NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 8 décembre 2022

Noëmie Guirandy

Évaluation des effets reprotoxiques et de leur transmission à la descendance chez le poisson modèle *Danio rerio* après irradiation gamma chronique

Discipline
Science de l'environnement

Spécialité
Environnement et santé

École doctorale
ED 251 – Sciences de l'environnement

Laboratoire/Partenaires de recherche
IRSN/PSE-ENV/SRTE - Laboratoire de recherche sur les effets des radionucléides sur les écosystèmes (LECO)

Composition du jury

Magalie Baudrimont EPOC - EA	Rapporteuse
Frédéric Silvestre Université de Namur	Rapporteur
Anne Bado-Nilles INERIS	Examinatrice
Alain Geffard Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinateur
Jean Christophe Poggiale Université Aix-Marseille (MIO)	Président du jury
Emilie Réalis INRAE UMR CARRTEL	Examinatrice
Olivier Simon IRSN	Directeur de thèse
Patrice Gonzalez EPOC - EA	Co-directeur de thèse

Affidavit

Je soussigné, Noëmie Guirandy, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Olivier Simon et Patrice Gonzalez, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Oraison, le 15 septembre 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Affidavit

I, undersigned, Noëmie Guirandy, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Olivier Simon and Patrice Gonzalez, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Oraison, date 15 septembre 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Remerciements

Mes premiers remerciements sont dédiés à Olivier Simon, mon encadrant et directeur de thèse. Je sais la chance que j'ai de t'avoir eu comme encadrant pendant ces 4 années. Merci infiniment pour ton implication dans ce projet sur tous les plans. Tu as su m'épauler au labo, me faire évoluer dans mon esprit scientifique, tout en me faisant confiance et me laissant de la liberté sur mes choix dans cette thèse. En bref, tu m'as initié au métier de chercheur. Initiation réussie, j'ai vraiment passé 4 années passionnantes (même si elles étaient dures). Outre cet aspect encadrement, tu es une personne avec qui il est agréable de travailler mais également de rigoler, et de parler de tout autre chose. Je souhaite également remercier Patrice Gonzalez, mon co-directeur de thèse. Même à distance il était très agréable de travailler ensemble. J'ai beaucoup apprécié le fait de pouvoir travailler avec plusieurs labos et c'était un réel plaisir d'être parmi vous tous les ans à Arcachon. C'était mes « petites vacances » à moi ! Pour continuer avec l'équipe encadrante, un grand merci à Fabien Pierron. Tu n'es pas officiellement encadrant mais tu l'as réellement été pourtant. Merci de m'avoir appris tant de chose lors de mes venues à Arcachon. Merci pour tes conseils et pour les riches discussions scientifiques que nous avons pu échanger. Et puis merci pour ta bonne humeur et ta confiance !

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, Magalie Baudrimont et Frédéric Silvestre d'avoir accepté le rôle de rapporteur ; mes examinateurs, Alain Geffard, Emilie Réalis et Anne Bado-Nilles ; ainsi que Jean-Christophe Poggiale en tant que président du jury. Merci à vous pour la lecture de ma thèse ainsi que pour les riches discussions lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'IRSN qui a participé à ce projet. Merci à Rodolphe Gilbin et Patrick Laloi de m'avoir accueillie au sein du LECO. Je tiens à remercier Olivier Armant pour l'aide sur toute la partie biologie moléculaire et l'initiation à la bioinformatique. Merci également à Sandrine Frelon pour le temps que tu as consacré à mes analyses. Je remercie également Virginie pour sa bonne humeur au labo ainsi qu'Isabelle. Béatrice, merci pour les bon moments partagés aussi bien sur la manip ESPES que sur les pauses midi. Je remercie également toute l'équipe Micado et en particulier Nico et Loic pour votre bonne humeur, votre aide, et pour les p'tits dej le week end ! Mention spéciale à Jean François. Tu as su m'apporter ton aide mais également un soutien moral sans faille. Merci pour tes précieux conseils et ta bienveillance. Je remercie de manière générale tous les membres du LECO pour ces 4 années enrichissantes à vos côtés, et également le LR2T, avec une mention spéciale à Fred : j'espère qu'on se retrouvera autour d'un bon foie gras du sud-ouest ! Enfin, un grand merci à Magali Coquillat. Merci pour ta bienveillance, ton sourire, tes conseils et pour tout gérer aussi bien !

Je remercie également les autres labos qui ont participé à ce projet. L'équipe d'Arcachon, merci pour votre accueil. Et merci à Cerise et Flore pour votre aide au labo ! Merci à l'équipe IFREMER de Palavas, toujours un plaisir de manger au bord de l'eau avec vous ! Alors merci à Benjamin et Camille.

Je tiens à remercier également tous les étudiants rencontrés au cours de ces années, nous étions tous dans la même galère ! Et puis, il y a les collègues étudiants qui deviennent les amis ! En premier lieu Cybèle, c'est avec toi que l'aventure a commencé, et quelle aventure ! Je ne retiens de toi que de superbes moments (et c'est pas fini). Audrey (et Flo), que dire de toi, la persévérance incarnée, la douceur, the best co-bureau. Bon ok, Clément aussi t'étais the best co-bureau ! Marine, la touche de bonne humeur quotidienne, la copine de rando et le sourire indécollable ! Antoine (mais qui saura deviner qui est il ?), t'es parfois chiant, mais t'es le genre de personne à rencontrer. Je retiendrai de toi tes gamelles au ski, les apéros, les séances psy, ect….. Sophiette et Peter, merci pour toutes les soirées partagées chez vous, les bonnes raclettes et fondues (miam). Sarah, un plaisir de t'avoir rencontré (et Fadi aussi !). Léonore, t'es arrivée un peu tard, mais change rien, t'es géniale ! Clara, bon ok t'es pas dans la case étudiant en galère, mais t'es dans la case rigolote et apéro ! Adrien, je n'oublierai pas ton accent légendaire, ton humour bien à toi et ta bonne humeur ! Pour toutes ces choses, merci les copains !!

Alexandre, mon plus grand bonheur de cette thèse. Tu fais le lien évident entre les étudiants en galère et ma famille. 4 ans à galérer ensemble sur ces thèses pour aboutir à un PACS et la maison de nos rêves. Tout est dit, tu m'auras tout apporté. Merci d'être entré dans ma vie.

Je finirai par ma famille. Celle qui ne comprend pas toujours ce que je fais, mais celle qui m'a toujours soutenu. Merci particulièrement à mes parents de m'avoir permis de faire des études et de m'y avoir encouragé. Pour finir je dédirai cette thèse à ma mamie. Cette grande dame qui m'aura appris toutes les bonnes valeurs de la vie. Cette femme forte que j'admire tellement. Tu es pour beaucoup dans ma réussite. Merci de tout l'amour que tu m'apportes.

Résumé

Les rejets radioactifs des accidents nucléaires tels Tchernobyl et Fukushima induisent une exposition chronique des individus dans l'environnement. Les populations sont alors exposées sur plusieurs générations, pouvant entraîner des effets délétères sur les organismes. Dans le cadre de l'évaluation du risque écologique (ERE), les études sur les effets multi- et transgénérationnels présentent un intérêt croissant. Cependant, les études multigénérationnelles après exposition aux rayonnements ionisants (RI) sont rares. Pourtant, des récentes études sur les invertébrés montrent un impact des RI sur plusieurs générations. Dans ce contexte, ce projet de thèse concerne l'évaluation des effets reprotoxiques et leur transmission après irradiation gamma chez un vertébré aquatique, *Danio rerio*, couramment utilisé en écotoxicologie. Une étude, en laboratoire à différentes organisations du vivant a été privilégiée. Pour cela, des poissons adultes F0 ont été irradiés à différents débits de dose (0.05, 0.5, 5 et 50 $mGy.h^{-1}$) avant reproduction. La descendance (F1) est ensuite placée soit en situation d'irradiation continue soit en condition contrôle (recovery) jusqu'à la génération suivante (F2). La comparaison des effets obtenus après irradiation continue ou en condition recovery permet d'estimer une transmission d'effets en évaluer l'implication de l'irradiation parentale.

Premièrement, ce travail a permis d'observer une mortalité précoce, des malformations chez les embryons F1 et la masculinisation de la génération F1. Deuxièmement, une analyse transcriptomique révèle que de nombreux transcrits maternels, nécessaires au développement embryonnaire sont altérés. De plus, la contribution des mécanismes épigénétiques dans la transmission d'informations entre générations après irradiation a été évaluée. La modulation de la méthylation des promoteurs de gènes clés du déterminisme sexuel chez les parents F0 pourrait expliquer la masculinisation de la génération F1. Ce travail met en évidence l'implication des parents dans les effets observés chez la descendance.

Ce projet a permis d'évaluer les effets des RI à différentes échelles biologiques chez un vertébré aquatique et de fournir de nouvelles connaissances pour l'ERE, notamment le type de relation dose-réponse révélé par les différentes expositions. Finalement, ces résultats permettent de proposer un modèle d'AOP pour les effets reprotoxiques et transmissibles après irradiation gamma.

Abstract

Radioactive releases from nuclear accidents such as Chernobyl and Fukushima lead to individuals' chronic exposure in the environment. Populations are then exposed over generations, which could induce deleterious effects on organisms. In the context of ecological risk assessment (ERA), studies on multi- and transgenerational effects are of great interest. However, multigenerational studies after exposure to ionizing radiation (IR) are rare. Recent studies on invertebrates show an impact of IR over generations. In this context, this thesis concerns the assessment of reprotoxic effects and their transmission after gamma irradiation in an aquatic vertebrate, *Danio rerio*, commonly used in ecotoxicology. A study in laboratory conditions at different organizations of living organisms is privileged. For this, F0 adult fish were irradiated at different dose rates (0.05, 0.5, 5 and 50 $mGy.h^{-1}$) before reproduction. The offspring (F1) is then placed either in a continuous irradiation or in a control condition (recovery) until the next generation (F2). Effects comparison obtained after continuous irradiation or in recovery condition allows to estimate effects transmission by assessing genitor irradiation involvement.

First, early mortality, malformations in F1 embryos and masculinization of the F1 generation are observed. Secondly, a transcriptomic analysis reveals that many maternal transcripts necessary for embryonic development are altered. Moreover, epigenetic mechanism contribution in information transmission between generations after irradiation is assessed. Methylation modulation of key sex-determining genes promotors in F0 genitors could explain offspring masculinization. This work highlights genitor involvement in offspring effects.

This project allows to assess IRs effects at different biological scales in an aquatic vertebrate and to provide new knowledge for ERA, in particular the dose-response relationship type revealed by the different exposures. Finally, these results permits to propose an AOP model for reprotoxic and transmissible effects after gamma irradiation.

Valorisation scientifique

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Houdigui, S.M.E., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environmental Toxicology and Chemistry 38, 2556–2567. https://doi.org/10.1002/etc.4562

2. Guirandy, N., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Pierron, F., Gonzalez, P., Simon, O., 2022a. Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish. Aquatic Toxicology 244, 106101. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106101

3. Guirandy, N., Armant, O., Frelon, S., Pierron, F., Geffroy, B., Daffe, G., Houdelet, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2022b. Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish (Soumis).

4. Guirandy, N., Simon, O., Geffroy, B., Daffe, G., Daramy, F., Houdelet, C., Gonzalez, P., Pierron, F., 2022c. Zebrafish female gamma irradiation exposure impacts methylation marks involved in offspring sex determination (Article en préparation).

5. Simon, O., Guirandy, N., Dubourg, N., Turies, C., Espinat, L., Gagnaire B., 2022d. Accelerated incubation period induced by chronic irradiation in 4 fish species without early mortality (Article en préparation).

2) Participation aux conférences nationales au cours de la période de thèse :

1. Guirandy, N., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. L'irradiation gamma aigue chez le poisson modèle *Danio rerio* induit des effets délétères sur la descendance. **Congrès de l'école doctorale 251 Aix-Marseille, Marseille**. Prix poster. (Poster)

2. Guirandy, N., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Effets reprotoxiques et leur transmission à la descendance après exposition chronique à l'irradiation gamma. **Journée des thèses de l'IRSN, La Grande Motte**. (Poster)

3. Guirandy, N., Simon, O., Gonzalez, P., 2020. Effets de l'irradiation gamma multigénérationnelle chez le poisson Danio rerio. **Colloque 2020 de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée**. (Oral)

4. Guirandy, N., Gonzalez, P., Simon, O., 2021. Effets reprotoxiques et leur transmission à la descendance après exposition chronique à l'irradiation gamma. **Journée des thèses de l'IRSN**. (Oral)

3) Participation aux conférences internationales au cours de la période de thèse :

1. Guirandy, N., Simon, O., Pierron, F., Gonzalez, P., 2021. Transmitted effects in the fish model, *Danio rerio*, after multigenerational gamma irradiation lead to F1 altered sex ratio in link with epigenetic mark modifications. **SETAC Europe 31st annual meeting**. (Oral)

2. Guirandy, N., Simon, O., Armant, O., Pierron, F., Gonzalez, P., 2021. Analyse transcriptomique en lien avec les phénotypes majeurs observés sur la descendance issue de parents exposés à l'irradiation gamma chez le poisson modèle *Danio rerio*. **COLLOQUE CONJOINT EcoBIM – EcotoQ – Chapitre Saint-Laurent**. (Oral)

3. Guirandy, N., Simon, O., Dubourg, N., Turies, C., Espinat, L., Gagnaire, B., 2021. Comparative study of radiosensitivity of wildlife and model fish species after gamma irradiation, a model stress exposure. **CEPA- Colloque d'Ecophysiologie Animale, 3eme édition, Montpellier.** (Oral)

4. Guirandy, N., Simon, O., Geffroy, B., Daffe, G., Houdelet, C., Gonzalez, P., Pierron, F., 2022. Une altération du sexe ratio d'origine épigénétique chez la descendance de femelles *Danio rerio* irradiées. **Colloque ECOBIM, Namur**. (Oral)

5. Simon, O., Guirandy, N., Dubourg, N., Turies, C., Espinat, L., Gagnaire, B., 2022. Ecotoxicité des stades embryo-larvaires de 4 espèces de poissons. Comparaison entre espèce modèle et espèces sauvages. **Colloque ECOBIM, Namur**. (Oral)

Table des matières

Introduction générale 1
Chapitre I – Etat de l'art 3
I.1 Les rayonnements ionisants : intérêt en écotoxicologie 4
I.1.1 Radioactivité et types de rayonnements 4
I.1.2 Les mécanismes d'action des rayonnements gamma 8
I.1.3 Radioprotection 12
I.2 Développement embryonnaire 18
I.2.1 Les stades de développement 18
I.2.2 Contrôle parental de l'embryogenèse 21
I.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur les stades précoces 26
I.3 Reproduction 28
I.3.1 La maturité sexuelle 29
I.3.2 Gamétogenèse 34
I.3.3 Effets des rayonnement ionisants sur la reproduction 37
I.4 Héritabilité des effets 38
I.4.1 Effets générationnels 39
I.4.2 Epigénétique 40
I.4.3 Effets générationnels radio-induits sur la méthylation de l'ADN 44
Chapitre II – Objectifs et choix expérimentaux 46
II.1 Objectifs 47
II.2 Choix expérimentaux 49
II.2.1 Modèle biologique 49
II.2.2 Exposition aux rayonnements ionisants 50
II.2.3 Choix des paramètres étudiés 55
Chapitre III – Effets à l'échelle phénotypique d'une exposition parentale au rayonnement gamma : transmission d'effets délétères 59
III.1 Introduction 60
III.2 Publication 1: « Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance » 62
III.2.1 Introduction 65
III.2.2 Materials and methods 67
III.2.3 Results 70
III.2.4 Discussion 77

III.2.5 Conclusion 81
III.2.6 References 81
III.2.7 Supporting information 84
III.3 Publication 2: «Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish». 86
III.3.1 Introduction 89
III.3.2 Materials and methods 91
III.3.3 Results 94
III.3.4 Discussion 99
III.3.5 Conclusion 103
III.3.6 Acknowledgements 104
III.3.7 Funding sources 104
III.3.8 References 104
III.4 Synthèse du chapitre 108
III.4.1 L'exposition d'adultes matures sexuellement 108
III.4.2 Des effets phénotypiques d'origine parentale chez la descendance 110
III.4.3 Relation dose/réponse 114
III.4.4 Conclusion 116
Chapitre IV – De l'individu à la molécule : implication maternelle dans la mortalité précoce de la descendance 118
IV.1 Introduction 119
IV.2 Publication 3: « Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish » 121
IV.2.1 Introduction 124
IV.2.2 Materials and methods 125
IV.2.3 Results 131
IV.2.4 Discussion 136
IV.2.5 Conclusions 141
IV.2.6 References 141
IV.2.7 Appendix A. Supplementary material 145
IV.3 Synthèse du chapitre 157
IV.3.1 Effets à l'échelle individuelle 157
IV.3.2 Apport parental dans les effets observés 157
IV.3.3 Relation dose-réponses à l'échelle moléculaire de différents de débits de dose 162
IV.3.4 Conclusion 165
Chapitre V – Implication de la méthylation de l'ADN dans les effets phénotypiques observés après irradiation gamma 167

