \quad (\text{IX.5a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ (1-s_f)fl^2 \frac{g(1+s(c_q))+l}{g(1+s(c_q))+ (1-s_f)f} - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.5b})$$

Hazard model:

$$\frac{dl}{dt} = r_B [(1-s_f)f - l] \quad (\text{IX.6a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ (1-s_f)fl^2 \frac{g+l}{g+(1-s_f)f} - l_p^3 \right] \exp^{-s(c_q)} \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.6b})$$

Costs model:

$$\frac{dl}{dt} = r_B [(1-s_f)f - l] \quad (\text{IX.7a})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1-l_p^3} \left[ (1-s_f)fl^2 \frac{g+l}{g+(1-s_f)f} - l_p^3 \right] (1+s(c_q))^{-1} \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{IX.7b})$$

analysis of Bayesian hierarchical models by Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Plummer, 2003). For each effect model, we performed an adaptive phase of 10,000 iterations. We then performed another 90,000 iterations. These iterations were performed on three independent MCMC chains. Chains' convergences were assessed using the Gelman & Rubin (1992) convergence statistic modified by Brooks & Gelman (1998). For the few estimations for which the convergence was not fully reached during this first run, we performed an adaptive phase of 15,000 iterations followed by 135,000 iterations on five independent MCMC chains.

Model fit quality was checked by plotting the fits for both the growth and the reproduction data. This assessment was performed using the mean and confidence interval of the 1,000 calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process.

The different modes of action models were compared using the Deviance Information Criterion (DIC) which is suitable for Bayesian calibration comparison (Spiegelhalter *et al.*, 2002). The DIC is a generalisation of the Akaike's Information Criterion (AIC). As for the AIC, the lower DIC points out the model that will make the best short-term predictions and a DIC difference of less than five indicates that the models show similar fits (Spiegelhalter *et al.*, 2003).

### IX.5.5 Sensitivity and uncertainty analysis

An uncertainty analysis was performed on the model parameters. The initial parameters values we used in this analysis were extracted from Jager *et al.* (2005). We applied a coefficient of variation of 20% to these values. Parameters' distributions were chosen according to the literature and expert opinion. We used triangle distributions for all parameters except for  $f$ ,  $g$ ,  $b$ ,  $NEC$ , and  $k_e$  for which an uninformative uniform distribution was used. The experimental design was built using a Monte Carlo approach. The variances of the model output were estimated by Monte Carlo integrations. Two independent input sample matrices ( $n \times p$ ) were used to compute the Monte Carlo integration. The sample size ( $n$ ) was of 30,000 and the number of parameters ( $p$ ) is indicated in the Table IX.2 for each model. Every row in each matrix represented a possible parameter combination for the model.

We also performed a sensitivity analysis on the parameters using a variance-based Sobol method (scheme by Saltelli 2002). The sensitivity analysis allows the identification of the main input contributors to the variation of the model outcome. Thus the sensitivity analysis indicates the parameters on which a particular emphasis must be paid. The Sobol's method is a global and model independent sensitivity analysis method that quantifies the amount of variance that each parameter contributes to the unconditional variance of the model output.

The parameters' values, the distribution, and the experimental design were the same as for the uncertainty analysis. We then calculated the first order ( $Si$ ; variance contribution of one parameter to the total model variance) and total order ( $STi$ ; result of the main effect of one parameter and of all its interactions with the other parameters) Sobol index. Calculations were performed thanks to the function "sobol2002" from

the *sensitivity* R-package (Pujol *et al.*, 2012) with the statistical computing software R 2.15 (R Core Team, 2012).

## IX.6 Results

### IX.6.1 Control data fit accuracy

Our model (Eq. IX.1) provided a relevant fit of both the growth and the reproduction data for the control conditions (Fig IX.1A and B). The parameters we obtained while fitting the control data set are presented in Table IX.3. Compared to the model proposed by Jager *et al.* (2005), both models present a similar fit accuracy ( $\Delta\text{DIC} < 5$ , see Table IX.2).

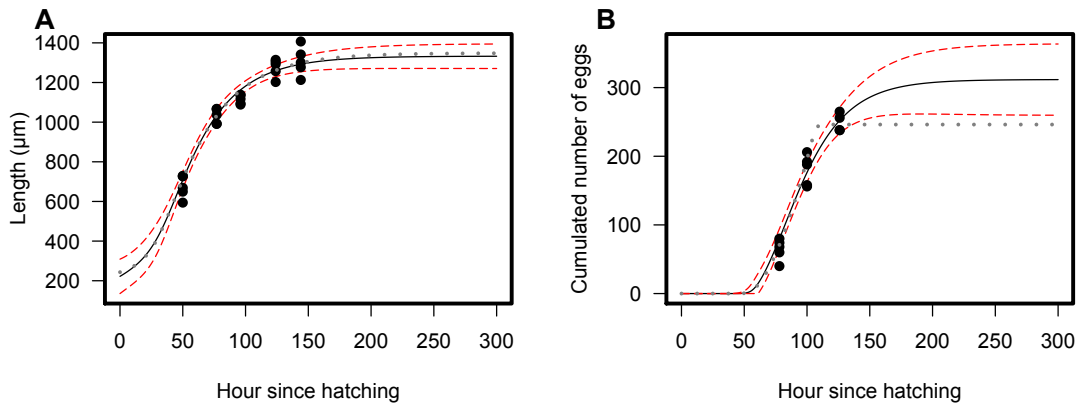


Figure IX.1: *C. elegans* length (A) and cumulated reproduction (B) in relation to age (hour since hatching) for the control conditions. Observed data are represented by *points*, the model fits (Eq. IX.1) are represented by the *regression line*. *Dashed lines* represent the 95% confident interval of the model ( $CI = Mean \pm 1.96 \times \sigma$ ). *Dotted lines* represent the model fitted with the equations of Jager *et al.* (2005).

Uncertainty analysis performed on the model proposed by Jager *et al.* (2005) showed that this model can handle only a small range of plausible biological parameters values. Indeed, over 50% of the simulated cases gave a non growing and therefore a non reproductive nematode (Fig. IX.2A and C.1A). In contrast, a large range of plausible biological parameters values can be handled by our model (Eq. IX.1) (Fig. IX.2B and C.1B). Model exploration also showed that the model we used is robust for the parameters estimations. Indeed, as showed by the Figures IX.2C and D, our model allows to test a larger range of values leading to a significant growth, while performing the parameters estimations compared to the initial model proposed by Jager *et al.* (2005).

### IX.6.2 Mode of action and sensitivity analysis

Table IX.2 presents the DIC comparison between the model by Jager *et al.* (2005) and our model for all the modes of action. The best mode of action is the *assimilation* model. Indeed, the DIC of the *assimilation* model is lower by over 32 points than all other modes of action DIC. In the same way as for the control

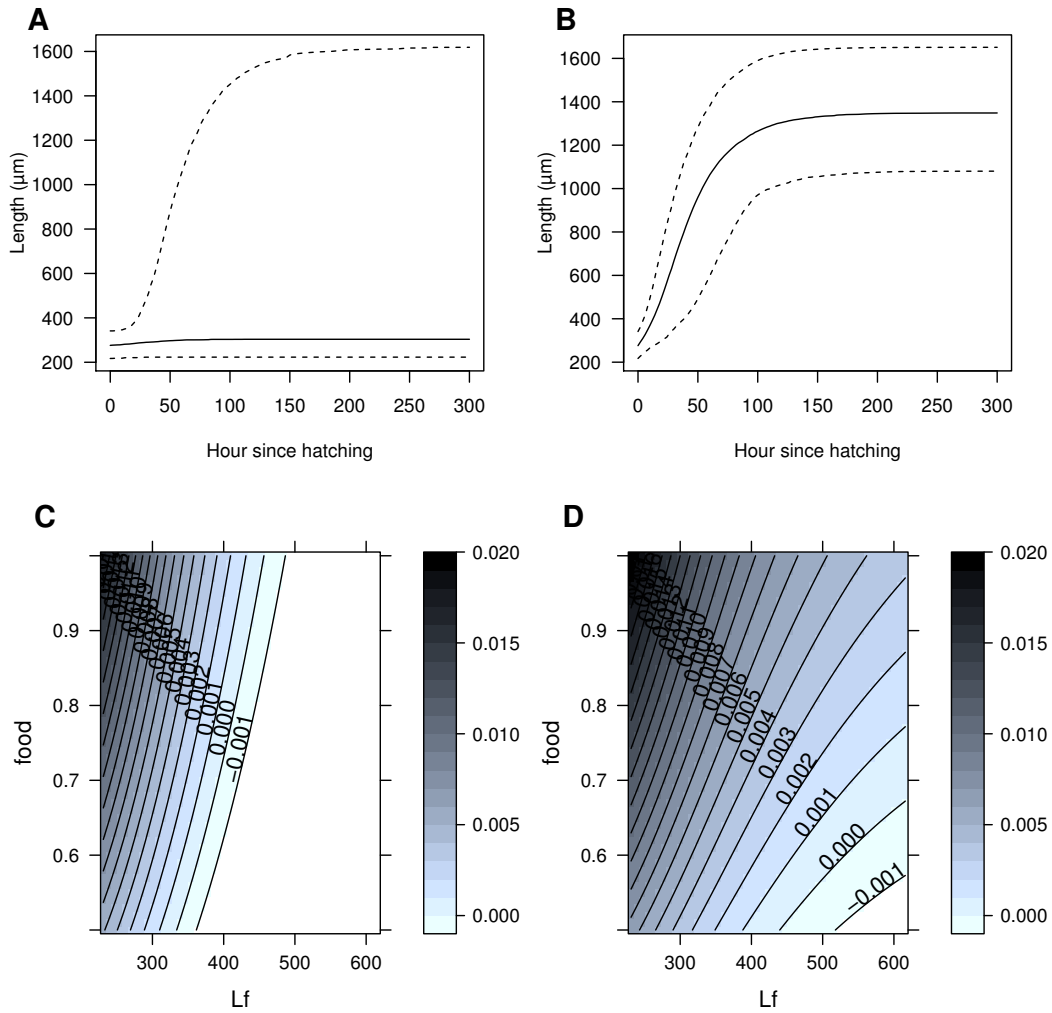


Figure IX.2: Uncertainty analysis and model exploration for growth. Panel A represents the uncertainty analysis of the model proposed by Jager *et al.* (2005) and panel B represents the uncertainty analysis of the model we used (Eq. IX.1). The *solid line* represents the median of the model output. *Dashed lines* represent the 95% quantiles of the model output. Panel C represents the scaled growth ( $\frac{dl}{dt}$ ) at hatching length for the model proposed by Jager *et al.* (2005) and panel D represents the scaled growth ( $\frac{dl}{dt}$ ) at hatching length for the model we used (Eq. IX.1). *Food* represents the resulting food  $(1 - s_f)f$  and *Lf* is the body length at which the ingestion rate is half the maximum ingestion rate.  $s_f$  includes the  $\alpha$  parameter in panel D but not in panel C

model, the Jager *et al.* (2005) model and our model have a non distinguishable quality of fit ( $\Delta\text{DIC} < 5$ ) for the *assimilation* model.

Table IX.2: Comparison of the fit quality between evaluated models

	Mode of action	Number of parameters	Log-likelihood	DIC
Jager <i>et al.</i> (2005)	Control	9	-195.5	399
	Assimilation	12	-2198.5	4408
	Maintenance	12	-2227.5	4485
	Growth	12	-2216.5	4451
Present study	Control	10	-196.5	401
	Assimilation	13	-2197.0	4405
	Maintenance	13	-2244.5	4687
	Growth	13	-2213.0	4437

Comparison between the model from Jager *et al.* (2005) and our model for all the modes of action. The comparison is based on the log-likelihood and the Deviance Information Criterion (DIC)

Sensitivity analysis (Fig. IX.3 and C.2) performed on our *assimilation* model showed that the main impact contributors to the growth model (Eq. IX.3a) output variations are parameters  $\alpha$  and the exposure concentration followed by parameters  $b$ ,  $f$ ,  $L_f$ , and  $NEC$ . Although  $L_f$  has a non negligible  $STi$ , its  $Si$  remains negligible. Parameters  $R_{Max}$ ,  $L_p$ ,  $R_M$ , and  $g$  did not influence the growth model output. Regarding the reproduction model (Eq. IX.3b), parameters  $f$  and the exposure concentration are the main contributors. These parameters are followed by parameters  $b$ ,  $\alpha$ ,  $L_{inf}$ ,  $L_p$ , and  $NEC$ . Parameters  $L_0$ ,  $R_M$ ,  $R_{Max}$ , and  $g$  did not influence the reproduction model output.

### IX.6.3 Parameter estimations

Parameter estimations for the *assimilation* mode of action (Eq. IX.3) are presented in Table IX.3 and Figure C.3. The distributions of the parameters estimated with the control data only were close to the distributions of the parameters estimated with all the data. Indeed, the means of the parameters estimates were within the confidence interval of each other. According to these estimations, the individuals were mostly fed *ad libitum* ( $f = 0.97$ ). The estimated no-effect concentration ( $NEC$ ) was of  $0.42 \pm 0.06$  mM and the elimination rate  $k_e$  was of  $0.16 \pm 0.11$  h<sup>-1</sup> indicating that under continuous exposure, internal concentration steady state should be reached within one day. The newly introduced parameter  $\alpha$  was estimated at  $0.88 \pm 0.07$  for the control data set and at  $0.86 \pm 0.06$  for all the data.

As showed on Figure IX.4, uranium affects both growth (especially the individuals' maximum length) and reproduction (both the onset of the reproduction and the maximum cumulated reproduction).

## IX.7 Discussion

In this study, the effect of uranium on growth and reproduction of the nematode *C. elegans* has been assessed using a bioenergetic approach.

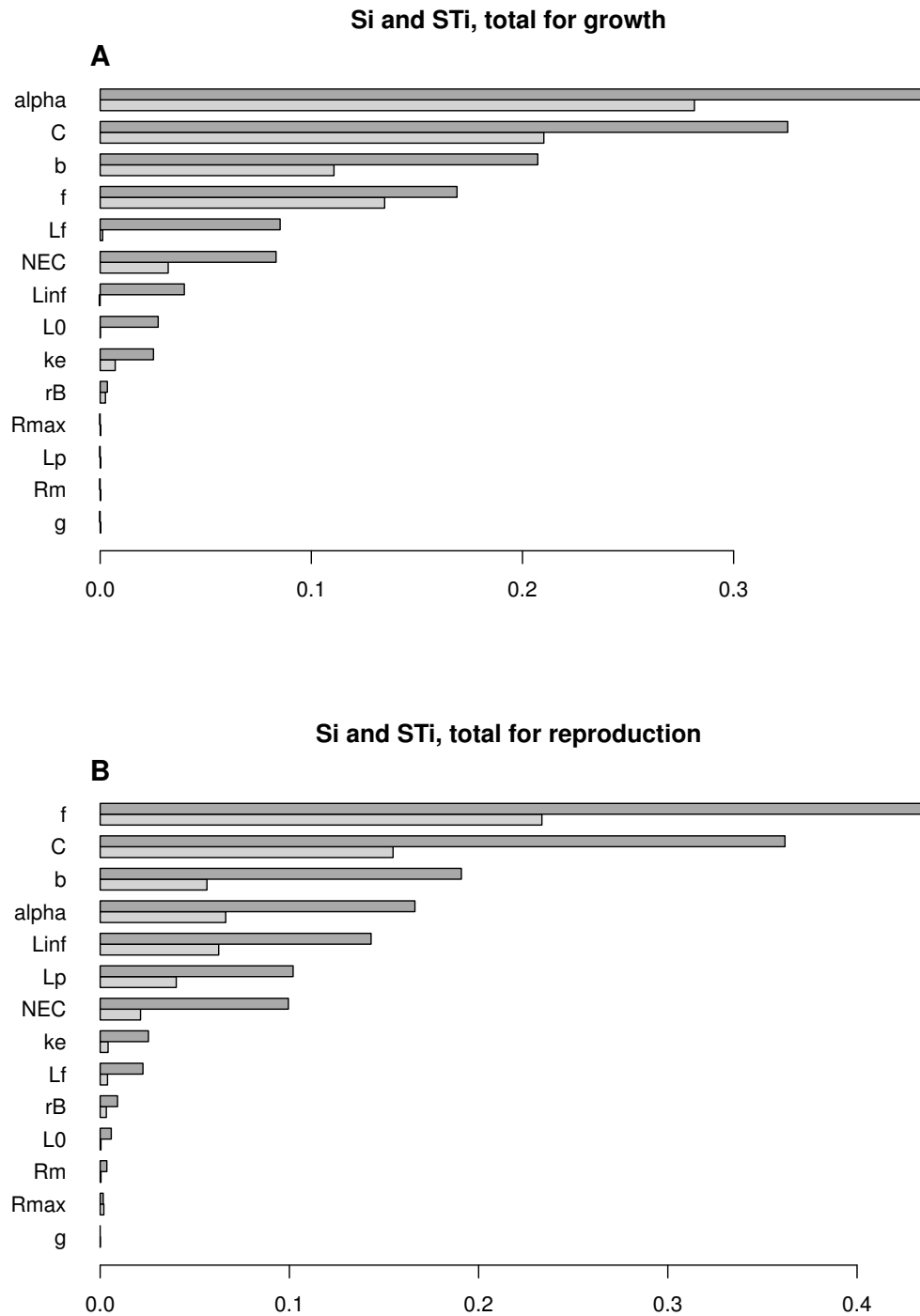


Figure IX.3: Sensitivity analysis for the *assimilation* model (Eq. IX.3). Mean of the sensitivity indices at the different times for the growth equation (A) and reproduction equation (B). Total order indices ( $ST_i$ ) are presented in *dark grey* and first order indices ( $Si$ ) in *light grey*. Parameters were ordered according to the total order Sobol sensitivity indices.

We have shown that our model presents a relevant fit for *C. elegans* growth and reproduction. The model we used presents a similar fit quality to the model proposed by Jager *et al.* (2005) ( $\Delta DIC < 5$ ). Nevertheless, our model has been shown to be more robust and to better account for the end of the reproductive period.

Table IX.3: Estimates of the model parameters using the *assimilation* model (Eq. IX.3) with the control data only or with all data (Full data set).

Parameter	Prior	Control data set (mean±SD)	Full data set (mean±SD)
$\alpha$ (-)	$U[0, 1]$	$0.88 \pm 0.07$	$0.86 \pm 0.06$
$f$ (-)	$U[0, 1]$	$0.97 \pm 0.02$	$0.97 \pm 0.03$
$L_0$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(282, 56) \text{ I } ]0, +\infty]$	$219 \pm 43.53$	$165 \pm 37.37$
$L_f$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(444, 89) \text{ I } ]0, +\infty]$	$418 \pm 50.96$	$364 \pm 47.35$
$L_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(1020, 204) \text{ I } ]0, +\infty]$	$764 \pm 87.18$	$818 \pm 57.64$
$L_{inf}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(1540, 308) \text{ I } ]0, +\infty]$	$1414 \pm 46.32$	$1383 \pm 41.14$
$r_B$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(0.039, 7.8 \cdot 10^{-3}) \text{ I } ]0, +\infty]$	$0.034 \pm 0.005$	$0.031 \pm 0.003$
$g$ (-)	$U[0, 20]$	$10 \pm 5.48$	$12 \pm 4.88$
$R_M$ ( $\# \text{ h}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(12.67, 2.53) \text{ I } ]0, +\infty]$	$15.8 \pm 2.02$	$15.1 \pm 1.90$
$R_{Max}$ ( $\#$ )	$\mathcal{N}(265, 53) \text{ I } ]0, +\infty]$	$312 \pm 27.42$	$249 \pm 22.13$
$k_e$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$U[0, 1]$	—	$0.16 \pm 0.11$
$b$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$U[0, 5]$	—	$0.31 \pm 0.03$
$NEC$ ( $\text{mM}$ )	$U[0, 2]$	—	$0.42 \pm 0.06$

The normal distribution of mean  $\mu$  and standard deviation  $\sigma$  is noted  $\mathcal{N}(\mu, \sigma)$  and the uniform distribution between  $a$  and  $b$  is noted  $U[a, b]$ .  $\text{I } ]c, d]$  denotes an interval censoring between  $c$  (excluded) and  $d$ .

Indeed, our model was more flexible, allowed a larger variation around the optimal values, and therefore, could handle a larger range of biological possibilities. Moreover, it took into account the slow decrease of the laying at the end of the reproductive period instead of a sudden stop of reproduction. This allowed a better fit of our reproduction data and may better assess *C. elegans* reproduction data from Byerly *et al.* (1976) and Jager *et al.* (2005) Figure 3 and 5.

The DEBtox modelling allows the assessment of the effects of a toxic compound on an organism. Nevertheless, the conclusions obtained through this method should be carefully controlled. Indeed, results may be biased by errors in the model or by wrong parameters estimations. As an example, assessment of ecotoxicological data made with DEBtox models which did not take into account the corrections by Billoir *et al.* (2008b) may result in a questionable assessment of the mode of action of the toxic compound. Another important point is that, in DEBtox modelling, the level of effects is assumed to be linearly dependent on the internal concentration, once the NEC is exceeded. This is a strong hypothesis to account for the actual shape of the dose response with a minimum set of parameters to estimate. This may bias the comparison between different modes of action if the focus is on “goodness of fit” only, if the actual dose response is far from linear. Thereby, previous studies assessing modes of action through DEBtox models proposed complementary measures to a standard test such as food limitation studies or histological observations (Massarin *et al.*, 2011; Péry *et al.*, 2003a). Another option consists in linking the physiological mode of action of pollutant based on DEBtox modelling with gene expression changes, as proposed by Swain *et al.* (2010). The authors exposed *C. elegans* to ranges of concentration of cadmium, fluoranthene or atrazine. Fluoranthene has been found to increase cost for *growth* and reproduction, and atrazine an increase of cost for *maintenance*. These effects were supported by gene expression analysis. In contrast, some DEBtox modes of action results can be in contradiction with supplementary studies. Indeed, regarding cadmium, Swain *et al.* (2010) found an

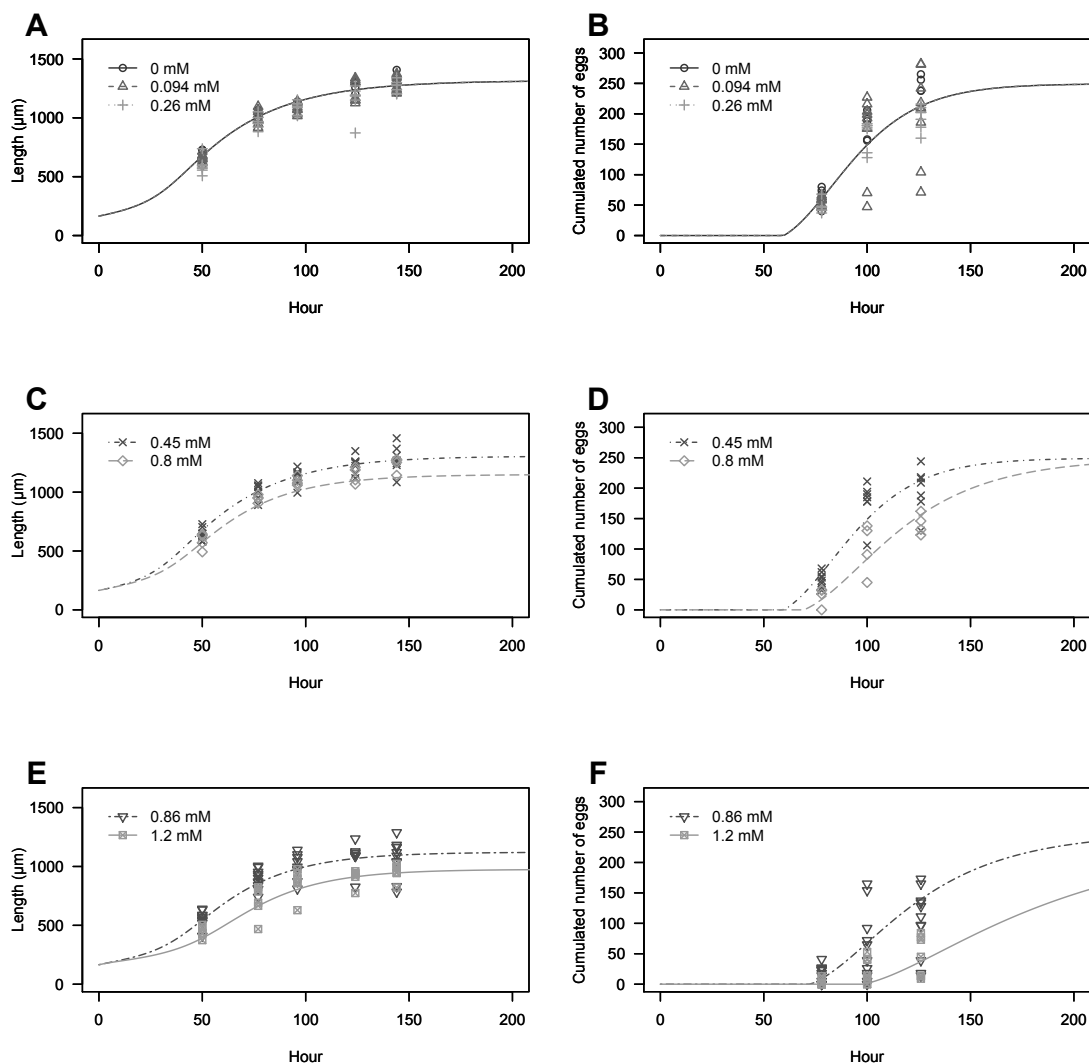


Figure IX.4: Mode of action results for the *assimilation* model (Eq IX.3). Panel A and B represent the results for a concentration below the no-effect concentration (*NEC*) for respectively the growth and the reproduction. Panel C, D (two lowest), E, and F (two highest) represent the results for the concentrations over the non effect concentration (*NEC*) for the growth and the reproduction. Model fits are represented by regression *lines*. Data are represented by *symbols*.

effect on energy *assimilation* but gene expression analysis showed both an effect on gene associated with energy production, on DNA integrity, and on transcriptional activity. The latter case suggests an increase of *maintenance* costs. Thereby, conclusions on the mode of action of a compound should be carefully discussed and supported by complementary studies.

Our results show that uranium affects both the reproduction and the growth of *C. elegans*. According to the DEBtox bioenergetic approach, such results indicate that the mode of action of uranium on our model organism is an indirect effect mode of action. Our modelling results suggest that the mode of action of uranium is an effect on the assimilation of energy from food. Indeed, the Deviance Information Criterion we obtained for the *assimilation* model was much better than for all other modes of action. This result is consistent with other experimental and modelling studies which tackled the mode of action of uranium. Augustine *et al.* (2012a) showed that the mode of action of uranium on *Danio rerio* could either be *assimilation*



or *maintenance*. A complementary study reveals that uranium induced an increase of damages in gut cell mitochondria, a loss of the gut wall architecture, the presence of large necrotic zones, and an overall decrease in gut bacteria (Augustine *et al.*, 2012b). These results are in accordance with effects on the assimilation of energy from food. Similarly, DEBtox analysis of the uranium toxicity on *Daphnia magna* exposed during three generations showed that for the two first generations, the *assimilation* and the *maintenance* captured equally effects on growth and reproduction, but for the last generation, the *assimilation* mode of action better captured the uranium effects (Massarin *et al.*, 2011). The authors concluded in favour of the *assimilation* mode of action based on this last result and on histological evidences. These results were indeed supported by measures demonstrating that uranium induced structural damages on intestinal epithelium (Massarin *et al.*, 2011; Zeman, 2008), a significant decrease of the ingestion rate expressed per daphnid (Zeman *et al.*, 2008), and a significant reduction in carbon ingestion and assimilation rates (Massarin *et al.*, 2010). The same kind of histological damages to the digestive tract was also reported on the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with uranium (Giovanetti *et al.*, 2010).

Even though we obtained a pertinent model, it did not fit very well the maximum egg laying under stress conditions. A better fit could be obtained using a double effect (both direct and indirect effect) on the *C. elegans* reproduction. The resulting equation for the *assimilation* model (Eq. IX.3) would become either

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ \frac{g + l}{g + (1 - s_f) f (1 - s(c_q))} (1 - s_f) f (1 - s(c_q)) l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} \exp^{-s(c_q)} - R}{R_{Max} \exp^{-s(c_q)}} \quad (\text{IX.8})$$

if we consider a *hazard* additional effect on the male gametes or:

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ \frac{g + l}{g + (1 - s_f) f (1 - s(c_q))} (1 - s_f) f (1 - s(c_q)) l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} (1 + s(c_q))^{-1} - R}{R_{Max} (1 + s(c_q))^{-1}} \quad (\text{IX.9})$$

if we consider a *cost* additional effect on the male gametes.

Applied to our data, Eq. IX.8 gave a DIC of 4,398 and Eq. IX.9 a DIC of 4,399. Although these obtained DIC are lower than the DIC we obtained in Table IX.2, to conclude certainly, and retain this model, further experimental analysis should be necessary to assess and validate this double effect. It should be interesting to assess the evolution of the number of male gamete produced under uranium exposure through for example the Major Sperm Protein (MSP) dosage.

The sensitivity analysis we performed showed that the parameters related to food assimilation such as  $f$  and  $\alpha$  greatly influence the model output. Thereby we believe that the food distribution must be constant throughout the replicates and conditions in toxicity test experiments. Moreover, the food linked parameters should be re-estimated during the data analysis. The impacts of the variations of the exposure concentration

on the model output were also assessed thanks to the sensitivity analysis. As this parameter is one of the most influential parameter on the output variability of the model, we recommend the careful analysis of the actual concentration present in the medium.

## IX.8 Conclusion

Our study proposed a robust and consistent DEB model for the nematode. Our results supported the hypothesis that uranium affects the assimilation of energy from food in many species. We also confirmed the importance of accurately assessing the actual concentration of exposure of contaminant and of food while analysing (toxicity) data through modelling. We highlight some points of attention when using modelling for assessing (eco)toxicological data such as the importance of supporting the modelling results by complementary studies.