V.1 Introduction 168
V.2 Publication 4: « Zebrafish Female gamma irradiation exposure impacts methylation marks involved in offspring sex determination » 170
V.2.1 Introduction 173
V.2.2 Materials and methods 174
V.2.3 Results 177
V.2.4 Discussion 180
V.2.5 Conclusion 182
V.2.6 References 183
V.2.7 Appendix A. Supplementary material. 186
V.3 Synthèse du chapitre 188
V.3.1 Méthylation de gènes clés dans la détermination du sexe. 188
V.3.2 Mécanismes connexes en lien avec la différenciation sexuelle 193
V.3.3 Impact sur le devenir des populations 198
V.3.4 Conclusion 199
Chapitre VI – Conclusions et perspectives 201
VI.1 Effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements gamma 203
VI.1.1 Effets phénotypiques 203
VI.1.2 Mécanismes moléculaires des effets transmis 204
VI.1.3 Perspectives générales liées aux expositions multigénérationnelles 206
VI.2 Evaluation du risque écologique 210
VI.2.1 La méthode d'évaluation 210
VI.2.2 Outils pour l'ERE 213
Références bibliographiques 215
Annexes 238

Liste des figures

Chapitre I

Figure I- 1 : Pouvoir pénétrant des différents types d'émissions radioactives. Source : infocrise.public.lu. 5

Figure I- 2 : Exposition moyenne de la population de France métropolitaine aux RI en 2015. Source : Bilan IRSN. 7

Figure I- 3 : Production d'espèces réactives de l'oxygène par radiolyse de l'eau. (Lousada et al., 2016). 10

Figure I- 4 : Schéma des mécanismes d'action (direct et indirect) des RI dans les cellules. Source : Azzam et al., 2012. 11

Figure I- 5 : Stades de développement du poisson zèbre. Adaptation d'après Kimmel et al., 1995. 19

Figure I- 6 : Organisation des domaines de la vitellogénine native dans le sang et ses produits protéiques dans le corps jaunes des ovocytes en croissance. (Reading and Sullivan, 2011). 22

Figure I- 7 : Modèle d'absorption de la vitellogénine par l'ovocyte depuis sa production dans le foie. (Hara et al., 2016) 22

Figure I- 8 : Schéma représentent l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal chez les téléostéens après exposition à un stress. L'activation de l'axe entraine la synthèse de cortisol. Adaptation d'après Faught and Vijayan, 2018). 23

Figure I- 9 : Schéma représentant l'évolution vers la maturité sexuelle via différent processus complexes. 29

Figure I- 10 : Synthèse des stéroïdes sexuels. 33

Figure I- 11 schéma synthèse de la détermination et de la différentiation du sexe chez le poisson zèbre. Adaptation d'après (Aharon and Marlow, 2021). 34

Figure I- 12 : Schéma représentent les stades de développement depuis les ovogonies jusqu'à l'ovocyte mature. Adaptation d'après Li and Ge, 2020. 36

Figure I- 13 : Schéma représentant les effets multigénérationnels et les effets transgénérationnels chez le poisson zèbre. L'éclair représente l'exposition a un stresseur. Adaptation d'après Best et al., 2018. 40

Chapitre II

Figure II- 1 : cycle de vie du poisson zèbre. Adaptation d'après Ribas and Piferrer, 2014..... 50

Figure II- 2 : Dispositif d'irradiation contenant les sources radioactives. 50

Figure II- 3 : Hall d'irradiation MICADO'Lab avec les dispositifs expérimentaux disposés en fonction du débit de dose souhaité. 51

Figure II- 4 : Choix des débits de dose utilisé au cours des différentes expérimentations confronté aux valeurs de protection de la littérature. 52

Figure II- 5 : design expérimental général utilisé pour toutes les expérimentations.. 55

Chapitre III

Figure III- 1 : Exposure duration, conditions, and endpoints for low dose rate (DR) and highDR experiments. For each exposure condition, a control condition was included. For the lowDR experiment (0.5, 5 mGy h–1), adults were exposed over 24 d. Reproduction was assessed after 10 and 24 d of irradiation. The progeny were then placed in irradiated and nonirradiated (F1 recovery) exposure conditions over 10 and 22 d. For the highDR ex¬periment (50 mGy h–1), adults were exposed over 10 d. The progeny were then placed in irradiated and nonirradiated (F1 recovery) exposure con¬ditions over 120 h. Adults irradiated for 10 d were placed in nonirradiated exposure (F0 recovery) over 63 d. Reproduction was assessed after 6, 36, and 63 d in F0 recovery conditions. The progeny were placed in nonirradiated exposure conditions over 96 h for each time point (6, 36, and 63 d). 68

Figure III- 2 : Individual (points) and average (histogram, means ± standard deviation) fecundity (number of eggs per female) of F0 adults measured after 10 d of exposure for both low–dose rate (DR) and highDR experiments (treatment vs control, *Kruskal-Wallis p = 0.03). ( ) = number of spawns. 71

Figure III- 3: Individual (points) and average (histograms, means ± standard deviation) survival rates of F1 progeny at 24 and 48 h. F1 progeny came from adults irradiated over 10 d for all experiments. For the low–dose rate (DR) experiment (control, 0.5, 5, R0.5, R5 mGy h–1), survival rate was calculated from 3 spawns (with 2 pseudoreplicates, 1 male + 1 female). For the highDR experiment (control, 50, R50 mGy h–1), survival rate was calculated from 6 spawns (1 male + 1 female). (Kruskal-Wallis test: treatment vs control, $^{a}p = 0.024$, $^{b}p = 0.015$, $^{c}p = 0.006$, $^{d}p = 0.006$). F1R = F1 recovery condition, i.e., progeny spawned by irradiated adults and placed in nonirradiated conditions..... 73

Figure III- 4: Survival rate of F1 progeny over time for the low–dose rate (DR) experiment. Data are means ± standard deviation of 2 replicates of 80 eggs for 3 spawns per condition (Kruskal-Wallis test: 5 vs F1R, ap = 0.049, n = 6). (A) F1 progeny coming from adults irradiated over 10 d. Immediately after spawning, F1 progeny was

placed in irradiated and in nonirradiated (F1R recovery) exposure conditions for 22 d. (B) F1 progeny coming from adults irradiated for 24 d. Immediately after spawning, F1 progeny was placed in irradiated exposure conditions for 10 d. F1R = F1 recovery condition, i.e., progeny spawned by irradiated adults and placed in nonirradiated conditions. 73

Figure III- 5 : Survival rate (n = 6) of F1 progeny (3–4 h postfertilization) over time. Progeny came from 10 d–irradiated adults for high–dose rate experimentation. F1 progeny were placed in irradiated and nonirradiated (F1R, recovery) exposure conditions over 120 h. (Kruskal-Wallis test: treatment vs control, ap = 0.006, bp = 0.006, cp = 0.003, dp = 0.003; ep = 0.003, fp = 0.003)..... 74

Figure III- 6 : Individual (points) and average (histograms, means ± standard deviation) survival rates (n = 4-6) of F1 progeny after 24 and 48 h. Progeny came from adults irradiated for 10 d and then placed in nonirradiated conditions (F0R, recovery) for 63 d. (Kruskal-Wallis test, treatment vs control, $^{a}p = 0.015$, n = 12; $^{b}p = 0.0060$, n = 11; $^{c}p = 0.05$, n = 8; $^{d}p = 0.006$, n = 11; $^{e}p = 0.0058$, n = 11; $^{f}p = 0.05$, n = 11)..... 74

Figure III- 7 : Body length and typical aspect of F1 progeny at 72 h. F1 progeny came from adults exposed for 10 d (Irr. 10d) and 10 d followed by 6 d (F0Irr. 10d+F0R 6d) and 36 d in nonirradiated (F0Irr. 10d+F0R 36d) conditions. (Kruskal-Wallis test, treatment vs control, *p < 0.05; F0Irr. 10d, p = 0.002, n = 20; p = 0.0049, n = 20; F0Irr. 10d+F0R 6d, p = 0.00007, n = 33; F0Irr. 10d+F0R 36d, p = 0.077, n = 85). 75

Figure III- 8 Reactive oxygen species production measured in larvae exposed for 4 d coming from F0 adults exposed for 10 (A1) and 24 (A2) d and in larvae exposed for 10 d coming from F0 adults exposed for 24 d (B) of low–dose rate experiments. n = 20 per condition, analysis of variance a,b,cp < 0.05. DR = dose rate; nd = not determined; ROS = reactive oxygen species..... 75

Figure III- 9 : : F1 progeny DNA damage (tail moment) after 1, 4, and 10 d of exposure. Progeny came from adults irradiated for 24 d for the low–dose rate experiment. Progeny (3–4 h postfertilization) were placed in irradiated and nonirradiated (F1R, recovery) conditions. Kruskal-Wallis test, *p < 0.05. DR = dose rate..... 76

Figure III- 10 : Progeny DNA damage (tail moment) in (A, 1 d, irradiated and nonirradiated exposure [F1R, recovery]) and in gonads of F0 adults (B, female; C, male) coming from the high–dose rate experiment. Kruskal-Wallis test, *p < 0.05. DR = dose rate. 77

Figure III- 11 : Experimental design and exposure conditions (duration (d) and dose rate (mGy h^{-1}) used for the multigenerational experiment. F0 adults were exposed over 30 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated (F1-I0.05, F1-I5) and non-irradiated (recovery, F1-R0.05, F1-R5) exposure conditions over 131 days. Mating was performed at 104 and 131d. F2 progenies (F2-I0.05, F2-I5) from F1 irradiated adults were irradiated over 22 days. F2 progenies (recovery, F2-R0.05,) from F1 recovery adult were placed in non-irradiated exposure over 22 days. F2 progenies

(recovery, F2-R5) from F1 recovery adults were placed in non-irradiated exposure conditions over 72 hours. M: mating. 92

Figure III- 12 : Box-plot of survival rate of progeny (%) over time tor the 1st generation (F1) at 4, 8 and 22 dpf after control (C), dose rate exposures to 0.05 and 5 mGy h^{-1}(I) and recovery (R) conditions. The boxplot represent the 25th and the 75th percentile with the median indicated by blackline. Dots represent individual data. Means are indicated as empty lozenge. For each condition, n = 9, * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). 96

Figure III- 13 : Box-plot of survival rate of progeny (%) over time for the 2nd generation (F2) at 4, 8 and 22 dpf after control (C), dose rate exposures to 0.05 and 5 mGy h^{-1}(I) and recovery (R) conditions. The boxplot represent the 25th and the 75th percentile with the median indicated by blackline. Dots represent individual data. Means are indicated as empty lozenge. For each condition, n = 15, * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). 97

Figure III- 14 : Female and male F1 adult distribution (%) in control (C), 0.05 and 5 mGyh^{-1} irradiated (I) and in recovery (R) conditions. at 131 days. Total number of adult fish; F1-C = 194; F1-R0.05 = 124; F1-R5 = 136; F1-I0.05 = 127; F1-I5 = 119. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). 97

Figure III- 15 : Estimation of population of F1 and F2 generations after irradiation exposures (Control conditions (C), to 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I). At the beginning, 60 fish were present (sex ratio = 1 male: 1 female) per condition for the F0 generation. The total effective population was calculated with the product of number of females, reproductive success rate, fecundity (mean number of viable eggs) and the survival rate of progeny (at 3 and 22 dpf for F1 and 3 dpf for F2). 98

Figure III- 16 : A : Contrôle B : 0.5 mGy.h^{-1} C : 5 mGy.h^{-1} D : 50 mGy.h^{-1} E : 50 mGy.h^{-1} 109

Figure III- 17 : (A) pourcentage de survie moyen de la génération F1 au cours du temps. (B) visualisation du pic de mortalité, correspondant à l'écart entre 2 pas de temps. 110

Figure III- 18 : évaluation de l'effet maternel. % de mortalité F1 irradiée à 50 mGy.h^{-1} après irradiation (F0_irradiés, n=6) ou non (F0_non_irradiés, n=3) des parents F0. Un test glm avec distribution binomial a été réalisé. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). 112

Figure III- 19 : Pourcentage d'éclosion sur le nombre de vivant à 48 hpf (A) et 72 hpf (B). (A) présente le pourcentage après irradiation des parents (F0_irradiés) ou avec irradiation unique de la descendance (F0_non_irradiés), N=3 pontes. (B) présente le pourcentage d'éclosion des F1 recovery selon le temps d'irradiation des parents F0 (1 jour, N=11 ; 10 jours, N=3). Un test glm avec distribution binomiale a été réalisé. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). 113

Figure III- 20 : Courbe de la relation dose-réponse avec droite de régression exponentielle. 115

Figure III- 21 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre III 116

Chapitre IV

Figure IV- 1 : Experimental design and exposure conditions (duration and dose rate ($mGy.h^{-1}$). F0 adults were exposed over 10 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated (irradiated condition) and non-irradiated (recovery condition) exposure conditions over 6 days. F0 adults were then moved to non-irradiated condition for 6 and 36 days before reproduction. F1 progenies from 6 days F0 (resilience_6d condition) and from 36 days F0 (resilience_36d condition) were then placed in control condition. 127

Figure IV- 2 : Box-plot of cumulative mortality rates of F1 (%)) at 24, 48, 72, 96, 120, 144 hpf after control, dose rate exposure to 50 $mGy.h^{-1}$ (irradiated) and recovery conditions. The boxplot represents the 25th and the 75th percentile with the median indicated by the horizontal black line. For control, irradiated and recovery, n=9, n=5, n=6, respectively. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). 131

Figure IV- 3 : (A) Photographs of F1 larvae at 72 hpf after Control, F0 exposure to 50 $mGy.h^{-1}$ (10 days) with F1 exposure to 50 $mGy.h^{-1}$(Irradiated), F0 exposure to 50 $mGy.h^{-1}$ (10 days) follow by non-irradiation 6 days (Resilience_6d) or 36 days (Resilience_36d). (B and C) Bar plot of yolk reserve area (mm^2) and pericardial area (mm^2) for control (n=6), control_resilience_6d (n=11), control_resilience_36d (n=45), irradiated (F0 + F1 exposed to 50 $mGy.h^{-1}$, n=9), recovery (F0 exposed to 50 $mGy.h^{-1}$, F1 non-irradiated, n=12), resilience_6d (F0 exposed to 50 $mGy.h^{-1}$ follow by non-irradiation exposure 6 days, F1 non-irradiated, n=11), resilience_36d (F0 exposed to 50 $mGy.h^{-1}$ follow by non-exposure 36 days, F1 non-exposed, n=32). Letters indicate statistical differences ($pl<0.05$) among conditions (Anova test and Tukey post-hoc). 132

Figure IV- 4 : (A) Bar plot of F0 ovaries cortisol concentration after control and exposure to 50 $mGy.h^{-1}$ (irradiated), n=6 per condition. (B) Barplot of log2FoldChange (as compared to controls) for genes involved in cortisol metabolism. Data came from transcriptomic data on F0 ovaries. Red line represents cut off value chosen for interpretation of gene regulation. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)..... 133

Figure IV- 5 : (A) Dot plot of selected GO (Gene Ontology) term enrichment from dysregulated, up and down genes in exposed F0 ovaries. Colours indicate the p-values from Fisher's exact test, and dots size is the number of genes constituting the given pathway. (B) Change in gene transcription levels (FC as compared to controls) in female gonad F0 from transcriptomic data. For all genes, FDR<0.01. Red line represents cut off value chosen for interpretation of gene regulation. 134

Figure IV- 6 : Dot plot of selected KEGG enrichment using human orthologues from misregulated, up and down genes in irradiated ovaries. Colours indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test, and dots size is the number of genes constituting the given pathway. 136

Figure IV- 7 : schéma représentant l'hypothèse de la sensibilité des différents stades ovocytaires exposés au rayonnement gamma. Les différents stades ovocytaires sont détaillés dans le chapitre I. T0 correspond au début de l'irradiation. Du fait de l'asynchronité de cette espèce, plusieurs types d'ovocytes peuvent être présents à T0. Les stades précoces sont donc exposés tout le long de leur maturité. 159

Figure IV- 8 : Nombre de gènes (ENSEMBL) en fonction de la dose cumulée. DE = différentiellement exprimés, FC = FoldChange. Les courbes en pointillées représentent les régressions exponentielles. 163

Figure IV- 9 : Diagrammes de Venn montrant les gènes communs entre les trois différents débits de dose après annotation zfin. (A) correspond aux genes différentiellement exprimés (padjust<0.05) sans valeur de cutoff), (B) correspond aux gènes différentiellement exprimés avec valeur de cutoff (pajust <0.05, FC≥|2|), (C) correspond aux gènes surexprimés (pajust < 0.05, FC ≥2, (D) correspond aux gènes sous exprimés (padjut <0.05, FC ≤-2). 163

Figure IV- 10 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre IV. 166

Chapitre V

Figure V- 1: Experimental design and exposure conditions (duration and dose rate ($mGy.h^{-1}$). D corresponds to exposure time in days with gonad sampling at the end. F0 adults were exposed over 30 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated condition and control condition (recovery) for 131 days until sexual maturity. 175

Figure V- 2 : Bar plot of F0 ovaries cortisol concentration after control and exposure to 5 $mGy.h^{-1}$ (irradiated). n=14 and n=8 for control and irradiation groups, respectively. 177

Figure V- 3 : Barplot of DNA methylation at different CpG sites of specific promoter genes for males and females. For each sex, all individuals from F0 and F1 control groups were considered. N = 22. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). 178

Figure V- 4 : DNA methylation and RNA transcription levels after irradiation at 5 $mGy.h^{-1}$ and control. (A): Barplot of average DNA methylation (%) of genes for control and irradiated female fish. N = 6, 4, 16, 6 and 8 for F0-ontrol, F0-I5, F1-control, F1-I5 and F1-I5 recovery, respectively. (B) Barplot of RNA transcription level (a.u.) for control and irradiated female fish. N = 8, 7 6, 4 and 9 for F0-control, F0-I5, F1-control, F1-I5 and

F1-I5 recovery, respectively. Colours correspond to the generation (F0 in black and F1 in grey). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), compared to control group. 179

Figure V- 5 : Méthylation de l'ADN(%) et transcription de l'ARN (a.u) dans la condition Control et après irradiation gamma à 0.05 $mGy.h^{-1}$ dans les gonades femelles. Pour la methylation, N = 6, 10, 15, 8 et 8 pour F0-control, F0-I005, F1-control, F1-I005 and F1-I005 recovery, respectivement. Pour la transcription, N = 8, 10, 6, 8 et 8 pour F0-control, F0-I005, F1-control, F1-I005 and F1-I005 recovery, respectivement. Les couleurs correspondent à la génération (F0 en noir et F1 en gris). Aucune différence statistique n'a été mise en évidence. 188

Figure V- 6 : Méthylation de l'ADN dans la condition Control et après irradiation gamma à 0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$dans les gonades mâles. control. N = 6, 10, 4, 8, 16, 10, 7 et 8 pour F0-control, F0-I005, F0-I5, F1-control, F1-I005, F1-I5, F1-I5 recovery and F1-I005 recovery, respectivement. Aucune différence statistique n'a été mise en évidence. 189

Figure V- 7 : méthylation de l'ADN (%) dans les gonades femelles aux différents sites de méthylation au niveau des promoteurs sur la séquence choisie. S1 = site 1, S2 = site 2, S3 = site 3, S4 = site 4, S5 = site 5. 190

Figure V- 8 : Transcription de l'ARN (a.u) en fonction de la méthylation de l'ADN(%) pour la totalité des individus femelles (toutes générations, toutes conditions)..... 192

Figure V- 9 : Concentration en 1-ketotestostérone dans les gonades femelles F0 pour les conditions contrôle et exposé à 5 $mGy.h^{-1}$. n=6. 195

Figure V- 10 : schéma conceptuel de la masculinisation induite par un excès de cortisol dans un contexte de stress chronique. Adaptation d'après Fernandino et al., 2013. 195

Figure V- 11 : (A) Dot plot de GO (Gene Ontology) term enrichis sélectionnés à partir des gènes différentiellement exprimés (DEG, FDR <0.05) et sur-exprimés (Up_gene, $|log2fold\ change| \geq 1$ and FDR < 0.05) dans les gonades femelles F0 irradiées. La couleur indique les p-values issues du test exact de Fisher, and la taille des points correspond au nombre de gènes consistuant la voie considérée. 196

Figure V- 12 : schéma conceptuel présentant la masculinisation induite par l'irradiation via les différents mécanismes hypothétiques présentés. 198

Figure V- 13 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre V..... 200

Chapitre VI

Figure VI- 1 : récapitulatif des différents axes de recherche avec les publications et les mesures réalisées. 202

Figure VI- 2 : proposition d'AOP sur la reprotoxicité après irradiation du poisson zèbre. Les éléments nouveaux de ce projet de thèse ont été ajoutés à l'AOP reprotoxicité récemment publiée (Tollefsen et al., 2022)..... 214

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I- 1 : « derived consideration reference levels » (DCRL) chez les poisons. Source : (ICRP, 2008). 13

Tableau I- 2 : Synthèse des tests standardisés de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), pour les poissons. Source : www.oecd-ilibrary.org. 16

Tableau I- 3 : liste non exhaustive des gènes de la différentiation sexuelle chez les poissons zèbre. 32

Chapitre II

Tableau II- 1 : débits de dose nominaux et mesurés dans les différents dispositifs expérimentaux. 53

Tableau II- 2 : liste des paramètres biologiques étudiés. 57

Chapitre III

Tableau III- 1 : Cumulative doses (Gy) calculated from the nominal dose rate for each condition (control, dose rate of 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I) and Recovery (R) and each generation (F0, F1, F2). 94

Tableau III- 2 : Mass (g, fresh weight), reproductive success (%) and fecundity of F0 and F1 adults after exposure to control (C), 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I) and Recovery (R) conditions * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.001$). 95

Tableau III- 3 : pourcentage de survie de la génération F1 à 5 mGy.h^{-1}, après irradiation des F0 parents pendant 30 jours. 110

Tableau III- 4 : débits de dose, temps d'exposition et doses cumulées des adultes F0 ainsi que la mortalité de la descendance à 24 hpf pour les différentes expérimentations. 114

Chapitre IV

Tableau IV- 1 : Analyse d'enrichissement révélant les processus biologiques communs entre 50 et 5 mGy.h^{-1}. 164

Chapitre V

Tableau IV- 1 : Analyse d'enrichissement révélant les processus biologiques communs entre 50 et 5 mGy.h^{-1}. 164

Chapitre VI

Tableau VI- 1 : Tableau récapitulatif des principaux phénotypes altérés observés, les mécanismes moléculaires associés ainsi que les investigations à poursuivre pour valider les hypothèses. 208

Liste des abbréviations

Bb : Balbiani body

CG : cellules germinales

CGP : cellules germinales primordiales

CS : cellules somatiques

Dpf : day post fertilization

ERE : évaluation du risque écologique

ERO : Espèces reactives de l’oxygène

ESD : environmental sex determination

FSH : hormone folliculo-stimulante

GSD : genetic sex determination

Hpf : hour post fertilization ; heure post fécondation

Jpf : jour post fécondation

LH : hormone lutéinisante

MPF : facteur intracellulaire de maturation

PGC : primordial germ cells

RI : Rayonnements ionisants

ROS : reactive oxygene species

VTG : vitellogénine

Introduction générale

Les activités anthropiques (agricoles, industrielles, militaires) entrainent la présence de nombreux contaminants dans l'environnement. Les contaminants se retrouvent alors dans les différents compartiments de la biosphère (eau, sol, air) et peuvent impacter le biote. Les rayonnements ionisants (RI) figurent parmi les contaminants environnementaux et proviennent des éléments radioactifs naturellement présents dans les sols ou l'atmosphère. Leur présence dans l'environnement est accentuée par des rejets d'origine anthropique (production d'électricité, médecine, activités nucléaires), émetteurs d'éléments radioactifs. Ces rejets, bien que réglementés et surveillés, contribuent à augmenter l'exposition des écosystèmes aux RI. Les accidents exceptionnels de Tchernobyl en 1986 et plus récemment Fukushima-Daiichi en 2011 ont suscité de réelles préoccupations sociétales.

Historiquement, l'Homme était la cible à protéger et l'écosystème était considéré comme le vecteur de l'exposition humaine. Protéger de façon adéquate l'Homme revenait à protéger les autres espèces vivantes (ICRP, 1977). Depuis plus d'une décennie, l'émergence de l'évaluation du risque radioécologique a permis de déterminer des recommandations pour la protection des écosystèmes (ICRP, 2007). Une base de données issue de la littérature scientifique, portant sur les effets des RI sur un ensemble d'espèces animales et végétales a ainsi été développée (Copplestone et al., 2008; Howard and Larsson, 2008; Larsson, 2004). Cette base de données a permis de dériver un débit de dose pour lequel aucun effet n'est attendu (PNEDR : « Predicted No-Effect Dose Rate »), sur les écosystèmes aquatiques, de 10 $\mu Gy.h^{-1}$ (Garnier-Laplace et al., 2010).

L'évaluation du risque écologique (ERE) utilise principalement des données issues d'expositions à forte dose pour caractériser les effets des contaminants et les valeurs de protection. Pourtant, les espèces vivantes sont exposées dans l'environnement à des scénarios chroniques à faibles débit de dose. La caractérisation des mécanismes d'action suite à une exposition chronique est donc un prérequis pertinent à l'amélioration de l'évaluation du risque écologique. Cette caractérisation doit intégrer des analyses à l'échelle phénotypique et à l'échelle moléculaire dans le but de définir les processus biologiques impactés par les RI. A ce jour, peu d'études sur les RI s'appuient sur ce genre d'approche représentant pourtant un enjeu prioritaire pour une protection efficiente du biota.

L'ERE, applicable à tous types de contaminants, est fonde sur les recommandations de l'Organisation de Coopération et Développement Economiques (OCDE). Dans un contexte d'émergence de la compréhension des mécanismes d'action toxiques, l'OCDE a commencé depuis 2012, à soutenir des programmes dans le but de

développer l'approche des « Adverse Outcome Pathway » (AOP). L'AOP permet de décrire une réponse toxicologique, en utilisant des analyses pour établir un lien entre un événement moléculaire déclencheur et un effet indésirable à un niveau d'organisation biologique pertinent pour l'ERE.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse qui a pour objectif d'évaluer les effets reprotoxiques et leur transmission à la descendance chez le poisson modèle *Danio rerio* après irradiation gamma chronique. Ce manuscrit s'articule en six parties :

- Le **Chapitre I** est une synthèse bibliographique présentant de manière générale les RI et leur mode d'action sur les organismes vivant. Cette partie traite également des différents stades de vie et des processus biologiques engagés dans un contexte d'exposition à l'échelle de plusieurs générations. L'embryogenèse, la différentiation sexuelle et la gamétogenèse sont détaillés ainsi que les effets connus des RI sur ces processus. Enfin, l'importance du type d'exposition dans un contexte d'héritabilité des effets est abordée.

- Le **Chapitre II** précise les objectifs et les axes de recherche de ce travail de thèse ainsi que la stratégie expérimentale utilisée.

- Le **Chapitre III** traite des effets à l'échelle phénotypique d'une exposition multigénérationnelle. L'exposition conjointe des parents et de la descendance permet d'évaluer l'aggravation des effets à l'échelle phénotypique pour plusieurs débits de dose.

- Le **Chapitre IV** traite des mécanismes moléculaires à l'origine d'effets transmissibles. L'exposition parentale est déterminante dans le devenir de la descendance. Ainsi, les mécanismes de transfert maternel sont développés.

- Le **Chapitre V** traite de l'héritabilité des effets via les processus épigénétiques, en particulier la méthylation de l'ADN. L'étude de gènes cibles impliqués dans les processus biologiques essentiels a été déployée pour mesurer la méthylation de leurs promoteurs.

- Le **Chapitre VI** établit une synthèse des principaux résultats obtenus durant cette thèse ainsi qu'une discussion générale et propose des perspectives de recherche à ce travail.

Chapitre I – État de l’art

L'objectif de ce chapitre est de présenter un état de l'art sur les différentes études menées jusqu'à présent traitant de l'évaluation du risque écologique (ERE) et des effets des rayonnements gamma. Cette première partie traite de la radioactivité et de la radioprotection de l'environnement. Ensuite, les différents processus complexes du développement (développement embryonnaire, détermination du sexe et gamétogenèse) sont décrits ainsi que les mécanismes d'action des RI associés à ces processus biologiques. Enfin, les mécanismes d'héritabilité des effets au fil des générations, en fonction du type d'exposition, sont détaillés.

I.1 Les rayonnements ionisants : intérêt en écotoxicologie

I.1.1 Radioactivité et types de rayonnements

I.1.1.1 Généralités

La matière est constituée d'atomes, composés d'un noyau de protons et de neutrons, autour duquel gravitent des électrons. La radioactivité est un phénomène naturel et spontané (www.irsn.fr). Certains noyaux sont stables, d'autres présentant un déséquilibre protons/neutrons, sont instables. Ces derniers sont dits « radioactifs » et vont se désintégrer avec libération d'énergie émise sous forme de rayonnements. Un rayonnement est dit « ionisant » lorsqu'il traverse la matière en lui arrachant un ou plusieurs électrons. Les produits de la désintégration peuvent être stables ou instables, enchainant pour ces derniers une nouvelle réaction de désintégration. La recherche d'état plus stable par les noyaux est appelée la radioactivité.

I.1.1.2 Rayonnements particulaires et électromagnétiques

Plusieurs types de rayonnement existent (Nakashima and Duong, 2022). Il en existe deux classes : les particulaires (α et β) et les électromagnétiques (rayons γ et X).

- Les émetteurs particulaires α sont émis par des atomes possédant une trop grande quantité de protons ou de neutrons dans leur noyau. Au cours de la désintégration, le noyau émet un atome d'hélium (particule α), constitué de deux protons et de deux neutrons

- Les émetteurs particulaires β sont émis par des atomes ayant un écart important entre le nombre de protons et de neutrons dans leur noyau. Au cours de la désintégration, le noyau émet soit un électron (particule β−) soit un positron (particule β+).

- Les émetteurs électromagnétiques (γ et X) sont émis par des atomes possédant trop d'énergie. Au cours de la désintégration, le noyau émet une onde électromagnétique de même nature que la lumière.

Les rayonnements sont plus ou moins pénétrants selon leur perte d'énergie en traversant la matière : c'est le transfert d'énergie linéique (TEL), exprimé en KeV/µm. Une importante perte d'énergie par ionisation traduit une faible distance parcourue dans la matière, c'est le cas des rayonnements particulaires. Dans ce cas, le dépôt d'énergie se fait de façon localisée dans la matière. A l'inverse, les rayonnements électromagnétiques ont un faible TEL et sont ainsi beaucoup plus pénétrants. **Ainsi, les rayonnements de types γ et X représente un grand danger dû à leur fort pouvoir pénétrant** (Figure I- 1). Les rayonnements gamma sont émis notamment par le Césium-137 (137Cs) ou le Cobalt-60 (60Co).

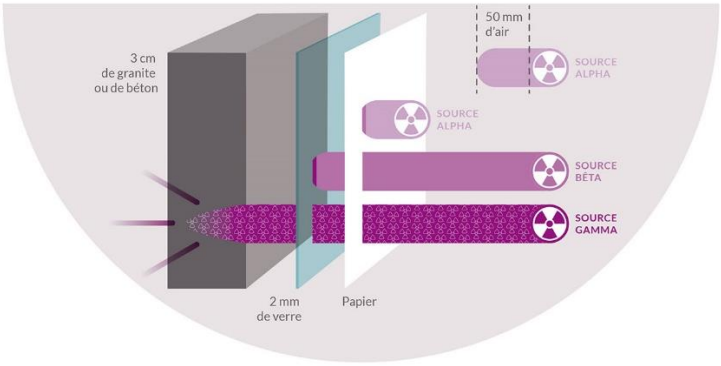


Figure I- 1 : Pouvoir pénétrant des différents types d'émissions radioactives. Source : infocrise.public.lu.

I.1.1.3 Grandeurs de la radioactivité

Une substance radioactive est caractérisée par son activité, qui correspond au nombre de désintégrations par seconde (Becquerel, Bq) et par la période radioactive (t1/2), qui correspond au temps nécessaire pour que l'activité initiale soit divisée par deux. Cependant, cette grandeur ne prend pas en compte les différents effets biologiques induits et ne permet pas l'évaluation du risque encouru.

Ainsi, en radiobiologie, d'autres unités sont couramment utilisées pour définir l'exposition :

- La dose absorbée en Gray (Gy) : elle correspond à la quantité d'énergie cédée par unité de masse. Un Gray correspond à un Joule d'énergie absorbée par kilogramme de matière (1 $J.kg^{-1}$).

- Le débit de dose absorbée en Gray par heure ($Gy.h^{-1}$) : il correspond à la dose absorbée (Gy) par unité de temps. **Il s'agit de la grandeur retenue pour l'évaluation du risque écologique.**

L'évaluation du risque des effets biologiques chez l'Homme est exprimée en Sievert (Sv). La dose absorbée (Gy) ne tient pas compte de la sensibilité des différents tissus, du type de rayonnement et de la durée d'exposition. Ainsi, le Sievert correspond au Gray pondéré par un facteur dépendant de différents paramètres : la nature du rayonnement et la sensibilité du tissu. Pour l'environnement, aucune pondération n'est prise en compte en fonction de l'´émetteur ou des tissus.

I.1.1.4 Sources de la radioactivité

Les différentes sources d'exposition à la radioactivité naturelle et anthropique sont représentées dans la Figure I- 2 (Bilan IRSN). Les radionucléides sont présents de manière naturelle dans le sol, l'eau et l'atmosphère, via quatre voies principales :

- Cosmique, correspondant aux photons et aux particules de haute énergie venant de l'espace. Le niveau d'exposition dépend de l'altitude et de la latitude.

- Tellurique, correspondant aux éléments radioactifs, par exemple l'uranium, présents depuis la formation de la Terre dans la croûte terrestre. Cette radioactivité diffère en fonction du type de sol.

- Atmosphérique : le radon, gaz radioactif émanant du sol et pouvant se concentrer dans les locaux. Il est issu de la désintégration du radium présent dans la croûte terrestre.