**Acknowledgements** We are especially grateful to Florian Parisot for experimental help, Catherine Lecomte for discussions and suggestion on this project, Audrey Sternalski for discussion and punctual help, Virginie Camilleri for technical assistance with the ICP-AES measurements, and Cleo Tebby for linguistic corrections and discussion. We also thank Henrique Teotónio for providing us with his base population and for comments. This work was part of the Envirohom-Eco research program supported by the french Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and the 190 DRC-08-02 program supported by the french Ministry of Ecology.

**Ethical standard and conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest and that the experiments comply with the current law of the country in which they were performed.

## IX.9 Conclusion du Chapitre IX

### IX.9.1 Principaux résultats

Ce chapitre nous présente une amélioration du modèle DEB pour nématode. Le nouveau modèle mis au point prend en compte des éléments biologiques qui ne l'étaient pas auparavant. Ainsi, l'arrêt progressif de la reproduction existant chez *C. elegans* est fidèlement retranscrit. De plus, l'ajout d'un nouveau paramètre,  $\alpha$ , permet de prendre en compte le fait qu'un nématode parviendra à ingérer de la nourriture quelque soit sa taille. Le nouveau modèle ne prédit ainsi plus d'arrêt de la croissance après éclosion lorsque les conditions du milieu deviennent légèrement restrictives. Le modèle proposé dans ce chapitre permet donc de prendre en compte une plus large gamme de possibilités biologiques, comme le confirme l'analyse d'incertitude du modèle. L'ajustement du modèle réalisé sur les données de toxicité (*C. elegans* exposé à une gamme de concentration en uranium) met en avant un mode d'action de l'uranium diminuant l'assimilation d'énergie depuis la nourriture à partir d'un seuil d'effet commun à la croissance et la reproduction de 0.42 mM d'uranium. Ce mode d'action induit un impact sur la croissance et sur la reproduction de *C. elegans*.

### IX.9.2 Bilan

La mise au point et l'application du modèle DEBtox nématode sur *C. elegans* exposé à l'uranium a permis la mise en évidence d'un effet néfaste de l'uranium sur l'assimilation d'énergie depuis la nourriture. Cet effet apparaissant à partir d'un seuil déterminé commun à deux critères que sont la croissance et la reproduction. L'Article II a également permis, grâce à l'inférence Bayésienne, de déterminer des distributions *a posteriori* de paramètres physiologiques et toxiques qui serviront de références pour l'étude des autres générations. En effet, l'application de ce modèle aux données produites lors de l'Article I (page 73) permettrait d'évaluer plus finement l'évolution des paramètres physiologiques et toxiques des populations de nématode exposées à de l'uranium au cours des générations. La prochaine étape de ce projet sera par conséquent dédiée à l'ajustement du mode d'action *assimilation* du modèle DEBtox nématode sur toutes les générations étudiées (Cf. Article III, page 110).

---

## Modélisation DEBtox multigénérationnelle de *C. elegans* exposés à de l'uranium

---

### X.1 Présentation du chapitre

A FIN d'appréhender au mieux les phénomènes microévolutifs présents au sein d'une population de *C. elegans* exposée à une forte force de sélection liée à l'uranium, un modèle bionergétique mécanistique a été utilisé. Ce type de modèle permet l'inférence de paramètres liés à la fois à la physiologie de l'organisme et à la toxicité du toxique. L'application du modèle DEBtox nématode permettrait donc de mieux comprendre la stratégie évolutive sélectionnée par les individus exposés ainsi que les conséquences probables sur la population.

### X.2 Plan expérimental succinct

Afin d'analyser plus précisément les données multigénérationnelles produites lors de l'Article I (page 73), le modèle décrit à l'Article II (page 93) a été appliqué à l'ensemble des générations d'intérêt (générations P0, F2, F3, F12 et F16). Les valeurs des *a priori* utilisées sont les distributions *a posteriori* déterminées sur la génération F2 de la population contrôle (les paramètres de cette dernière n'ayant pas été inférés de nouveau). Un critère d'analyse statistique a été établi afin de déterminer les différences significatives sur les valeurs des paramètres entre générations. Pour ce faire, il a été considéré qu'une distribution postérieure d'un paramètre d'une génération était significativement différente de la distribution de ce paramètre dans une génération de référence si plus de 80% de sa distribution se situe dans le 95<sup>e</sup> percentile supérieur ou inférieur de la génération de référence.

### X.3 Matériel supplémentaire

Cet article contient des figures supplémentaires qui sont présentées en annexe D (page 179).

# Mechanistic modelling for in depth analysis of a multigenerational evolution study: Application to *Caenorhabditis elegans* population submitted to uranium

Benoit GOUSSEN<sup>1,2</sup>, Alexandre R.R. PÉRY<sup>1</sup>, Jean-Marc BONZOM<sup>2</sup>, and Rémy BEAUDOUIN<sup>1</sup>

**1** Unité Modèles pour l'Écotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

**2** Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire d'ÉCOtoxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

2013

In preparation

## Abstract

The assessment of toxic effects is required at population and multi-generations scales in order to assess the evolutionary responses of long-term exposed populations. Mechanistic models allow the in-depth analysis of the variation of physiological and toxic relevant parameters along the evolution of population's individuals. In the present study, a bioenergetic mechanistic model has been used to assess the evolution of two populations of the ubiquitous nematode *Caenorhabditis elegans* in control conditions or exposed to a selective pressure in uranium inducing a reduction of the brood size of 60%. The analysis showed an adaptation of individuals of both populations to experimental conditions (increase of maximal length, decrease of growth rate, decrease then increase of brood size, and decrease of the elimination rate). Nevertheless, differential evolution was also highlighted between the two populations such as a selection of higher maximal length and an increase of the sensitivity of the individuals of the uranium population once the maternal effects have been dimmed. This study also confirmed the interest of using mechanistic modelling to analyse environmental evolutionary datasets.

**Keywords:** Multigenerations — Dynamic Energy Budget — *Caenorhabditis elegans* — Uranium — Bayesian

## X.4 Introduction

The assessment of pollutant perturbations is required at population and multi-generations scales, especially if the considered exposure time-scale is longer than the organisms life span (Gagliano & McCormick, 2007; Mousseau & Fox, 1998; Muysen & Janssen, 2004; Nisbet *et al.*, 1989; Räsänen & Kruuk, 2007; Scheiner, 1993). It is known that stressful environment may lead to evolutionary responses such as local adaptation of long-term exposed populations (Coutellec & Barata, 2011). Indeed, environmental stress may introduce new selective forces — with their own intensities and directions — which may impact significantly evolutionary processes and therefore the genetic and structural shape of populations (Bickham, 2011; Bijlsma & Loeschcke, 2005; Coutellec & Barata, 2011; Coutellec *et al.*, 2011; Dutilleul, 2013). While local adaptation occurs, a population will be characterised by genetic and phenotypic particularities (which can evolve through time) allowing the individuals in a population to present a better fitness facing local environmental conditions (Hedrick, 2006; Hendry & Gonzalez, 2008). Medina *et al.* (2007) indicate that knowledge on the phenotypic and genetic changes involved within a population submitted to stress over several generations could allow the assessment of long-term exposure risks on population loss of biodiversity and potential extinction.

According to Kawecki *et al.* (2012), experimental evolution requires a biological model organism with a short life cycle which could be maintained in laboratory, showing a high standing genetic diversity which will be the main limiting factor of microevolution processes (Barrett & Schluter, 2008; Bijlsma & Loeschcke, 2005; Denver *et al.*, 2009; Mackay *et al.*, 1994; Reed & Frankham, 2003; Reed *et al.*, 2003), and a sufficient population size to avoid genetic drift (Dias, 2010; Willi & Hoffmann, 2009). *Caenorhabditis elegans* fully comply to these requirements (short life span, short life cycle, high fecundity, short length, high population size, and ease to culture in laboratory conditions; Byerly *et al.*, 1976) and, then, is a powerful model for the assessment of evolutionary responses of populations submitted to stress. Moreover nematodes allow the measurement of physiological endpoints such as length or reproduction at various time steps during an multigenerations experimentation. In the present study, a population of *C. elegans* presenting a large standing genetic diversity (Teotónio *et al.*, 2012) has been used.

According to Klerks (2002), the only analysis of the evolution of the resistance to a toxic compound should not be considered as an accurate tool to assess ecological impacts. Indeed, evolution under stress may involve several other mechanisms such as physiological modifications, population diversity reduction, etc. Therefore, an increase of a population's resistance to a toxic compound may, for instance, be driven by the elimination of sensitive individuals (Medina *et al.*, 2007) and, as a consequence, by a reduction of the population genetic variation (Hoffmann & Merilä, 1999). The analysis of ecotoxicological data based on biology and mechanistic toxicology-based models permits the inference of both physiological and toxic parameters which may change during the population evolution in response to pollution. Such information may provide clues on the life strategy selected by a population to face a long-term stressful situation or increased sensitivity throughout successive generations (Massarin *et al.*, 2011).

The DEB theory (Kooijman, 2010) is based on a mathematical description of the uptake and use of energy within an organism. According to this theory, energy is taken up from food, assimilated, and stored into reserves. This energy is then dispatched between three main processes: (i) maintenance, (ii) growth, and (iii) reproduction. DEBtox models based on the DEB theory have been built by Kooijman & Bedaux (1996a,b,c) and corrected by Billoir *et al.* (2008b). DEBtox models describe the perturbation of energy management when an organism is exposed to a pollutant. They assume that the effects on one of the parameters of the DEB model for the investigated species appear when the internal concentration exceeds a threshold called the no-effect concentration (NEC). It has been shown in a previous study, that DEBtox model can handle *C. elegans* life cycle and can assess accurately the mode of action of a pollutant on this nematode provided some adjustments are performed related to *C. elegans* biology (Goussen *et al.*, 2013a).

In a previous study, two populations have been derived from the ancestral population (Goussen *et al.*, 2013b). One was submitted to a strong selection pressure over 16 generations and the other was a control population (Goussen *et al.*, 2013b). In the present study, the evolution of physiological and toxic parameters of the two populations has been assessed using a nematode DEBtox model in order to better understand physiological modifications that may appear under long-term uranium exposure. This approach should provide more information on the life strategy selected by *C. elegans* populations exposed to heavy metal selective pressure.

## X.5 Materials and Methods

### X.5.1 Experimental data

#### Population maintenance

All experiment were performed and described in a previous study (Goussen *et al.*, 2013b). The population used in this study is an androdioecious population created by Teotónio *et al.* (2012) through a funnel cross strategy. Briefly, two-isolate hybrids were obtained by crossing in a pair-wise fashion 16 wild isolates. The two-isolate hybrids were the inter-crossed in a pair-wise fashion to create four-isolate hybrids. Hybridizations continued until the 16-isolate hybrids were created. The authors maintained the population over 140 generations and did not observe any significant loss of genetic diversity after the recombination-selection equilibrium was mostly reached. Adaptation processes may be expected to occur within this population, which contains around 30% of males, as it is genetically highly diverse.

#### Multi-generations exposure

The full multigeneration exposure was extensively described by Goussen *et al.* (2013b). Briefly, two populations derived from the maintenance population were followed over 16 generations on 9 cm Petri dishes. The two populations were fed *ad libitum* with UV killed bacteria (Bio-Link Crosslinker,  $\lambda = 254$  nm; intensity = 200  $\mu\text{watt m}^{-2}$  for 15 minutes). The first population was the control population (thereafter called MGC),

the second one was exposed to a nominal concentration of 1.1 mM of uranium (thereafter called MGU). The uranium stock solution was obtained by a dilution of uranyl nitrate ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, France) and uranium was added to the modified NGM just before flowing the plates. To measure actual exposure concentration, 100  $\mu\text{L}$  of contaminated NGM samples were collected for each treatment and stored at  $4^\circ\text{C}$ . The samples were digested with a combination of 1 mL  $\text{HNO}_3$  and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  at  $90^\circ\text{C}$  prior to measurement with ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA; detection limit 0.04  $\mu\text{M}$ ). Maintenance protocol was the same as for the maintenance population.

### Experimental test for each generation

The experimental exposure procedure was extensively described by Goussen *et al.* (2013b). Briefly, at generation P0, F2, F3, F12, and F16, individuals from the MGC and the MGU populations were exposed to a range of 7 concentrations of uranium (nominal concentrations: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.9, 1.1, and 1.2 mM U). The exposure was realised in 12-well tissue-plates and the contamination protocol and the measure of the actual exposure concentration were the same than for the multi-generations exposure. For the selected generations, around 60 gravid hermaphrodites were randomly picked up from respectively MGC and MGU populations dishes, placed on two set of new 9 cm Petri dishes (one by population), and allowed to lay for 90 min. Eggs of each population were then pooled separately and randomly deposited in the 12-well tissue-plates. Growth and egg laying were monitored individually for six days.

## X.5.2 Modelling

### Model description

The DEBtox models describe five modes of action of chemicals on physiological processes. Two of these have a direct effect on the reproduction (*costand hazard* models). The three others have indirect effects on the reproduction in conjunction with effects on growth (*assimilation, maintenance, and growth* models). Our previous study has shown that the uranium mode of action on *C. elegans* is likely to be a decrease of energy assimilation from food (Goussen *et al.*, 2013a). Therefore data have been modelled using the *assimilation* mode of action equations' as described in Goussen *et al.* (2013a):

$$s_f(l) = \alpha \left[ 1 - \left( 1 + \frac{l_f^3}{l^3} \right)^{-1} \right] \quad (\text{X.1a})$$

$$\frac{dl}{dt} = r_B \frac{(1 - s_f) f + g}{g + [(1 - s_f) f (1 - s(c_q))]} [(1 - s_f) f (1 - s(c_q)) - l] \quad (\text{X.1b})$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left[ \frac{g + l}{g + (1 - s_f) f (1 - s(c_q))} (1 - s_f) f (1 - s(c_q)) l^2 - l_p^3 \right] \frac{R_{Max} - R}{R_{Max}} \quad (\text{X.1c})$$

where  $s_f$  is the size-dependant ingestion stress factor,  $(1 - \alpha)$  the proportion of food available whatever the length,  $r_B$  the von Bertalanffy growth rate,  $f$  the actual ingestion rate divided by the maximal ingestion



rate for a body size,  $R_M$  the maximum reproduction rate,  $R_{Max}$  the maximal cumulated reproduction, and  $g$  the investment ratio.  $L$  represents the body length at time  $t$ ,  $L_0$  the body length at birth (*i.e.* the start of feeding in the DEB framework),  $L_f$  the body length at which the ingestion rate is half the maximum ingestion rate, and  $L_p$  the body length at puberty. All these length data are scaled by the maximal length  $L_{inf}$  resulting in parameters  $l$ ,  $l_0$ ,  $l_f$ , and  $l_p$ .

The internal concentration of the pollutant scaled by the bioconcentration factor,  $c_q$ , has been calculated as described by Kooijman & Bedaux (1996a) and modified in Goussen *et al.* (2013a):

$$\frac{dc_q}{dt} = C \frac{k_e(1-s_f)f}{l} - c_q \left[ \frac{k_e(1-s_f)f}{l} + \frac{d \ln l^3}{dt} \right] \quad (\text{X.2})$$

where  $k_e$  is the elimination rate and  $C$  the actual exposure concentration. The toxic stress function,  $s$ , was calculated as  $s(c_q) = b(c_q - NEC)_+$  with  $b$  the slope of the effect and  $NEC$  the no-effect concentration.

### Parameters inferences

Parameters inferences were performed using the statistical computing software R 3.01 (R Core Team, 2013) and the JAGS 3.3.0 (Just Another Gibbs Sampler) software. This software is a program for the statistical analysis of Bayesian hierarchical models by Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Plummer, 2003). For each selected generation, we performed an adaptive phase of 6,000 iterations. We then performed another 54,000 iterations. These iterations were performed on three independent MCMC chains. Prior values were extracted from Goussen *et al.* (2013a) and are presented in Table X.1. Since, the experimental protocol (including food conditions) was the same as for the experiment presented in Goussen *et al.* (2013a), the parameters related to food availability were not expected to move. Therefore, parameters  $\alpha$ ,  $f$ ,  $L_f$  were fixed. The parameter  $g$  was also fixed as the model sensitivity analysis has showed that it does not influence the model output (Goussen *et al.*, 2013a).

Chains' convergences were assessed using the Gelman & Rubin (1992) convergence statistic modified by Brooks & Gelman (1998). Model fit quality was visually checked by plotting the fits for both the growth and the reproduction data. Posterior distributions correspond to the 1,000 calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process.

### Statistical analysis

We chose to consider parameters significantly different from the generation P0 if more than 80% of the posterior distribution of the parameter at a given generation was either upper or lower than the 95th percentiles of the posterior distribution of the parameter at P0.

Table X.1: Prior parameters values used for the model calibration.

Parameter	Prior
$\alpha$ (-)	0.86
$f$ (-)	0.97
$L_0$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(165, 37)$ T $]0, +\infty]$
$L_f$ ( $\mu\text{m}$ )	364
$L_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(818, 57)$ T $]0, +\infty]$
$L_{inf}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\mathcal{N}(1383, 41)$ T $]0, +\infty]$
$r_B$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(0.031, 3 \cdot 10^{-3})$ T $]0, +\infty]$
$g$ (-)	12
$R_M$ ( $\# \text{h}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(15, 1.90)$ T $]0, +\infty]$
$R_{Max}$ ( $\#$ )	$\mathcal{N}(249, 22)$ T $]0, +\infty]$
$k_e$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(0.16, 0.11)$ T $]0, +\infty]$
$b$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$\mathcal{N}(0.31, 0.03)$ T $]0, +\infty]$
$NEC$ ( $\text{mM}$ )	$\mathcal{N}(0.42, 0.06)$ T $]0, +\infty]$

Physiological prior were extracted from Jager *et al.* (2005). The normal distribution of mean  $\mu$  and standard deviation  $\sigma$  is noted  $\mathcal{N}(\mu, \sigma)$ , and the uniform distribution between  $a$  and  $b$  is noted  $U[a, b]$ . T  $]c, d]$  denotes an interval truncation between  $c$  (excluded) and  $d$ .

## X.6 Results

### X.6.1 Joint evolution of the parameters for the two populations compared with P0

Both the MGC and the MGU populations have evolved during the experiment. Indeed, as presented in Table X.2 and Figure X.1, parameters  $L_{inf}$ ,  $r_B$ ,  $R_{Max}$ , and  $k_e$  significantly evolved, even slightly, from P0 in the same way for both MGC and MGU populations. Results indicate that the ultimate length ( $L_{inf}$ ) increased throughout the generation by at least more than 3%. In contrast, the von Bertalanffy growth rate ( $r_B$ ) decreased throughout the generations by more than 8%. In the same way, the elimination rate ( $k_e$ ) decreased throughout the generations by over 43% and the maximal cumulated reproduction ( $R_{Max}$ ) decreased at generation F3 and F12 by more than 20%. The  $R_{Max}$  tended to return to the level of P0 at generation F16. Interestingly the no-effect concentration parameter ( $NEC$ ) did not evolve compared to P0 in neither the MGC nor the MGU populations (Cf. Table X.2 and Fig.D.4).

### X.6.2 Differential evolution of the parameters for the two populations compared with P0

Some parameters did not evolve from P0 in the same time-scale for the two populations (Table X.2). Parameter  $L_{inf}$  started to increase from F3 in MGC (increase of 7% for F3, increase of 4% for F12, and 3% for F16). Its modification only became significant from generation F12 for the MGU population (increase of 3% for F12 and 9% for F16). The same pattern could be observed with parameter  $k_e$  which started to decrease from F3 in MGC and from F12 in MGU. Indeed, parameter  $k_e$  started to decrease from F3 in

MGC by over 50% (43% at F12 and 50% at F16). Decrease of elimination rate only became significant from generation F12 for the MGU population (respectively 64% at F12 and 50% at F16).

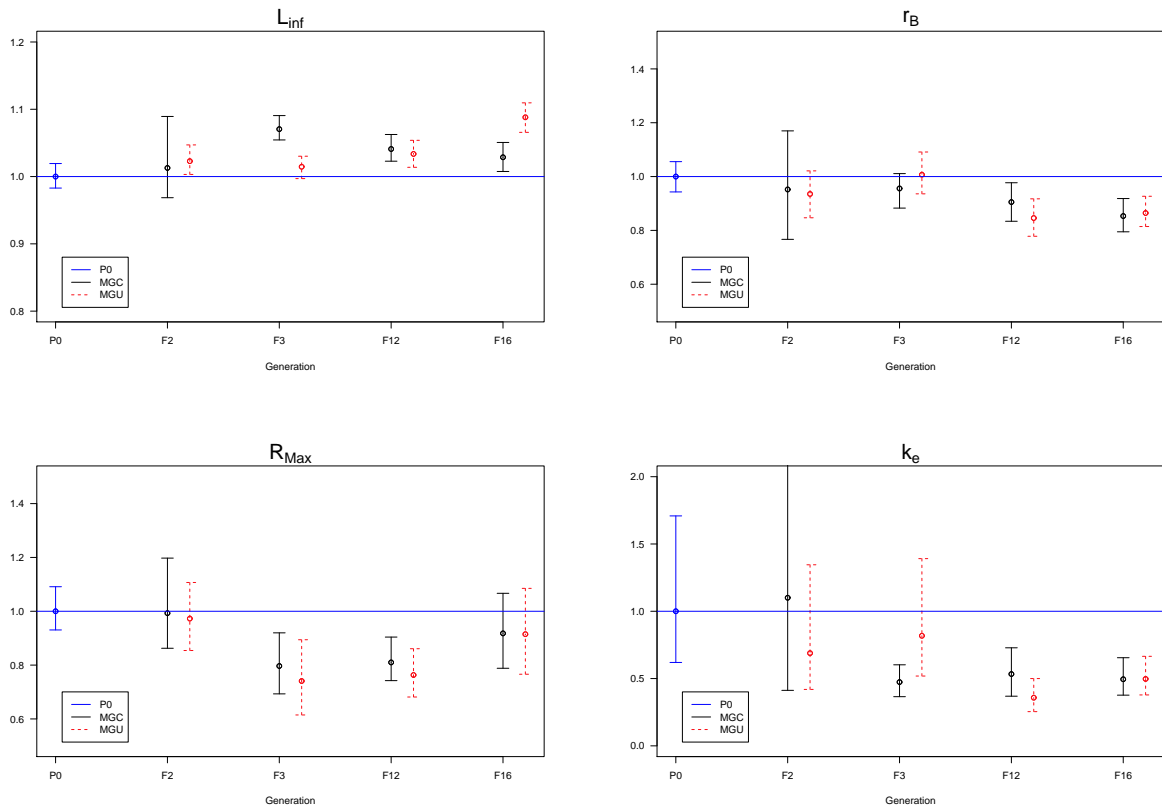


Figure X.1: Evolution of the parameters  $L_{inf}$ ,  $r_B$ ,  $R_{Max}$ , and  $k_e$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

### X.6.3 Evolution of the parameters for the two populations compared with F3

When compared to the third generation (F3) of respectively MGC for the control population (MGC) and MGU for the uranium population (MGU) (cf. Table X.3 and Figure X.2) it appears that the initial length ( $L_0$ ) increased in MGU at F16 compared to F3 by over 20%. The same pattern can be observed for the ultimate length ( $L_{inf}$ ) of MGU which increased by 7% at F16 compared to F3. In contrast, the maximal length decreased in the MGC at F12 and F16 by over 3%. The von Bertalanffy growth rate ( $r_B$ ) decreased in both populations by over 10% and 15% in respectively MGC (F12) and MGU (F12 and F16). Regarding the toxic parameters, the slope of the effect ( $b$ ) increased in MGC at F16 by 24%, but no difference was observed in MGU. The no-effect concentration ( $NEC$ ) and the elimination rate ( $k_e$ ) respectively decreased by 28% (F16) and 58% (F12) in MGU but no difference was observed in MGC (cf. Figure D.9).

Table X.2: Parameters comparison with P0 for each generation of the two populations MGC (control) and MGU (uranium).

		MGC			MGU		
	Generation P0	Relative to P0 1.00	< 95% P0 -	> 95% P0 -	Relative to P0 1.00	< 95% P0 -	> 95% P0 -
$L_0$	F2	0.98	0.42	0.36	0.89	0.75	0.00
	F3	0.94	0.43	0.00	0.82	<b>1.00</b>	0.00
	F12	0.93	0.54	0.00	0.92	0.65	0.00
	F16	0.95	0.42	0.00	0.98	0.21	0.01
$L_p$	F2	1.04	0.02	0.32	1.09	0.00	<b>0.82</b>
	F3	1.04	0.01	0.03	1.04	0.00	0.42
	F12	1.01	0.03	0.07	1.00	0.04	0.02
	F16	1.02	0.01	0.10	1.07	0.00	0.66
$L_{inf}$	F2	1.01	0.13	0.36	1.02	0.00	0.66
	F3	1.07	0.00	<b>1.00</b>	1.01	0.00	0.24
	F12	1.04	0.00	<b>0.99</b>	1.03	0.00	<b>0.92</b>
	F16	1.03	0.00	<b>0.81</b>	1.09	0.00	<b>1.00</b>
$r_B$	F2	0.95	0.53	0.13	0.95	0.68	0.00
	F3	0.95	0.43	0.00	1.01	0.03	0.15
	F12	0.92	<b>0.81</b>	0.00	0.86	<b>1.00</b>	0.00
	F16	0.86	<b>0.99</b>	0.00	0.86	<b>0.99</b>	0.00
$R_M$	F2	0.96	0.17	0.05	0.96	0.13	0.02
	F3	0.90	0.33	0.01	0.82	0.62	0.00
	F12	1.06	0.03	0.13	1.05	0.02	0.12
	F16	0.88	0.38	0.01	0.85	0.54	0.00
$R_{Max}$	F2	0.99	0.24	0.13	0.97	0.26	0.04
	F3	0.80	<b>0.98</b>	0.00	0.74	<b>1.00</b>	0.00
	F12	0.81	<b>1.00</b>	0.00	0.76	<b>1.00</b>	0.00
	F16	0.92	0.60	0.01	0.92	0.57	0.02
$b$	F2	0.76	<b>0.93</b>	0.00	0.78	<b>0.99</b>	0.00
	F3	0.93	0.23	0.00	0.95	0.17	0.01
	F12	0.85	<b>0.84</b>	0.00	0.85	0.77	0.00
	F16	1.15	0.00	0.74	1.07	0.00	0.28
$NEC$	F2	0.93	0.22	0.08	0.87	0.32	0.00
	F3	0.87	0.27	0.00	1.11	0.00	0.48
	F12	0.89	0.23	0.00	0.87	0.35	0.00
	F16	0.91	0.15	0.00	0.80	0.72	0.00
$k_e$	F2	1.14	0.21	0.15	0.71	0.35	0.00
	F3	0.50	<b>0.99</b>	0.00	0.86	0.10	0.01
	F12	0.57	<b>0.84</b>	0.00	0.36	<b>1.00</b>	0.00
	F16	0.50	<b>0.95</b>	0.00	0.50	<b>0.94</b>	0.00

Results relative to P0 represent the ratio  $\frac{FX}{P0}$ . The < 95% and > 95% values correspond respectively to the proportion of the posterior distribution of the parameter of FX which was above the upper or below the lower 95th percentile of the posterior distribution of P0.

## X.7 Discussion

In the present study, an experimental evolution research on the adaptation of the nematode *C. elegans* to a high uranium pressure has been performed and results were assessed through to a bioenergetic mecha-

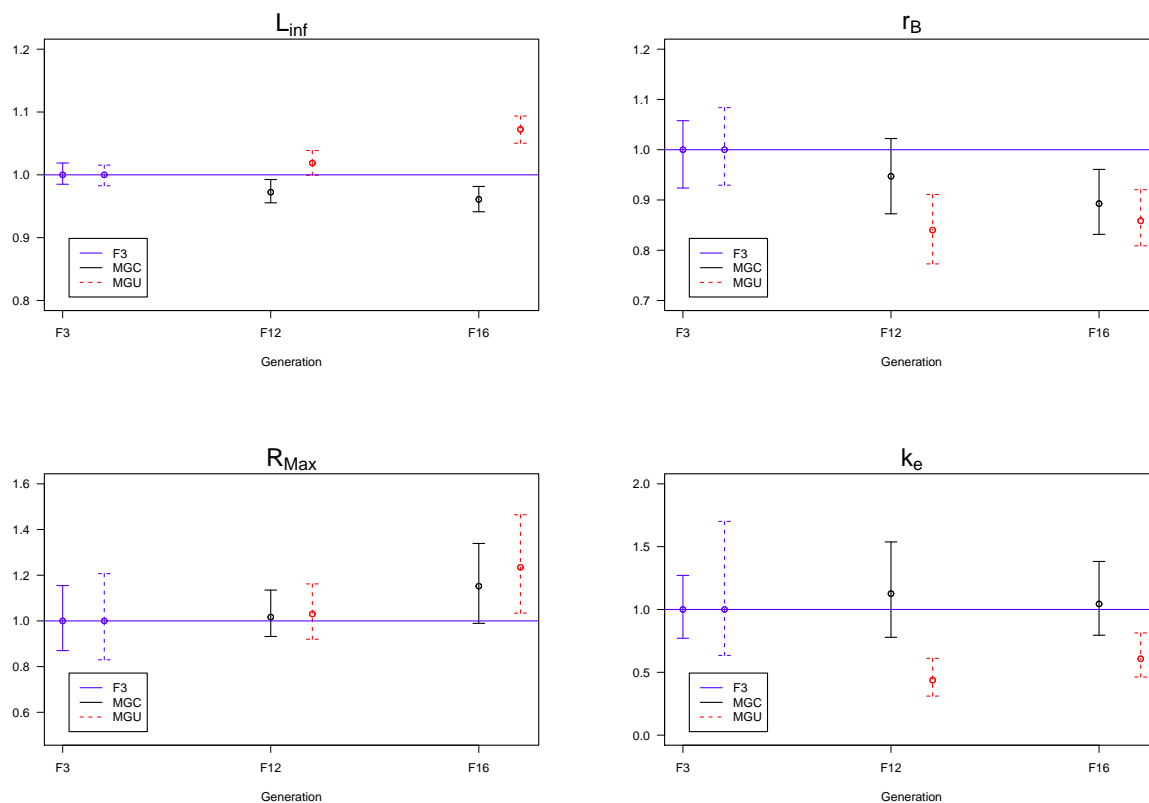


Figure X.2: Evolution of the parameters  $L_{inf}$ ,  $r_B$ ,  $R_{Max}$ , and  $k_e$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

nistic model. This research demonstrates a slightly joint evolution of the individuals from both the control population and the population submitted to the uranium selective stress on several physiological and toxic parameters. Indeed, along the experiment, the maximal length of individuals of both populations increased and their growth rate decreased compared to the ancestral population. Moreover, individual fecundity was affected compared to the ancestral population but tended to return to the level of the ancestral population at the end of the experiment. It is also interesting to highlight that the no-effect concentration parameter did not evolve compared to the ancestral population throughout the generations whatever the population. This result, combined with the response observed on the elimination rate, suggests an increase of the capacity of individuals of both populations to accumulate the uranium without an increase of the toxic effect (it is important to be aware that the  $NEC$  is scaled by the bioconcentration factor in the DEBtox framework). This kind of results has been shown for other heavy metal compounds. Indeed, Bryan & Hummerstone (1971) measured an internal concentration of copper 100 times higher in copper-adapted *Nereis diversicolor* individuals than in non-adapted ones. This could be due to metallothioneins which could bind with heavy metal compounds and thereby allow higher accumulation without an increase of toxic effects (Jiang *et al.*, 2009; Roesijadi, 1992).

Table X.3: Parameters comparison with F3 for each generation of the two populations MGC (control) and MGU (uranium).

		MGC			MGU		
	Generation	Relative to F3	< 95% F3	> 95% F3	Relative to F3	< 95% F3	> 95% F3
	F3	1	-	-	1	-	-
$L_0$	F12	0.99	0.07	0.01	1.13	0.00	0.75
	F16	1.01	0.03	0.01	1.20	0.00	<b>0.98</b>
$L_p$	F12	0.97	0.09	0.00	0.95	0.14	0.00
	F16	0.98	0.04	0.00	1.03	0.00	0.09
$L_{inf}$	F12	0.97	<b>0.90</b>	0.00	1.02	0.00	0.62
	F16	0.96	<b>0.99</b>	0.00	1.07	0.00	<b>1.00</b>
$r_B$	F12	0.97	0.31	0.00	0.85	<b>0.99</b>	0.00
	F16	0.90	<b>0.85</b>	0.00	0.85	<b>0.99</b>	0.00
$R_M$	F12	1.18	0.00	0.27	1.28	0.00	0.45
	F16	0.98	0.02	0.02	1.04	0.00	0.03
$R_{Max}$	F12	1.02	0.00	0.01	1.03	0.00	0.01
	F16	1.16	0.00	0.47	1.24	0.00	0.60
$b$	F12	0.92	0.53	0.00	0.90	0.30	0.00
	F16	1.24	0.00	1.00	1.13	0.00	0.49
$NEC$	F12	1.03	0.04	0.14	0.78	0.76	0.00
	F16	1.05	0.02	0.16	0.72	<b>0.96</b>	0.00
$k_e$	F12	1.14	0.02	0.20	0.42	<b>0.99</b>	0.00
	F16	1.00	0.01	0.07	0.58	0.70	0.00

Results relative to F3 represent the ratio  $\frac{FX}{F3}$ . The < 95% and > 95% values correspond respectively to the proportion of the posterior distribution of the parameter of FX which was above the upper or below the lower 95th percentile of the posterior distribution of F3.

Thereby this joint evolution may be due to directional uncontrolled selection forces which should have been predominant compared to the uranium selection pressure. This selection pressure should have been brought by the experiment protocol by itself. Such results have been encountered by Beaudouin *et al.* (2012a) who highlighted individuals' evolution in a non-exposed *Chironomus riparius* population throughout generations. These authors explained the evolution they observed in the control population thanks to a non-desired artificial selection during the experiment represented by a bias in the eggs selection for the next generation. Some part of our protocol may have brought the same kind of artificial selection throughout the generations such as the transfer protocol which involves a medium change for instance (agar-medium to liquid-medium to agar-medium). Another phenomenon may have driven this uncontrolled phenotypic evolution through a genetic drift. Indeed, the protocol transfer involves a transfer of 500 individuals every three days which introduces an artificial strong reduction of the population at each transfer. However, the long term size of a population is known to affect the genetic diversity of the population (Hoffmann & Merilä, 1999; Reed *et al.*, 2003).

Despite this uncontrolled evolution, some slight differences were measured between the individuals of MGC and the individual of the MGU population. Indeed, a delay in the apparition of evolution of the

maximal length and the elimination rate appears in the MGU population compared to the MGC population. As the natural selection act on complex polygenic phenotypes leading to the modification of the frequency of numerous alleles (Falconer & Mackay, 1996), it may result in evolutionary trade-off, especially if pleiotropy is involved. Such slight evolutionary trade-off should have been involved in the present study between the uranium selections forces and the unknown ones leading to a delay in the apparition of the evolution.

While eliminating maternal effects (*i.e.* cross generation phenotypic plasticity induced by the mother's environment; Day & Bonduriansky, 2011; Räsänen & Kruuk, 2007) of P0 generation, some differential evolution aspects appear between the two populations. Thereby, it appears that the decrease of the elimination rate was mainly due to the three first generations in the MGC population whereas it was due to a long term evolution for the MGU population. Another differential evolution appears regarding the maximal length. Indeed, while this parameter increased in both populations compared to P0, it decreased in MGC compared to F3 and continued to increase in MGU. This suggests that the early increase of maximal length in MGC should be due to maternal effects and that it tended to rejoin the initial level with a later decrease. In contrast, individuals' maximal length still increases in the MGU population, which may suggest a selection of larger individuals in this population. The results also showed a decrease of the no-effect concentration in MGU at F16 compared to F3 whereas this parameter did not change in MGC. This may indicate an evolution toward a higher sensibility of individuals exposed to uranium after many generations of exposure. This pattern may have been firstly hidden by the P0 maternal effect. Such sensitivity increase to uranium has also been measured on *Daphnia magna* with an increase of DNA damages and of the severity of effects on life history traits across the generations (Massarin *et al.*, 2010; Plaire *et al.*, 2013).

Regarding these results, it may be suggested that once maternal effects have been dimmed, the MGU population may evolve in a different manner than the MGC population. The maximal length increase in the MGU population and the growth rate decrease suggesting the selection of larger individuals with a slower development. Moreover, as no difference has been measured for the length at puberty and regarding the decrease of the growth rate, the onset of the reproduction should be delayed across the generations. Another experiment on *C. elegans* exposed during 22 generations to uranium also concluded, while performing common-garden experiments in control environment, to the selection by the uranium of individuals with a higher maximal length (Dutilleul, 2013). Moreover, these uranium-selected individuals tended to be longer in the common-garden than the control individuals starting from generation 15. These results can be compared to the ones of the present study as the physiological parameters estimated here are control parameters and therefore represent the parameters values without the application of the toxic effect.

These analyses were performed using a mechanistical model. The use of such models for the analysis of multi-generations experiments allows an in depth analysis of the variations of physiological and toxic relevant parameters, and an acquisition of information regarding the evolution strategy of the individuals of a population. This analysis allowed conclusions that were not highlighted in a previous non-mechanistical analysis describe in Goussen *et al.* (2013b) such as the slight evolution of the uranium population's maximal

length. One could explain this by the fact that the mechanistic analysis of the present study was a more integrative analysis than the previous one as it took into account both the reproduction and the growth dynamics simultaneously. In contrast, it did not confirm others such as the differential evolution of the maximal cumulated reproduction between MGC and MGU. Moreover, this mathematical analysis confirmed the existence of uncontrolled selection forces which mitigate the uranium selection forces.

## X.8 Conclusion

We performed an in depth analysis of a multigenerational evolution of a nematode population exposed to a strong selective pressure to uranium based on a mechanistic bioenergetic model. We highlighted an adaptation to experimental conditions in both control and exposed populations. The mechanistic model allowed the highlight of some points of differential evolution between the two populations, especially when the maternal effects of the ancestral population were dimmed. This study confirmed the interest of using mechanistic modelling to analyse multigeneration data sets and the importance to include both the control population and the maternal effects in such analysis.

**Acknowledgements** We are especially grateful to Florian Parisot for experimental help and discussion. We also thank Henrique Teotónio for providing us with his base population and for comments. This work was part of the Envirohm-Eco research program supported by the french Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and the 190 DRC-08-02 program supported by the french Ministry of Ecology.

**Ethical standard and conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest and that the experiments comply with the current law of the country in which they were performed.



## X.9 Conclusion du Chapitre X

### X.9.1 Principaux résultats

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent une évolution conjointes des deux populations, témoin (MGC) et soumise à une pression de sélection en uranium (MGU). Cette évolution conjointe est observable sur les paramètres physiologiques que sont la taille maximale ( $L_{inf}$ ), le taux de croissance de von Bertalanffy ( $r_B$ ), la ponte cumulée maximale ( $R_{Max}$ ) ainsi que sur un paramètre de toxicité qui est le taux d'élimination ( $k_e$ ). Malgré cette évolution conjointe, une évolution différentielle entre les deux populations a été mise en évidence une fois les effets maternels liés à la population ancestrale estompés. Ainsi, la taille maximale ( $L_{inf}$ ) continue à augmenter au cours des générations chez les individus issus de MGU comparée à celle des individus de la F3 MGU alors qu'elle décroît chez les individus de MGC comparée à celle des individus de la F3 MGC. En ce qui concerne la concentration sans effets ( $NEC$ ), cette dernière décroît au cours des générations chez les individus issus de MGU comparée à celle des individus de la F3 MGU alors qu'elle reste constante chez les individus de la MGC.

### X.9.2 Bilan

L'évolution des individus soumis à une contamination multigénérationnelle a été analysée à l'aide d'un modèle bioénergétique mécanistique. Cette étude, bien qu'elle ait mis en évidence un schéma d'évolution conjoint aux individus des deux populations, a permis de démontrer une évolution différentielle des individus de la population uranium par rapport à ceux de la population témoin. Une comparaison de l'analyse mécanistique et de l'analyse classique des données d'évolution sous stress permettrait désormais de discuter des apports éventuels de la première par rapport à la seconde. Il s'agit donc de la prochaine étape de ce doctorat.

## Quatrième partie

# Discussion générale et perspectives



## CHAPITRE XI

---

**Discussion générale**

---

DANS LE CADRE de ce doctorat, une stratégie en trois temps a été mise en place afin d'évaluer les apports de la modélisation mécanistique dans l'analyse de l'évolution de populations exposées à un polluant. Dans cette partie, l'ensemble des éléments de ce travail sera discuté ensemble. Une synthèse des résultats obtenus est tout d'abord présentée. Suite à cela, un regard critique est porté sur l'utilisation de la modélisation en écotoxicologie. Enfin, les apports de la modélisation mécanistique sont discutés.

**XI.1 Synthèse et cohérence des résultats**

Une synthèse des résultats est présentée dans le Tableau XI.1 (page 128).

**XI.1.1 Les effets de l'uranium**

L'uranium impacte négativement la croissance et la reproduction de *C. elegans* de manière concentration dépendante. Ces résultats ont été retrouvés à la fois lors de l'analyse statistique classique (*i.e.* non mécanistique) (Article I), avec la mise en évidence de NOEC pour la reproduction et la croissance de respectivement 0,5 et 0,9 mM U, et lors de l'analyse mécanistique (Article II), avec la détermination d'un seuil d'effet commun de 0,42 mM U. Les résultats de l'Article I ayant mis en évidence un effet conjoint sur la croissance et la reproduction, il avait été émis l'hypothèse d'un mode d'action de l'uranium sur *C. elegans* à travers un impact sur l'assimilation d'énergie depuis la nourriture. Cette hypothèse a pu être confirmée avec la détermination du mode d'action DEBtox s'ajustant le mieux aux données lors de l'analyse mécanistique menée dans l'Article II. Ce résultat est de plus conforté par d'autres études ayant mis en évidence ce mode d'action de manière expérimentale ou par modélisation mécanistique sur d'autres organismes tels que *D. magna*, *D. rerio* ou *E. fetida* (Augustine *et al.*, 2012a,b; Giovanetti *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2010, 2011; Zeman, 2008; Zeman *et al.*, 2008).

### XI.1.2 Évolution des individus des populations dérivées comparée aux individus de la population ancestrale

L'évolution des structures phénotypiques et génétiques des populations de nématodes au cours des générations met en jeu des phénomènes complexes. Les résultats obtenus ont ainsi mis en évidence l'existence d'une évolution conjointe et suivant un même schéma des deux populations d'étude (contrôle et uranium) par rapport à la population ancestrale (Articles I et III). Ainsi, l'analyse non mécanistique (Article I) met en évidence une augmentation de la taille maximale des individus de la population témoin jusqu'à la sixième génération suivi d'une stabilisation et une décroissance de la ponte cumulée maximale jusqu'à la troisième génération suivi d'une stabilisation. L'analyse mécanistique, quant à elle, démontre, chez les individus de la population témoin, une augmentation de la taille maximale jusqu'à la troisième génération suivi d'une décroissance. De même, cette seconde analyse démontre une diminution de la ponte maximale cumulée jusqu'à la troisième génération, suivi d'une stabilisation et enfin d'un retour au niveau de la population ancestrale sur la dernière génération. Concernant les paramètres de toxicité, l'analyse classique et l'analyse mécanistique concluent sur une absence d'évolution significative des seuils de toxicité ( $EC_{50}$  et  $NEC$ ) des deux populations par rapport à la population ancestrale. En revanche concernant les autres paramètres de toxicité, l'analyse mécanistique met en évidence une diminution du taux d'élimination au cours des générations pour les deux populations par rapport à la population ancestrale. Des évolutions différentielles entre les populations contrôle et uranium par rapport à la population ancestrale ont également été observées. Ainsi, l'analyse non mécanistique menée dans l'Article I met en évidence l'existence d'une ponte moyenne plus faible dans la population uranium par rapport à la population contrôle. Ce résultat n'a néanmoins pas été retrouvé lors de l'analyse mécanistique (Article III). En revanche, l'analyse mécanistique a mis en évidence un délai dans l'apparition des réponses évolutives de la population uranium en ce qui concerne la taille maximale et le taux d'élimination par rapport à la population contrôle, ce qui n'avait pas pu être observé lors de l'analyse classique. Ces différences de résultats entre les deux types d'analyses peuvent être dues à une meilleure description des traits relatifs à la croissance et la reproduction par la méthode mécanistique.

### XI.1.3 Évolution des individus après estompage des effets maternels

Il est également intéressant de noter que les effets maternels ont probablement masqué plusieurs types de réponses non détectées lors de la première analyse (Article I). En étudiant l'évolution des paramètres descripteurs des traits physiologiques et toxiques à partir de la troisième génération respectivement pour chaque population, des évolutions différentielles ont pu être mises en évidence (Article III). Ainsi, une fois les effets maternels estompés, il a été démontré que la force de sélection liée l'uranium induisait la sélection d'individus plus grands au cours des générations. La taille maximale (paramètre physiologique non soumis à l'effet toxique) de ces individus est même devenue supérieure à celle déterminée chez les individus de la population contrôle. Un résultat similaire a été retrouvé par Dutilleul (2013) qui a mis en évidence, lors d'une expérience en jardin commun non contaminé, une augmentation progressive de la taille maximale des

individus issus d'une population exposée à 1,1 mM U ainsi qu'une tendance à dépasser la taille des individus issus d'une population contrôle à compter de la quinzième génération. En revanche, dans l'expérience de jardin-commun cet auteur a retrouvé, après une diminution lors de la première génération, une augmentation stable de la ponte totale des individus exposés à l'uranium au cours des générations.

Un paramètre descripteur des effets toxiques, le seuil d'effet de l'uranium (*NEC*), a également évolué de manière différentielle entre les deux populations une fois les effets maternels estompés. En effet, ce seuil diminue avec les générations dans la population uranium — de près de 30% à la seizième génération de la population uranium par rapport à la troisième génération de la population uranium — alors qu'aucune évolution n'est perceptible dans la population contrôle. Cela indique une sensibilisation des individus à l'uranium au cours des générations. Cette augmentation de la sensibilité des individus à l'uranium au cours des générations a également été retrouvée chez d'autres organismes tel que *D. magna* (Massarin *et al.*, 2010; Plaire *et al.*, 2013).

Enfin, concernant le taux d'élimination il est intéressant de noter que même si les valeurs de ce paramètre sont identiques à la dernière génération d'étude pour les deux populations par rapport à la population ancestrale, la diminution observée intervient essentiellement lors des trois premières générations pour les individus issus de la population contrôle, alors qu'elle est continue tout au long de l'expérience pour les individus de la population uranium. Ainsi la diminution dans la population contrôle pourrait être due à des phénomènes plastiques qui seraient, dans la population uranium, moins influents que les forces liées à l'uranium. Cette hypothèse serait néanmoins à confirmer par des expérimentations supplémentaires.

En conclusion, les résultats de l'analyse classique et de l'analyse mécanistique sont globalement concordants. Néanmoins, des différences sont apparues. Ces dernières pourraient être dues à une description plus fine des mécanismes mis en jeu par l'analyse mécanistique. Il est donc essentiel de comprendre les apports et limites de cette analyse mécanistique.

## XI.2 Cadre conceptuel pour la modélisation

Tout modèle n'étant qu'une idéalisation de la réalité effectuée sur la base d'hypothèses, il est nécessaire de prêter attention à certains points durant son utilisation. L'utilisation des modèles doit donc se faire dans un cadre bien défini. Legay (1997) et Kooijman (2011a) ont défini et décrit un certain nombre de critères permettant de juger la qualité du modèle dans son ensemble : un modèle se doit d'être consistant, cohérent, efficient, réaliste, utile et stable.

**Un modèle consistant.** Pour être consistant, un modèle ne doit pas présenter d'hypothèses sous-jacentes contradictoires entre elles. De plus la confrontation des sorties du modèle avec les données observées ne doit pas non plus donner lieu à des contradictions. Enfin, un modèle qui ne respecte pas les différentes lois de conservation (de l'énergie, de la masse, du temps...) ou qui viole les règles de calcul des dimensions des valeurs (*e.g.* addition ou soustraction de valeurs de même dimensions uniquement) ne sera pas consistant.

TABLE XI.1 – Synthèse des résultats et de leur concordance.

Paramètre	Population	Analyse statistique (Article I)	Analyse DEBtox (Article II et III)
Taille maximale	Témoin	$P0 \nearrow F6 \rightarrow F16$	$P0 \nearrow F3 \searrow F16$
Ponte cumulée	Témoin	$P0 \searrow F3 \rightarrow F16$	$P0 \searrow F3 \rightarrow F12 \nearrow F16$
EC <sub>50</sub> / NEC	Témoin	$P0 \rightarrow F16$	$P0 \rightarrow F16$
$k_e$	Témoin	–	$P0 \searrow F16$
Taille maximale	Uranium	$P0 \nearrow F6 \rightarrow F16$	$P0 \rightarrow F3 \nearrow F16$
Ponte cumulée	Uranium	$P0 \searrow F3 \rightarrow F16$ < population Témoin	$P0 \searrow F3 \rightarrow F12 \nearrow F16$ = population Témoin
EC <sub>50</sub> / NEC	Uranium	$P0 \rightarrow F16$	$P0 \rightarrow F12 \searrow F16$
$k_e$	Uranium	–	$P0 \rightarrow F3 \searrow F16$

Les différences entre les analyses sont présentées en rouge. Les différences entre populations sont présentées en gras.  $\nearrow$  indique une modification positive (augmentation),  $\searrow$  une modification négative (diminution) et  $\rightarrow$ , une absence de modifications. P0 correspond à la population ancestrale et FX correspond à la X<sup>e</sup> génération de la population dérivée de P0.

**Un modèle cohérent.** Le jugement sur la cohérence du modèle fait plus appel à des informations qualitatives que pour la consistance. Ainsi, un modèle cohérent est un modèle ne violant pas les relations logiques entre les variables dont l'existence est « reconnue ».

**Un modèle efficient.** Le modèle développé se doit d'être le plus simple possible en fonction du degré de complexité choisi afin d'éviter ou de limiter une sur-paramétrisation du modèle. Il doit aussi être équilibré dans sa construction. Ainsi le niveau de détail du modèle devrait être équivalent entre les différentes parties composant ce modèle.

**Un modèle réaliste.** Ainsi, il est important de ne pas étendre de manière abusive le domaine de validité du modèle. Il convient pour ce faire de vérifier les hypothèses posées par le modèle au préalable. Enfin, il est important de noter qu'un modèle ne permet pas d'éviter le travail expérimental. En effet, il est nécessaire d'intégrer l'expérience dans la construction et la validation du modèle afin d'éviter la construction d'hypothèses n'ayant aucune réalité et ainsi d'observer des résultats qui n'ont aucune existence réelle.

**Un modèle utile.** Les modèles doivent en effet servir à explorer la réalité et non à éviter de répondre expérimentalement à certaines questions. Un modèle sera meilleur qu'un autre s'il s'applique à un univers plus large, rend obsolète d'autres modèles, permet l'extension des techniques communément utilisées ou permet d'effectuer des comparaisons nouvelles.

**Un modèle stable.** Le comportement numérique du modèle doit aussi être analysé. Ainsi un modèle stable sera peu sensible aux facteurs secondaires mais sera fortement sensible aux facteurs primaires. De plus, la connaissance de sa plasticité est importante dans la réalisation du processus d'inférence des paramètres et la mise au point du plan d'expérience. Les analyses de sensibilité et d'incertitude permettent d'étudier la stabilité du modèle.

Les critères et les réponses apportées pour juger le modèle utilisé dans le cadre de ce doctorat sont présentés dans le Tableau XI.2 (page 129). Les éléments présentés dans ce Tableau démontrent que le modèle utilisé dans ce doctorat répond à l'ensemble des critères énoncés.

TABLE XI.2 – Validation de la qualité du modèle DEBtox utilisé dans le cadre de ce doctorat.

Critère de qualité	Réponse apportée
Consistance	* Hypothèses du modèle exposées et non contradictoires (Cf. concepts d'homéostasie section V.2.2, page 46)
	* Dimensions du modèle exposées (Billoir <i>et al.</i> , 2008b; Kooijman, 2010)
	* Sorties du modèle confrontées aux données (Cf. Article II, page 93)
Cohérence	* Vérification préalable de la cohérence des liens logiques entre les variables du modèle
Efficience	* Modèle utilisant des paramètres composés et analyse de sensibilité des paramètres (Cf. Article II, page 93 et Billoir <i>et al.</i> , 2008b)
	* Niveau de détail équivalent pour les modules croissance, reproduction et toxique (Cf. Article II, page 93)
Réalisme	* Modèle construit, largement utilisé et pertinence validée dans le cadre d'utilisation pour l'analyse de données d'écotoxicologie (Cf. modèle DEBtox, section V.3.2, page 48)
	* Développement du modèle basé sur des données expérimentales et comportement validé à partir de jeux de données différents du jeu de calibration (Cf. Article II, page 93 et III, page 110)
Utilité	* Amélioration du modèle présenté par Jager <i>et al.</i> (2005) afin de mieux prendre en compte les particularités biologiques de <i>C. elegans</i> (Cf. Article II, page 93)
	* Modèle plus flexible que celui de Jager <i>et al.</i> (2005) et permettant une prise en compte d'une plus large gamme de possibilités biologiques (Cf. Article II, page 93)
	* Extrapolation possible à des concentrations non utilisées pour la calibration du modèle
Stabilité	* Comportement numérique du modèle analysé par des analyses de sensibilité et d'incertitude (Cf. Article II, page 93)

En dernier lieu il convient de prendre en compte le fait que le choix d'utiliser ou non un modèle engage la responsabilité et la personnalité du chercheur et est en partie lié à sa culture, ses motivations, ses expériences de chercheur ainsi que son point de vue (Legay, 1997).

### XI.3 Apports de la modélisation

L'utilisation de la modélisation mécanistique dans l'analyse des données d'évolution expérimentale a permis une description plus fine des traits d'histoire de vie liés à la croissance et à la reproduction. En effet, le modèle développé et utilisé dans le cadre de ce doctorat a décrit chacun de ces traits à l'aide de



plusieurs paramètres physiologiquement pertinents qui n'auraient pas été facilement accessibles dans une analyse classique (*e.g.* taux de croissance, taille initiale, taille à la puberté, taille maximale, taux maximal de reproduction). Un autre point intéressant dans l'utilisation de la modélisation mécanistique a été la possibilité d'inférer les mêmes paramètres pour des données obtenues à des temps différents à chaque génération. En effet, des contraintes réglementaires, financières, techniques ou temporelles ne facilitent pas toujours, dans une expérimentation effectuée sur plusieurs générations, la réalisation des mesures au même pas de temps sur toutes les générations étudiées. Ainsi, à l'aide de la modélisation, il est possible de comparer des paramètres issus de jeux de données mesurés à des temps différents et par conséquent de s'affranchir partiellement de ces contraintes.

L'utilisation couplée d'un module toxicocinétique (TK) avec un module toxicodynamique (TD) lors des analyses mécanistiques des données d'évolution a amélioré l'analyse du seuil d'effet du toxique. En effet, le seuil d'effet ainsi déterminé est non seulement indépendant du temps de mesure, mais également des concentrations utilisées lors de l'expérimentation. L'utilisation des modèles TKTD rend en effet possible l'extrapolation des mesures à des valeurs non utilisées pour la calibration du modèle. Enfin, le modèle DEBtox utilisé dans le cadre de ce doctorat intègre les fonctions liées à la croissance et à la reproduction, permettant ainsi la détermination de paramètres de toxicité communs à ces deux critères.

L'utilisation de la modélisation bioénergétique a également permis de vérifier les hypothèses sur les conditions expérimentales utilisées, en particulier sur certains facteurs pouvant fortement influencer les réponses des organismes. Il s'agit par exemple des facteurs reliés à l'alimentation de l'organisme telle que la disponibilité de la nourriture dans le milieu. L'analyse de ce facteur a permis de vérifier que les individus sont bien nourris de manière *ad libitum* ( $f \approx 1$ ) et que, par conséquent, la réponse microévolutive n'est pas liée à une carence alimentaire. Augustine *et al.* (2011) ont ainsi mis en évidence sur *D. rerio* un niveau d'ingestion estimé ( $f$ ) de 0,4 pour des individus présentés comme ayant été élevés dans des conditions idéales de laboratoire (Schilling, 2002). Ce niveau de nourriture faible peut se traduire par l'apparition d'un retard de développement.

Enfin, ces modèles peuvent être calibrés à l'aide de méthodes Bayésiennes. Outre le fait que ces méthodes permettent d'obtenir intuitivement des distributions de probabilité des valeurs des paramètres — autorisant de ce fait la prise en compte directe des incertitudes liées aux mesures ainsi qu'au modèle — elles permettent également d'inférer des paramètres sur un faible nombre de données ou de réplicats grâce à l'utilisation d'*a priori*. Cela peut se révéler particulièrement utile pour les études ne permettant pas l'utilisation d'un grand nombre d'organisme du fait de contraintes réglementaires, financières ou éthiques par exemple.

## XI.4 La modélisation, le changement d'échelle

Le modèle mécanistique développé et utilisé dans le cadre de ce travail pourrait être intégré dans un modèle de dynamique de population afin de permettre des extrapolations des effets des polluants à la population.

Ce type d'approche a déjà été utilisé en couplant des modèles de type individu-centré (individual-based model, IBM) avec des modèles bioénergétiques. Les modèles IBM sont basés sur l'hypothèse que les processus existant au niveau de la population émergent de ce que font les individus (Grimm & Railsback, 2005). Ainsi, ce type de modèle considère les individus comme étant des entités discrètes qui vont posséder un ou des attributs changeants au cours de leur cycle de vie (Beaudouin, 2007; Grimm & Railsback, 2005). Les modèles individu-centrés sont des outils prédictifs plus puissants que les approches de statistiques descriptives en permettant notamment la détection de perturbations biologiques et significatives qui seraient passées inaperçues avec les méthodes classiques (Beaudouin *et al.*, 2012b; Forbes & Calow, 2012). L'utilisation des modèles IBM couplés avec des modèles de type TKTD — dans lesquels les liens mécanistiques entre niveaux physiologiques sont faits — permet une capture de plusieurs niveaux d'organisation biologique et une détection des mécanismes gouvernant probablement les populations exposées à un toxique ou non (Beaudouin *et al.*, 2012a; Forbes & Calow, 2012; Gabsi *et al.*, 2013; Grimm & Martin, 2013). Ainsi, un modèle IBM basé sur un modèle DEB permet d'explorer à la fois les traits d'histoire de vie individuels et la dynamique des populations (Grimm & Martin, 2013). Ce type de modèle a déjà été utilisé avec succès notamment sur le diptère *Chironomus riparius* exposé à de l'uranium où une population expérimentale a été modélisée. Cela a permis de tirer des conclusions non accessibles par d'autres moyens classique ou par un modèle TKTD pur (ici l'apparition d'effets sur la croissance et la reproduction impliquant une sélection phénotypique au sein de la population via une survie différentielle) (Beaudouin *et al.*, 2012a).



## CHAPITRE XII

---

**Perspectives**

---

DANS LE CADRE de ce doctorat, les avantages de l'utilisation de la modélisation par rapport à une analyse classique ont été explicités. Un modèle bioénergétique mécanistique a été développé, analysé et utilisé pour étudier l'évolution du nématode *C. elegans* exposé à un polluant métallique radioactif, l'uranium. Le modèle développé a donc été utilisé dans un cadre bien particulier correspondant à une exposition d'individus à une pollution constante et non fluctuante par un métal lourd radioactif. Il serait par conséquent intéressant de vérifier la robustesse du modèle utilisé dans ce doctorat. En effet, les activités anthropiques amènent un grand nombre de pollutions diverses et variées. Ainsi, de nombreux métaux, pesticides, composés pharmaceutiques et autres substances industrielles sont régulièrement dispersés dans les écosystèmes. La capacité du modèle à analyser de manière pertinente et réaliste ces autres types de composés permettrait d'étendre son domaine de validité. Néanmoins, il est nécessaire de faire attention à ne pas étendre de manière abusive ce domaine de validité. En effet, les effets toxiques sur les organismes ne sont pas obligatoirement reliés à des actions chimiques. Un certain nombre d'actions physiques (*e.g.* rayonnement ionisant, température) peut également aboutir à un effet toxique. Dans la perspective d'utiliser le modèle présenté ici, afin d'étudier ce type d'actions physiques, il sera nécessaire d'analyser la cohérence de ce type d'action avec les hypothèses sous-jacentes du modèle et probablement de modifier le module toxicocinétique du modèle.