- L'incorporation d'éléments radioactifs naturels, correspondant à la présence de radionucléides naturels dans les denrées alimentaires.

Il existe également une origine anthropique à l'exposition aux RI :

- Exposition médicale : les RI sont utilisés dans le cadre de diagnostics et de thérapies radiologiques. Cependant, pour la radiothérapie, il s'agit d'actes particuliers à forte dose, ainsi, les patients ne sont pas pris en compte dans l'exposition générale de la figure suivante.

- Exposition industrielle : cela concerne les rejets des installations nucléaires. Ce sont des rejets contrôlés et règlementés.

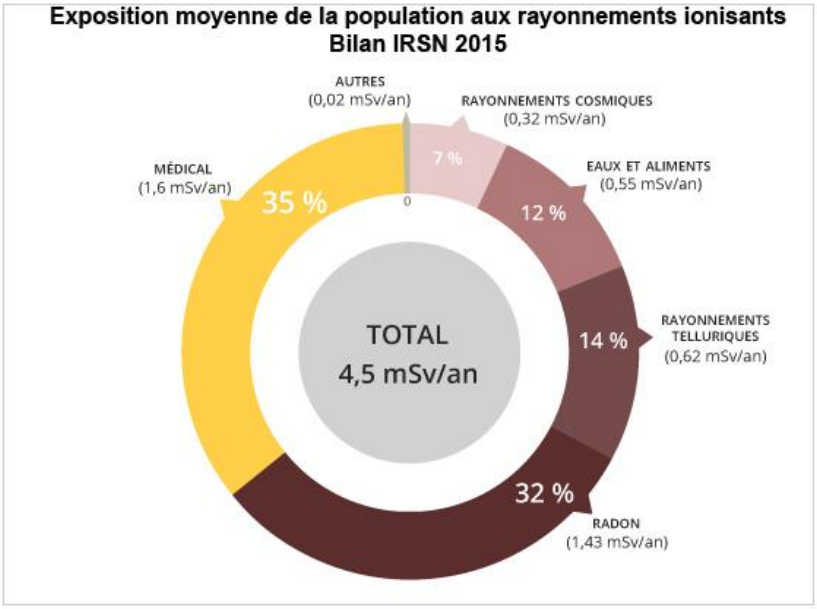


Figure I- 2 : Exposition moyenne de la population de France métropolitaine aux RI en 2015. Source : Bilan IRSN.

A l'inverse, il existe des rejets incontrôlés à caractères exceptionnels. Ces rejets englobent les retombées provenant des essais militaires nucléaires réalisés entre 1945 et 1980 ainsi que les accidents de centrales nucléaires produisant de l'électricité. L'accident nucléaire de Tchernobyl a eu lieu le 26 avril 1986 en Ukraine. Les principaux radionucléides mesurés en France en mai 1986 sont : l'iode 131, le tellure 132, le tellure 129m, le ruthénium 103, le césium 137, le césium 134 et le baryum. L'accident nucléaire de Fukushima-Daiishi a eu lieu le 11 mars 2011 au Japon et a conduit au rejet d'éléments radioactifs dans l'environnement (Iode, Césium, Tellure, Xénon et Krypton).

Du point de vue de la radioprotection, l'iode (131I) et le césium (137Cs) sont les principaux radionucléides à prendre en considération car ils sont à l'origine de la majeure partie de la radioexposition de la population. La période radioactive du Césium 137 est de 30 ans. En revanche, l'Iode 131 a une demi-vie de seulement 8 jours, suggérant que la plupart de la radioactivité présente dans l'environnement sur le long terme est représentée par le 137Cs (Chino et al., 2011). Lors de ces accidents, des rejets de Césium 137 dépassant les 600.000 Bq/m² ont été mesurés dans l'air (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, 2018, 2014).

La contamination des cours d'eau et marin est principalement due aux dépôts atmosphériques. Notamment dans la mer Baltique, les concentrations de césium 137 sont les plus élevées d'Europe (Agence Internationale de l'Energie Atomique, 1996). C'est également le cas à Fukushima où le Césium 137 est le radionucléide prépondérant dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Saito et al., 2015; Wada et al., 2016).

Le Césium est donc le radionucléide le plus présent dans tous les compartiments terrestres et aquatique. En se désintégrant, le Césium 137, émetteur β-, donne naissance au 137mBa, qui à son tour se désintègre en Baryum 137 stable en 2.55 minutes induisant une émission de rayonnement gamma (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, 2005).

À retenir

- Le rayonnement gamma est le plus pénétrant et donc le plus dangereux pour les tissus biologiques

- Le Césium 137 est un des radionucléides le plus rejeté suite aux accidents et est toujours présent dû à sa période radioactive

- La désintégration du Césium 137 induit l'émission de rayonnement gamma

QUELS SONT LES EFFETS DE TELLES EXPOSITIONS SUR LE BIOTA ?

I.1.2 Les mécanismes d'action des rayonnements gamma

I.1.2.1 Voies d'exposition

Les organismes peuvent être exposés de plusieurs façons aux RI. La contamination interne correspond à une ingestion ou une inhalation de radionucléides (principalement, les émetteurs alpha) à l'intérieur de l'organisme, où ils peuvent provoquer une irradiation qui persistera jusqu'à la décroissance radioactive ou l'élimination par l'organisme. Une contamination externe est également possible, dans le cas où la source est en contact avec la peau de l'organisme. **L'exposition externe survient quand un organisme est exposé à une source de rayonnements extérieure.** Cette exposition concerne les radionucléides émettant des rayons gamma ou X, qui sont suffisamment pénétrants pour traverser la matière et impacter potentiellement les organes en profondeur. Il s'agit d'une exposition qui ne cible pas un organe précis, comme la contamination interne, mais qui agit sur l'ensemble de l'organisme. Une telle exposition permet d'appréhender les effets sur l'organisme entier. Selon l'UNSCEAR (UNSCEAR, 2000), les principales voies d'exposition aux RI dans le milieu aquatique sont l'exposition externe aux radionucléides dans les sédiments (principalement des rayonnements gamma), et l'exposition interne via

l'ingestion de radionucléides incorporés dans la chaîne alimentaire (rayonnements particulaires).

À retenir

- Césium 137 principale source d'exposition externe

- Exposition externe permet d'évaluer les effets sur l'organisme entier

EXPOSITION EXTERNE PLUS PERTINENTE POUR L'ETUDE DES RAYONNEMENTS GAMMA

I.1.2.2 Les mécanismes de toxicité

Les rayonnements ionisent et excitent la matière. Ces actions aboutissent à la dégradation des molécules constitutives et essentielles à la survie des cellules. Ces effets peuvent subvenir par action indirecte ou directe (Averbeck, 2000). Les effets directs correspondent à l'ionisation directe d'un atome d'une molécule biologique. Les effets indirects sont causés par l'action du rayonnement sur les molécules d'eau conduisant à la radiolyse de l'eau (Figure I- 3). Ce phénomène est le principal processus d'action du rayonnement gamma. En effet, les organismes étant principalement constitués d'eau, la probabilité d'interaction du rayonnement est plus grande avec l'eau qu'avec les macromolécules biologiques (Azzam et al., 2012; Desouky et al., 2015). Sous l'effet des radiations, les molécules d'eau peuvent soit subir un processus d'excitation, soit un processus d'ionisation. **La radiolyse de l'eau mène à la formation de radicaux libres, appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO)**. Le stress oxydant a été identifié comme un élément clé responsable des effets phénotypiques observés chez de nombreuses espèces non humaines (Tollefsen et al., 2022).

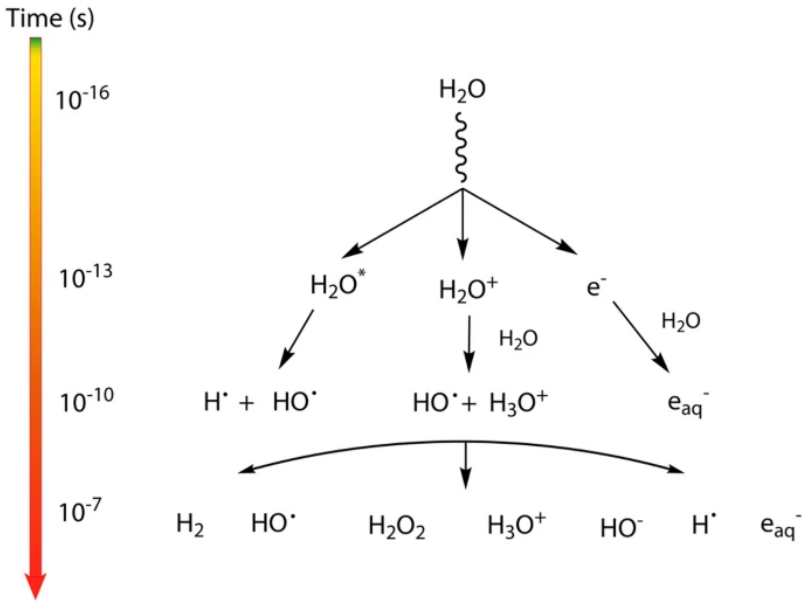


Figure I- 3 : Production d'espèces réactives de l'oxygène par radiolyse de l'eau en fonction du temps. (Lousada et al., 2016).

Les EROs sont produits naturellement dans les cellules via la consommation d'oxygène, mais de nombreux polluants sont connus pour accentuer cette génération. C'est le cas des RI. Les antioxydants sont présents dans les organismes afin de rétablir l'équilibre oxydatif. Ce sont des mécanismes de défense très étudiés en écotoxicologie (Pan et al., 2018; Regoli et al., 2002; Velki et al., 2017; Zhang et al., 2016a). Lorsque que les mécanismes de défense atteignent une limite et que l'équilibre est rompu, les cellules subissent un **stress oxydant** (Figure I- 4). De plus, les RI provoquent un dysfonctionnement de la chaine de transport des électrons dans les mitochondries, ce qui accentue la production d'ERO. Le stress oxydant mène alors à la dégradation radio-induite de biomolécules telles (Spitz et al., 2004) :

- L'ADN

Les dommages (cassures simple et double brin, altérations de base) induits par les RI (Praveen Kumar et al., 2017; Reisz et al., 2014), peuvent être réparés, ou déclencher des effets à court terme tels qu'une mortalité cellulaire (apoptose ou nécrose), et des modifications génétiques transmissibles à la descendance (mutation) lorsqu'elles ont lieu dans les cellules germinales (Lemos et al., 2017). Les mutations peuvent entraîner des répercussions sur les cellules germinales, pouvant ainsi modifier le devenir des populations et à long terme des écosystèmes. Des modifications génétiques ont ainsi été observées pour un débit de dose élevé (0,95 $Gy.min^{-1}$ pendant 5 et 10 jours) sur la descendance chez le Medaka, *Oryzias latipes* (Shimada and Shima, 2001). Pour pallier à ces lésions radio-induites, la cellule met en place des systèmes de réparation spécifiques aux dommages de l'ADN (Christmann et al., 2003; Smith and Jackson, 1999). Les cassures double brins sont les plus rares, mais également les plus

dangereuses et difficiles à réparer. La réparation de ces cassures fait intervenir deux systèmes. Le système HR utilise un chromosome homologue pour une reconstruction à l'identique permettant une réparation fidèle. Le système NHEJ reforme les liaisons cassées entre les bases sans restaurer la séquence initiale conduisant à une réparation infidèle. Les dommages à l'ADN induits par les rayonnements gamma, chez le bivalve *P. malabarica* (Praveen Kumar et al., 2014) sont très importants lors des premières heures d'irradiation puis diminuent au fur et à mesure. Des dommages ont été observés via le test des comètes, qui est également utilisé pour les vertébrés aquatiques (Gagnaire et al., 2015; Pereira et al., 2011; O. Simon et al., 2011b).

- Les protéines

La modification des acides aminés (oxydation, substitution, suppression) par les RI peut altérer les protéines. Après irradiation, les protéines peuvent être oxydées et inactivées. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles à l'action des protéases et du protéasome. Un des effets courants après irradiation de cette oxydation est la carbonylation des protéines (Dubois et al., 2018; Hoerter et al., 2005; McBride et al., 2003; Štajner et al., 2007).

- Les lipides

Ils sont la cible des radicaux hydroxyles, entrainant la peroxydation lipidique. Les produits de la peroxydation lipidique sont stables, toxiques et peuvent moduler l'autophagie (Ayala et al., 2014). La peroxydation lipidique par l'irradiation a déjà été observée (Kergonou et al., 1986, 1981; Ye et al., 2020).

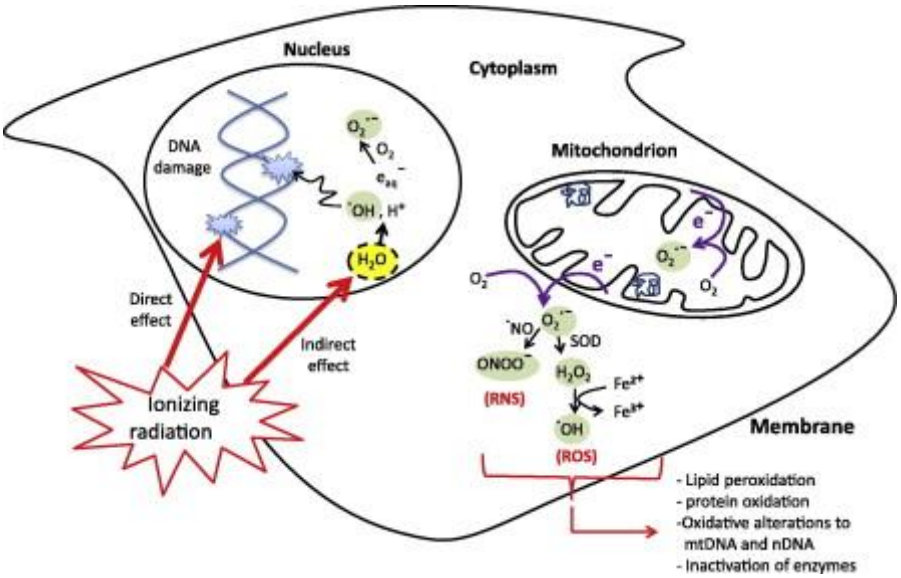


Figure I- 4 : Schéma des mécanismes d'action (direct et indirect) des RI dans les cellules. Source : Azzam et al., 2012.

À retenir

- Rayonnement gamma induit la radiolyse de l'eau

- La production d'EROs entraine un stress oxydant

- L'ADN et autres macromolécules biologiques sont ciblés par les ERO

- Les mutations de l'ADN peuvent être héritées via les cellules germinales

NECESSITE D'ETUDIER LES EFFETS SUR LES MACROMOLECULES INDISPENSABLES A L'ORGANISME ET IN FINE AUX POPULATIONS

I.1.3 Radioprotection

La radioprotection consistait en premier lieu à la protection de l'Homme, considéré comme espèce la plus sensible. Par conséquent, l'Homme était la cible à protéger et l'environnement était considéré uniquement comme vecteur de contamination vers l'homme. A partir des années 90, ce postulat a évolué ; les données d'effets acquises sur les espèces non humaines conduisent à un consensus international (CIPR, AIEA, UNSCEAR etc.) sur la nécessité de mettre en place un système de protection de l'environnement comparable à celui développé pour les substances chimiques stables. La CIPR n° 91 (2003) instaure la radioprotection de l'environnement. Ce consensus a mené à la création d'une base de données FRED ERICA (projet européen FASSET) qui regroupe des données des effets (morbidité, mortalité, capacité de reproduction, mutations) des RI sur des espèces animales et végétales (Copplestone et al., 2008), dans le but de définir des valeurs de référence pour la protection des écosystèmes. Seuls les effets déterministes ont été pris en compte pour la mise en place d'un système de radioprotection de l'environnement, en 4 étapes (formulation du problème, analyse des expositions, analyse des effets et caractérisation du risque). Le système repose sur 2 hypothèses majeures telles que la sensibilité de l'écosystème dépend de l'espèce la plus sensible et la protection de la structure de l'écosystème revient à protéger son fonctionnement.

I.1.3.1 Les valeurs de référence

Des premières valeurs de protection sont définies en 2008 (UNSCEAR, 2008). Les débits de dose de 100 µGy.h^{-1} et de 400 µGy.h^{-1} sont définis comme n'ayant pas d'effet néfaste sur les populations terrestre et aquatique, respectivement. Le projet ERICA (5ème PCRD) a également permis de définir une EDR_{50} (doses induisant 50% de l'effet en cas d'exposition aiguë) ou EDR_{10} (débits de dose induisant 10% de l'effet en cas d'exposition chronique). Ces valeurs sont utilisées dans les modèles de distribution de

sensibilité d'espèces (SSDs) et ont permis la définition d'une valeur seuil pour la protection des écosystèmes de 10 µGy.h^{-1} (Garnier-Laplace et al., 2010).

La CIPR a proposé un cadre de protection fondé sur l'utilisation d'animaux et de plantes de référence (RAP) (ICRP, 2008). Un RAP est défini comme « a hypothetical entity, with the assumed basic characteristics of a specific type of animal or plant, as described to the generality of the taxonomic level of Family, with defined anatomical, physiological, and life-history properties, that can be used for the purposes of relating exposure to dose, and dose to effects, for that type of living organism ». Les effets potentiels de l'exposition aux rayonnements ont été consolidés à partir des données de la littérature et utilisés pour produire des « derived consideration reference levels » (DCRL), représentant une gamme de débits de dose susceptible de produire des effets délétères sur un RAP. Les poissons sont représentés par la truite et les poissons plats (Tableau I- 1).