De plus, les pollutions auxquelles sont soumis les organismes peuvent être de type constante, mais aussi fluctuante ou en pulse. L'analyse de ces deux derniers types de pollution à l'aide d'un modèle mécanistique a déjà été menée notamment sur des organismes aquatiques (Ashauer *et al.*, 2006; Péry *et al.*, 2001). Se pose donc la question de l'application du modèle développé à l'analyse de l'impact de concentrations fluctuantes ou pulsées et de la capacité du modèle à y répondre. L'intégration de l'analyse de ce type de pollution nécessiterait principalement une adaptation du module de toxicocinétique du modèle et une acquisition supplémentaire d'information, dont l'évolution de la concentration au cours du temps et, dans certains cas, une estimation du facteur de bioconcentration (Péry *et al.*, 2001).

De même, les organismes sont régulièrement exposés à des alternances ou à des mélange de polluants qui

vont modifier, amplifier ou diminuer la réponse de ces populations aux pollutions. Dutilleul (2013) a ainsi étudié l'évolution d'une population de *C. elegans* exposée à une alternance de stress (uranium et NaCl). Dans cette étude l'auteur a mis en évidence une réponse évolutive rapide ainsi qu'une forte spécialisation des individus exposés alors que l'hypothèse contraire avait été posée. L'auteur explique cette réponse par un effet de coévolution entre le NaCl et l'uranium. Il serait intéressant d'appliquer le modèle développé afin de vérifier sa capacité à prendre en compte ce type de coévolution et si possible, tenter de l'expliquer plus finement. Différents projets étudient également l'effet d'un mélange de polluants sur les organismes. En effet, les réponses liées à ces mélanges de polluants peuvent fortement différer des effets seuls de ces polluants, notamment du fait des phénomènes de synergie ou d'antagonisme d'effet. À l'heure actuelle, deux concepts sont utilisés pour rendre compte de l'effet de ces mélanges. Il s'agit du concept d'addition des concentrations — basé sur un principe de dilution et mis au point pour des composés ayant le même mécanisme d'action — et du concept d'action indépendante — mis au point pour des composés ayant des mécanismes d'action différents (Bliss, 1939; Loewe & Muischnek, 1926). Ces concepts peuvent être ajustés afin de prendre en compte les effets synergiques ou antagonistes des polluants. Le modèle développé dans ce doctorat pourrait ainsi intégrer ces méthodes et être testé pour l'analyse de l'impact de mélanges de polluants sur *C. elegans* et sur son évolution.

*« L'imagination est plus importante que la connaissance.*

*La connaissance est limitée alors que l'imagination englobe le monde entier »*

Albert Einstein

# Bibliographie



---

## Bibliographie

---

- Abada, E., Sung, H., Dwivedi, M., Park, B.-J., Lee, S.-K., & Ahn, J. (2009). *C. elegans* behavior of preference choice on bacterial food. *Molecules and Cells*, 28 :209–213.
- Adam, O., Badot, P.-M., Degiorgi, F., & Crini, G. (2009). Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2) :441–449.
- Albert, J. (2007). *Bayesian Computation with R*. Use R! Springer.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Colao, B. N., & Kammenga, J. E. (2006a). Temporal Dynamics of Effect Concentrations. *Environmental Science & Technology*, 40(7) :2478–2484. PMID : 16646492.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Kooijman, S. A. L. M., & Kammenga, J. E. (2005). Responses to stress of *Caenorhabditis elegans* populations with different reproductive strategies. *Functional Ecology*, 19(4) :656–664.
- Alda Álvarez, O., Jager, T., Redondo, E. M., & Kammenga, J. E. (2006b). Physiological modes of action of toxic chemicals in the nematode *Acroboloides nanus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(12) :3230–3237.
- Allen, A. P. & Gillooly, J. F. (2009). Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecology Letters*, 12 :369–384.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Bourrachot, S., Floriani, M., Morello, M., & Garnier-Laplace, J. (2006). Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 80(3) :228–236.
- Altun, Z. & Hall, D. (2009). Introduction. In *WormAtlas*. WormAtlas, <http://www.wormatlas.org>.
- Andersen, M. E., Reddy, M. B., Clewell, H. J., & Yang, R. S. H. (2005). *Conclusions and Future Directions*, chapter 15, pages 389–399. John Wiley & Sons, Inc.
- Anderson, G. L., Boyd, W. A., & Williams, P. L. (2001). Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4) :833–838.



- Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5) :1235–1240.
- Anderson, J. L., Morran, L. T., & Phillips, P. C. (2010). Outcrossing and the Maintenance of Males within *C. elegans* Populations. *Journal of Heredity*, 101(suppl 1) :S62–S74.
- Anderson, S. L. & Wild, G. C. (1994). Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(12) :9–12. Napa Conference on Genetic and Molecular Ecotoxicology, YOUNTVILLE, CA, OCT 12-15, 1993.
- Araiz, C., Château, M.-T., Descamps, S., & Galas, S. (2008). Quantitative genomics in *Caenorhabditis elegans* : Identification strategies for new human therapeutic targets and molecular mechanisms. *IRBM*, 29(5) :289–296.
- Ashauer, R., Agatz, A., Albert, C., Ducrot, V., Galic, N., Hendriks, J., Jager, T., Kretschmann, A., O’connor, I., Rubach, M. N., Nyman, A.-M., Schmitt, W., Stadnicka, J., van Den Brink, P. J., & Preuss, T. G. (2011). Toxicokinetic-toxicodynamic modeling of quantal and graded sublethal endpoints : A brief discussion of concepts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11) :2519–2524.
- Ashauer, R., Boxall, A., & Brown, C. (2006). Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7) :1899–1912.
- Ashauer, R. & Brown, C. D. (2008). Toxicodynamic assumptions in ecotoxicological hazard models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(8) :1817–1821.
- ASTM, American Society for Testing and Materials. (2002). Standard Guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Technical Report E 2172-01, ASTM International.
- Augustine, S. (2012). *Metabolic programming of zebra fish, Danio rerio, uncovered; physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget theory and life cycle consequences of uranium induced perturbations*. Ph.D. Thesis, Aix-Marseille Université ; Vrije Universiteit.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., & Kooijman, S. A. L. M. (2012a). Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 118-119 :9–26.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., & Kooijman, S. A. L. M. (2011). Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 159(3) :275–283.
- Augustine, S., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Gagnaire, B., Kooijman, S. A. L. M., & Adam-Guillermin, C. (2012b). Uranium induces ultra structural damage to gut wall of zebrafish, *Danio rerio*. In Augustine, S., editor, *Metabolic programming of zebra fish, Danio rerio, uncovered; physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget theory and life cycle consequences of uranium induced perturbations*., Ph.D. Thesis 6, pages 107–119.

## BIBLIOGRAPHIE

- Avery, L. & Shtonda, B. B. (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*, 206(14) :2441–2457.
- Avery, L. & You, Y.-J. (2012). *C. elegans* feeding (May 21, 2012). In WormBook, editor, *WormBook*. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Bargmann, C. I. (2006). Chemosensation in *C. elegans* (October 25, 2006). In WormBook, editor, *WormBook*. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., & Devaux, A. (2007). Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(3) :497–505.
- Barkleit, A., Moll, H., & Bernhard, G. (2008). Interaction of uranium(VI) with lipopolysaccharide. *Dalton Transactions*, (21) :2879–2886.
- Barrett, R. D. & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(1) :38–44.
- Barrière, A. & Félix, M.-A. (2005a). High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current Biology*, 15 :1176–1184. Biological Resource Center.
- Barrière, A. & Félix, M.-A. (2005b). Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans* (December 26, 2005). In WormBook, editor, *WormBook*. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Bayes, T. & Price, R. (1763). An Essay towards Solving a Problem in the Doctrine of Chances. By the Late Rev. Mr. Bayes, F. R. S. Communicated by Mr. Price, in a Letter to John Canton, A. M. F. R. S. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 53 :370–418.
- Beaudouin, R. (2007). *Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie, en écosystème expérimental*. Ph.D. Thesis, Université de Rennes I.
- Beaudouin, R., Dias, V., Bonzom, J.-M., & Péry, A. R. R. (2012a). Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology*, 21(4) :1225–1239.
- Beaudouin, R., Ginot, V., & Monod, G. (2012b). Improving mesocosm data analysis through individual-based modelling of control population dynamics : a case study with mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology*, 21(1) :155–164.
- Bickham, J. (2011). The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology*, 20(3) :497–502.
- Bickham, J. W. & Smolen, M. J. (1994). Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(Suppl 12) :25.

- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. (2005). Environmental stress, adaptation and evolution : an overview. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4) :744–749.
- Billoir, E. (2008). *Modélisation dynamique et inférence bayésienne pour l'analyse de données en écotoxicologie*. Ph.D. Thesis, Université Claude Bernard, Lyon 1.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M. L., Péry, A. R. R., & Charles, S. (2008a). A Bayesian Approach to Analyzing Ecotoxicological Data. *Environmental Science & Technology*, 42(23) :8978–8984.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M.-L., Péry, A. R. R., Geffard, O., & Charles, S. (2008b). Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of Theoretical Biology*, 254(1) :55–64.
- Billoir, E., Péry, A. R. R., & 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. *Ecological Modelling*, 203(3-4) :204–214.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143) :396–398.
- Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26(3) :585–615.
- Blount, Z. D., Borland, C. Z., & Lenski, R. E. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(23) :7899–7906.
- Bois, F. Y., Jamei, M., & Clewell, H. J. (2010). PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. *Toxicology*, 278(3) :256–267. Highlights of the 2010 Annual Congress of The British Toxicology Society. Includes the Abstracts of the British Toxicology Society, Spring 2010.
- Bourlès, Y., Alunno-Bruscia, M., Pouvreau, S., Tollu, G., Leguay, D., Arnaud, C., Gouletquer, P., & Kooijman, S. A. L. M. (2009). Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research*, 62(2-3) :62–71. Metabolic organization : 30 years of DEB applications and developments.
- Bourrachot, S. (2009). *Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (D. Rerio) : impact sur les stades de vie*. Ph.D. Thesis, Université Aix-Marseille 1.
- Bourrachot, S., Simon, O., & Gilbin, R. (2008). The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 90(1) :29–36.
- Boyd, W. A., Cole, R. D., Anderson, G. L., & Williams, P. L. (2003). The effects of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(12) :3049–3055.

- Boyd, W. A., McBride, S. J., & Freedman, J. H. (2007). Effects of Genetic Mutations and Chemical Exposures on *Caenorhabditis elegans* Feeding : Evaluation of a Novel, High-Throughput Screening Assay. *PLoS ONE*, 2(12) :e1259.
- Boyd, W. A., McBride, S. J., Rice, J. R., Snyder, D. W., & Freedman, J. H. (2010a). A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(2) :153–159.
- Boyd, W. A., Smith, M. V., Kissling, G. E., & Freedman, J. H. (2010b). Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1) :68–73.
- Boyd, W. A., Smith, M. V., Kissling, G. E., Rice, J. R., Snyder, D. W., Portier, C. J., & Freedman, J. H. (2009). Application of a Mathematical Model to Describe the Effects of Chlorpyrifos on *Caenorhabditis elegans* Development. *PLoS ONE*, 4(9) :e7024.
- Boyd, W. A. & Williams, P. L. (2003a). Availability of metals to the nematode *Caenorhabditis elegans* : Toxicity based on total concentrations in soil and extracted fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(5) :1100–1106.
- Boyd, W. A. & Williams, P. L. (2003b). Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(11) :2768–2774.
- Brenner, S. (1974). Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1) :71–94.
- Brooks, S. P. & Gelman, A. (1998). General Methods for Monitoring Convergence of Iterative Simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 7(4) :434–455.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a Metabolic Theory of Ecology. *Ecology*, 85(7) :1771–1789.
- Bryan, G. W. & Hummerstone, L. G. (1971). Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals. I. General observations and adaptation to copper. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51 :845–863.
- Burt, A. (2000). Perspective : Sex, recombination, and the efficacy of selection — was Weismann right ? *Evolution*, 54(2) :337–351.
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans* : I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*, 51(1) :23–33.
- Cardoso, J. F. M. F. (2007). *Growth and reproduction in bivalves ; an energy budget approach*. Ph.D. Thesis, Groningen Universiteit.
- Casella, G. & George, E. I. (1992). Explaining the Gibbs sampler. *The American Statistician*, 46(3) :167–174.

- Cassada, R. C. & Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 46(2) :326–342.
- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C. R., Goulet, R. R., & Kamunde, C. N. (2003). Conducting Ecological Risk Assessments of Inorganic Metals and Metalloids : Current Status. *Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal*, 9(4) :641–697.
- Chen, Y., Breen, P. A., & Andrew, N. L. (2000). Impacts of outliers and mis-specification of priors on Bayesian fisheries-stock assessment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(11) :2293–2305.
- Cioci, L. K., Qiu, L., & Freedman, J. H. (2000). Transgenic strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* as biomonitors of metal contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(8) :2122–2129.
- Cole, L. C. (1954). The Population Consequences of Life History Phenomena. *The Quarterly Review of Biology*, 29(2) :103–137.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., & Baudin, J. P. (2001). Comportement de l'uranium dans l'environnement. In Metivier, H., editor, *L'uranium, de l'environnement à l'Homme*, chapter 6, pages 187–211. EDP Science, Les Ulis (France). Collection ISPN.
- Cooper, V. S. & Lenski, R. E. (2000). The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407(6805) :736–739.
- Coutellec, M.-A. & Barata, C. (2011). An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 20(3) :493–496.
- Coutellec, M.-A., Collinet, M., & Caquet, T. (2011). Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, 20 :524–534.
- Cui, Y., Boyd, W. A., McBride, S. J., & Freedman, J. H. (2007a). Toxicogenomic analysis of cadmium responsive transcription in *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in heavy metal resistance. In *46th Meeting of the Society of Toxicology*, page 396, Charlotte, Caroline du Nord (USA). Abstract 1923.
- Cui, Y., McBride, S. J., Boyd, W. A., Alper, S., & Freedman, J. H. (2007b). Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biology*, 8(6) :1–15.
- Cutter, A. D., Avilés, L., & Ward, S. (2003). The proximate determinants of sex ratio in *C. elegans* populations. *Genetics Research*, 81 :91–102.
- Dajoz, R. (2006). *Précis d'écologie*. Sciences Sup. Dunod, 8 edition. ISBN 2 10 049627 1.

- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- David, H. E., Dawe, A. S., de Pomerai, D. I., Jones, D., Candido, E. P. M., & Daniells, C. (2003). Construction and evaluation of a transgenic hsp16-GFP-lacZ *Caenorhabditis elegans* strain for environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1) :111–118.
- David, J. R., Gibert, P., Legout, H., Petavy, G., Capy, P., & Moreteau, B. (2005). Isofemale lines in *Drosophila* : an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, 94(1) :3–12.
- Day, T. & Bonduriansky, R. (2011). A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance. *The American Naturalist*, 178(2) :E18–E36.
- Dengg, M. & van Meel, J. C. A. (2004). *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 50(3) :209–214.
- Denver, D. R., Dolan, P. C., Wilhelm, L. J., Sung, W., Lucas-Lledó, J. I., Howe, D. K., Lewis, S. C., Okamoto, K., Thomas, W. K., Lynch, M., & Baer, C. F. (2009). A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38) :16310–16314.
- DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2) :77–81.
- Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (1999). Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 58(7) :451–462.
- Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (2000). A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(12) :3061–3067.
- Dias, V. (2010). *Étude des réponses adaptatives d'une population d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) soumise à une exposition métallique chronique : le cas de l'uranium*. Ph.D. Thesis, Université de Provence Aix-Marseille I.
- Dias, V., Vasseur, C., & Bonzom, J.-M. (2008). Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium : Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere*, 71(3) :574–581.
- Dodenhoff, J., Van Vleck, L. D., & Gregory, K. E. (1999). Estimation of direct, maternal, and grandmaternal genetic effects for weaning weight in several breeds of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 77(4) :840–5.
- Donkin, S. G. & Williams, P. L. (1995). Influence of developmental stage, salts and food presence on various end-points using *Caenorhabditis elegans* for aquatic toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(12) :2139–2147.

- Dorazio, R. M. & Johnson, F. A. (2003). Bayesian inference and decision theory — a framework for decision making in natural resource management. *Ecological Applications*, 13(2) :556–563.
- Ducrot, V., Péry, A. R. R., & Lagadic, L. (2010). Modelling effects of diquat under realistic exposure patterns in genetically differentiated populations of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 365(1557) :3485–3494.
- Dutilleul, M. (2013). *Réponses microévolutives et coûts adaptatifs de populations de Caenorhabditis elegans exposées à des stress environnementaux*. Ph.D. Thesis, Université de Montpellier I & Université du Québec à Montréal.
- Dutilleul, M., Lemaire, L., Réale, D., Lecomte, C., Galas, S., & Bonzom, J.-M. (2013). Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology*, 22(5) :862–868.
- Einarsson, B., Birnir, B., & Sigurðsson, S. (2011). A dynamic energy budget (DEB) model for the energy usage and reproduction of the Icelandic capelin (*Mallotus villosus*). *Journal of Theoretical Biology*, 281(1) :1–8.
- Ellison, A. M. (1996). An Introduction to Bayesian Inference for Ecological Research and Environmental Decision-Making. *Ecological Applications*, 6(4) :1036–1046.
- Faivre, R., Iooss, B., Mahévas, S., Makowski, D., & Monod, H., editors (2013). *Analyse de sensibilité et exploration de modèles : application aux sciences de la nature et de l'environnement*. Savoir faire. Quæ. ISBN 978-2-7592-1906-3.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics (4th Edition)*. Prentice Hall.
- Fang-Yen, C., Avery, L., & Samuel, A. D. T. (2009). Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47) :20093–20096.
- Félix, M.-A. & Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22) :R965–R969.
- Félix, M.-A. & Duveau, F. (2012). Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *BMC Biology*, 10(59).
- Forbes, V. E. & Calow, P. (1999). Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(7) :1544–1556.
- Forbes, V. E. & Calow, P. (2002). Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 357(1425) :1299–1306.

- Forbes, V. E. & Calow, P. (2012). Promises and problems for the new paradigm for risk assessment and an alternative approach involving predictive systems models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12) :2663–2671.
- Forbes, V. E., Hommen, U., Thorbek, P., Heimbach, F., Van den Brink, P. J., Wogram, J., Thulke, H.-H., & Grimm, V. (2009). Ecological models in support of regulatory risk assessments of pesticides : developing a strategy for the future. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 5(1) :167–172.
- Fortin, C., Dutels, L., & Garnier-Laplace, J. (2004). Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation : The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4) :974–981.
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.-C., & Garnier-Laplace, J. (2004). Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*) : Quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5) :1108–1114.
- Freedman, J. H., Chen, M., Coughlan, S., & Boyd, W. A. (2006). Changes in gene expression associated with exposure to environmental toxicant. In *45th Meeting of the Society of Toxicology*, page 240, San Diego, Californie (USA). Abstract 1178.
- Freeman, M. N., Peredney, C. L., & Williams, P. L. (1999). A Soil Bioassay Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*. In Henshel, D. S., Black, C., Harrass, C., & ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate, editors, *Environmental Toxicology and Risk Assessment : Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment. Eighth volume*, number ASTM STP 1364. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.
- Fuller, R. C., Baer, C. F., & Travis, J. (2005). How and When Selection Experiments Might Actually be Useful. *Integrative and Comparative Biology*, 45(3) :391–404.
- Gabsi, F., Hammers-Wirtz, M., Grimm, V., Schäffer, A., & Preuss, T. G. (2013). Coupling different mechanistic effect models for capturing individual- and population-level effects of chemicals : Lessons from a case where standard risk assessment failed. *Ecological Modelling*. In press.
- Gaglia, M. M. & Kenyon, C. (2009). Stimulation of Movement in a Quiescent, Hibernation-Like Form of *Caenorhabditis elegans* by Dopamine Signaling. *The Journal of Neuroscience*, 29(22) :7302–7314.
- Gagliano, M. & McCormick, M. I. (2007). Maternal condition influences phenotypic selection on offspring. *Journal of Animal Ecology*, 76(1) :174–182.
- Garland Jr, T. (2003). Selection experiments : an under-utilized tool in biomechanics and organismal biology. *Vertebrate biomechanics and evolution*, pages 23–56.
- Gause, G. F. (1932). Experimental Studies on the Struggle for Existence : I. Mixed Population of Two Species of Yeast. *Journal of Experimental Biology*, 9(4) :389–402.



- Gause, G. F. (1935). Vérification expérimentales de la théorie mathématique de la lutte pour la vie. In *Actualités scientifiques et industrielles*, volume 277, Paris. Hermann.
- Gelman, A. (2006). Prior distributions for variance parameters in hierarchical models. *Bayesian Analysis*, 1(3) :515–533.
- Gelman, A., Bois, F., & Jiang, J. (1996). Physiological Pharmacokinetic Analysis Using Population Modeling and Informative Prior Distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 91(436) :1400–1412.
- Gelman, A., Carlin, J. B., Stern, H. S., & Rubin, D. B. (2003). *Bayesian Data Analysis, Second Edition*. Chapman & Hall/CRC Texts in Statistical Science. Taylor & Francis.
- Gelman, A. & Rubin, D. B. (1992). Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Statistical Science*, 7(4) :457–472.
- Geman, S. & Geman, D. (1984). Stochastic Relaxation, Gibbs Distributions, and the Bayesian Restoration of Images. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, PAMI-6(6) :721–741.
- Gems, D. & Riddle, D. L. (1996). Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. *Nature*, 379(0028-0836 (Linking)) :723–725.
- Gerlowski, L. E. & Jain, R. K. (1983). Physiologically based pharmacokinetic modeling : Principles and applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(10) :1103–1127.
- Gillooly, J. F., Charnov, E. L., West, G. B., Savage, V. M., & Brown, J. H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, 417(6884) :70–73.
- Giovanetti, A., Fesenko, S., Cozzella, M. L., Asencio, L. D., & Sansone, U. (2010). Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 101(6) :509–516.
- Gomez-Eyles, J. L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M. E., & Spurgeon, D. J. (2009). Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1) :71–79.
- Goranson, N. C., Ebersole, J. P., & Brault, S. (2005). Resolving an adaptive conundrum : reproduction in *Caenorhabditis elegans* is not sperm-limited when food is scarce. *Evolutionary Ecology Research*, 7 :325–333.
- Goussen, B., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Bonzom, J.-M., & Péry, A. R. R. (2013a). DEBtox modelling applied to *Caenorhabditis elegans* : a case study on uranium. Submitted.
- Goussen, B., Parisot, F., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Péry, A. R. R., & Bonzom, J.-M. (2013b). Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*, 22(5) :869–878.

- Graves, A. L., Boyd, W. A., & Williams, P. L. (2005). Using Transgenic *Caenorhabditis elegans* in Soil Toxicity Testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4) :490–494.
- Grimm, V. & Martin, B. T. (2013). Mechanistic effect modeling for ecological risk assessment : Where to go from here? *Integrated environmental assessment and management*, 9(3) :e58–63.
- Grimm, V. & Railsback, S. F. (2005). *Individual-based Modeling and Ecology*. Number ISBN : 9780691096667 in Princeton Series in Theoretical and Computational Biology. Princeton University Press.
- Gueniot, B., Munier-Lamy, C., & Berthelin, J. (1988). Geochemical behavior of uranium in soils, part I. Influence of pedogenetic processes on the distribution of uranium in aerated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 31(1) :21–37.
- Guo, Y., Yang, Y., & Wang, D. (2009). Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reproductive Toxicology*, 28(1) :90–95.
- Harada, H., Kurauchi, M., Hayashi, R., & Eki, T. (2007). Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66 :378–383.
- Hart, D. R., McKee, P. M., Burt, A. J., & Goffin, M. J. (1986). Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research*, 12(3) :206–220.
- Hastings, W. K. (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57(1) :97–109.
- Hedrick, P. W. (2006). Genetic Polymorphism in Heterogeneous Environments : The Age of Genomics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1) :67–93.
- Hendry, A. P., Farrugia, T. J., & Kinnison, M. T. (2008). Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology*, 17(1) :20–29.
- Hendry, A. P. & Gonzalez, A. (2008). Whither adaptation? *Biology & Philosophy*, 23 :673–699.
- Hendry, A. P. & Kinnison, M. T. (2001). An introduction to microevolution : rate, pattern, process. *Genetica*, 112-113(1) :1–8.
- Hendry, A. P., Nosil, P., & Rieseberg, L. H. (2007). The speed of ecological speciation. *Functional Ecology*, 21(3) :455–464.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology*, 40 :iv–vii.
- Hitchcock, D. R., Black, M. C., & Williams, P. L. (1997). Investigations into Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* for Municipal and Industrial Wastewater Toxicity Testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(3) :252–260.

- Hoffmann, A. A. & Merilä, J. (1999). Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(3) :96–101.
- Hope, B. (2006). An examination of ecological risk assessment and management practices. *Environment International*, 32(8) :983–995.
- Horvitz, H. R., Moyed, & Sternberg, P. W. (1982). Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience Commentaries*, 1 :56–65.
- Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Gratzner, H., Ahlf, W., & Steinberg, C. (1997). Influence of particle size distribution and content of organic matter on the toxicity of copper in sediment bioassays using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Water, Air, and Soil Pollution*, 99(1-4) :689–695.
- Höss, S., Henschel, T., Haitzer, M., Traunspurger, W., & Steinberg, C. E. W. (2001). Toxicity of cadmium to *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in whole sediment and pore water—the ambiguous role of organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12) :2794–2801.
- Höss, S., Jänsch, S., Moser, T., Junker, T., & Römbke, J. (2009). Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7) :1811–1818.
- Hu, P. J. (2007). Dauer (August 08, 2007). In WormBook, editor, *WormBook*, pages 1–19. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Hu, Y.-O., Wang, Y., Ye, B.-P., & Wang, D.-Y. (2008). Phenotypic and Behavioral Defects Induced by Iron Exposure Can Be Transferred to Progeny in *Caenorhabditis elegans*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(6) :467–473.
- Ingham, R. E., Trofymow, J. A., Ingham, E. R., & Coleman, D. C. (1985). Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers - effects on nutrient cycling and plant-growth. *Ecological Monographs*, 55(1) :119–140.
- Innan, H. & Kim, Y. (2004). Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29) :10667–10672.
- Inserm, Institut national de la santé et de la recherche médicale. & ENS, École Normale Supérieure. (2011). Genetics and Neurobiology of *C. elegans*. [Online] 06 Oct 2013 <http://www.biologie.ens.fr/bcsgnce/>.
- IRSN, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. (2012). Uranium naturel et environnement. [Online] <http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/fiches-radionucleides/environnement/Pages/Uranium-naturel-environnement.aspx>. Contributeurs : Février, Laureline; Simon, Olivier; Boust, Dominique; Pommier, Julien; Augeray, Céline; Boulet, Béatrice; Cagnat, Xavier; Loyer, Jeanne; Picolo, Jean-Louis; Vidal, Romain; Renaud, Philippe.

- Jager, T. (2012). Bad habits die hard : The NOEC's persistence reflects poorly on ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2) :228–229.
- Jager, T., Alda Álvarez, O., Kammenga, J. E., & Kooijman, S. A. L. M. (2005). Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Functional Ecology*, 19(1) :136–144.
- Jager, T., Crommentuijn, T., van Gestel, C. A. M., & Kooijman, S. A. L. M. (2004). Simultaneous Modeling of Multiple End Points in Life-Cycle Toxicity Tests. *Environmental Science & Technology*, 38(10) :2894–2900. PMID : 15212265.
- Jansen, M., Coors, A., Stoks, R., & de Meester, L. (2011a). Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance : a case study in *Daphnia*. *Ecotoxicology*, 20 :543–551.
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., van Doorslaer, W., & de Meester, L. (2011b). Collateral damage : rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution*, 65(9) :2681–2691.
- Jiang, G. C.-T., Hughes, S., Sturzenbaum, S. R., Evje, L., Syversen, T., & Aschner, M. (2009). *Caenorhabditis elegans* Metallothioneins Protect against Toxicity Induced by Depleted Uranium. *Toxicological Sciences*, 111(2) :345–354.
- Jiang, G. C.-T., Tidwell, K., McLaughlin, B. A., Cai, J., Gupta, R. C., Milatovic, D., Nass, R., & Aschner, M. (2007). Neurotoxic Potential of Depleted Uranium—Effects in Primary Cortical Neuron Cultures and in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences*, 99(2) :553–565.
- Johnson, L. R., Pecquerie, L., & Nisbet, R. M. (2013). Bayesian inference for bioenergetic models. *Ecology*, 94(4) :882–894.
- Jones, D. & Candido, E. P. M. (1999). Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans* : Relationship to the cellular stress response. *Journal of Experimental Zoology*, 284(2) :147–157.
- Jørgensen, S. E. (2008). Overview of the model types available for development of ecological models. *Ecological Modelling*, 215(1-3) :3–9.
- Jurgens, B. C., Fram, M. S., Belitz, K., Burow, K. R., & Landon, M. K. (2010). Effects of Groundwater Development on Uranium : Central Valley, California, USA. *Ground Water*, 48(6) :913–928.
- Kawecki, T. J. & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12) :1225–1241.
- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10) :547–560.
- Khanna, N., Cressman III, C. P., Tatara, C. P., & Williams, P. L. (1997). Tolerance of the Nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, Salinity, and Hardness in Aquatic Media. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(1) :110–114.