Tableau I- 1 : « derived consideration reference levels » (DCRL) chez les poisons. Source : ICRP, 2008.

Dose rate (mGy.d^{-1})	Reference Trout	Reference Flatfish
>1000	Mortality in embryos (0.3 to 19 Gy LD_{50}) depending on embryonic stage	Mortality in adults ($LD_{50/50}$ 30 Gy) mortality in eggs (LD_{50} 1 Gy)
100-1000	Potential for increased morbidity	Some mortality expected in larvae and hatchlings
10-100	Some deleterious effects expected on young fish, e.g., reduction in resistance to infections. Reduced reproductive success	Reduced reproductive success
1-10	Possible reduced reproductive success	Possible reduced reproductive success due to reduced fertility in males
0.1-1	No information	No information
0.01-0.1	No information	No information
<0.01	Natural background	Natural background

I.1.3.2 Méthodologie de l'évaluation du risque écologique (ERE)

I.1.3.2.1 Relation dose-réponse

Dans la zone d'exclusion de Tchernobyl, les débits de dose actuels ne dépassent pas les 100 µGy.h^{-1} (2.4 mGy.d^{-1}) (Beresford et al., 2020a; Lecomte-Pradines et al., 2020). Ainsi, selon les DCRLs, ce débit de dose se situe dans la première gamme susceptible d'engendrer des effets. Cependant, les effets dans l'environnement ne sont pas directement liés à l'exposition actuelle, mais peuvent être la conséquence de débits de dose beaucoup plus élevés dans le passé. **La prise en compte de la durée d'exposition est donc nécessaire, notamment dans le cas où les populations sont exposées sur plusieurs générations**. Pourtant, dans certains cas, les valeurs seuils pour les expositions chroniques sont extrapolées à partir des données d'expositions aigues (Beaugelin-Seiller et al., 2020). Par exemple, dans la base de données FREDERICA, 65 % des données proviennent d'expositions aigues. De plus, les mécanismes d'action ne sont souvent pas les mêmes entre faible et forte doses (Belli and Tabocchini, 2020; MotherSill and Seymour, 2012; Tubiana et al., 2006). **Ceci remet en question les valeurs de référence utilisées pour la protection des écosystèmes. Il est nécessaire d'augmenter les données principalement issues d'expositions chroniques et de vérifier l'extrapolation des données à différents débits de dose.** Des expositions chroniques à **l'échelle multigénérationnelle** semblent adéquates pour évaluer le devenir des populations dans un tel contexte. Des effets multigénérationnelles après irradiation gamma ont déjà été mis en évidence sur des invertébrés aquatiques (Parisot et al., 2015; Trijau et al., 2018). En revanche, une seule étude a évalué les effets multigénérationnels sur vertébrés aquatiques (Hurem et al., 2018a, 2018b).

I.1.3.2.2 Tests standardisés

Le paragraphe précédent soulève un manque de données utilisables pour l'ERE à l'échelle multigénérationnelle afin d'évaluer au mieux le devenir des populations en cas d'exposition à des contaminants. Les tests standardisés OCDE sont utilisés pour évaluer les effets dans un protocole cadré. La radioprotection tout comme l'évaluation du risque de manière générale (pour les chimiques) s'appuient sur ce genre de tests pour définir les valeurs seuils. Les études sur les vertébrés aquatiques étant rares, nous avons choisi de détailler les tests existant pour ce sous-embranchement (Tableau I- 2).

Seulement deux tests OCDE sont déployés à l'échelle multigénérationnelle (229 et 240, Tableau I- 2). Le test MEOGRT n°240 n'est utilisable que sur une seule espèce, le medaka. Pourtant, la variabilité inter-espèce de la réponse existe (Spurgeon et al., 2020) et devrait à notre sens être prise en compte. De plus, ce test est recommandé

principalement pour les substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens (PE). Le n°229 n'évalue pas tous les stades biologiques, en exposant seulement l'adulte mature (gamétogenèse tardive) et les premiers stades de vie de la descendance (embryogenèse), ces derniers étant considérés comme les plus sensibles (Adam-Guillermin et al., 2018). En conclusion, peu de tests comportent des expositions multigénérationnelles. De plus, l'exposition unique des stades embryonnaires ne prend pas en compte l'exposition de tous les processus biologiques du cycle de vie pouvant affecter le devenir des populations. Dans le cadre des RI et compte tenu de leur sensibilité suspectée, les stades de vie précoces chez vertébrés aquatiques ont largement été étudiés (Gagnaire et al., 2015; Hurem et al., 2017b; Murat El Houdigui et al., 2019; O. Simon et al., 2011b). En revanche à notre connaissance seulement une première étude a émergé sur vertébré aquatique après exposition multigénérationnelle au rayonnement gamma (Hurem et al., 2018a, 2018b). Déjà dans cette première étude, l'intérêt d'étudier parents et descendance apparait clairement.

Les expositions multigénérationnelles permettent également d'exposer toutes les étapes de développement telles que l'embryogenèse, la détermination du sexe, la différentiation des gonades, et la gamétogenèse. Le test n°210 englobe tous ces stades selon la recommandation d'exposition (Tableau I- 2), ce qui permettrait d'évaluer les effets sur les différents processus complexes du développement, essentiels au devenir des populations. Cependant, l'objectif de ce test n'est pas d'évaluer les effets sur tous les processus biologiques majeurs mais seulement de définir des concentrations effectives sur des paramètres classiques telles l'éclosion et la survie.

La majorité des tests standardisés ne prennent donc pas en compte les expositions chroniques à l'échelle multigénérationnelle pour l'ERE. Or, comme expliqué précédemment, la durée d'exposition aux RI conditionne l'intensité des effets. De plus, la majorité des tests consiste en l'évaluation d'effets phénotypiques. D'une part, leur mesure sur le terrain peut s'avérer complexe et d'autre part, leur altération représente une réponse tardive, difficilement remédiable. Ce constat a conduit au développement de biomarqueurs, précoces et sensibles pour évaluer des effets à des échelles biologiques plus fines.

Tableau I- 2 : Synthèse des tests standardisés de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), pour les poissons. Source : www.oecd-ilibrary.org.

No.	Titre	Date de création	Stade début de l'exposition	Durée d'exposition	Mesures	Commentaire
203	Poisson, essai de toxicité aiguë	12/05/1981	Juvéniles	96h	CL50	
210	Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie	17/07/1992	Œufs	30 jours recommandés (*Danio rerio*)	Malformations, éclosion, survie	
212	Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin	21/09/1998	Œufs	Jusqu'à la résorption du sac vitellin	Malformations, éclosion, survie	
215	Poisson, essai sur la croissance des juvéniles	21/01/2000	Juvéniles	28 jours	Survie, poids	
229	Essai à court terme de reproduction des poissons	07/09/2009	Adultes matures	21 jours	Fécondité, caractères sexuels secondaires, vitellogénine	
230	Essai de 21 jours sur les poissons : un dépistage à court terme de l'activité oestrogénique, et androgénique et de l'inhibition de l'aromatase	07/09/2009	Adultes matures	21 jours	Caractères sexuels secondaires, vitellogénine	Test sur les substances avérées PE
234	Essai de développement sexuel des poissons	28/07/2011	Œuf	60 jours	Vitellogénine, sexe ratio	Test sur les substances potentiellement PE
236	Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire	26/07/2013	Œuf	96h	CL50	
240	Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT)	28/07/2015	Adultes matures	F0 : 21 jours ; F1 : 14 semaines ; F2 : 14 jours	Fécondité, survie, éclosion, vitellogénine, caractères sexuels secondaires	Test sur les substances potentiellement PE

I.1.3.2.3 Les biomarqueurs

En écotoxicologie, le biomarqueur correspond à un paramètre biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui peut être mesuré dans les organismes afin de mettre en évidence l'exposition ou les effets de contaminants (Depledge and Fossi, 1994). Le biomarqueur sert d'indicateur d'alerte précoce d'effets sur les individus ou les populations (Forbes et al., 2006). Cependant, la mesure dans laquelle les biomarqueurs sont capables de fournir des indicateurs non ambigus et écologiquement pertinents de l'exposition ou des effets des substances toxiques reste très controversée. Il est indispensable avant de définir un biomarqueur pertinent de comprendre sa mécanistique, de la molécule au phénotype, pour valider son utilisation (Forbes et al., 2006; Garric et al., 2010). En effet, il est souvent difficile de discriminer les facteurs confondants des réponses suite à une exposition aux contaminants. Les biomarqueurs peuvent donc être utiles pour la génération d'hypothèses dans des expériences soigneusement contrôlées. Dans un contexte de surveillance environnementale, l'objectif est de prévoir les effets sur les populations et écosystèmes soulignant la nécessité d'améliorer la détermination des biomarqueurs. L'office français de la biodiversité (OFB) a récemment initié le projet « Biomarqueurs et Biodiversité » soulignant l'intérêt de cette approche pour la surveillance opérationnelle des masses d'eau côtière continentales, et de transition dans le contexte de la Directive Cadre sur l'Eau. Un travail d'enquête approfondi auprès de 15 laboratoires de recherche français a ainsi permis de référencer 331 couples espèce/biomarqueur, de les évaluer selon leur maturité opérationnelle et de caractériser leurs limites, leur spécificité et leur pertinence écologique dans un objectif de surveillance réglementaire des milieux aquatiques. Enfin, les **approches écotoxicogénomiques** semblent idéales pour la compréhension des effets des contaminants et pour l'ERE.

I.1.3.3 Émergence des AOPs

Les approches écotoxicogénomiques sont fondés sur l'utilisation de données « omiques » pour caractériser et quantifier les changements moléculaires et biochimiques. Ce type de données permet une génération rapide et importante de données sur les effets biologiques, incluant une multitude de voies biologiques. **Ces approches écotoxicogénomiques facilitent le développement d'Adverse Outcome Pathway** (AOP). L'AOP est un modèle qui permet d'identifier la séquence des effets d'une substance sur un organisme, d'un événement initiateur à l'échelle moléculaire et cellulaire, jusqu'à la production d'un effet délétère sur les populations. Ce type de modèle contribue à l'évaluation du risque à travers une vision mécanistique des effets d'un contaminant. Ainsi, **cette approche avec compréhension complète permettrait d'identifier des biomarqueurs plus pertinents et très spécifiques d'une contamination**. En 2012, L'OCDE a notamment créé un programme pour le développement des AOPs à intégrer dans l'ERE.

À retenir

- Une valeur générique pour la protection des écosystèmes 10 µGy.h^{-1}

- Nécessité d'une prise en compte d'expositions plus environnementalement réalistes

- Intérêt des expositions multigénérationnelles : exposition chronique et de tous les processus biologiques

- Utilisation des approches écotoxicogénomiques pour la définition de biomarqueurs pertinents

NECESSITE D'AUGMENTER LES DONNEES SUR L'IRRADIATION POUR L'ERE

I.2 Développement embryonnaire

La partie précédente a révélé la nécessité d'évaluer des modalités d'exposition proches des conditions *in situ* et sur les vertébrés aquatiques. Ainsi, les parties suivantes présentent tous les processus biologiques du développement et qui sont des paramètres démographiques clés dans le maintien des populations, sur le modèle biologique *Danio rerio*. Ce poisson est couramment utilisé en écotoxicologie (Baker et al., 2014). En premier lieu, les stades de développement embryonnaires (embryogenèse) sont les processus jugés particulièrement sensibles aux contaminants, et notamment au rayonnement gamma. L'embryogenèse correspond aux processus de divisions et différentiations cellulaires qui interviennent pendant les stades précoces du développement. L'embryogenèse commence au moment de la fécondation après l'achèvement de la méiose et se termine au moment de l'éclosion (48-72 hpf) (Kane and Kimmel, 1993).

I.2.1Les stades de développement

L'embryogenèse du poisson zèbre se divise en sept stades avant le stade larvaire (Kimmel et al., 1995, Figure I- 5).

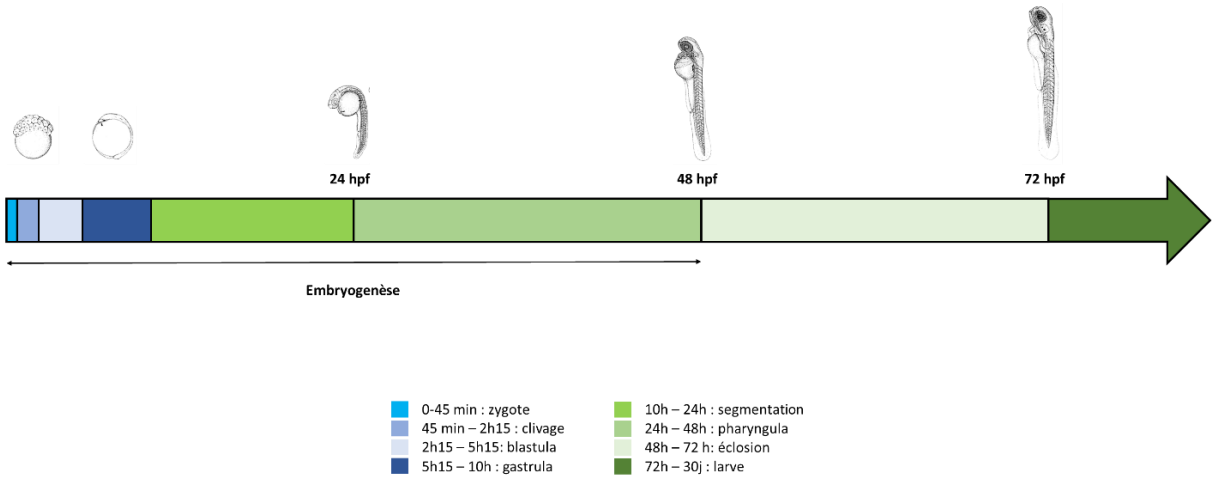


Figure I- 5 : Stades de développement du poisson zèbre. Adaptation d'après Kimmel et al., 1995.

- Le stade zygote :

Le chorion se gonfle et se détache de l'œuf post-fécondation. Les pôles animal et végétal se mettent en place. Les œufs sont constitués en grande majorité de vitellus, maternellement apporté et indispensable à l'énergie de l'embryon.

- Le clivage :

Ce stade comporte des divisions mitotiques rapides dépendantes de facteurs maternels déposés dans l'œuf. Des détails seront donnés ultérieurement sur ces facteurs. Les clivages résultent de la division du cytoplasme au niveau du pôle animal. Les divisions sont dites méroblastiques car elles ne sont que dans une partie précise de l'œuf, permettant de ne pas couper le vitellus. Six clivages ont lieu durant ce stade pour atteindre un stade à 64 cellules (Blastomères).

- La blastula :

Au cours des premières divisions de l'embryon, le développement précoce est dépendant des facteurs maternels. Cependant, à partir du stade 512 cellules, la majorité des ARNm maternels sont dégradés par des miARNs et des protéines de l'embryon. C'est la transition mi-blastuléenne. À partir de ce stade, les cellules de l'embryon suivent leur destin cellulaire selon les territoires présomptifs. En parallèle, des cellules (blastomères) fusionnent avec la réserve vitelline pour former la couche vitelline syncytiale (Yolk Syncytial Layer, YSL). Il s'agit d'une particularité unique aux téléostéens, essentielle pour la détermination des axes embryonnaires. L'épibolie commence et les axes embryonnaires (dorso-ventral, antéro-postérieur) sont déterminés moléculairement. Les axes sont définis via une localisation précise de molécules issues de voies de signalisation :

- Les BMP (Bone Morphogenic Proteins) pour l'axe dorso-ventral, plus particulièrement pour l'identité ventrale

- La voie Wnt/β-caténine pour l'axe dorso-ventral, plus particulièrement pour l'identité dorsale

- Les facteurs Activine et Nodal pour l'axe antéro-postérieur

- La gastrulation :

L'épibolie se poursuit et se termine, jusqu'à ce que toute la réserve vitelline soit recouverte de cellules embryonnaires. Les axes embryonnaires sont visibles tout comme les régions de l'embryon (tête, queue).

- La segmentation :

Durant ce stade, l'embryon s'allonge et les ébauches d'organe deviennent visibles. Le développement des somites commence, ils donneront les vertèbres, les muscles striés squelettiques, le derme et l'hypoderme.

- La pharyngula :

Ce stade commence 24 heures après la fécondation, l'axe du corps se redresse autour du sac vitellin. La circulation, la pigmentation et les nageoires commencent à apparaitre. Le cœur est visible et des mouvements musculaires spontanés commencent.

- L'éclosion :

L'éclosion a lieu entre 48 et 72 hpf. Pendant cette période, la morphogenèse des ébauches d'organes primaires se termine. Les embryons éclosent de façon asynchrone, sous la dépendance de libération d'enzymes d'éclosion et de mouvements embryonnaires permettant la déchirure mécanique du chorion. Après l'éclosion, le stade larvaire commence et se termine à la détermination sexuelle. Les larves sont nourries par la réserve vitelline jusqu'à 5 jours (Hernandez et al., 2018), puis deviennent autonomes et commencent des comportements de prédation.