- Kiontke, K. & Sudhaus, W. (2006). Ecology of *Caenorhabditis* species (January 09, 2006). In WormBook, editor, *WormBook*. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Klass, M. R. (1977). Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans* : Major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 6(6) :413–429.
- Klerks, P. & Levinton, J. (1989). Rapid Evolution of Metal Resistance in a Benthic Oligochaete Inhabiting a Metal-polluted Site. *Biological Bulletin*, 176(2) :135–141.
- Klerks, P. L. (2002). Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment : Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal*, 8(5) :971–982.
- Knight, C., Patel, M., Azevedo, R., & Leroi, A. (2002). A novel mode of ecdysozoan growth in *Caenorhabditis elegans*. *Evolution and Development*, 4(1) :16–27.
- Koga, M., Zwaal, R., Guan, K.-L., Avery, L., & Ohshima, Y. (2000). A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. *The EMBO Journal*, 19(19) :5148–5156.
- Kooijman, S. A. L. M. (1986). Energy budgets can explain body size relations. *Journal of Theoretical Biology*, 121(3) :269–282.
- Kooijman, S. A. L. M. (1993). *Dynamic Energy Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press, Cambridge, first edition.
- Kooijman, S. A. L. M. (2000). *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press, Cambridge, second edition.
- Kooijman, S. A. L. M. (2010). *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation*. Cambridge University Press, Cambridge, third edition.
- Kooijman, S. A. L. M. (2011a). Basic methods in Theoretical Biology. Part of the deb tele-course, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Kooijman, S. A. L. M. (2011b). Energy Budgets. In Hastings, A. & Gross, L., editors, *Sourcebook in Theoretical Ecology*. University of California Press.
- Kooijman, S. A. L. M. & Bedaux, J. J. M. (1996a). Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Research*, 30(7) :1711–1723.
- Kooijman, S. A. L. M. & Bedaux, J. J. M. (1996b). Analysis of toxicity tests on fish growth. *Water Research*, 30(7) :1633–1644.
- Kooijman, S. A. L. M. & Bedaux, J. J. M. (1996c). *The Analysis of Aquatic Toxicity Data*. VU University Press.

- Kurz, C. L., Shapira, M., Chen, K., Baillie, D. L., & Tan, M.-W. (2007). *Caenorhabditis elegans* *pqp-5* is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires TIR-1 and a p38 map kinase cascade. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2) :438–443.
- Lagauzère, S., Terrail, R., & Bonzom, J.-M. (2009). Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2) :527–537.
- Lagido, C., McLaggan, D., Flett, A., Pettitt, J., & Glover, L. A. (2009). Rapid Sublethal Toxicity Assessment Using Bioluminescent *Caenorhabditis elegans*, a Novel Whole-Animal Metabolic Biosensor. *Toxicological Sciences*, 109(1) :88–95.
- Landis, W. G. & Chapman, P. M. (2011). Well past time to stop using NOELs and LOELs. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4) :vi–viii.
- Lecoutre, B. (2005). Et si vous étiez un bayésien qui s'ignore ? *Revue MODULAD*, 32 :92–105.
- Lee, J.-H. & Landrum, P. F. (2006). Development of a Multi-Component Damage Assessment Model (MDAM) for Time-Dependent Mixture Toxicity with Toxicokinetic Interactions. *Environmental Science & Technology*, 40(4) :1341–1349.
- Lee, J.-H., Landrum, P. F., & Koh, C.-h. (2002). Prediction of Time-Dependent PAH Toxicity in *Hyalella azteca* Using a Damage Assessment Model. *Environmental Science & Technology*, 36(14) :3131–3138.
- Legay, J.-M. (1997). *L'expérience et le modèle : Un discours sur la méthode*. Sciences en Questions. INRA Editions, Paris. ISBN 2738007783.
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T., & Raymond, M. (1999). Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*, 400(6747) :861–864.
- Leung, M. C. K., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans* : An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1) :5–28.
- Liao, V.-C. & Yu, C.-W. (2005). *Caenorhabditis elegans* *gcs-1* Confers Resistance to Arsenic-Induced Oxidative Stress. *Biometals*, 18(5) :519–528.
- Lika, K. & Nisbet, R. M. (2000). A Dynamic Energy Budget model based on partitioning of net production. *Journal of Mathematical Biology*, 41(4) :361–386.
- Lints, R. & Hall, D. H. (2009). Male introduction. In *WormAtlas*. WormAtlas, <http://www.wormatlas.org>.
- Loewe, S. & Muischnek, H. (1926). Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 114(5-6) :313–326.

- Lopes, C., Péry, A. R. R., Chaumot, A., & Charles, S. (2005). Ecotoxicology and population dynamics : Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, 188(1) :30–40.
- Lopes, P. C., Sucena, E., Santos, M. E., & Magalhães, S. (2008). Rapid experimental evolution of pesticide resistance in *C. elegans* entails no costs and affects the mating system. *PLoS ONE*, 3(11) :e3741.
- Lottermoser, B. G., Ashley, P. M., & Costelloe, M. T. (2005). Contamination dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology*, 48(6) :748–761.
- Lozano, J. C., Vera Tomé, F., Gómez Escobar, V., & Blanco Rodríguez, P. (2000). Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. *Applied Radiation and Isotopes*, 53(1) :337–343.
- Ludwig, D. (1996). Uncertainty and the Assessment of Extinction Probabilities. *Ecological Applications*, 6(4) :1067–1076.
- Lutke, L., Moll, H., & Bernhard, G. (2012). Insights into the uranium(vi) speciation with *Pseudomonas fluorescens* on a molecular level. *Dalton Transactions*, 41 :13370–13378.
- MacArthur, R. H. & Wilson, E. O. (1967). *The theory of island biogeography*, volume 1. Princeton University Press.
- Mackay, T. F., Fry, J. D., Lyman, R. F., & Nuzhdin, S. V. (1994). Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster* : estimates from response to selection of inbred strains. *Genetics*, 136(3) :937–51.
- Mahévas, S. (2013). Grille d'analyse et un exemple d'exploration de modèle complexe. In *Ecole ASPEN 2013 - Analyse de sensibilité, propagation d'incertitudes et exploration numérique de modèles en sciences de l'environnement*. [Présentation PowerPoint].
- Makarieva, A. M., Gorshkov, V. G., & Li, B.-L. (2004). Ontogenetic growth : models and theory. *Ecological Modelling*, 176(1–2) :15–26.
- Makowski, D. (2013). Analyse d'incertitude, analyse de sensibilité. Objectifs et principales étapes. In *Ecole ASPEN 2013 - Analyse de sensibilité, propagation d'incertitudes et exploration numérique de modèles en sciences de l'environnement*. [Présentation PowerPoint].
- Markich, S. J., Brown, P. L., & Jeffree, R. A. (1996). The use of geochemical speciation modelling to predict the impact of uranium to freshwater biota. *Radiochimica Acta*, 74 :321–326.
- Martin, B. T., Jager, T., Nisbet, R. M., Preuss, T. G., Hammers-Wirtz, M., & 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) :574–583.
- Massarin, S. (2010). *Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de Daphnia magna*. Ph.D. Thesis, Université Aix Marseille 2.

- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., & Poggiale, J.-C. (2010). Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 99(3) :309–319.
- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., & Pery, A. R. R. (2011). Biology-Based Modeling To Analyze Uranium Toxicity Data on *Daphnia magna* in a Multigeneration Study. *Environmental Science & Technology*, 45(9) :4151–4158.
- Maupas, E. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 8 :463–624.
- McMullen, P. D., Aprison, E. Z., Winter, P. B., Amaral, L. A. N., Morimoto, R. I., & Ruvinsky, I. (2012). Macro-level Modeling of the Response of *C. elegans* Reproduction to Chronic Heat Stress. *Plos Computational Biology*, 8(1) :e1002338.
- Medina, M. H., Correa, J. A., & Barata, C. (2007). Micro-evolution due to pollution : Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67(11) :2105–2114.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., & Teller, E. (1953). Equations of State Calculations by Fast Computing Machines. *Journal of Chemical Physics*, 21(6) :1087–1092.
- Metz, J. A. J. & Diekmann, O. (1986). *The Dynamics of Physiologically Structured Populations*. Number 68 in Lecture notes in biomathematics. Springer-Verlag, Berlin.
- Miaud, C. & Merilä, J. (2001). Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota*, 2(1) :31–50.
- Misson, J., Henner, P., Morello, M., Floriani, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., & Février, L. (2009). Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2) :353–362.
- Mkandawire, M., Vogel, K., Taubert, B., & Dudel, E. G. (2007). Phosphate regulates uranium(VI) toxicity to *Lemna gibba* L. G3. *Environmental Toxicology*, 22(1) :9–16.
- Monod, H. (2013). Plans d'expérience pour le criblage et l'analyse de sensibilité. In *Ecole ASPEN 2013 - Analyse de sensibilité, propagation d'incertitudes et exploration numérique de modèles en sciences de l'environnement*. [Présentation PowerPoint].
- Morgan, A. J., Kille, P., & Stürzenbaum, S. R. (2007). Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environmental Science & Technology*, 41(4) :1085–1096.
- Mori, I., Sasakura, H., & Kuhara, A. (2007). Worm thermotaxis : a model system for analyzing thermosensation and neural plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(6) :712–719.



- Morran, L. T., Cappy, B. J., Anderson, J. L., & Phillips, P. C. (2009a). Sexual partners for the stressed : facultative outcrossing in the self-fertilizing nematode *Caenorhabditis elegans*. *Evolution*, 63(6) :1473–1482.
- Morran, L. T., Parmenter, M. D., & Phillips, P. C. (2009b). Mutation load and rapid adaptation favour outcrossing over self-fertilization. *Nature*, 462(7271) :350–352.
- Morris, M. D. (1991). Factorial sampling plans for preliminary computational experiments. *Technometrics*, 33(2) :161–174.
- Mousseau, T. A. & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10) :403–407.
- Munns Jr., W. R. (2006). Assessing risks to wildlife populations from multiple stressors : Overview of the problem and research needs. *Ecology and Society*, 11(1) :art. no. 23.
- Muscatello, J. & Liber, K. (2009). Accumulation and Chronic Toxicity of Uranium Over Different Life Stages of the Aquatic Invertebrate *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57 :531–539.
- Mutwakil, M. H. A. Z., Reader, J. P., Holdich, D. M., Smithurst, P. R., Candido, E. P. M., Jones, D., Stringham, E. G., & de Pomerai, D. I. (1997). Use of Stress-Inducible Transgenic Nematodes as Biomarkers of Heavy Metal Pollution in Water Samples from an English River System. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(2) :146–153.
- Muyssen, B. T. & Janssen, C. R. (2004). Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution*, 130(3) :309–316.
- Neher, D. A. & Stürzenbaum, S. R. (2006). Extra-long PCR, an identifier of DNA adducts in single nematodes (*Caenorhabditis elegans*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 144(3) :279–285.
- Nisbet, R. M., Gurney, W. S. C., Murdoch, W. W., & McCauley, E. (1989). Structured population models : a tool for linking effects at individual and population level. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2) :79–99.
- Nisbet, R. M., McCauley, E., Gurney, W. S. C., Murdoch, W. W., & Wood, S. N. (2004). Formulating and testing a partially specified dynamic energy budget model. *Ecology*, 85(11) :3132–3139.
- Nobelprize.org (2013). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002. [Online] 26 Sep 2013 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2002/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/).
- OECD, International Atomic Energy Agency (IAEA) (2012). *Uranium 2011 Resources, Production and Demand*. Number ISBN 9789264178038. OECD Publishing.

## BIBLIOGRAPHIE

- Pecquerie, L., Petitgas, P., & Kooijman, S. A. L. M. (2009). Modeling fish growth and reproduction in the context of the Dynamic Energy Budget theory to predict environmental impact on anchovy spawning duration. *Journal of Sea Research*, 62(2-3) :93–105. Metabolic organization : 30 years of DEB applications and developments.
- Peredney, C. L. & Williams, P. L. (2000). Utility of *Caenorhabditis elegans* for Assessing Heavy Metal Contamination in Artificial Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1) :113–118.
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity : where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9) :481–486.
- Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., & Alonzo, F. (2013). Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 158(4) :231–243.
- Plummer, M. (2003). JAGS : A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. In *Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing (DSC 2003)*. March, pages 20–22.
- Plummer, M. (2012). JAGS Version 3.3.0 user manual. Technical report.
- Poggiale, J.-C. (2009). Principes écologiques et modélisation en écologie. In *UE BEM 221(MODélisation En écologie Marine)*. [Présentation PowerPoint].
- Posthuma, L. & Straalen, N. M. V. (1993). Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates : A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(1) :11–38.
- Poston, T. M., Hanf Jr., R. W., & Simmons, M. A. (1984). Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22(3) :289–298.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., & Alunno-Bruscia, M. (2006). Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research*, 56(2) :156–167.
- Price, C. A., Weitz, J. S., Savage, V. M., Stegen, J., Clarke, A., Coomes, D. A., Dodds, P. S., Etienne, R. S., Kerkhoff, A. J., McCulloh, K., Niklas, K. J., Olf, H., & Swenson, N. G. (2012). Testing the metabolic theory of ecology. *Ecology Letters*, 15(12) :1465–1474.
- Péry, A. R. R. (2006). L'écotoxicologie revisitée par la modélisation de la dynamique énergétique. Habilitation à diriger des recherches, Université Claude Bernard - Lyon 1.

- Péry, A. R. R., Bedaux, J. J. M., Zonneveld, C., & Kooijman, S. A. L. M. (2001). Analysis of bioassays with time-varying concentrations. *Water Research*, 35(16) :3825–3832.
- Péry, A. R. R., Ducrot, V., Mons, R., & Garric, J. (2003a). Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 65(3) :281–292.
- Péry, A. R. R., Ducrot, V., Mons, R., Miège, C., Gahou, J., Gorini, D., & Garric, J. (2003b). Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model. *Water Research*, 37(11) :2691–2699.
- Péry, A. R. R., Flammarion, P., Vollat, B., Bedaux, J. J. M., Kooijman, S. A. L. M., & Garric, J. (2002a). Using a biology-based model (DEBtox) to analyze bioassays in ecotoxicology : Opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(2) :459–465.
- Péry, A. R. R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., & Garric, J. (2002b). A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11) :2507–2513.
- Pujol, G., Iooss, B., & Janon, A. (2012). *sensitivity : Sensitivity Analysis*. R package version 1.6-1.
- Pulak, R. (2006). Techniques for Analysis, Sorting, and Dispensing of *C. elegans* on the COPAS™ Flow-Sorting System. In Strange, K., editor, *C. elegans*, volume 351 of *Methods in Molecular Biology*, pages 275–286. Humana Press.
- R Core Team (2012). *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- R Core Team (2013). *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramade, F. (2010). Ecotoxicologie. [Online] <http://www.universalis.fr/encyclopedie/ecotoxicologie/>.
- Rankin, C. H., Beck, C. D. O., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans* : A new model system for the study of learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 37(1) :89–92.
- Rasband, W. (2012). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. [Online] <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Reed, D. H. & Frankham, R. (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17(1) :230–237.
- Reed, D. H., Lowe, E. H., Briscoe, D. A., & Frankham, R. (2003). Fitness and adaptation in a novel environment : effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution*, 57(8) :1822–1828.

## BIBLIOGRAPHIE

- Reichert, P. & Omlin, M. (1997). On the usefulness of overparameterized ecological models. *Ecological Modelling*, 95(2–3) :289–299.
- Reznick, D. N. & Ghalambor, C. K. (2005). Selection in Nature : Experimental Manipulations of Natural Populations. *Integrative and Comparative Biology*, 45(3) :456–462.
- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., & Narbonne, J.-F. (1996). Uranium in the environment : occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 146 :53–89.
- Ritz, C. (2010). Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1) :220–229.
- Ritz, C. & Streibig, J. C. (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software*, 12 :1–22.
- Rivot, E. (2003). *Investigations Bayésienne de la dynamique des populations de saumon atlantique (Salmo salar L.) : des observations de terrain à la construction du modèle statistique pour apprendre et gérer*. Ph.D. Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Roesijadi, G. (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 22(2) :81–113.
- Roff, D. A. (2007). Contributions of genomics to life-history theory. *Nature Reviews. Genetics*, 8(2) :116–125.
- Räsänen, K. & Kruuk, L. E. B. (2007). Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology*, 21(3) :408–421.
- Rundle, H. D. & Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3) :336–352.
- Salice, C. J., Anderson, T. A., & Roesijadi, G. (2010). Adaptive responses and latent costs of multigeneration cadmium exposure in parasite resistant and susceptible strains of a freshwater snail. *Ecotoxicology*, 19 :1466–1475.
- Salminen, R., editor (2005). *Geochemical Atlas of Europe. Part 1 : Background Information, Methodology and Maps*, page 526. Espoo, Geological Survey of Finland.
- Saltelli, A. (2002). Making best use of model evaluations to compute sensitivity indices. *Computer Physics Communications*, 145(2) :280–297.
- Saltelli, A., Chan, K., & Scott, E. M. (2008). *Sensitivity Analysis*. Number ISBN : 978-0-470-74382-9. John Wiley & Sons, Ltd, 2nd edition.
- Saltelli, A., Tarantola, S., & Chan, K. P.-S. (1999). A Quantitative Model-Independent Method for Global Sensitivity Analysis of Model Output. *Technometrics*, 41(1) :39–56.
- Scheiner, S. (1993). Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annual review of ecology and systematics*, 24 :35–68.

- Schilling, T. F. (2002). The morphology of larval and adult zebrafish. In Nüsslein-Volhard, C. & Dahm, R., editors, *Zebrafish : a practical guide*, pages 59–83. Oxford University Press, New-York.
- Schulte, R. D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N. K., & Schulenburg, H. (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16) :7359–7364.
- Shen, L., Xiao, J., Ye, H., & Wang, D. (2009). Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1) :125–132.
- Sheppard, S. C., Sheppard, M. I., Gallerand, M.-O., & Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79(1) :55–83.
- Shirley, M. D. F. & Sibly, R. M. (1999). Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53(3) :826–836.
- Shugart, L. R., editor (2011). *Special Issue on Evolutionary Process in Ecotoxicology*, volume [Special Issue]20(3). Ecotoxicology.
- Shugart, L. R., editor (2013). *Transgenerational and Evolutionary Responses in Environmental Species*, volume [Special Issue]22(5). Ecotoxicology.
- Smith, M. V., Boyd, W. A., Kissling, G. E., Rice, J. R., Snyder, D. W., Portier, C. J., & Freedman, J. H. (2009). A Discrete Time Model for the Analysis of Medium-Throughput *C. elegans* Growth Data. *PLoS ONE*, 4(9) :e7018.
- Sobol', I. M. (1993). Sensitivity analysis for non-linear mathematical models. *Mathematical Modelling and Computational Experiment*, 1 :407–414. Translated from Russian : I.M. Sobol' (1990) Sensitivity estimates for nonlinear mathematical models, *Matematicheskoe Modelirovanie*, 2(1) :112–118.
- Sochová, I., Hofman, J., & Holoubek, I. (2006). Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environment International*, 32(3) :374–383.
- Sochová, I., Hofman, J., & Holoubek, I. (2007). Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International*, 33(6) :798–804.
- Sotka, E. E. (2005). Local adaptation in host use among marine invertebrates. *Ecology Letters*, 8(4) :448–459.
- Spiegelhalter, D. J., Best, N., Carlin, B., & van der Linde, A. (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 64(4) :583–616. Annual Meeting of the Royal-Statistical-Society, LONDON, ENGLAND, MAY 13-22, 2002.
- Spiegelhalter, D. J., Thomas, A., Best, N., & Lunn, D. (2003). WinBUGS User Manual - Version 1.4, January 2003. Technical report, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.

## BIBLIOGRAPHIE

- Staniland, L. N. (1957). The swarming of *Rhabditid* eelworms in mushroom houses. *Plant Pathology*, 6(2) :61–62.
- Stewart, A. D. & Phillips, P. C. (2002). Selection and Maintenance of Androdioecy in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 160(3) :975–982.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. In WormBook, editor, *WormBook*, pages 1–11. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Stringham, E. G. & Candido, E. P. M. (1994). Transgenic hsp 16-LacZ strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(8) :1211–1220.
- Sulston, J. & Brenner, S. (1974). The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1) :95–104.
- Sulston, J. E. (1976). Post-Embryonic Development in the Ventral Cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 275(938) :287–297.
- Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56(1) :110–156.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100 :64–119.
- Sutphin, G. L. & Kaeberlein, M. (2009). Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span on Solid Media. *JoVE*, 27 :e1152.
- Swain, S., Keusekotten, K., Baumeister, R., & Sturzenbaum, S. (2004). *C. elegans* metallothioneins : New insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *Journal of Molecular Biology*, 341(4) :951–959.
- Swain, S., Wren, J., Stürzenbaum, S., Kille, P., Morgan, A., Jager, T., Jonker, M., Hankard, P., Svendsen, C., Owen, J., Hedley, B., Blaxter, M., & Spurgeon, D. (2010). Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Systems Biology*, 4(32).
- Tailliez, A., Pierrisnard, S., Camilleri, V., Keller, C., & Henner, P. (2013). Do rhizospheric processes linked to P nutrition participate in U absorption by *Lupinus albus* grown in hydroponics? *Journal of Environmental Radioactivity*, 124(0) :255–265.
- Tatara, C. P., Newman, M. C., McCloskey, J. T., & Williams, P. L. (1998). Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions : *Caenorhabditis elegans* LC50. *Aquatic Toxicology*, 42(4) :255–269.
- Teotónio, H., Carvalho, S., Manoel, D., Roque, M., & Chelo, I. (2012). Evolution of outcrossing in experimental populations of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 7(4) :1–13.

- Teotónio, H., Manoel, D., & Phillips, P. C. (2006). Genetic variation for outcrossing among *Caenorhabditis elegans* isolates. *Evolution*, 60(6) :1300–1305.
- Tew, J., Rivera, A., Hajela, R. K., & Atchison, W. D. (2009). Methylmercury-induced death in *C. elegans* and its' isolated embryonic neurons. In *48th Meeting of the Society of Toxicology*, page 72, Baltimore, Maryland (USA). Abstract 346.
- Tsalik, E. L. & Hobert, O. (2003). Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurobiology*, 56(2) :178–197.
- Tseng, Y.-Y., Yu, C.-W., & Liao, V. H.-C. (2007). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional ArsA. *FEBS Journal*, 274(10) :2566–2572.
- Tvermoes, B. & Freedman, J. H. (2008). *Caenorhabditis elegans* gene, *Numr-1*, assembles into nuclear stress granules after cadmium treatment. In *47th Meeting of the Society of Toxicology*, Seattle, Washington (USA). Abstract 1614.
- UNSCEAR, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. (2000). Report Vol 1. Sources and effects of ionizing radiation. Technical report, United Nations, New-York.
- Uralbekov, B. M., Smodis, B., & Burkitbayev, M. (2011). Uranium in natural waters sampled within former uranium mining sites in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289(3) :805–810.
- van der Meer, J. (2006a). An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research*, 56(2) :85–102.
- van der Meer, J. (2006b). Metabolic theories in ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(3) :136–140.
- Vindimian, E. (2000). Les modèles mécanistiques d'effet toxique en écotoxicologie. In *Modélisation en écotoxicologie*, number ISBN 2-912154-06-5, pages 123–132. Association ECRIN.
- Wade, P. R. (2000). Bayesian Methods in Conservation Biology. *Conservation Biology*, 14(5) :1308–1316.
- Wang, S., Tang, M., Pei, B., Xiao, X., Wang, J., Hang, H., & Wu, L. (2008). Cadmium-Induced Germline Apoptosis in *Caenorhabditis elegans* : The Roles of HUS1, p53, and MAPK Signaling Pathways. *Toxicological Sciences*, 102(2) :345–351.
- Ward, S. & Carrel, J. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 73(2) :304–321.
- Ward, T. J. & Robinson, W. E. (2005). Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9) :2341–2349.
- Waxman, D. & Gavrillets, S. (2005). 20 Questions on Adaptive Dynamics. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5) :1139–1154.

## BIBLIOGRAPHIE

- West, G. B., Brown, J. H., & Enquist, B. J. (2001). A general model for ontogenetic growth. *Nature*, 413(6856) :628–631.
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.
- WHO, World Health Organization. (2001). Depleted Uranium : Sources, Exposure and Health Effects. Technical Report WHO/SDE/PHE/01.1, World Health Organization, Geneva.
- Willi, Y. & Hoffmann, A. A. (2009). Demographic factors and genetic variation influence population persistence under environmental change. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(1) :124–133.
- Williams, G. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Williams, P. L., Anderson, G. L., Johnstone, J. L., Nunn, A. D., Tweedle, M. F., & Wedeking, P. (2000). *Caenorhabditis elegans* as an alternative animal species. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 61(8) :641–647. PMID : 11132694.
- Wren, J. F., Kille, P., Spurgeon, D. J., Swain, S., Sturzenbaum, S. R., & Jager, T. (2011). Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicology*, 20(2) :397–408.
- Ye, H., Ye, B., & Wang, D. (2008). Trace administration of vitamin E can retrieve and prevent UV-irradiation- and metal exposure-induced memory deficits in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1) :10–18.
- Yeates, G. W. (1979). Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology*, 11(3) :213–229.
- Yeates, G. W. (1998). Feeding in free-living soil nematodes : A functional approach. In Perry, R. N. & Wright, D. J., editors, *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes.*, pages 245–269. CAB INTERNATIONAL, New York, NY, USA.
- Yeates, G. W. (1999). Effects of plants on nematode community structure. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1) :127–149. PMID : 11701819.
- Yeates, G. W. (2001). *Nematodes in Ecological Webs*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Yeates, G. W. & Bongers, T. (1999). Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1–3) :113–135.
- Zeman, F. A. (2008). *Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie Daphnia magna : Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange*. Ph.D. Thesis, Université Montpellier II.
- Zeman, F. A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., & Aliaume, C. (2008). Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 86(3) :370–378.



Zimmer, E., Jager, T., Ducrot, V., Lagadic, L., & Kooijman, S. (2012). Juvenile food limitation in standardized tests : a warning to ecotoxicologists. *Ecotoxicology*, 21 :2195–2204.

Zimmer, E. I. (2013). *The pond snail under stress : interactive effects of food limitation, toxicants and copulation explained by Dynamic Energy Budget theory*. Ph.D. Thesis, VU University Amsterdam.

# Annexes



---

## Exemples de code JAGS

---

### A.1 Exemple de code JAGS : mode d'action assimilation

```

1 ### JAGS DEB Nematode      ###
2 ### Mode action Assimilation  ###
3 ###                        ###
4 ### Benoit Goussen        ###
5 ###                        ###
6
7 #=====
8 # 1. Variables declaration
9 #=====
10 var
11 muL[Nmax, M] , muR[Nmax, M] , L[Nmax, M] , R[Nmax, M]
12
13 #=====
14 # 2. Hour data transformation
15 #=====
16 data {Pmax <- round( Hmax * 1/pdt) }
17
18 #=====
19 # 3. Model
20 #=====
21 model {
22   ## Concentration calcul loop
23   for (i in 1:M){
24
25     ## Initialisation
26     l[1, i] <- 10
27     r[1, i] <- 0
28     cq[1, i] <- 0

```

```

29
30 stress[1,i] <- 1 - (( 1-(1+(lf^3/l[1,i]^3))^-1 ) * alpha) # Nematode specific food
      function
31 Effet[1,i] <- max(1 - ( b * max( (cq[1,i] - NEC) , 0 ) ),0) # Stress function
32 dcq[1,i] <- ( ( (Co[i]*ke*stress[1,i]*f)/l[1,i] ) - ( cq[1,i]*((ke*stress[1,i]*f)/l[1,i]
      ])+(3*(dl[1,i]/pdt)/l[1,i])) ) * pdt # Scaled tissue concentration
33
34 tmp.dl[1,i] <- rB * ( (stress[1,i]*f+g)/(g+(stress[1,i]*f*Effet[1,i]))) * ((stress[1,i]*
      f*Effet[1,i] - l[1,i]) * pdt
35 dl[1,i] <- max(tmp.dl[1,i],0)
36 dr[1,i] <- 0
37
38 ## Calculations for each time-step
39 for ( h in 2:(Pmax[i]+1) ){
40
41     ## Specific nematode food function
42     stress[h,i] <- min( (1 - (( 1-(1+(lf^3/(l[h,i]^3))^-1 ) * alpha)), 1)
43
44     ## Toxicant effects
45     dcq[h,i] <- ( ( (Co[i]*ke*stress[h,i]*f)/l[h,i] ) - ( cq[h,i]*((ke*stress[h,i]*f)/l[h
      ,i] )+(3*(dl[h,i]/pdt)/l[h,i])) ) ) * pdt # Scaled tissue concentration
46     cq[h,i] <- cq[h-1,i] + dcq[h-1,i]
47     Effet[h,i] <- max(1 - ( b * max( (cq[h,i] - NEC) , 0 ) ),0) # Stress function
48
49     ## Growth model
50     l[h,i] <- l[h-1,i] + dl[h-1,i]
51     # Growth
52     tmp.dl[h,i] <- rB * (( stress[h,i]*f +g)/(g+(stress[h,i]*f*Effet[h,i]))) * ((stress[h
      ,i]*f*Effet[h,i] - l[h,i])*pdt
53     dl[h,i] <- max(tmp.dl[h,i] , 0)
54
55
56
57     ## Reproduction model
58     r[h,i] <- r[h-1,i] + dr[h-1,i]
59     # Reproduction
60     tmp.dr[h,i] <- ( ( Rm /(1-lp^3) ) * ( stress[h,i]*f*Effet[h,i]*l[h,i]^2 * ( (g+l[h,i])
      / (g+(stress[h,i]*f*Effet[h,i])) ) - lp^3 ) ) * ((Rmax-r[h,i])/Rmax) * pdt
61     tmp2.dr[h,i] <- max(tmp.dr[h,i],0)
62     dr[h,i] <- ifelse ( l[h,i] > lp , tmp2.dr[h,i] , 0)
63 }
64
65 ## Likelihood calculation for the j times of concentration i
66 for (j in 1:N[i]){ # N[i] = nbr temps exp i
67     muL[j,i] <- ( (l[round(H[j,i] * 1/pdt+1),i]) * Linf) # model en taille standard et
      data taille totale

```

```

68     muR[j,i] <- r[round(H[j,i]* 1/pdt+1),i]
69
70     L[j,i] ~ dnorm(muL[j,i], tau.L) # Observed length for control
71     R[j,i] ~ dnorm(muR[j,i], tau.R) # Observed repro for control
72   }
73 }
74
75 ## Prior specifications
76
77 ke      ~ dunif(1e-6,1)           # Elimination rate
78 b       ~ dunif(0,5)             # Effect slope
79 NEC     ~ dunif(0,2)             # Non effect concentration
80
81 alpha   ~ dunif(0,1)             # Linked to nematode capacity to eat
82
83 l0      ~ dnorm(0.1831,745.70)T(1e-6,) # Scaled length at birth (L0/Linf)
84 d.lf    ~ dnorm(0.1052,225.90)T(1e-6,) # Delta scaled length at half maximal
      assimilation
85 lf      <- d.lf + 10             # Scaled length at half maximal assimilation
      (Lf/Linf)
86 d.lp    ~ dnorm(0.4792,108.87)T(1e-6,) # Delta scaled length at puberty
87 lp      <- d.lp + 10             # Scaled puberty length (Lp/Linf)
88 Linf    ~ dnorm(1540,1.054e-5)T(1e-6,) # Ultimate length  $\mu$ (m)
89 f       ~ dunif(0,1)             # Functional response
90 rB      ~ dnorm(0.0389,1.652e+4)T(1e-6,) # von Bertalanffy growth rate
91 g       ~ dunif(0,20)            # Energy investment ratio
92 Rm      ~ dnorm(12.67,0.156)T(1e-6,) # Egg laying rate
93 Rmax    ~ dnorm(265,3.55e-4)T(1e-6,) # Maximal number of gamete
94 sigma.L ~ dunif(0.00001,200)     # Length standard error
95 tau.L   <- pow(sigma.L, -2)      # Length precision
96 sigma.R ~ dunif(0.00001,200)     # Reproduction standard error
97 tau.R   <- pow(sigma.R, -2)      # Reproduction precision
98 }
99
100 #=====
101 # 4. End
102 #=====

```

Code JAGS : Modèle DEBtox effet sur l'assimilation

## A.2 Exemple de code JAGS : mode d'action maintenance

```

1 #### JAGS DEB Nematode      ###
2 #### Mode action Maintenance ###
3 ####                        ###
4 #### Benoit Goussen         ###

```

```

5  ###                               ###
6
7  #=====
8  # 1. Variables declaration
9  #=====
10 var
11 muL[Nmax, M], muR[Nmax, M], L[Nmax, M], R[Nmax, M]
12
13 #=====
14 # 2. Hour data transformation
15 #=====
16 data {Pmax <- round( Hmax * 1/pdt ) }
17
18 #=====
19 # 3. Model
20 #=====
21 model {
22   ## Concentration calcul loop
23   for (i in 1:M){
24
25     ## Initialisation
26     l[1,i] <- 10
27     r[1,i] <- 0
28     cq[1,i] <- 0
29
30     stress[1,i] <- 1 - (( 1-(1+(lf^3/l[1,i]^3))^(-1) ) * alpha) # Nematode specific food
31     function
32     Effet[1,i] <- 1 + ( b * max( (cq[1,i] - NEC) , 0 ) ) # Stress function
33     dcq[1,i] <- ( ( (Co[i]*ke*stress[1,i]*f)/l[1,i] ) - ( cq[1,i]*(((ke*stress[1,i]*f)/l[1,i]
34     ])+(3*(dl[1,i]/pdt)/l[1,i])) ) ) * pdt # Scaled tissue concentration
35
36     tmp.dl[1,i] <- rB * ( stress[1,i]*f - l[1,i]*Effet[1,i] ) * pdt
37     dl[1,i] <- max(tmp.dl[1,i],0)
38     dr[1,i] <- 0
39
40     ## Calculations for each time-step
41     for ( h in 2:(Pmax[i]+1) ){
42
43       ## Specific nematode food function
44       stress[h,i] <- min( ( 1 - (( 1-(1+(lf^3/(l[h,i]^3))^(-1) ) * alpha)), 1)
45
46       ## Toxicant effects
47       dcq[h,i] <- ( ( (Co[i]*ke*stress[h,i]*f)/l[h,i] ) - ( cq[h,i]*(((ke*stress[h,i]*f)/l[h,i]
48       ,i)+(3*(dl[h,i]/pdt)/l[h,i])) ) ) * pdt # Scaled tissue concentration
49       cq[h,i] <- cq[h-1,i] + dcq[h-1,i]
50       Effet[h,i] <- 1 + ( b * max( (cq[h,i] - NEC) , 0 ) ) # Stress function

```

```

48
49  ## Growth model
50  l[h,i] <- l[h-1,i] + dl[h-1,i]
51  # Growth
52  tmp.dl[h,i] <- rB * ( stress[h,i]*f - l[h,i]*Effet[h,i]) * pdt
53  dl[h,i] <- max(tmp.dl[h,i] , 0)
54
55
56
57  ## Reproduction model
58  r[h,i] <- r[h-1,i] + dr[h-1,i]
59  # Reproduction
60  tmp.dr[h,i] <- ( Rm / (1-lp^3) ) * Effet[h,i] * ( stress[h,i]*f*l[h,i]^2 * ( g*Effet
61    [h,i]^(-1)+l[h,i]) / (g+stress[h,i]*f) ) - lp^3 * ((Rmax - r[h,i])/(Rmax)) * pdt
62  tmp2.dr[h,i] <- max(tmp.dr[h,i],0)
63  dr[h,i] <- ifelse ( l[h,i] > lp , tmp2.dr[h,i], 0)
64  }
65
66  ## Likelihood calculation for the j times of concentration i
67  for (j in 1:N[i]){ # N[i] = nbr temps exp i
68    muL[j,i] <- ( l[round(H[j,i]* 1/pdt+1),i]) * Linf) # model en taille standard et
69    data taille totale
70    muR[j,i] <- r[round(H[j,i]* 1/pdt+1),i]
71
72    L[j,i] ~ dnorm(muL[j,i], tau.L) # Observed length for control
73    R[j,i] ~ dnorm(muR[j,i], tau.R) # Observed repro for control
74  }
75
76  ## Prior specifications
77
78  ke ~ dunif(1e-6,1) # Elimination rate
79  b ~ dunif(0,5) # Effect slope
80  NEC ~ dunif(0,2) # Non effect concentration
81
82  alpha ~ dunif(0,1) # Linked to nematode capacity to eat
83
84  l0 ~ dnorm(0.1831,745.70)T(1e-6,) # Scaled length at birth (L0/Linf)
85  d.lf ~ dnorm(0.1052,225.90)T(1e-6,) # Delta scaled length at half maximal
86  assimilation
87  lf <- d.lf + 10 # Scaled length at half maximal assimilation
88  (Lf/Linf)
89  d.lp ~ dnorm(0.4792,108.87)T(1e-6,) # Delta scaled length at puberty
90  lp <- d.lp + 10 # Scaled puberty length (Lp/Linf)
91  Linf ~ dnorm(1540,1.054e-5)T(1e-6,) # Ultimate length μ(m)
92  f ~ dunif(0,1) # Functional response

```



```

90  rB      ~ dnorm(0.0389,1.652e+4)T(1e-6,)    # von Bertalanffy growth rate
91  g       ~ dunif(0,20)                      # Energy investment ratio
92  Rm      ~ dnorm(12.67,0.156)T(1e-6,)      # Egg laying rate
93  Rmax    ~ dnorm(265,3.55e-4)T(1e-6,)      # Maximal number of gamete
94  sigma.L ~ dunif(0.00001,200)              # Length standard error
95  tau.L   <- pow(sigma.L, -2)                # Length precision
96  sigma.R ~ dunif(0.00001,200)              # Reproduction standard error
97  tau.R   <- pow(sigma.R, -2)                # Reproduction precision
98  }
99
100 #=====
101 # 4. End
102 #=====

```

Code JAGS : Modèle DEBtox effet sur la maintenance

ANNEXE **B**

---

Matériel supplémentaire Article I

---

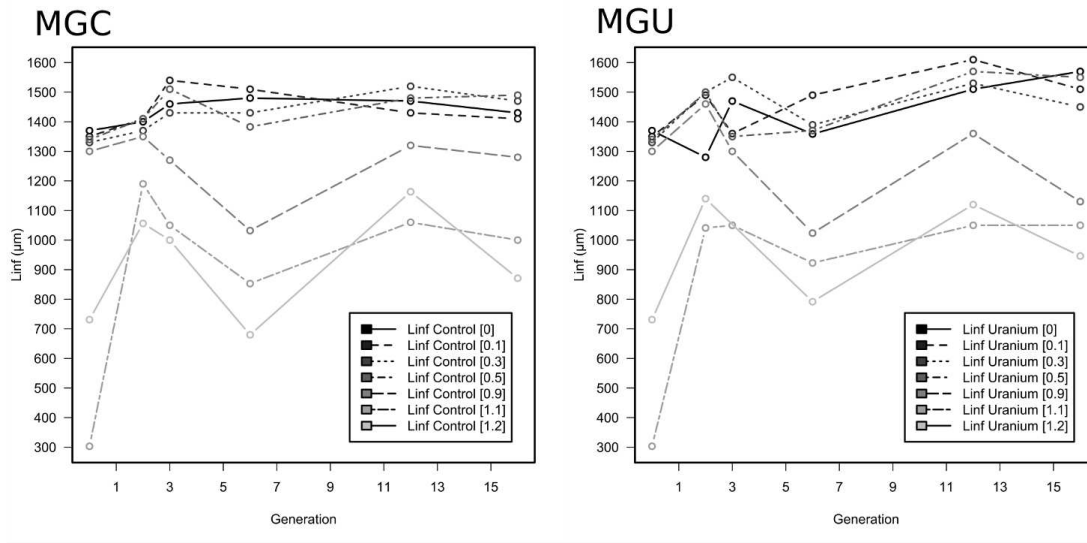


FIGURE B.1 – Maximal length ( $L_{inf}$ ) for hermaphrodite individuals ( $\mu\text{m}$ ) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U. Each point represents the  $L_{inf}$  value of the model (Eq. VIII.1) fitted using all replicate for each treatment

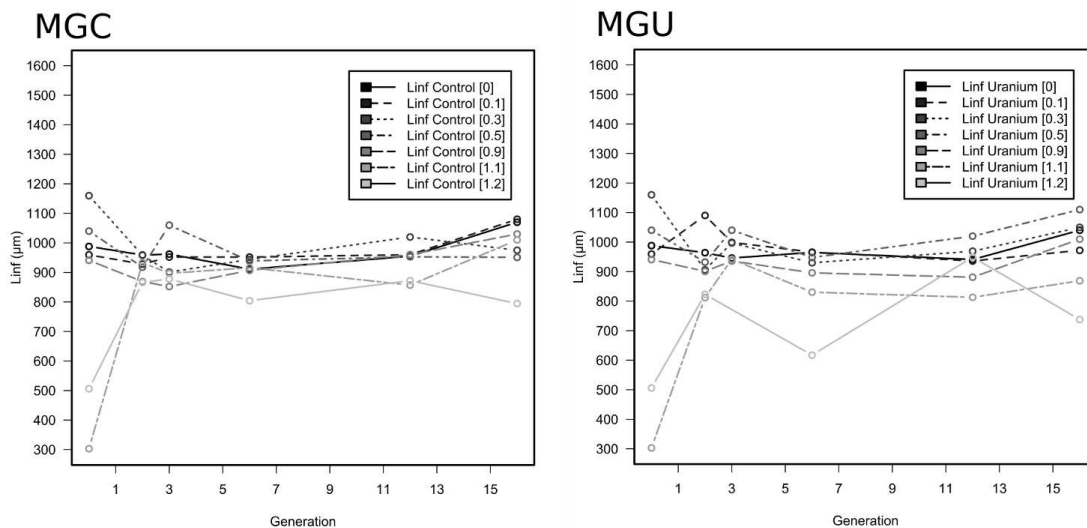


FIGURE B.2 – Maximal length ( $L_{inf}$ ) for male individuals ( $\mu\text{m}$ ) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U. Each point represents the  $L_{inf}$  value of the model (Eq. VIII.1) fitted using all replicate for each treatment

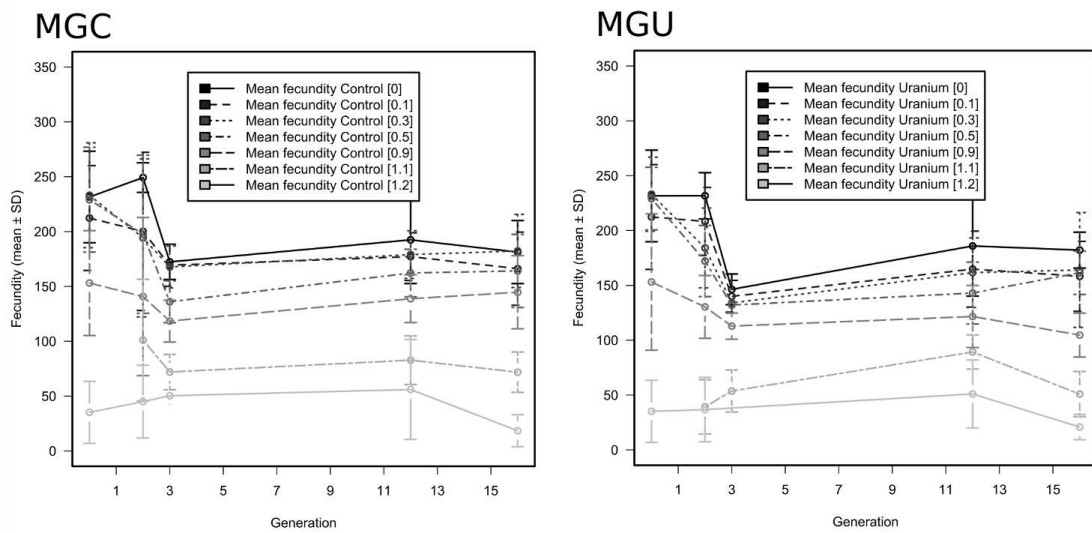


FIGURE B.3 – Mean fecundity ( $\pm$ Standard Deviation) as a function of the generation for MGC (Control population) and MGU (Uranium population) exposed to 0 mM U, 0.1 mM U, 0.3 mM U, 0.5 mM U, 0.9 mM U, 1.1 mM U, and 1.2 mM U.



ANNEXE **C**

---

Matériel supplémentaire Article II

---

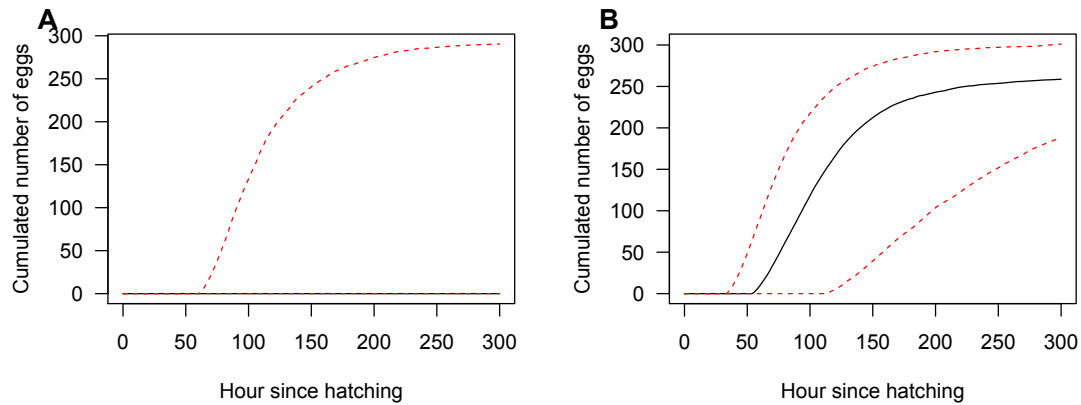


FIGURE C.1 – UUncertainty analysis for reproduction part of the DEBtox the *assimilation* model for nematode. Panel A represent the uncertainty analysis of the model proposed by Jager *et al.* (2005) and panel B represent the uncertainty analysis of the model we used (Eq. IX.1). The *solid line* represent the median of the model output. *Dashed lines* represent the 95% quantiles of the model output.

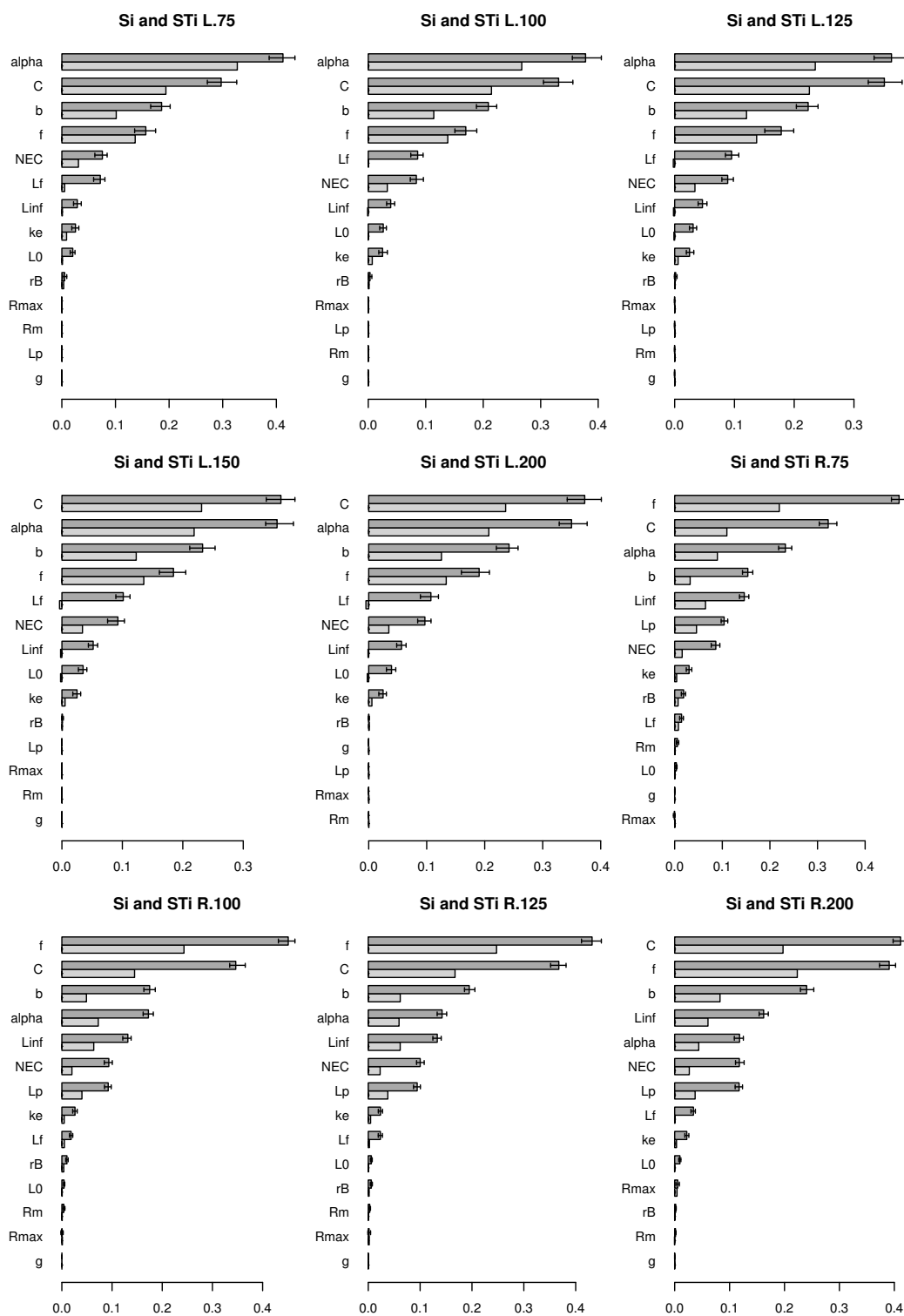


FIGURE C.2 – Sensitivity analysis for the *assimilation* model (Eq. IX.3). Sensitivity indices at the different times for the growth equation and reproduction equation (e.g. L.75 and R.75 represent respectively sensitivity indices at 75 hours for growth, and reproduction equations). First order indices ( $Si$ ) are presented in *light grey* and total order indices ( $STi$ ) in *dark grey*. Parameters were ordered according to the total order Sobol sensitivity indices.



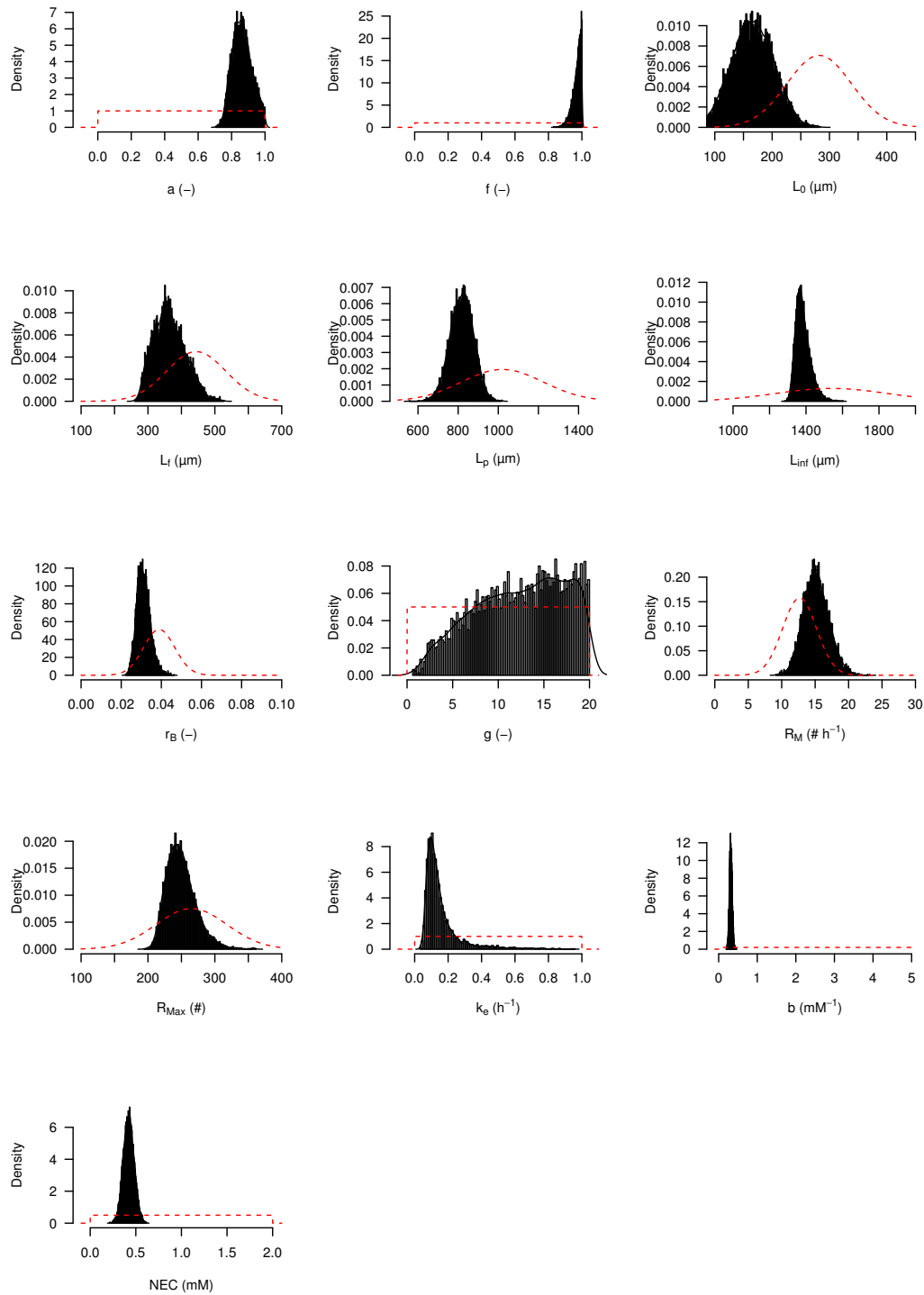


FIGURE C.3 – Prior and posterior distribution density for the *assimilation* model (Eq. IX.3. Prior distribution is presented with *dashed line* and posterior distribution is presented with *histograms*.

## Matériel supplémentaire Article III

## D.1 Parameters evolution relative to P0

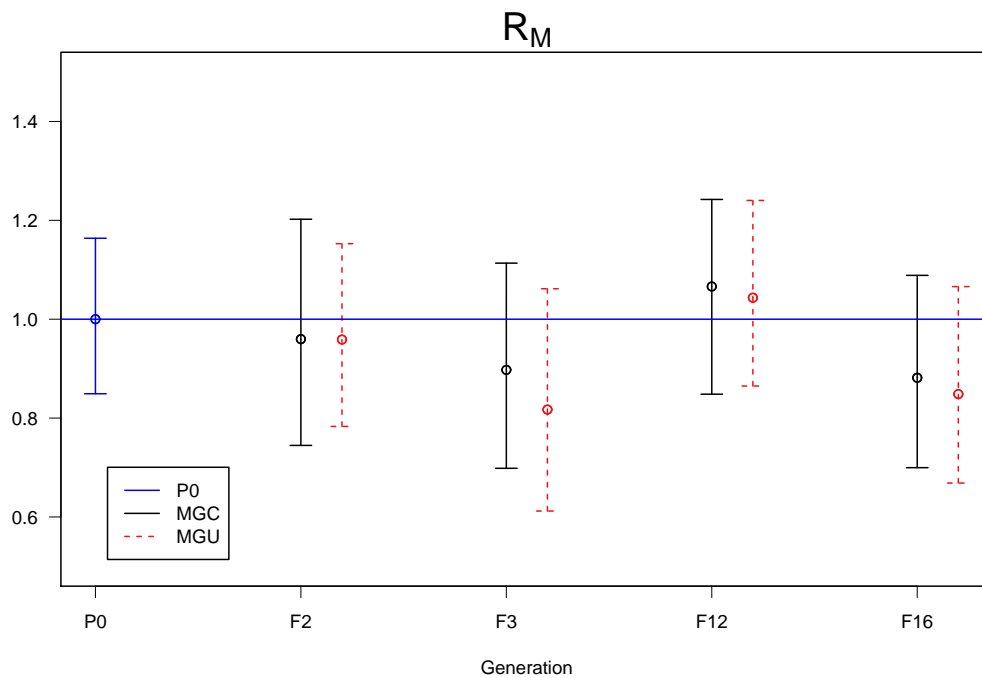


FIGURE D.1 – Evolution of the parameter  $R_M$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

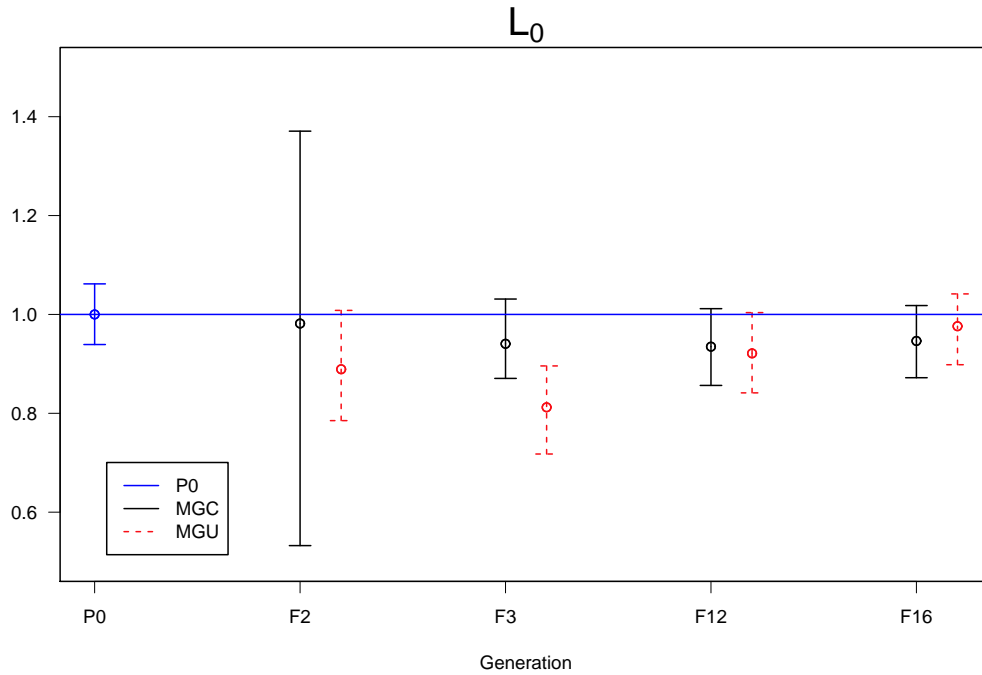


FIGURE D.2 – Evolution of the parameter  $L_0$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

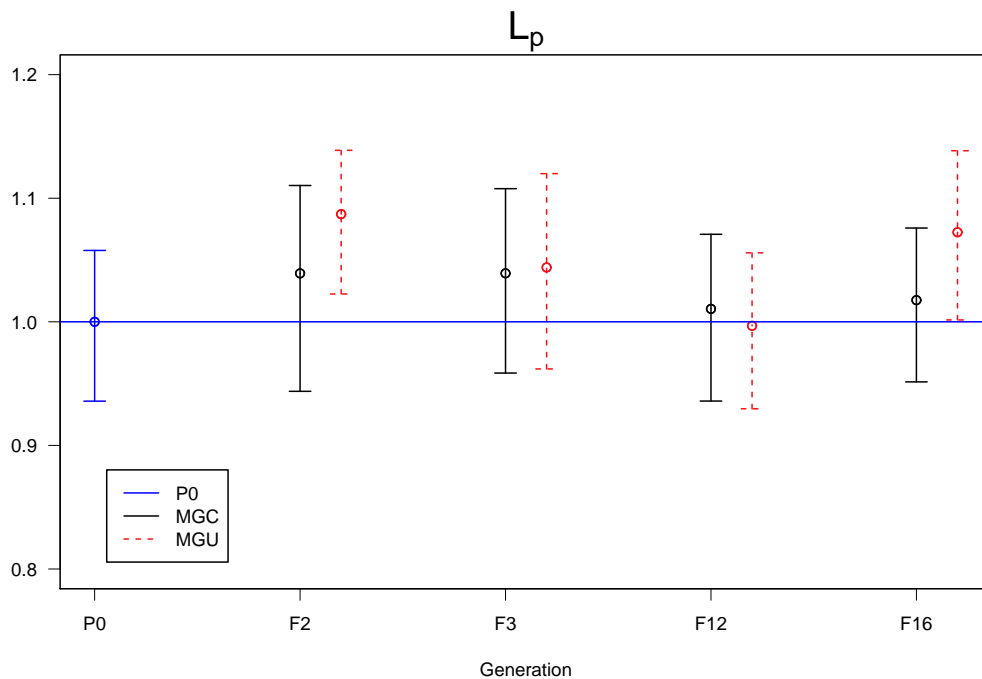


FIGURE D.3 – Evolution of the parameter  $L_p$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