I.2.2Contrôle parental de l'embryogenèse

La production d'embryons viables est dépendante du bon déroulement des stades présentés précédemment, mais ces derniers sont en lien direct avec des apports parentaux. Les parents peuvent fortement influencer la qualité des œufs (Brooks et al., 1997). Le principal apport parental est leur ADN. Les gamètes transmettent une information génétique et épigénétique qui sera détaillée ultérieurement. La principale cible connue des RI étant l'ADN, une exposition à ce type de stresseur est susceptible d'entrainer une sensibilité de l'embryon en cas de dommages des ADN parentaux (Grygoryev et al., 2013; Hurem et al., 2018a; Lemos et al., 2017; Wdowiak et al., 2019). Une information à prendre en compte est l'incapacité paternelle à réparer les dommages au niveau des gamètes altérés (Cabrita et al., 2011; Herráez et al., 2017; Hulak et al., 2013). Les gamètes maternelles sont en revanche capable d'apporter la machinerie de réparation de l'ADN (Herráez et al., 2017; Pérez-Cerezales et al., 2010). Compte tenu de cette spécificité, les principaux apports et mécanismes, nécessaires à la descendance, sont apportés maternellement. Ainsi, les facteurs maternels ont été détaillés dans cette partie.

I.2.2.1 Vitellogénine

Parmi les apports maternels essentiels, nous avons vu précédemment que l'énergie embryonnaire dépendait de la consommation du vitellus inclus dans les ovocytes matures (Carnevali et al., 2001). Le vitellus est composé initialement de vitellogénine (VTG), une phospholipoglycoprotéine. Les protéines du vitellus sont synthétisées principalement dans le foie sous contrôle des œstrogènes (Yilmaz et al., 2021). Chez le poisson zèbre, l'expression des gènes de la VTG est également retrouvée dans l'intestin et les ovaires, montrant qu'il existe ainsi d'autres sources de production de la VTG. Chez les téléostéens, il existe trois types de VTG : VTG A, VTG B et VTG C, toutes incorporées dans l'ovocyte (Lubzens et al., 2010).

La VTG est séquestrée depuis le sang pour être incorporée aux ovocytes (Van der Ven et al., 2003). Elle parvient à l'ovocyte puis est endocytée (Figure I- 7). Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les lysosomes. À l'intérieur de ce complexe vésicules d'endocytose/lysosomes, les VTG sont clivées par des enzymes lysosomales, comme la cathepsine D (Yilmaz et al., 2021, 2018), en protéines constitutives du vitellus (Figure I- 6):

- LvH : lipovitelline, chaîne lourde
- LvL : Phosvitine, chaîne légère

- Composants β' et C

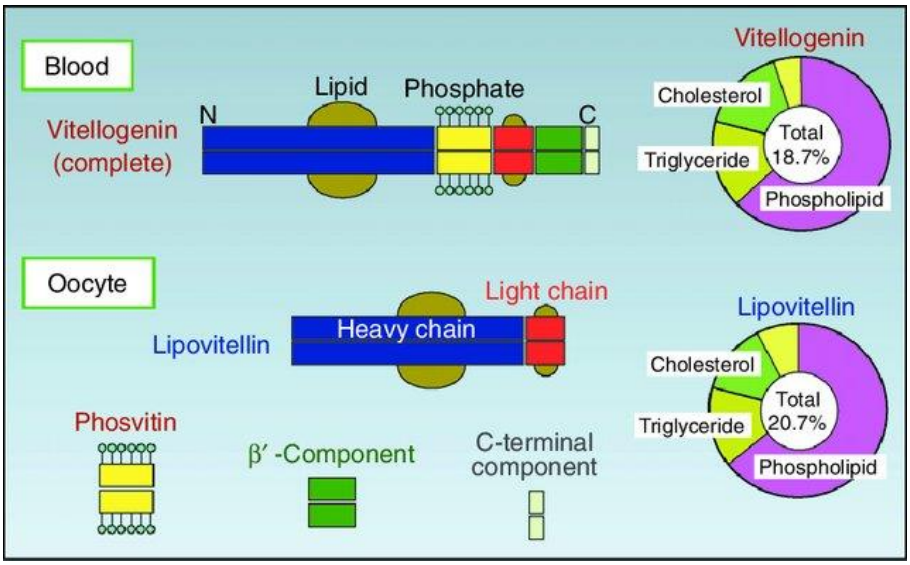


Figure I- 6 : Organisation des domaines de la vitellogénine native dans le sang et ses produits protéiques dans le corps jaunes des ovocytes en croissance. (Reading and Sullivan, 2011).

L'absorption de la VTG et sa lyse par les ovocytes sont un mécanisme majeur pour leur croissance (Figure I- 7). Une mauvaise qualité des œufs est généralement associée à un mauvais clivage de la VTG pendant la maturation des ovocytes (Carnevali et al., 2001). Une altération de la production de VTG, de son absorption ou de sa lyse serait drastique pour le développement embryonnaire.

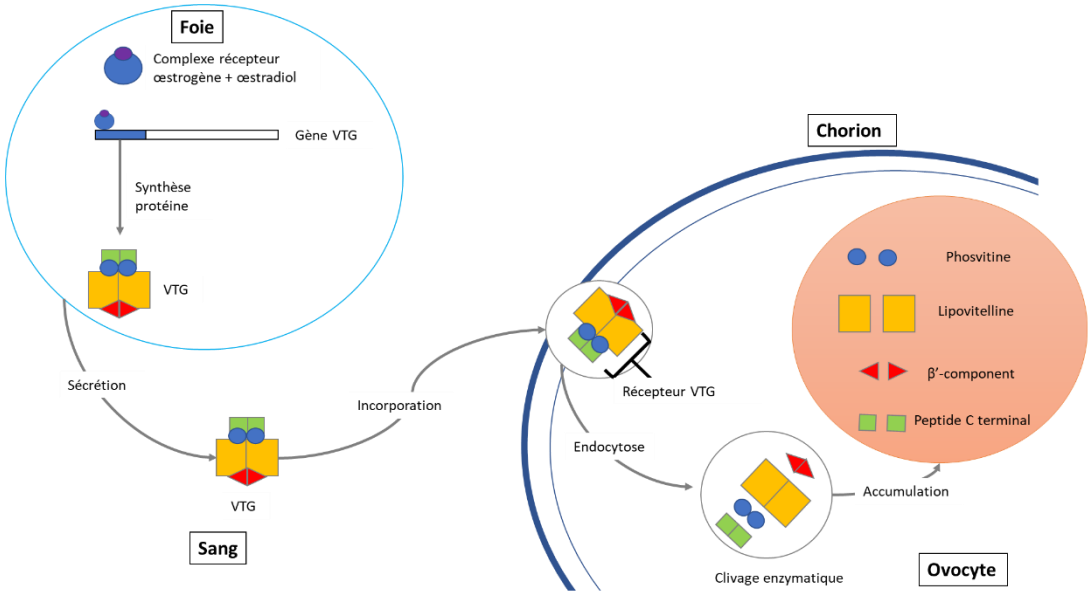


Figure I- 7 : Modèle d'absorption de la vitellogénine par l'ovocyte depuis sa production dans le foie. Adaptation d'après Hara et al., 2016.

I.2.2.2 Cortisol

Le cortisol est considéré comme l'hormone du stress. Il s'agit d'un glucocorticoïde impliqué dans l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal chez les téléostéens. Suite à un stress, l'hormone corticotropin relasing factor (CRF) stimule la libération de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse. À son tour, l'ACTH stimule les cellules stéroïdogènes dans le tissu inter rénal pour produire du cortisol. Le cortisol permet la mobilisation de substrats énergétiques stockés et la production de glucose pour palier à la demande immédiate d'énergie suite au stress pour restaurer l'homéostasie (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016, 2013). Une élévation importante en cortisol altère les fonctions de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, avec notamment une réduction de gonadotropines et une inhibition du récepteur aux œstrogènes (ER). Le cortisol a un impact sur la stéroïdogenèse puisqu'il est un inhibiteur de la production d'œstradiol (Faught and Vijayan, 2018). Ainsi, cortisol, œstradiol et VTG sont étroitement liés puisque la production d'œstradiol conditionne la synthèse de VTG (Figure I- 8).

De plus, pendant la vitellogenèse, le cortisol maternel est incorporé à la réserve vitelline. Peu de données concernent la dynamique du cortisol maternel et la compréhension des mécanismes du dépôt dans les ovocytes (Nesan and Vijayan, 2016). L'excès de cortisol contenu dans les ovocytes pourrait directement perturber la descendance (Figure I- 8).

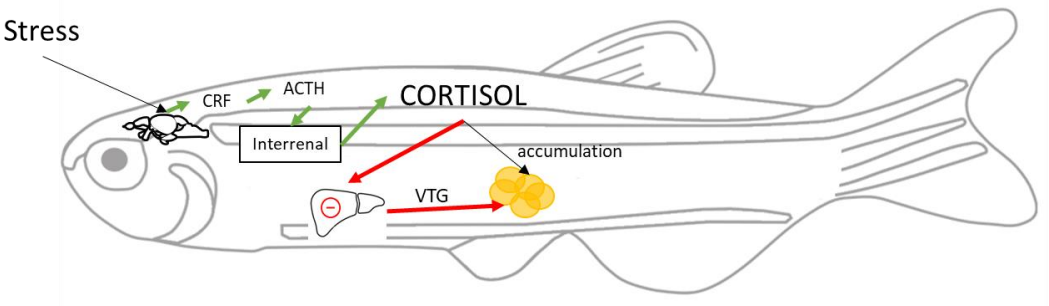


Figure I- 8 : Schéma représentant l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-inter rénal chez les téléostéens après exposition à un stress. L'activation de l'axe entraine la synthèse de cortisol. Adaptation d'après Faught and Vijayan, 2018.

Le taux de cortisol maternel persiste puis diminue au cours de l'embryogenèse, jusqu'à ce que l'embryon synthétise le cortisol *de novo*. La production du cortisol commence vers l'éclosion, ce qui indique que le développement précoce est dépendant du cortisol maternel déposé avant fécondation (Nesan and Vijayan, 2013, 2012). Chez le poisson zèbre, une teneur basse ou élevée en cortisol peut altérer le programme de développement et le comportement (Best and Vijayan, 2018; Colson et al., 2015; Faught and Vijayan, 2018). Après injection de cortisol dans la réserve vitelline d'embryons au stade 1 cellule (mimant une augmentation de cortisol maternel), des œdèmes cardiaques et des malformations majeures sont observés (Nesan and Vijayan, 2013). Compte tenu de l'accumulation de cortisol dans les ovocytes, en cas

de stress maternel, la régulation de la teneur en cortisol chez les embryons après fécondation est importante pour le développement (Nesan and Vijayan, 2012). Deux mécanismes existent pour la régulation des concentrations en cortisol :

- 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β-HSD2)

Pour pallier un apport trop important en cortisol, les follicules ovariens possèdent une enzyme, la 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β-HSD2), qui catalyse la conversion du cortisol en cortisol biologiquement inactif (cortisone) (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016).

- Les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)

Les GR sont apportés par le géniteur femelle et permettent la régulation du cortisol circulant. Le renouvellement des transcrits de ces récepteurs a lieu après la transition au mid-blastula (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016, 2013). Les GR permettent avec le cortisol comme ligand, de fonctionner comme facteur de transcription. Des poissons « knock-out GR » ont un axe hypothalamus-hypophyse-inter rénal très actif avec surproduction de cortisol. Ce cortisol est ensuite transféré à la descendance ce qui montre également un rôle de régulation des concentrations en cortisol par les GR. De plus, la diminution des GR augmente l'apoptose embryonnaire (Nesan and Vijayan, 2013). Une altération des GR empêcherait la liaison du cortisol à son récepteur. D'une part, le cortisol circulant ne serait alors pas diminué et d'autre part, les complexes GR/cortisol ne pourraient réguler les gènes cibles, entrainant des effets délétères.

I.2.2.3 Vitamines

Les vitamines sont des composés à l'état de trace nécessaires pour la croissance et la reproduction. Elles arrivent à la descendance par la voie maternelle, de même manière que les lipides. Durant l'ovogenèse, les vitamines A et E sont recrutées depuis les tissus périphériques et les muscles des femelles. Leur déplacement jusqu'à l'ovocyte dépend des particules de lipoprotéines via la voie de transport endogène. Ces deux vitamines sont nécessaires au développement de l'embryon. La vitamine E agit comme antioxydant, tout comme la vitamine A qui permet également la régulation de la transcription de gènes chez l'embryon. Cependant, la voie des vitamines reste encore inconnue bien qu'elle contribue à la qualité de l'œuf (Lubzens et al., 2010).

I.2.2.4 Les ARNm maternels

Les transcrits maternels supportent les premiers stades de vie chez le poisson zèbre (Andersen et al., 2013; Dosch et al., 2004; Pelegri, 2003). Le développement

embryonnaire est marqué par une cascade d'activation et d'inactivation de gènes après fécondation. Chez le poisson zèbre, il existe une longue période de divisions cellulaires en l'absence de transcription. Il s'agit de 10 cycles cellulaires rapides, sans phase G1 et G2. La cellule ne fait ainsi que répliquer son ADN. A la fin de ce stade de réplication (~3 hpf), au stade midblastula, avec environ 1000 cellules, le génome zygote s'active. Avant cette étape d'activation, le développement est réalisé par les protéines et les ARN stockés dans le cytoplasme de l'œuf. Les protéines et les miARN zygotiques suppriment la transcription maternelle. Antérieurement, pendant le pré-midblastula, les génomes paternel et maternel sont remodelés pour préparer la future transcription zygotique. Les transcrits maternels dirigent donc les premiers stades de vie avant activation du génome zygote. Il existe 5 clusters de gènes qui agissent pendant la période midblastula (Andersen et al., 2013) :

- Les transcrits maternels dégradés

Ce sont les ARNm détectés dans les œufs et impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, avec notamment la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN et l'acheminement des protéines. Ces transcrits sont dégradés pendant le pré-midblastula mais certains subsistent et sont surexprimés jusqu'à l'activation du génome zygote.

- Les transcrits maternels-zygotiques

Ils encodent pour des protéines impliquées dans l'homéostasie cellulaire.

- Les transcrits pré-midblastula

Ces transcrits sont détectés avant l'activation du génome zygote. Une partie de ces transcrits est surexprimée avant et après le midblastula, et une autre partie est surexprimée seulement avant le midblastula. Avant la période du midblastula, ces transcrits encodent pour des molécules impliquées dans des modifications post-traductionnelles, dans le transport et la dégradation des protéines et dans la régulation de l'expression des gènes. Les transcrits de ce cluster sont également impliqués dans le remodelage de la chromatine.

- Les transcrits du midblastula

Il s'agit de transcrits qui interviennent au moment de l'activation du génome zygote. Ils ne sont pas détectés avant le midblastula et encodent pour de nombreux facteurs de transcription.

- Les transcrits post-midblastula

Ils encodent pour le développement et la différenciation cellulaire après activation du génome zygote. Des mécanismes sont nécessaires pour le maintien de ces gènes dans un environnement réprimé.

I.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur les stades précoces

I.2.3.1 Effets sur le développement

La sensibilité des stades précoces aux RI est accrue en raison des nombreuses mitoses qui ont lieu lors la multiplication des cellules. Dans cette partie, les effets sur les effets des rayonnements ionisants sur le développement du poisson zèbre ont été détaillés. Des embryons (26 hpf) irradiés de manière aigüe de 1 à 10 Gy ne présentent pas de mortalité et d'altérion de l'éclosion, mais seulement une diminution des tailles à 10 Gy (Freeman et al., 2014). En revanche, une exposition aigüe plus précoce (3 hpf) entraine une mortalité tardive (120 hpf) ainsi qu'une diminution du taux d'éclosion pour les mêmes doses (Praveen Kumar et al., 2017). Les résultats opposés de ces deux études suggèrent une sensibilité accrue des stades très précoces. Une exposition à partir de 3 hpf chronique (0.42 et 42 $mGy.h^{-1}$) ou aigüe (0.3, 1 et 2 Gy) induit une accélération et un ralentissement de l'éclosion respectivement, sans induire de mortalité (Pereira et al., 2011). **Cette étude souligne la différence de réponse selon le type d'exposition. Étant donné que la plupart des données sont extrapolées à partir de données d'exposition aigüe, cette divergence souligne l'intérêt de réaliser des études chroniques.** Dans notre laboratoire, des expositions chroniques à différents débits de dose (0.03, 0.04, 0.4, 4.2, 23.75, 42 $mGy.h^{-1}$), produisent également une accélération de l'éclosion (Gagnaire et al., 2015; O. Simon et al., 2011b) sans impacter la mortalité. Une étude de notre laboratoire (Murat El Houdigui et al., 2019), après exposition chronique, n'a également pas montré de mortalité après un débit de dose très élevé (50 $mGy.h^{-1}$). En revanche, à 38 $mGy.h^{-1}$, un effet sur la survie des embryons et des malformations sont observés (Hurem et al., 2017b). Les études de notre laboratoire ont été réalisées avec une source de Césium 137 tandis que l'étude de Hurem et al., 2017b a été réalisée avec une source de cobalt 60. Ainsi, la divergence dans les résultats pourrait être due au type de source utilisée ne fournissant pas le même transfert linéique d'énergie (LET) et pouvant donc impacter différemment les tissus biologiques. Azzam et al., 2012 ont notamment mis en évidence d'importantes différences dans la répartition des ERO (H_2O_2, °OH, HO_2°) en lien avec les différents types de radiation. À notre connaissance, une seule étude a évalué les défauts de développement des embryons de poisson zèbre après irradiation

des géniteurs également (Hurem et al., 2017a). Pourtant, ce type d'exposition mime les conditions rencontrées *in situ* et devrait être plus étudié. Des dommages à l'ADN ont été retrouvés chez la progéniture dont les parents avaient été irradiés (8.7 $mGy.h^{-1}$), qu'ils aient continué d'être exposés par la suite ou non. Ces dommages sont persistants un an après, ce qui marque l'instabilité génomique de la descendance. De plus, après une exposition des adultes à 53 $mGy.h^{-1}$ pendant 27 jours, aucune descendance viable n'a pu être générée. Cette étude présente une transmission d'effet à la descendance après irradiation des géniteurs.