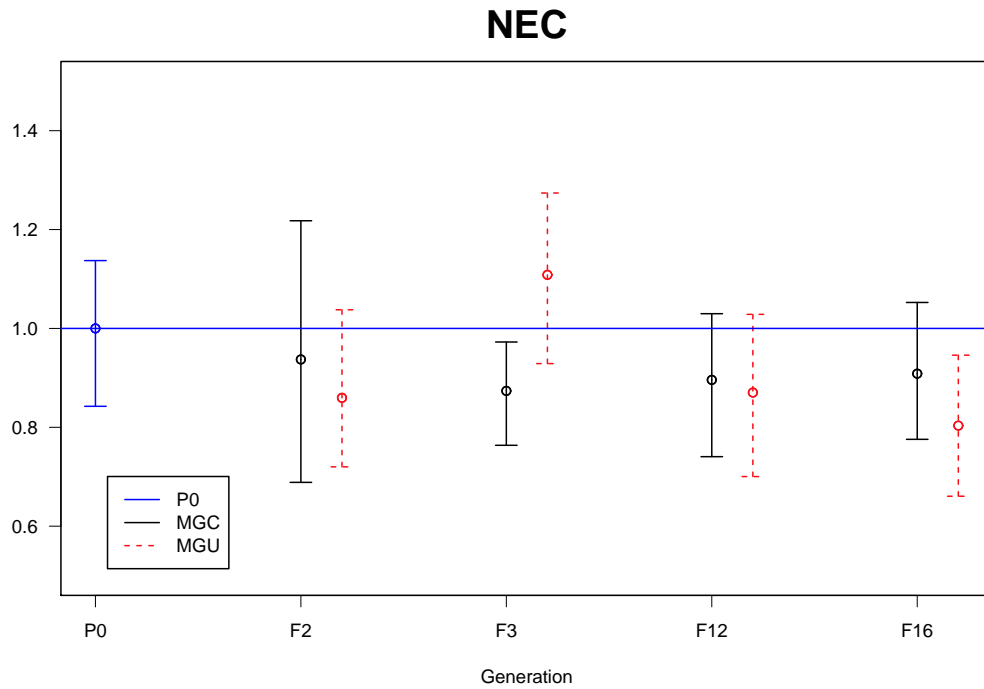


FIGURE D.4 – Evolution of the parameter  $NEC$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

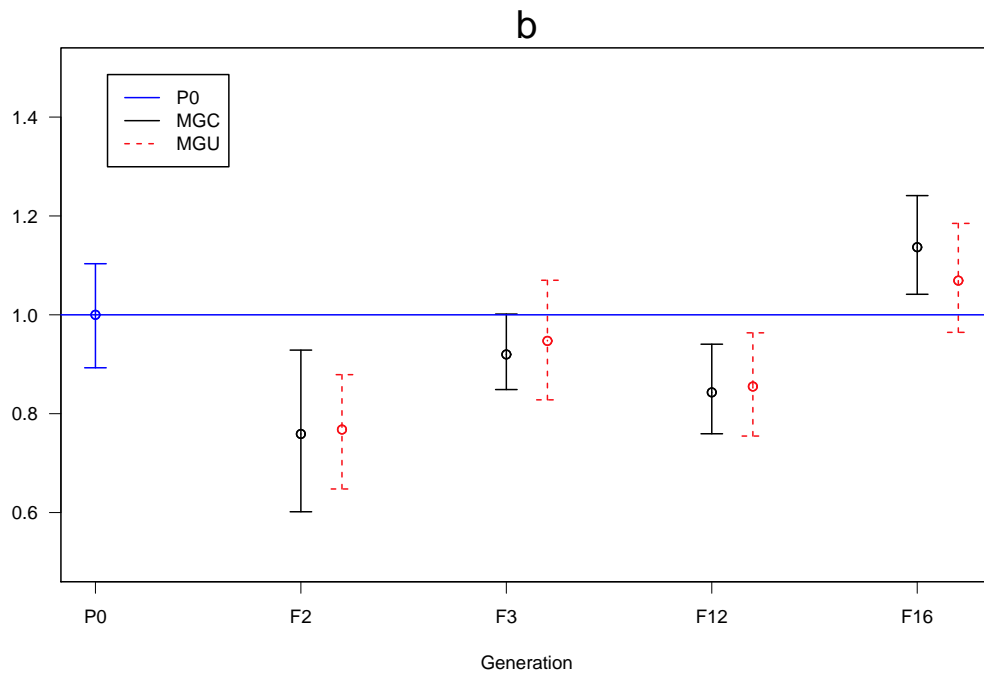


FIGURE D.5 – Evolution of the parameter  $b$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at P0. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of P0). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

## D.2 Parameters evolution relative to F3

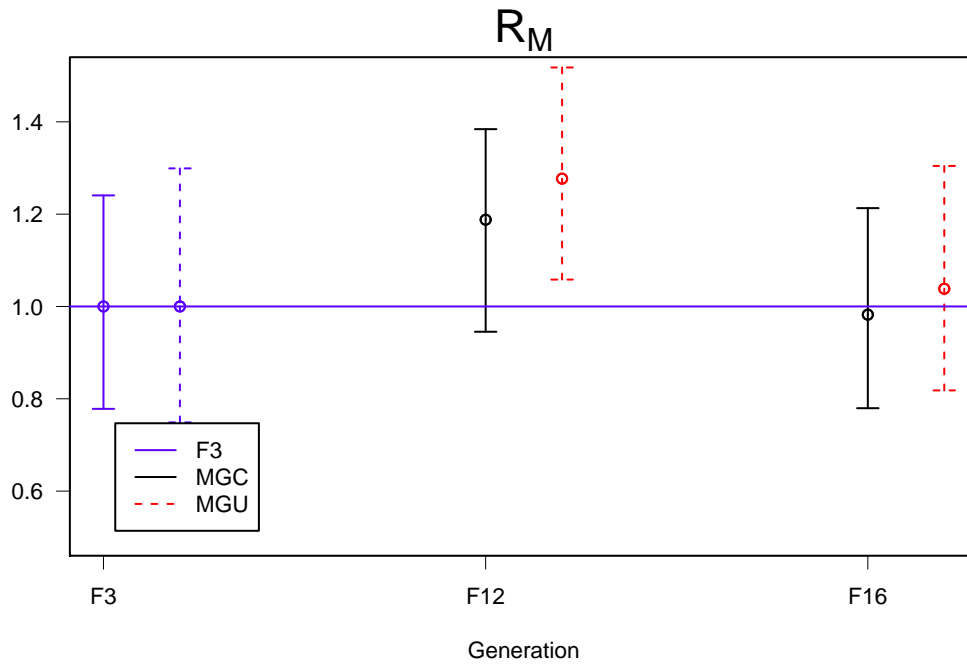


FIGURE D.6 – Evolution of the parameter  $R_M$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

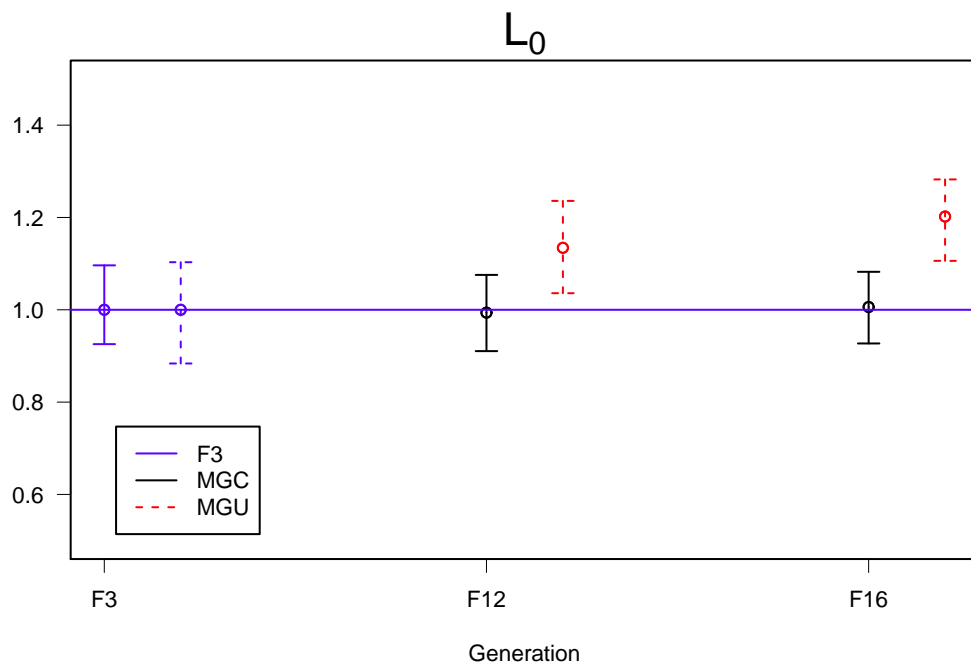


FIGURE D.7 – Evolution of the parameter  $L_0$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

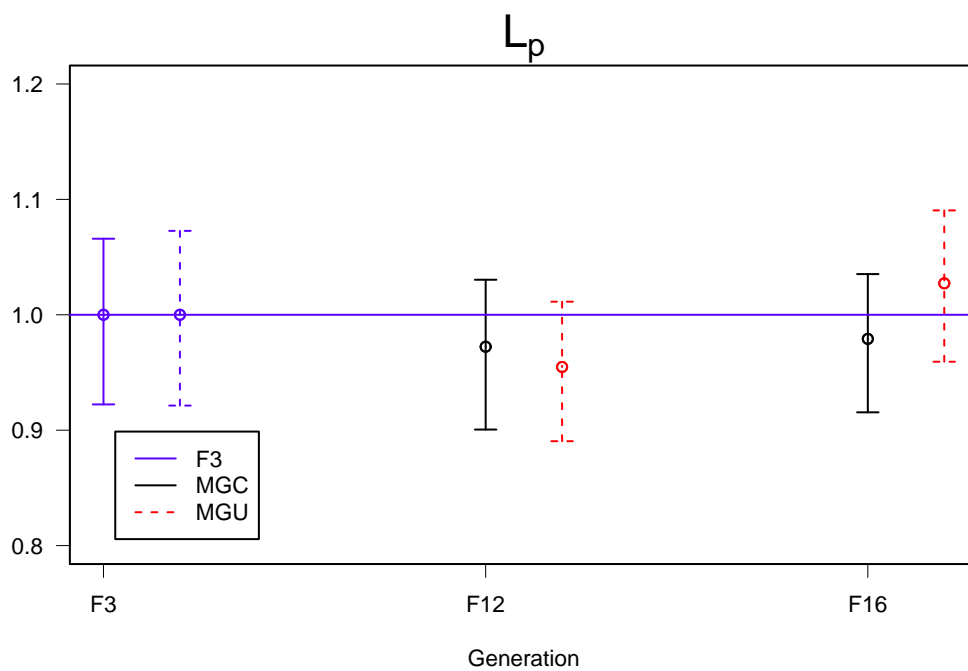


FIGURE D.8 – Evolution of the parameter  $L_p$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

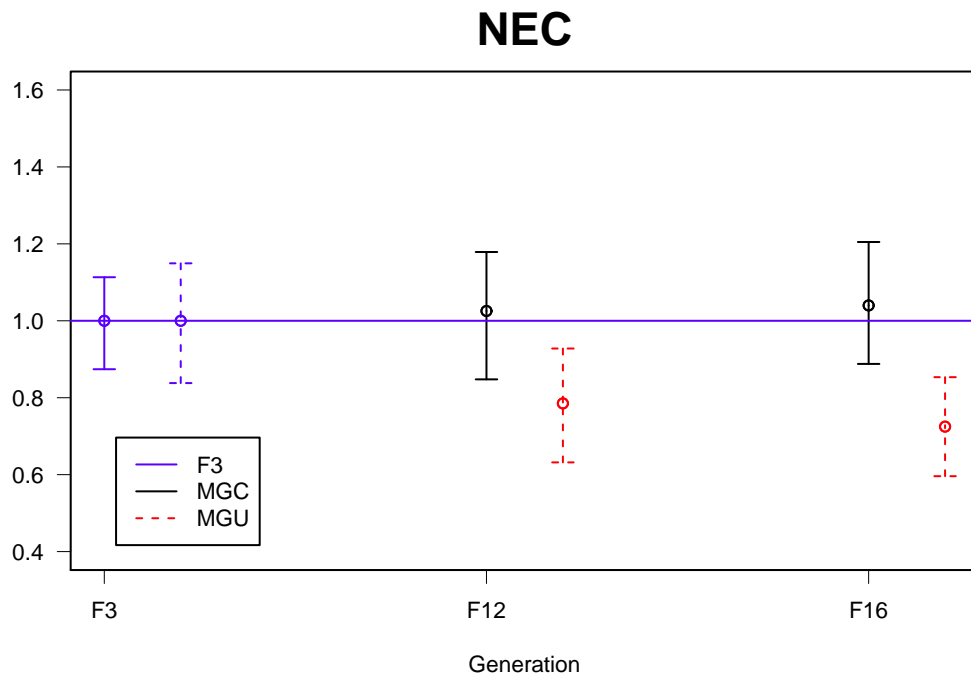


FIGURE D.9 – Evolution of the parameter  $NEC$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.



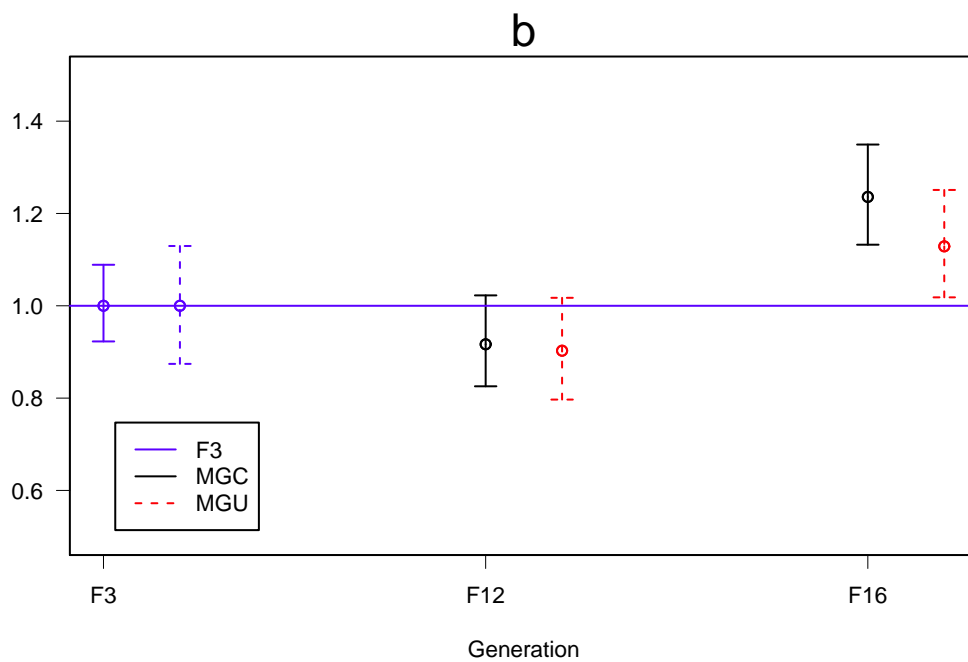


FIGURE D.10 – Evolution of the parameter  $b$  throughout the generations. Means of the parameters posterior distribution values for each generation have been scaled by the mean of the parameter posterior distribution value at F3 MGC and F3 MGU respectively for MGC and MGU populations. The horizontal line corresponds to 1 (*i.e.* the reference value of F3 MGC and F3 MGU). Confidence intervals represent the 95th percentiles of the posterior distribution.

### **D.3 Model fit quality for each generation**

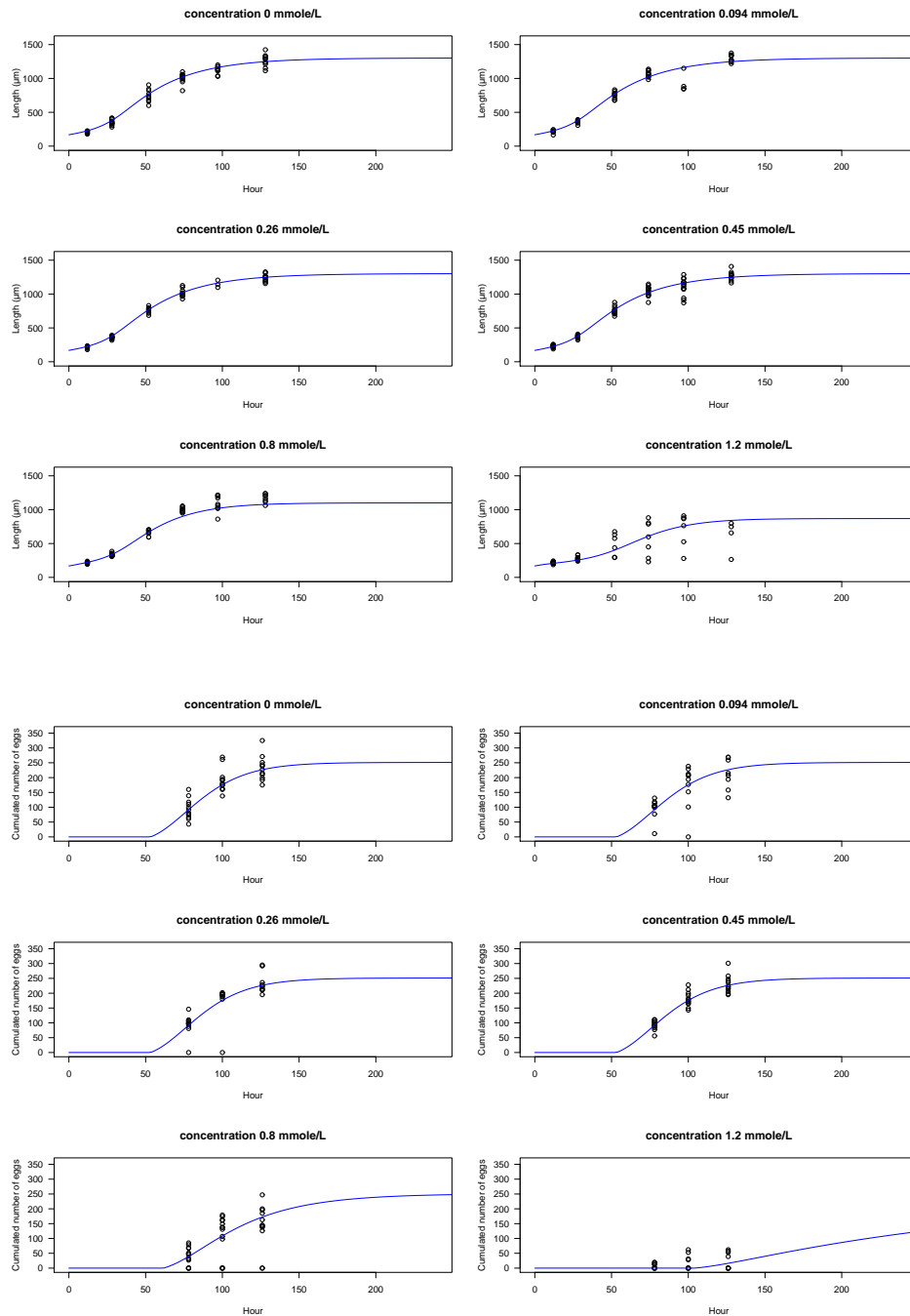


FIGURE D.11 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation P0 for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the parameter estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

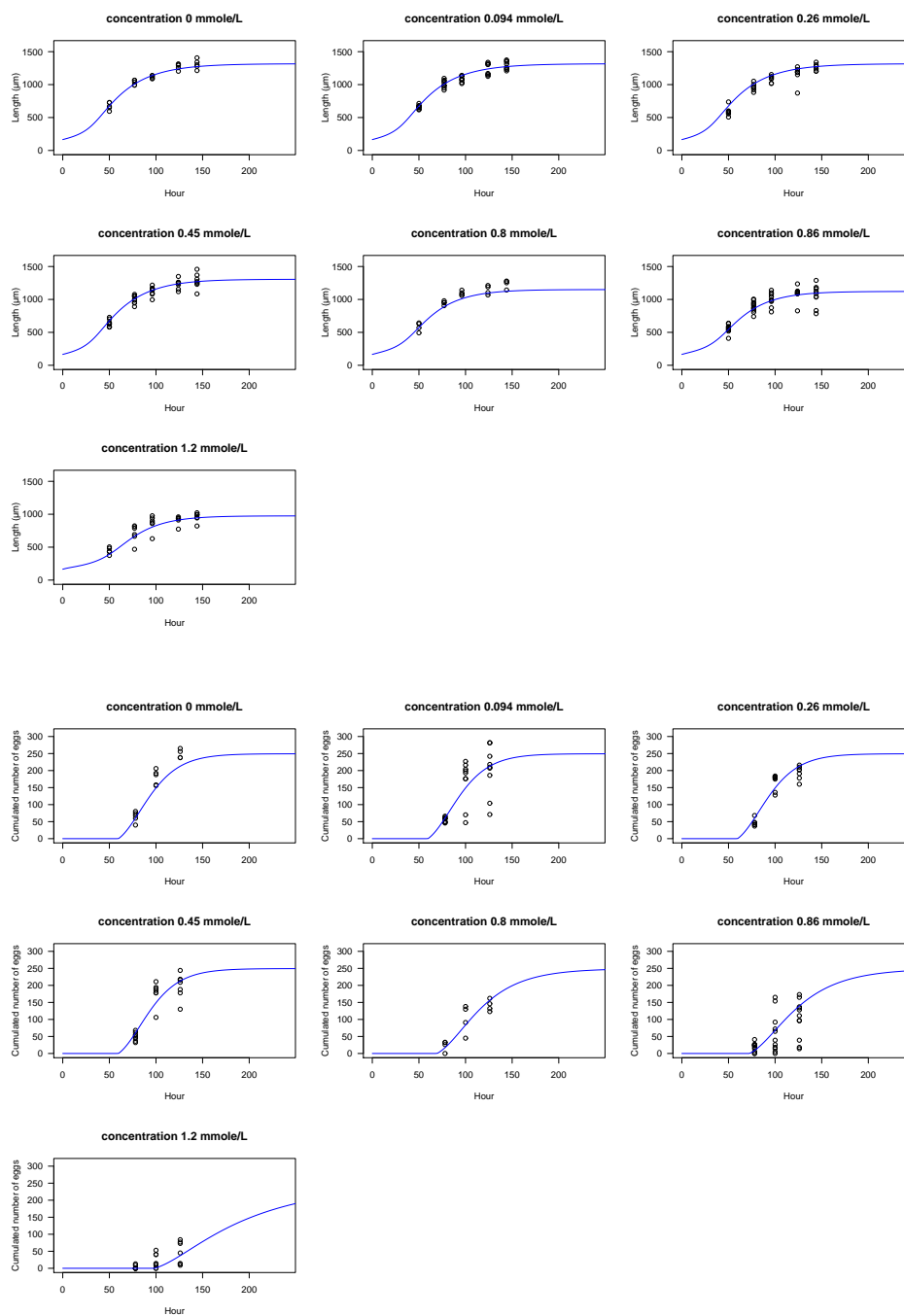


FIGURE D.12 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F2 MGC for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

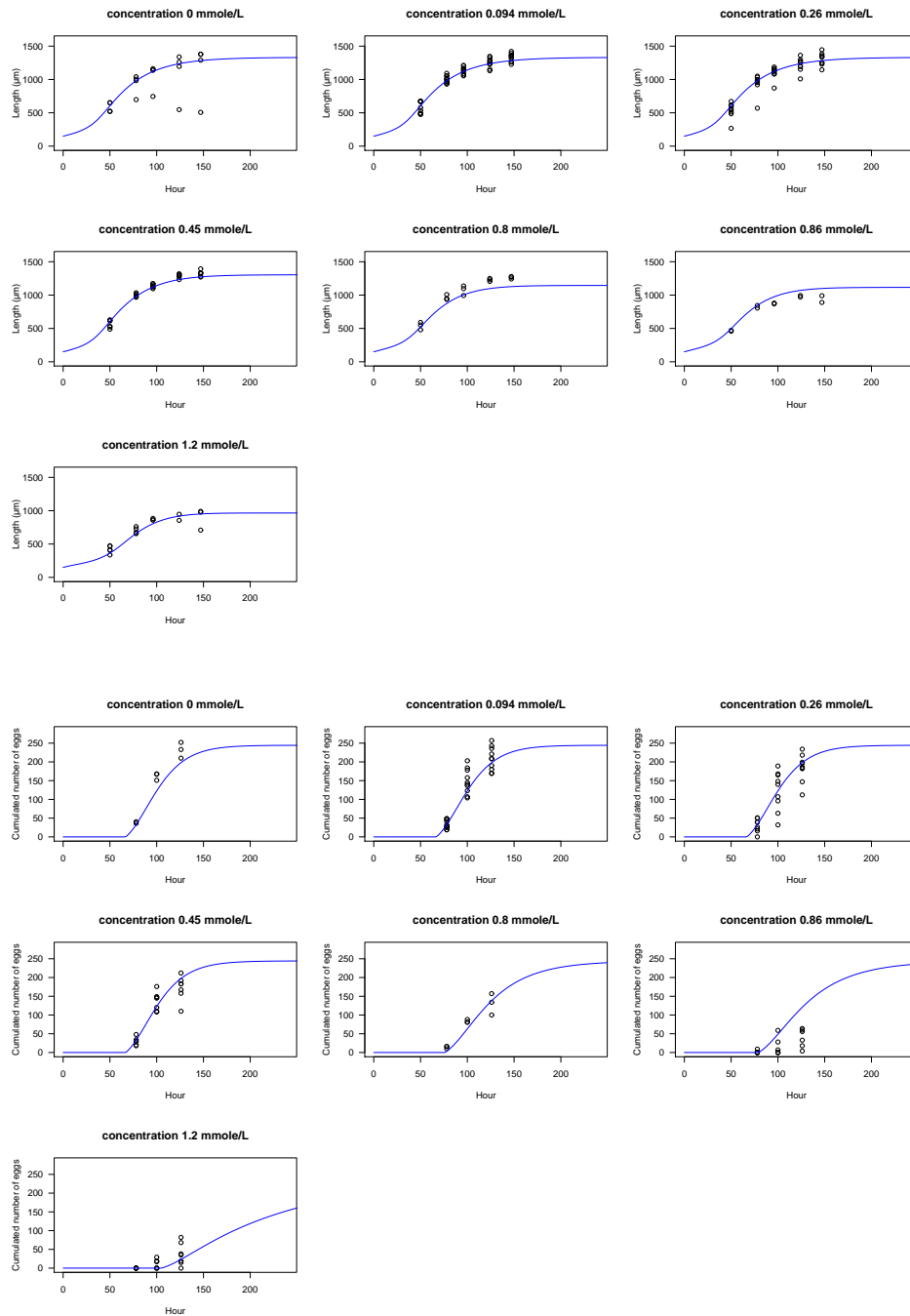


FIGURE D.13 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F2 MGU for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

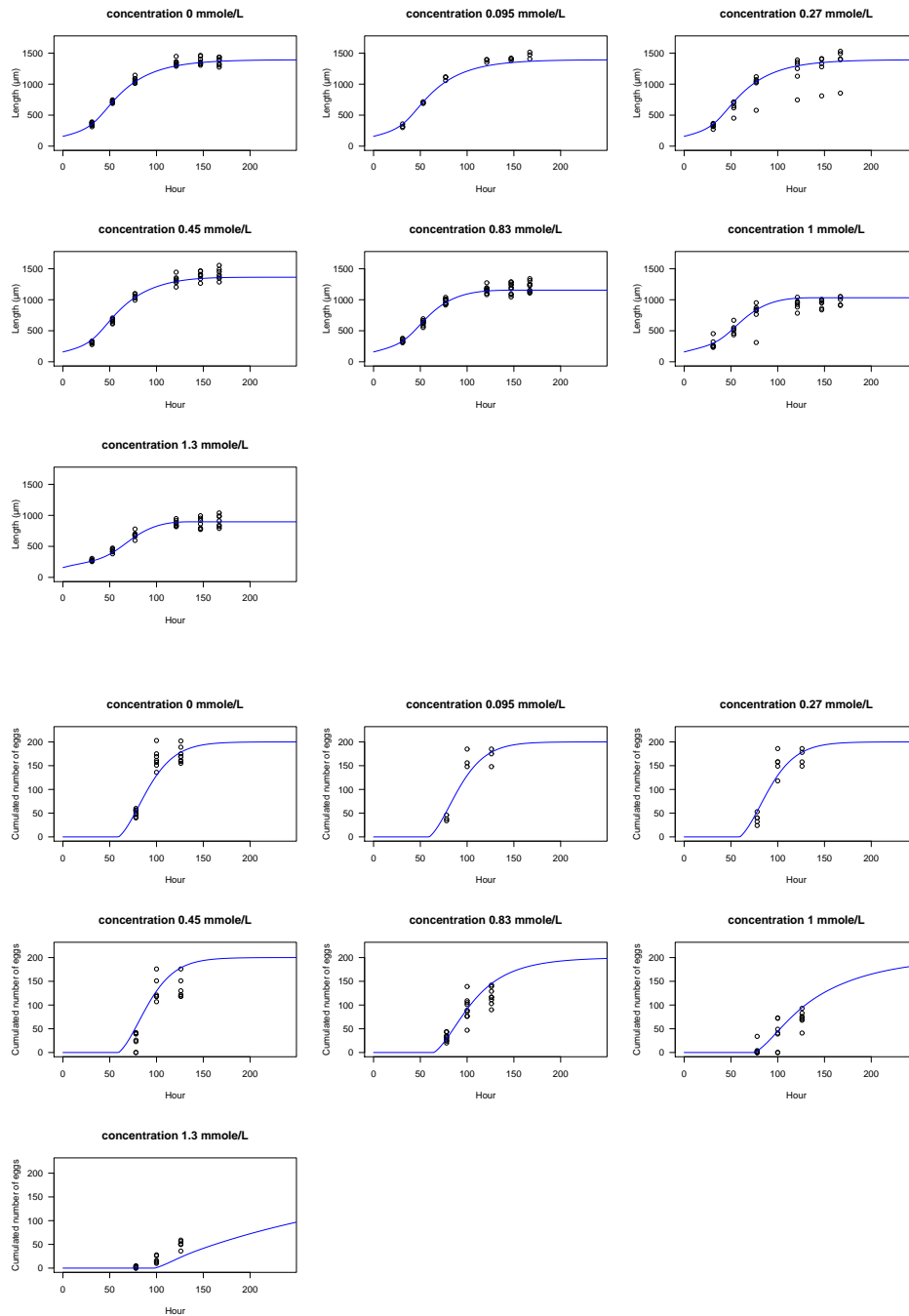


FIGURE D.14 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F3 MGC for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