De manière générale, dans ces études, les effets phénotypiques sont beaucoup plus étudiés que les effets moléculaires pouvant expliquer ces phénotypes. Ces études mettent également en évidence une contradiction dans les effets soulignant l'importance du type d'exposition (**exposition chronique ou aigue, type de source, exposition uniquement sur embryons ou avec exposition des géniteurs**).

I.2.3.2 Effets sur les facteurs maternels

Nous avons vu que l'irradiation des géniteurs induit des effets drastiques sur une descendance non irradiée (Hurem et al., 2017a). Ce résultat n'est pas étonnant compte tenu de l'important apport parental nécessaire au développement de la descendance, en particulier les apports maternels. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux apports maternels après irradiation gamma chez le poisson zèbre. Pourtant des molécules comme la vitellogénine, le cortisol et les vitamines, précédemment citées, pourraient directement être altérées par le stress oxydant de l'irradiation. Sur *Caenorhabditis elegans*, l'irradiation entraine notamment des défauts de synthèse de VTG (Dubois et al., 2019). De plus, après exposition directe d'embryons, Murat El Houdigui et al., 2019 identifient une dérégulation de l'acide rétinoïque (vitamine A). L'irradiation des mères pourrait produire les mêmes effets puisque que cette vitamine est maternellement apportée. Pour des contaminants chimiques, **des effets sur les facteurs maternels ont déjà été observés soulignant l'intérêt de leur étude dans un contexte d'exposition multigénérationnelle**. Les polluants sont connus pour impacter le vitellus maternel utile aux embryons (Sant and Timme-Laragy, 2018). L'exposition parentale au bisphénol A entraîne une augmentation de la VTG2 dans les larves de poisson zèbre (Chen et al., 2019). Le 2-bromo-4, 6-dinitroaniline (BDNA), un composé mutagène, entraine à l'inverse une diminution de VTG chez la descendance (Xie et al., 2019). Une exposition parentale à l'antidépresseur Venlafaxine entraine une altération du taux de cortisol en réponse à un stress sur 3 générations (Thompson and Vijayan, 2021). Les niveaux de cortisol sont également impactés chez une descendance de parents exposés à la Fluoxetine, en lien avec une origine maternelle (Martinez et al., 2019). Outre une altération du taux de cortisol maternel qui peut engendrer des effets délétères chez la descendance, les mécanismes de régulation du cortisol pourraient être impactés et ne pas remplir leur fonction. Des contaminants tels les phtalates et les perfluorés ont déjà été montrés

comme inhibiteurs de la 11β-HSD2. L'étude de cette enzyme est compliquée puisqu'il n'existe pas d'anticorps spécifique chez les poissons pour sa quantification. Ainsi, la majorité des études concernent uniquement l'abondance des transcrits (Faught and Vijayan, 2018). Ainsi, une étude transcriptomique sur les génitrices permettrait d'évaluer tous les effets engendrés par l'irradiation entraînant une répercussion sur la descendance.

À retenir

- Stades précoces :

→Sensibles aux variations de l'environnement

→Conditionnés par les apports parentaux, principalement maternels

- Nécessité d'étudier l'impact des contaminants sur les génitrices

- Nécessité de réaliser des expositions multigénérationnelles

- Utilisation des approches écotoxicogénomiques pour la définition de biomarqueurs pertinents

DANS LE CADRE D'EXPOSITION MULTIGENERATIONNELLE, QUELS SONT LES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ?

I.3 Reproduction

Les stades précoces sont principalement étudiés car considérés comme sensibles. Dans l'ERE, les performances de reproduction des adultes sont également étudiées. Les stades précoces étant très dépendants des apports parentaux, finalement les réponses des stades précoces sont en lien étroit avec la reproduction des adultes. Ainsi, il est nécessaire de réaliser des expositions multigénérationnelles et d'analyser les effets parentaux.

La reproduction définit une capacité à se reproduire et à générer une descendance viable. La plupart des téléostéens, dont fait partie le poisson zèbre, sont ovipares. Ils rejettent des ovocytes chargés en réserves dans l'environnement aquatique, où les œufs seront fécondés. Chez les téléostéens, le développement des ovaires et des testicules est un mécanisme très complexe modulé par de nombreuses voies endogènes et exogènes, comme par exemple la production de juvéniles seulement au moment où les chances de survie sont optimales, le plus souvent quand la disponibilité en nourriture est au plus haut (Coward et al., 2002).

Pour permettre une reproduction, les individus doivent être matures sexuellement, c'est-à-dire que la détermination du sexe et la différentiation des gonades se sont passées normalement. L'ERE ne s'attarde que sur des marqueurs simples de la reproduction (succès reproducteur, fécondité, viabilité de la descendance). Pourtant, **la détermination sexuelle et la différentiation des gonades sont des étapes déterminantes dans le devenir des populations**.

La partie suivante présente donc le développement du poisson zèbre jusqu'à maturité sexuelle où il sera capable de générer une descendance. Nous avons vu que le développement précoce repose principalement sur des apports maternels. Ainsi un focus a été fait sur la gamétogenèse maternelle c'est-à-dire l'ovogenèse. Cependant, l'apport paternel ne peut être négligé. La spermatogenèse est donc brièvement décrite.

I.3.1La maturité sexuelle

Le poisson zèbre est une espèce gonochorique. Chez les téléostéens, et donc chez le poisson zèbre, les gonades primordiales bi-potentielles, constituées de cellules germinales primordiales (CGP) et cellules somatiques (CS), sont à l'origine de l'évolution vers la maturité sexuelle (Figure I- 9). Chez *Danio rerio*, le développement ovarien est considéré comme la voie par défaut. Ainsi, les individus développent initialement un tissu ovarien immature (Santos et al., 2017). Les organes reproducteurs se développent en commençant par la détermination du sexe puis la différentiation du sexe (Rajendiran et al., 2021). La différentiation des gonades débute vers 22 jpf et s'achève à 60 jpf. Cependant, la maturité sexuelle n'est atteinte qu'à trois mois environ. À la fin du processus de maturation, un dimorphisme phénotypique est observable. La femelle a un ventre plus bombé que le mâle et possède une papille urogénitale.

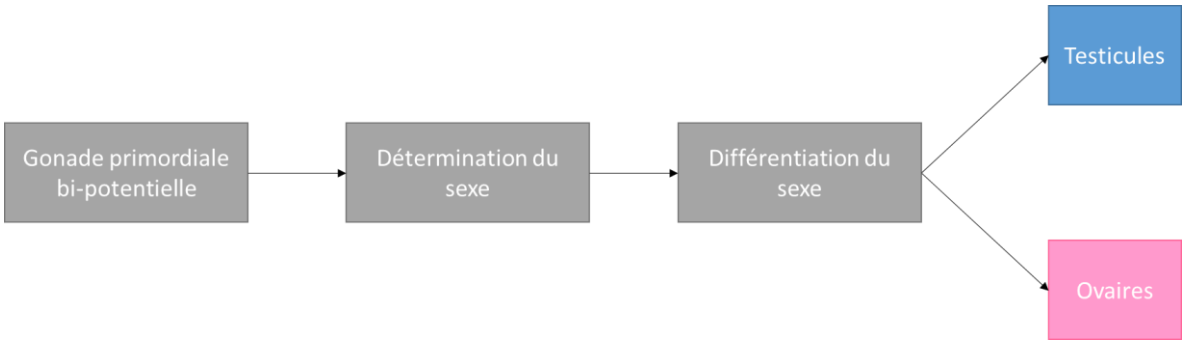


Figure I- 9 : Schéma représentant l'évolution vers la maturité sexuelle via différent processus complexes.

I.3.1.1 La lignée germinale

Chez le poisson zèbre, les cellules germinales (CG) indiquent la spécification sexuelle des CS des futures gonades. Les CS des gonades produisent ainsi des hormones

sexuelles appropriées qui ordonnent ensuite la différenciation spécifique au sexe des CS dans le reste du corps. Les CGP du poisson zèbre sont spécifiées par la mère où elles sont accumulées dans le plasma germinatif. Les CGP commencent à migrer pendant la gastrulation et finissent par se rassembler en deux groupes de part et d'autre de la notocorde, à l'emplacement de la future gonade, à 1 jpf. Certains transcrits maternels (*vasa* ou *ddx4*, *nanos3*) sont nécessaires durant la première semaine de développement pour la survie de ces cellules (Aharon and Marlow, 2021).

I.3.1.2 La détermination du sexe

La gonade est indifférenciée et bi-potentielle jusqu'à environ 12 jpf (Aharon and Marlow, 2021). La détermination du sexe agit comme un interrupteur vers l'ébauche gonadique bipotentielle et active la voie de différenciation via l'expression de gènes spécifiques. En effet, le poisson zèbre est une espèce à détermination sexuelle génétique (GSD) et plus précisément une détermination polygénique pour laquelle plusieurs gènes interviennent pour la détermination (Rajendiran et al., 2021; Santos et al., 2017), dans le cas des souches domestiques (Aharon and Marlow, 2021). Les souches domestiques sont également des espèces à détermination du sexe par des facteurs environnementaux (ESD), c'est-à-dire que le sexe est influencé par des facteurs externes (pH, température, contaminants, etc.) qui jouent sur les gènes de la détermination (Liew et al., 2012; Rajendiran et al., 2021). La mesure du sexe ratio des populations de *Danio rerio* peut être un marqueur de la perturbation de ce processus. Ainsi, il est intéressant d'utiliser le poisson zèbre comme organisme modèle dans le cadre d'une exposition multigénérationnelle à des contaminants.

I.3.1.3 La différentiation du sexe

I.3.1.3.1 Apoptose

L'activation de gènes pour la différentiation fait suite à l'apoptose notamment via la voie Tp53. L'apoptose indique vers quel sexe se tourner et ensuite les gènes nécessaires en fonction du sexe sont activés dans les cellules somatiques (Rodríguez-Marí et al., 2010). Les premiers signes de différenciation commencent alors vers 20-25 jpf lorsque les ovocytes présents chez les mâles présumés commencent à subir une apoptose. Des études supposent que les ovocytes produisent un signal dont une quantité est nécessaire pour stabiliser l'expression de gènes du développement ovarien. Si chaque ovocyte peut produire une quantité définie de signal, alors la quantité totale de signal sera directement corrélée au nombre d'ovocytes produits, eux-mêmes proportionnels au nombre de cellules germinales (Kossack and Draper, 2019; Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008).

I.3.1.3.2 Facteurs génétiques

Le transcriptome du poisson zèbre présente un dimorphisme sexuel net au niveau des gonades (Ribas et al., 2017a), indiquant clairement l'existence de gènes pro femelle et de gènes pro male. Les gènes qui sont largement impliqués dans la différenciation sexuelle sont présentés dans le Tableau I- 3.

Tableau I- 3 : liste non exhaustive des gènes de la différentiation sexuelle chez les poissons zèbre.

Gène	Nom complet	Rôle	Références
amh	Anti-Müllerian hormone	Contrôle l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules germinales chez les mâles	(Ye and Chen, 2020)
dmrt1	Doublesex and mab-3 related transcription factor	Non essentiel pour le développement des ovaires, indispensable pour le développement des testicules	(Ye and Chen, 2020)
sox9a	SRY-box transcription factor 9a	Important pour la détermination des testicules masculins	(Ye and Chen, 2020)
ar	androgen receptor	Interagit avec les androgènes, essential au développement du mâle	(Ye and Chen, 2020)
cyp19a1a	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a	Encore pour l'aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes	(Ye and Chen, 2020)
foxl2	forkhead box L2	Crucial pour le développement et l'entretien des ovaires, foxl2a et foxl2b coopèrent pour mener à bien le développement et le maintien des ovaires	(Ye and Chen, 2020)
brca2	BRCA2 DNA repair associated	Critique pour le développement ovarien	(Ye and Chen, 2020)
fancl	FA complementation group L	Important pour la différentiation et le développement ovarien	(Ye and Chen, 2020)
cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	Nécessaire au développement ovarien	(Ye and Chen, 2020)
cyp11c1	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1	Nécessaire pour la maturation des ovocytes, le développement des testicules et la spermatogenèse	(Ye and Chen, 2020)
nr0b1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Influence la détermination du sexe en régulant la prolifération des CG et l'expression du gène pro-femelle *cyp19a1a* au cours de la phase bipotentielle des gonades	(Kossack and Draper, 2019)
wnt4a	wingless-type MMTV integration site family, member 4	Favorise la détermination du sexe féminin	(Kossack and Draper, 2019)
zp3	zona pellucida glycoprotein 3	Promeut la différenciation sexuelle des femelles	(Sreenivasan et al., 2014)
pdgfr	platelet-derived growth factor receptor	Acteurs clés de la régulation du développement embryonnaire et postnatal de la gonade masculine.	(Basciani et al., 2010)
bmp15	bone morphogenetic protein 15	La perte de bmp15 entraine un échec de la progression des ovocytes dans l'ovogenèse	(Kossack and Draper, 2019)

I.3.1.3.3 Hormones sexuelles

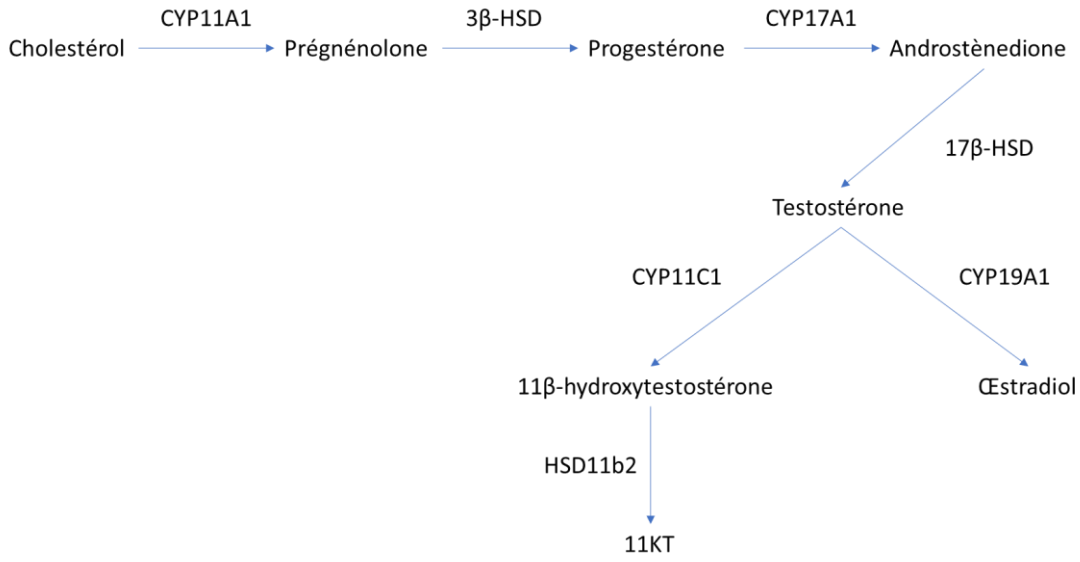


Figure I- 10 : Synthèse des stéroïdes sexuels.

Certains gènes de la détermination sont en lien direct avec la synthèse des hormones sexuelles (stéroïdogenèse) issues de la conversion de molécules de cortisol (Figure I-10). *In fine*, les gonades différenciées produiront des hormones propres à chaque sexe. Chez les téléostéens, la testostérone est convertie en 11-ketotestostérone ou œstradiol et induit une différenciation testiculaire ou ovarienne, respectivement (Bhat et al., 2021). La production hormonale dépend de la régulation et de l'expression des gènes de la voie des stéroïdes.

Tous les mécanismes détaillés dans cette partie sont étroitement liés et définissent le sexe de l'individu. La Figure I- 11 représente les étapes de détermination et différentiation sexuelle jusqu'à la gamétogenèse.