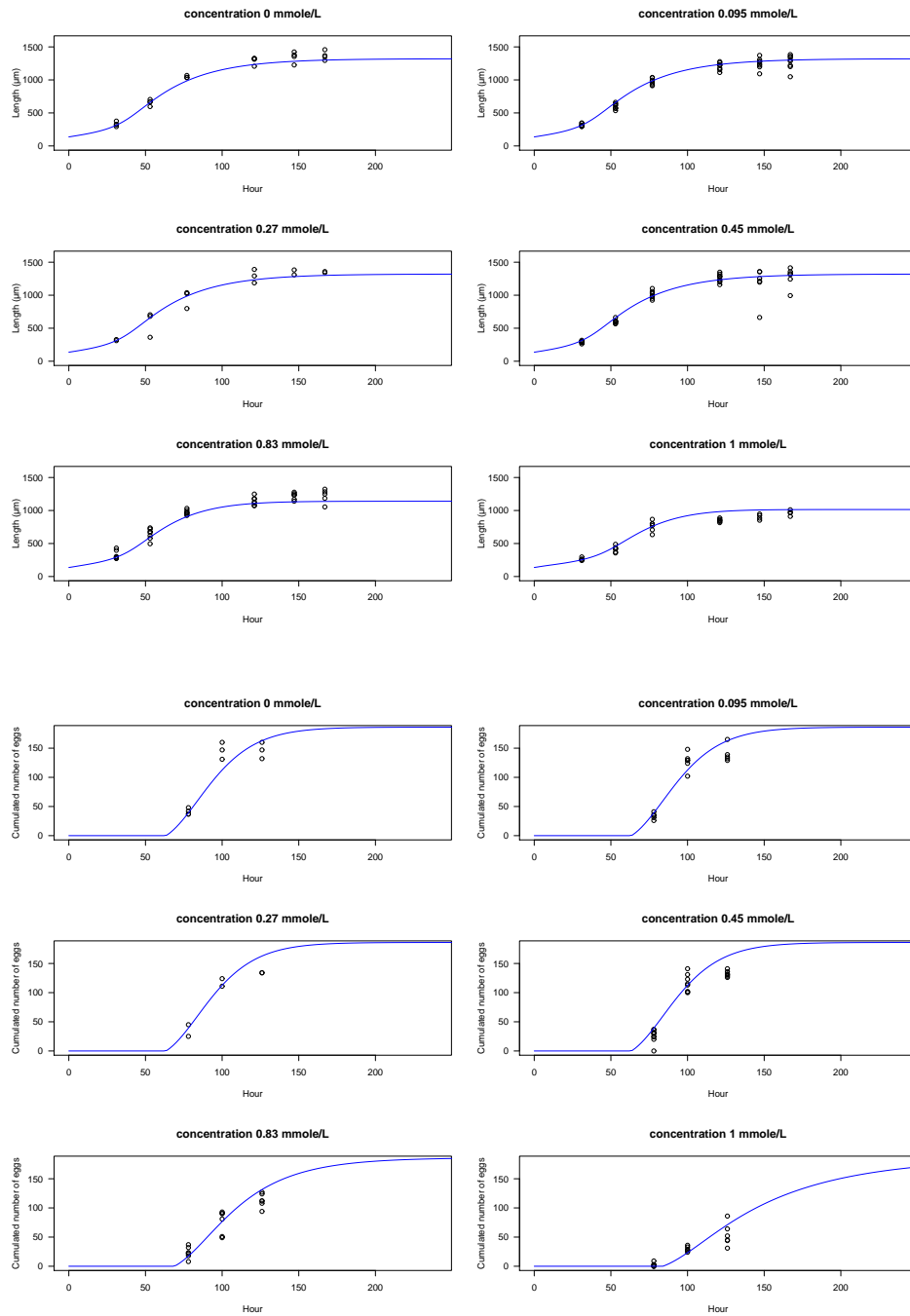


FIGURE D.15 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F3 MGU for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

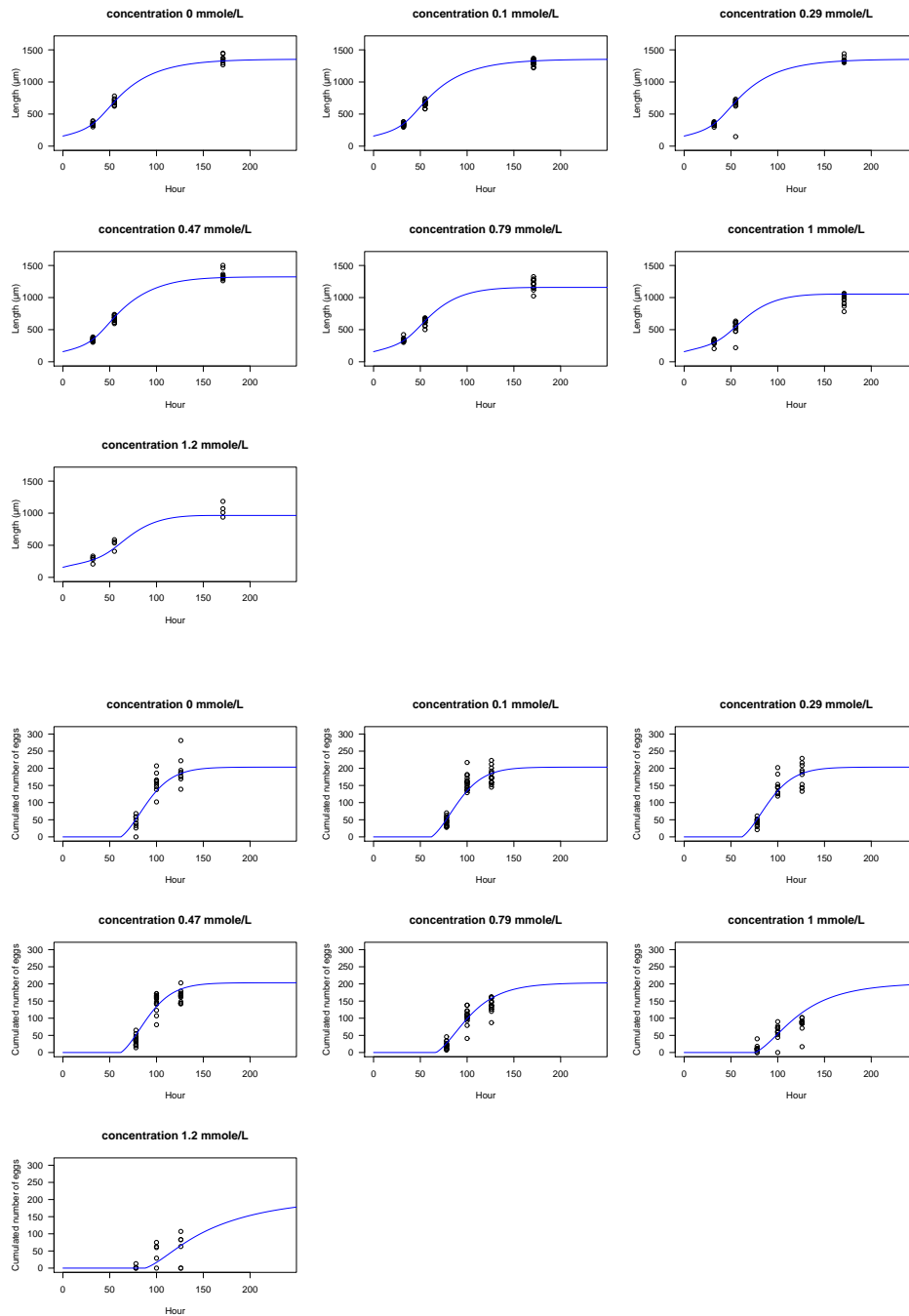


FIGURE D.16 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F12 MGC for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.



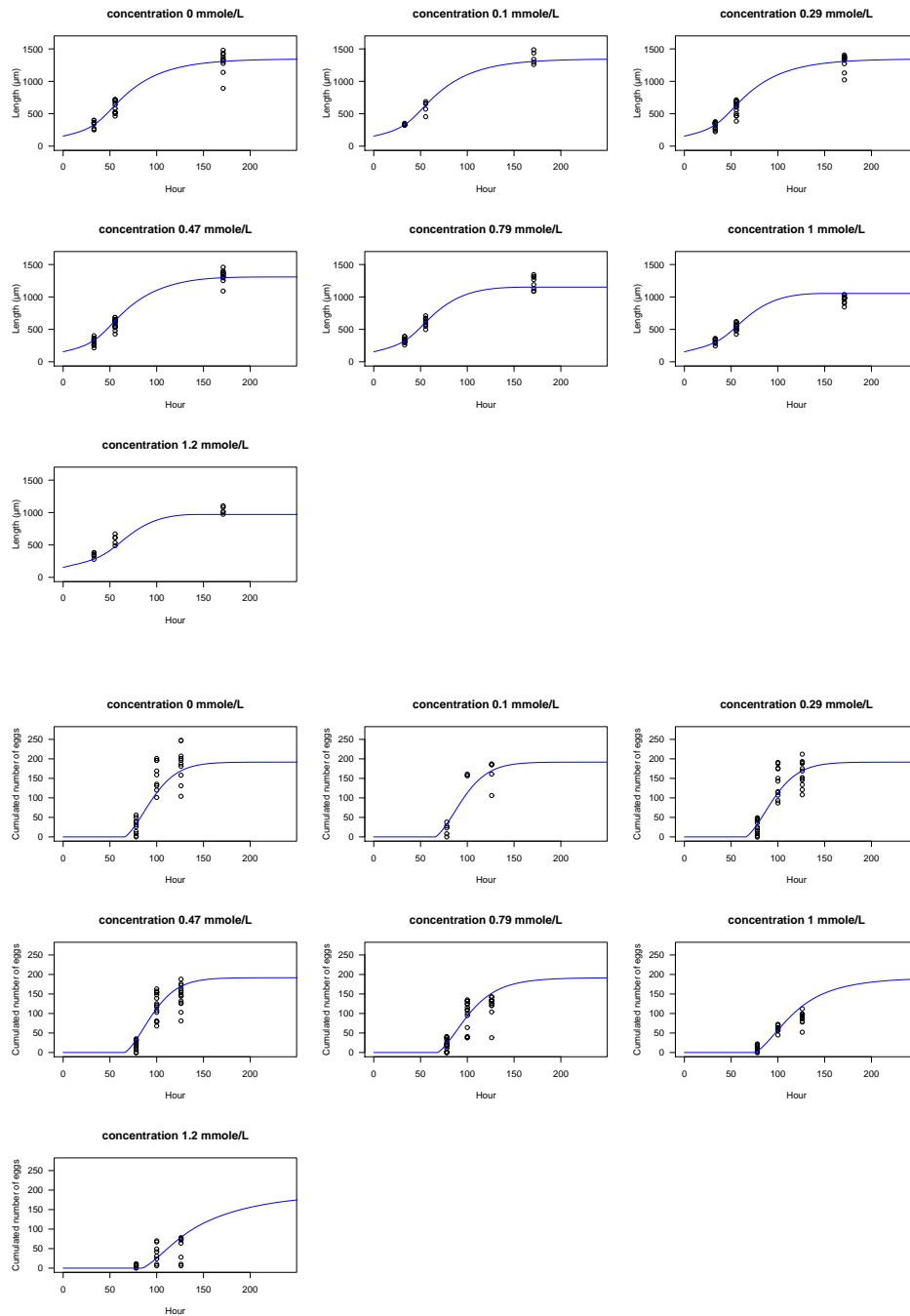


FIGURE D.17 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F12 MGU for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

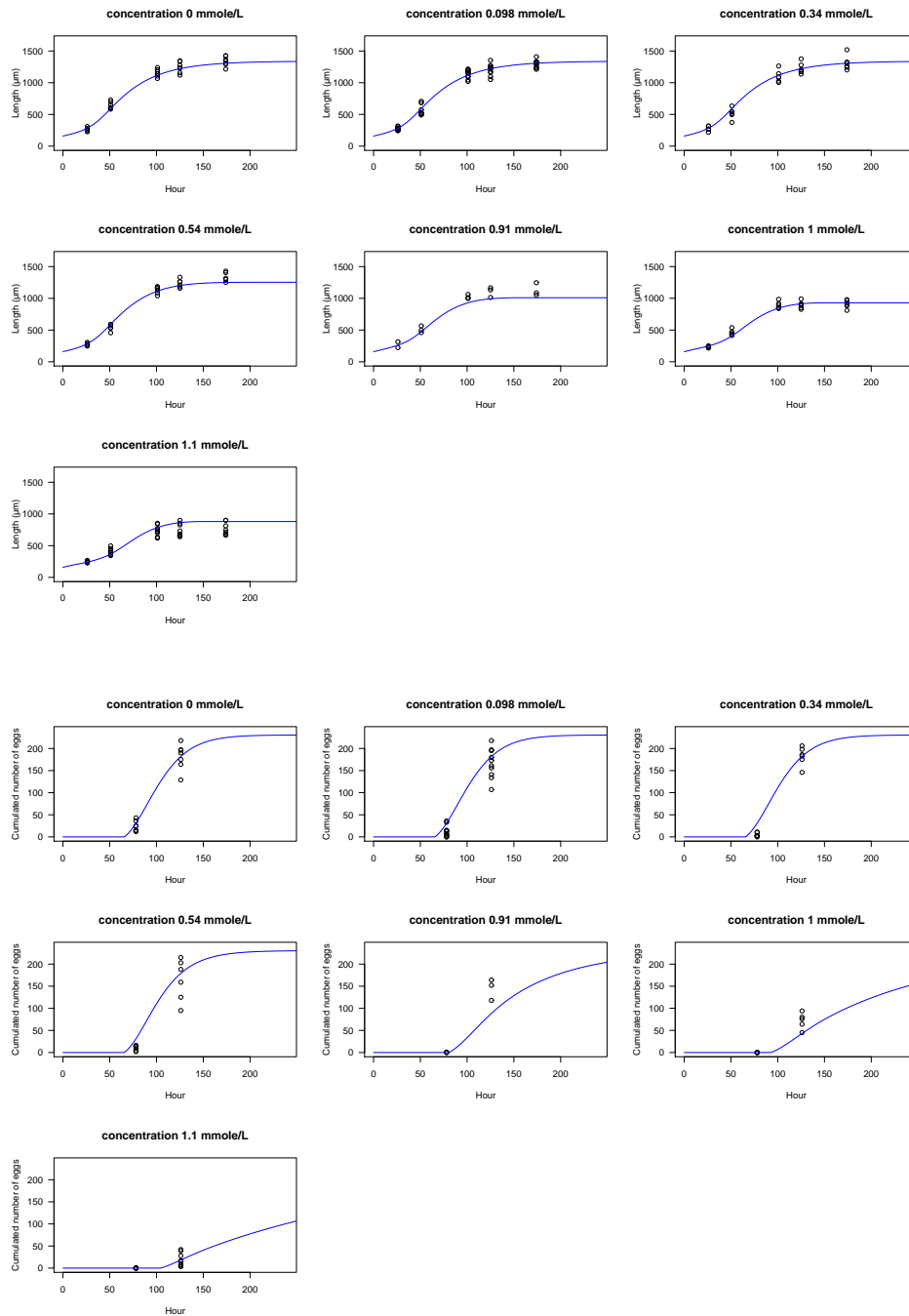


FIGURE D.18 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F16 MGC for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

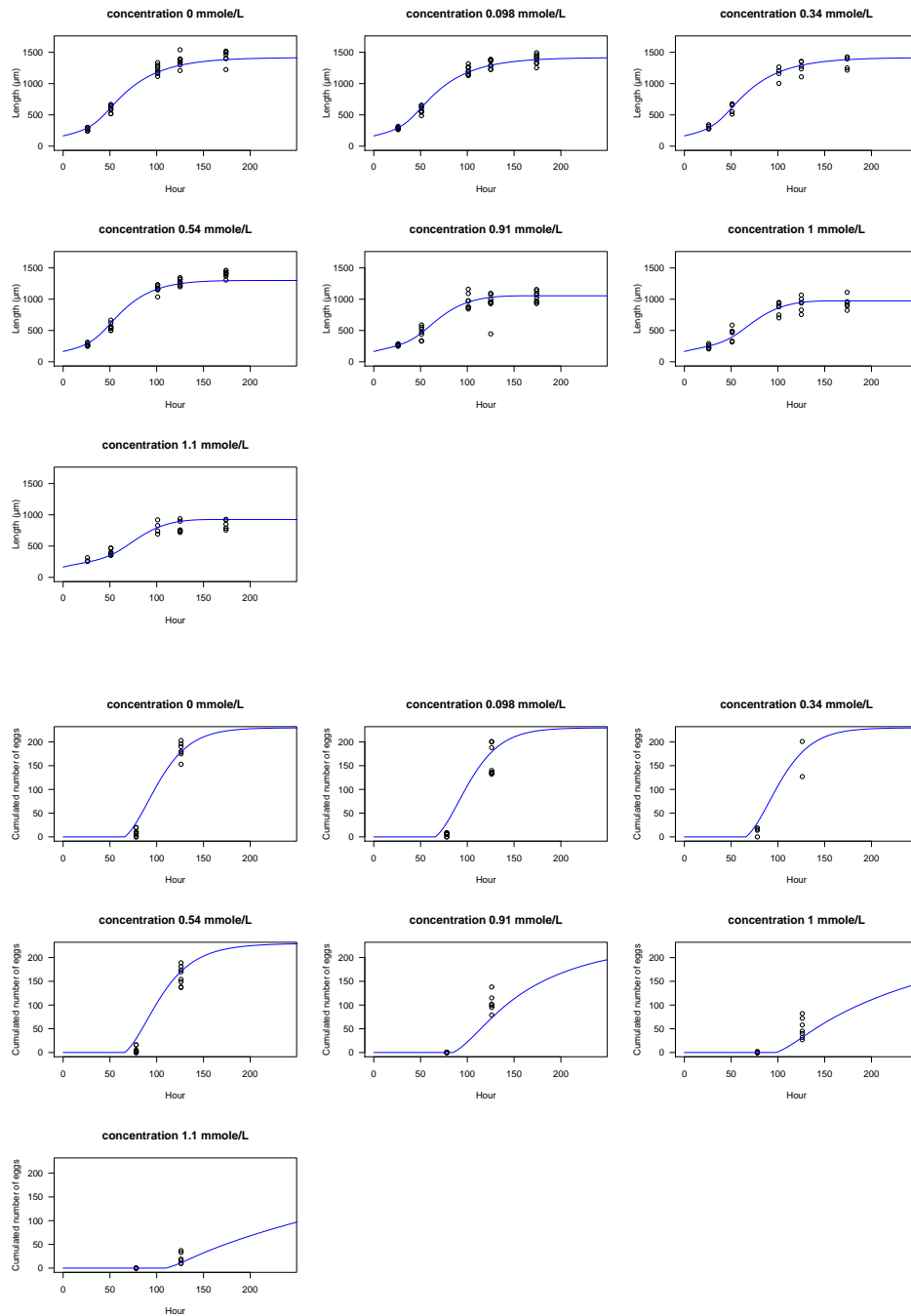


FIGURE D.19 – Model fit for the growth and the reproduction of the generation F16 MGU for each concentration of the toxicity test. Parameters used for the fit correspond to the means of the 1,000 last calculations corresponding to the 1,000 last iterations of the estimation process. The *points* represent the observed data and the *lines* represent the model regression curve.

---

## Valorisations scientifiques de la thèse

---

### E.1 Publications scientifiques

**Goussen B.**, Parisot F., Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Péry A.R.R., and Bonzom J.-M. 2013. Consequences on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity of multi-generation exposure to uranium. *Ecotoxicology* 22(5) :869–878. DOI 10.1007/s10646-013-1078-5

**Goussen B.**, Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Bonzom J.-M., and Péry A.R.R. 2013. DEBtox modelling applied to *Caenorhabditis elegans* : a case study on uranium. *Submitted*

**Goussen B.**, Péry A.R.R., Bonzom J.-M., and Beaudouin R. 2013. Mechanistic modelling for in depth analysis of a multigenerational evolution study : Application to *Caenorhabditis elegans* population submitted to uranium. *In prep*

Dutilleul M., Bonzom J.-M., Lecomte C., **Goussen B.**, Galas S., and Réale D. 2013. Multivariate analyzes of evolutionary changes in life history traits of a *Caenorhabditis elegans* population exposed to pollution. *In prep*

Dutilleul M., Réale D., **Goussen B.**, Lecomte C., Daian F., Galas S., and Bonzom J.-M. 2013. Profits and costs of adaptation to constant and fluctuating polluted environments. *In prep*

Dutilleul M., **Goussen B.**, Bonzom J.-M., Galas S., and Réale D. 2012. Pollution breaks down the expression of genetic structure of life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Submitted*

### E.2 Communications orales internationales

**Goussen B.**, Beaudouin R., Parisot F., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Bonzom J.-M., and Péry A.R.R. 2013 Evaluating effects of a multi-generation pollution on *Caenorhabditis elegans*' population. SETAC Glasgow. Glasgow, UK.

Dutilleul M., Bonzom J.-M., **Goussen B.**, Galas S., and Réale D. 2012. Evolutionary changes in life history traits in a *Caenorhabditis elegans* population exposed to pollutants. Evolution 2012. Ottawa, Ontario, Canada.

Beaudouin R., Dias V., **Goussen B.**, Péry A.R.R., and Bonzom J.-M. 2011. Analysis of multi-generation data for *Chironomus riparius* exposed to uranium-spiked sediments using a DEB-based population dynamics model. DEB Symposium 2011. Lisboa, Portugal.

### E.3 Communications orales nationales

**Goussen B.**, Beaudouin R., Diaz V., Bonzom J.-M., and Péry A.R.R. 2013. Un modèle mathématique pour mieux comprendre l'impact des polluants sur la dynamique évolutive des populations. Association pour la Recherche en Toxicologie (ARET). Paris, France.

**Goussen B.**, Parisot F., Péry A.R.R., Beaudouin R., Buisset A., Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2012. Evaluation des effets de la pollution sur la dynamique de population de *Caenorhabditis elegans* à travers une approche de type bioénergétique. Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA). Lyon, France.

Dutilleul M., Réale D., Lecomte C., **Goussen B.**, Galas S., and Bonzom J.-M. 2011. S'adapter, mais à quel coût ? Une étude expérimentale chez *C. elegans*. 33ème Réunion annuelle du Groupe d'Etude de Biologie et Génétique des Populations. Toulouse, France.

### E.4 Posters spotlight

**Goussen B.**, Parisot F., Péry A.R.R., Beaudouin R., Buisset A., Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2012. Evaluating effects of pollution on *Caenorhabditis elegans*' population dynamic through a bio-energetic approach. SETAC Berlin 2012. Berlin, Germany.

### E.5 Posters

Parisot F., Bonzom J.-M., and **Goussen B.** 2012. Suivi multigénérationnel d'une toxicité chronique : le cas de la reproduction chez *Caenorhabditis elegans*. Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA). Lyon, France.

**Goussen B.**, Péry A.R.R., Beaudouin R., Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2011. Integrating the DEB theory in an adaptive dynamic model for a better evaluation of the ecological risks : using of *C. elegans* as a model organism. DEB Symposium 2011. Lisboa, Portugal.

**Goussen B.**, Péry A.R.R., Beaudouin R., Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2011. Integrating the Dynamic Energy Budget theory in an adaptive dynamic model for a better evaluation of the ecological risks. Models in Evolutionary Ecology. Montpellier, France.

**Goussen B.**, Péry A.R.R., Beaudouin R., Dutilleul M., Lecomte C., and Bonzom J.-M. 2011. Intégration d'un modèle bioénergétique dans un modèle de dynamique adaptative : une population de *Caenorhabditis elegans* soumise à divers stress anthropiques. 33ème Réunion annuelle du Groupe d'Etude de Biologie et Génétique des Populations. Toulouse, France.







# Résumé

L'évaluation des effets toxiques à des échelles pertinentes est un challenge important pour la protection des écosystèmes. En effet, les polluants peuvent impacter les populations sur le long terme et représenter une nouvelle force évolutive qui peut s'ajouter aux autres forces de sélection. Il est par conséquent nécessaire d'acquérir des connaissances sur les changements phénotypiques et génétiques apparaissant dans une population exposée à un stress durant plusieurs générations. En général les études multi-générationnelles sont analysées à partir d'approches purement statistiques. La modélisation mécanistique a le potentiel de comprendre pleinement les effets des polluants sur la dynamique des populations. Ce type de modèle permet d'intégrer des processus biologiques et toxiques à l'analyse de données d'écotoxicologie et d'étudier les interactions entre ces processus. L'objectif de ce doctorat était d'étudier les apports de la modélisation mécanistique, par rapport à une analyse statistique classique, dans l'analyse de données d'évolution expérimentale suite à l'exposition sur le long terme à un contaminant. Pour ce faire, une stratégie en trois temps a été menée. Tout d'abord, une expérience multigénérationnelle a été réalisée sur deux populations de *C. elegans* (contrôle et exposée à 1,1 mM U) dérivées d'une population ancestrale présentant une forte diversité génétique. Toutes les trois générations, des individus ont été extraits des populations et soumis à une gamme de concentrations en uranium (de 0 à 1,2 mM U). Une première analyse statistique classique a alors été menée. Dans un second temps, un modèle bioénergétique adapté à l'analyse de données d'écotoxicologie (DEBtox) a été mis au point pour *C. elegans* et son comportement numérique a été analysé. Enfin, ce modèle a été appliqué à l'ensemble des générations étudiées afin d'inférer les valeurs des paramètres pour les deux populations et d'étudier leur évolution. Les résultats obtenus ont mis en évidence un impact de l'uranium à la fois sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* à partir de 0,4 mM U. Les résultats de l'analyse mécanistique indiquent que cet effet est la résultante d'un impact sur l'assimilation d'énergie depuis la nourriture. Les deux approches, tant mécanistique que classique, ont mis en évidence une adaptation des individus des deux populations aux conditions expérimentales. Malgré cela, les analyses ont également mis en évidence une évolution différentielle des individus de la population soumise à l'uranium par rapport à ceux de la population témoin. Ces résultats ont été plus finement décrits par l'analyse mécanistique. Globalement, ce travail contribue à accroître nos connaissances sur les effets des polluants sur la dynamique des populations, et démontre les apports de la modélisation mécanistique qui pourra être appliquée dans d'autres contextes afin de réaliser *in fine* une meilleure évaluation des risques écologiques des polluants.

*Mots clés : Caenorhabditis elegans, évolution, modélisation mécanistique, uranium, Budget Énergétique Dynamique*

---

# Abstract

The evolution of toxic effects at a relevant scale is an important challenge for the ecosystem protection. Indeed, pollutants may impact populations over long-term and represent a new evolutionary force which can be adding itself to the natural selection forces. Thereby, it is necessary to acquire knowledge on the phenotypic and genetic changes that may appear in populations submitted to stress over several generations. Usually statistical analyses are performed to analyse such multigenerational studies. The use of a mechanistic mathematical model may provide a way to fully understand the impact of pollutants on the populations' dynamics. Such kind of model allows the integration of biological and toxic processes into the analysis of ecotoxicological data and the assessment of interactions between these processes. The aim of this Ph.D. project was to assess the contributions of the mechanistic modelling to the analysis of evolutionary experiment assessing long-term exposure. To do so, a three step strategy has been developed. Foremost, a multi-generational study was performed to assess the evolution of two populations of the ubiquitous nematode *Caenorhabditis elegans* in control conditions or exposed to 1.1 mM of uranium. Several generations were selected to assess growth, reproduction, and dose-responses relationships, through exposure to a range of concentrations (from 0 to 1.2 mM U) with all endpoints measured daily. A first statistical analysis was then performed. In a second step, a bioenergetic model adapted to the assessment of ecotoxicological data (DEBtox) was developed on *C. elegans*. Its numerical behaviour was analysed. Finally, this model was applied to all the selected generations in order to infer parameters values for the two populations and to assess their evolutions. Results highlighted an impact of the uranium starting from 0.4 mM U on both *C. elegans*' growth and reproduction. Results from the mechanistic analysis indicate this effect is due to an impact on the assimilation of energy from food. Both the mechanistic and the classic approaches highlighted individuals' adaptation to environmental conditions. Despite this, differential evolutions of the individuals from the uranium-selected population were also highlighted. All these results were more in-depth described by the mechanistic analysis. Overall, this work contributes to our knowledge on the effects of pollutants on population dynamics, and demonstrates the contributions of mechanistic modelling which can be applied in other contexts to achieve *in fine* a better assessment of environmental risks of pollutants.

*Keywords: Caenorhabditis elegans, evolution, mechanistic modelling, uranium, Dynamic Energy Budget*