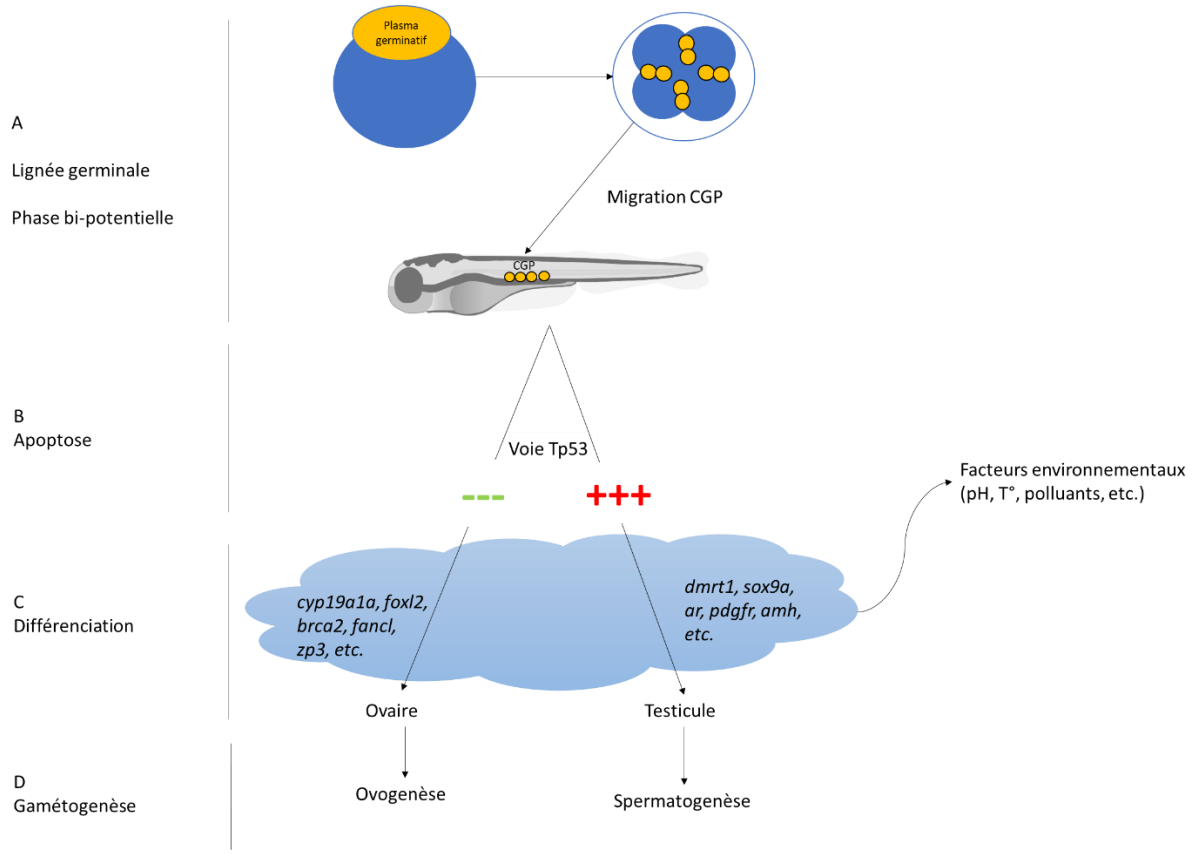


Figure I- 11 : schéma synthèse de la détermination et de la différentiation du sexe chez le poisson zèbre. Adaptation d'après Aharon and Marlow, 2021.

I.3.2 Gamétogenèse

La gamétogenèse correspond au processus conduisant à la formation des cellules reproductrices (gamète) mâle (spermatogenèse) et femelle (ovogenèse). Les gamètes sont des cellules haploïdes (n chromosomes) ayant subi une méiose depuis des cellules diploïdes (2n chromosomes).

I.3.2.1 Ovogenèse

L'ovogenèse a lieu dans l'ovaire et permet le développement des ovogonies (2n chromosomes) en ovocytes matures (n chromosomes) qui pourront être fécondés (Patiño and Sullivan, 2002; Selman et al., 1993). Le poisson zèbre est une espèce asynchrone, c'est-à-dire que tous les stades ovocytaires sont présents dans la gonade sans population dominante. La Figure I- 12 représente un schéma des 5 stades de l'ovogenèse.

I.3.2.1.1 Stade de développement des ovocytes

- Stade I – Croissance primaire :

Les CGP donnent des ovogonies (2n), chez les femelles, qui se multiplient par divisions mitotiques. Chez les téléostéens, l'ovaire contient un stock d'ovogonies pouvant se renouveler par divisions mitotiques dans l'ovaire adulte (Selman et al., 1993). Ainsi, certaines ovogonies entrent en méiose pour devenir des ovocytes et d'autres restent stockées. Les ovogonies prêtes à entrer en méiose sont entourées de CS. A ce stade, l'ovogonie devient un ovocyte primaire, caractérisé par la première division méiotique (Lubzens et al., 2010). La méiose est alors bloquée en prophase I. Les ovocytes primaires sont entourés d'une couche de CS (couche folliculaire) formant la granulosa et d'une autre couche formant la thèque. La zona radiata, une couche acellulaire, sépare l'ovocyte des enveloppes de CS.

- Stade II – stade alvéolaire cortical

Cette phase est la période la plus critique pour la croissance de l'ovocyte. Les alvéoles corticales sont des vésicules à membrane. Durant la croissance des ovocytes, elles augmentent en taille et en nombre, remplissant ainsi le cytoplasme de l'ovocyte. Le contenant des alvéoles est rejeté à la surface de l'œuf ce qui permet la restructuration des protéines formant le chorion.

- Stade III – vitellogenèse

Au début de ce stade, l'équipement métabolique nécessaire à l'accumulation de réserves et à la croissance de l'ovocyte se met en place. La vitellogenèse permet à terme l'incorporation de VTG, de lipides et de vitamines dans l'ovocyte. Au cours de la vitellogenèse, des follicules ovariens sont recrutés pour ne pas finir leur maturation. C'est l'atrésie folliculaire. L'atrésie est considérée comme un processus apoptotique initié dans les cellules de la granulosa (Lubzens et al., 2010).

- Stade IV – maturation ovocytaire

Après la vitellogenèse, le noyau migre vers le micropyle (orifice permettant la pénétration du spermatozoïde) et sa membrane se désintègre. L'ovocyte est alors mature. La méiose reprend, le noyau se divise et le premier globule polaire est expulsé (Patiño and Sullivan, 2002). L'ovocyte mature (ou secondaire) est bloqué en métaphase II.

- Stade V – ovulation et œuf mature

Pendant l'ovulation, l'ovocyte est libéré du follicule vers la cavité ovarienne. C'est alors un ovocyte mature complètement formé et contenant toutes les molécules et réserves nutritives nécessaires au développement embryonnaire. Il est entouré par le chorion

qui est seulement perméable à l'eau et aux petites molécules. La ponte se produit et l'œuf peut être fécondé pour achever la méiose (Lubzens et al., 2010).

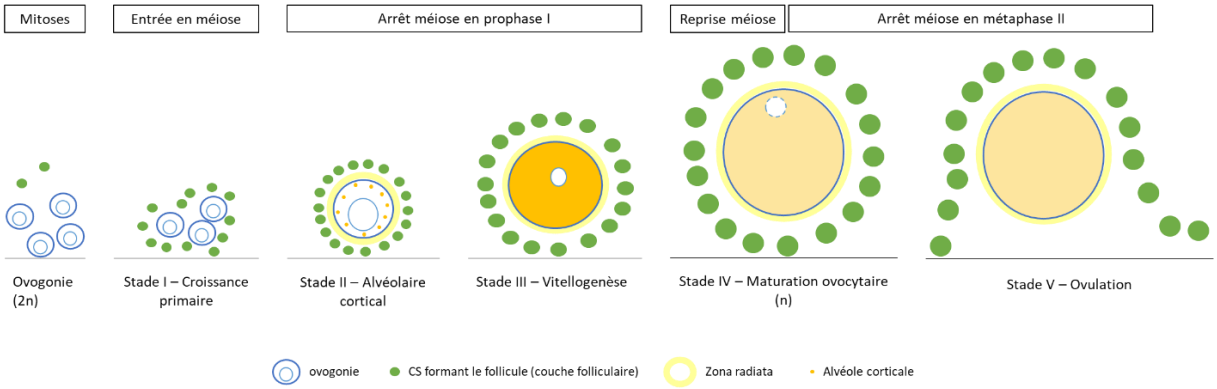


Figure I- 12 : Schéma représentant les stades de développement depuis les ovogonies jusqu'à l'ovocyte mature. Adaptation d'après Li and Ge, 2020.

I.3.2.1.2 Le contrôle hormonal de l'ovogenèse

Le principal axe endocrinien reproducteur commun des téléostéens femelles est constitué du cerveau, de l'hypophyse et des ovaires (Lubzens et al., 2017). La fonction des gonades est sous la stimulation directe des gonadotropines (hormone lutéinisante (LH) et hormone folliculo-stimulante (FSH)), synthétisées par l'hypophyse. Les principales cibles de ces hormones sont les couches de cellules somatiques (couches folliculaires) entourant l'ovocyte. La phase de croissance de l'ovocyte est sous contrôle de la FSH et les dernières étapes de la maturation ovocytaire est essentiellement sous le contrôle de la LH (Clelland and Peng, 2009). Les gonadotropines permettent la régulation de la production des stéroïdes sexuels. En effet, lors de la vitellogenèse, la FSH induit la synthèse d'œstradiol par l'ovaire. Ce signal œstrogénique va alors induire la synthèse de VTG (Bobe et al., 2014). Pendant la maturation ovocytaire, la LH induit la production d'une progestine qui, elle-même, induit l'activation d'un facteur intracellulaire de maturation (MPF) pour la reprise de la méiose. Les stéroïdes sexuels permettent à leur tour des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur le cerveau et l'hypophyse.

I.3.2.2 Spermatogenèse

Les spermatozoïdes sont formés à partir des cellules germinales via une série de changements développementaux. C'est la spermatogenèse, qui consiste en une prolifération de spermatogonies via des divisions mitotiques répétées. S'en suit une période de croissance pour former les spermatocytes primaires. Après méiose, les spermatocytes sont au stade secondaire, conduisant à la phase spermatide et après métamorphose pour former des spermatozoïdes matures. La composition ionique, le pH et particulièrement la pression osmotique semblent être les facteurs les plus importants dans l'activation du sperme chez les téléostéens. La qualité du sperme chez les téléostéens dépend de la mobilité et de la capacité à féconder, et de façon

moins importante, de la concentration en spermatozoïdes. La mobilité des spermatozoïdes est le paramètre le plus étudié pour évaluer la qualité du sperme bien que la fécondité apporte une réponse plus claire (Coward et al., 2002).

I.3.3 Effets des rayonnements ionisants sur la reproduction

Précédemment, nous avons vu que les stades précoces étaient particulièrement sensibles aux RI. Ainsi, l'ERE est fondé principalement sur des tests standardisés pour l'évaluation des effets sur les stades précoces. Cependant, **la production d'une descendance viable est directement liée à la qualité de la reproduction**. Dans l'ERE, seulement des critères simples de la reproduction sont évalués (succès reproducteur, fécondité). Pourtant, les facteurs environnementaux (Karga and Mandal, 2017; Lawrence, 2007; Lawrence et al., 2012; Wafer et al., 2016), tout comme les RI (Buisset-Goussen et al., 2014; Rackham and Woodhead, 1984; Woodhead, 1977) sont connus pour induire des effets sur les performances de reproduction.

Des effets sur la reproduction après exposition aux RI sont évidents. Cependant, peu d'études se sont intéressées à rechercher les causes de telles altérations. Pourtant, les paragraphes précédents montrent qu'avant la reproduction, à proprement parler la ponte, de nombreux processus biologiques complexes, comme la différenciation du sexe et la gamétogenèse doivent être établis avec une régulation fine. Ainsi, il semble indispensable d'étudier les effets des rayonnements sur ces processus. Une étude sur des perches à Tchernobyl s'est intéressée aux facteurs impactant les fonctions de reproduction. Un retard de la maturation des ovocytes était corrélé au gradient de dose. Des gènes de la reproduction et de la stéroïdogenèse sont également impactés (Lerebours et al., 2020, 2018). Ces résultats suggèrent une **altération de la gamétogenèse**. À notre connaissance, une seule étude sur le poisson zèbre a évalué l'impact des rayonnements gamma sur la gamétogenèse, révélant des effets drastiques sur la production de descendance viable (Hurem et al., 2018a). Il semble indispensable, face à un contaminant comme le rayonnement, d'étudier l'ovogenèse. En effet, les poissons ont une sensibilité 100 fois supérieure à celle des mammifères à l'induction de mutations spécifiques au cours de l'ovogenèse (Brooks et al., 1997). Ceci est dû à la division rapide des ovogonies chez le poisson zèbre ne permettant pas l'intervention de mécanismes de réparation (Walker and Streisinger, 1983). Ainsi, des effets délétères pourraient être retrouvés chez la descendance. L'étude de Hurem et al. a montré un défaut sur les stades ovocytaires. Cependant, cette étude s'est concentrée sur les effets moléculaires de la descendance. **L'investigation des effets sur les géniteurs reste donc indispensable.**

A notre connaissance, aucune étude n'a révélé une altération du sexe ratio par l'irradiation gamma. Cependant les effets sur la maturation des ovocytes pourraient induire un effet sur la différenciation du sexe. Lerebours et al., 2020 ont montré une inhibition du développement des gonades indépendamment d'une forte exposition. Leur hypothèse serait que l'exposition de plusieurs générations a provoqué l'apparition de ce phénotype délétère, soulignant une nouvelle fois l'intérêt des expositions multigénérationnelles et notamment l'exposition de tous les processus biologiques complexes en lien avec la reproduction (embryogenèse, différenciation du sexe, gamétogenèse). **Le phénotype sexe ratio biaisé étant couramment retrouvé en cas d'exposition stressante** (Geffroy et al., 2021; Navarro-Martín et al., 2011; Pierron et al., 2021; Valdivieso et al., 2022, 2020), il semble indispensable d'étudier la détermination et la différentiation sexuelles.

Dans le cas des accidents nucléaires, l'exposition sur plusieurs générations suscite des questions sur l'exposition de ces processus complexes à long terme rendant le devenir des populations incertain. Il est nécessaire de comprendre les processus moléculaires engagés et l'héritabilité de ces derniers.

À retenir

- Le succès reproducteur ne suffit pas à long terme pour définir le devenir d'une population

- La détermination sexuelle est une étape clé dans le maintien des populations

- Données moléculaires manquantes sur l'altération de la reproduction

- Nécessité d'inclure l'évaluation des processus biologiques complexes dans l'ERE

COMMENT L'INFORMATION DELETERE VEHICULE-T-ELLE ENTRE LES GENERATIONS POUR LE DEVENIR DES POPULATIONS ?

I.4 Héritabilité des effets

Les chapitres précédents montrent la nécessité de réaliser des expositions multigénérationnelles pour évaluer l'héritabilité des effets après des expositions *in situ* englobant plusieurs générations. Il est également nécessaire de définir les mécanismes d'action encore très peu étudiés dans le cas de l'irradiation gamma. L'héritabilité à l'échelle moléculaire peut se traduire par l'analyse des marques épigénétiques. Ce type d'approche est encore peu utilisé en écotoxicologie (Terrazas-Salgado et al., 2022). Pourtant les marques épigénétiques sont connues pour être modulées par l'environnement et notamment par l'exposition à des contaminants.

I.4.1Effets générationnels

I.4.1.1 Généralités

L'exposition d'un organisme à un contaminant peut aboutir à une transmission d'effets ou d'informations aux générations suivantes. En effet, des informations peuvent être transmises d'une génération à l'autre via les gamètes (Nilsson et al., 2022), depuis les cellules somatiques et les cellules germinales. Deux types de transmission peuvent être distingués en fonction de l'exposition, conduisant à deux types d'effets (Figure I-13):

- Les **effets multigénérationnels** : l'exposition directe des cellules germinales à un contaminant peut affecter la génération suivante. Dans ce cas, chez le poisson zèbre, l'exposition d'une génération F0 conduit à des effets multigénérationnels à la génération F1 (Best et al., 2018). L'exposition directe peut également être continue. Ainsi, toutes les générations subissent des effets multigénérationnels. Une exposition continue, représentative des conditions rencontrées in situ conduisant à des effets multigénérationnels, permet d'évaluer l'accentuation des effets au fil des générations.

- Les **effets transgénérationnels** : l'exposition de cellules germinales peut affecter plusieurs générations en l'absence d'influences environnementales directes sur ces dernières (Nilsson et al., 2022). Chez le poisson zèbre, l'exposition d'une génération F0 conduit à des effets transgénérationnels à partir de la génération F2, sans exposition supplémentaire. En effet, les cellules germinales de cette génération n'auront jamais été irradiées. Ce type d'exposition a pour objectif principal d'analyser si des effets se propagent au fil des générations non exposées.

Précédemment, l'importance de l'implication maternelle a été soulevée. L'utilisation de téléostéens ovipares est avantageuse pour l'étude des effets transgénérationnels en raison de la facilité à étudier la contribution des ovocytes. En effet, les ovocytes sont facilement obtenus et peuvent être manipulés pour étudier les mécanismes moléculaires avant fécondation externe, offrant une voie pour des études mécanistes étudiant les effets spécifiques à la lignée maternelle (Best et al., 2018). **L'ensemble de l'information transmise responsable d'effets héréditaires peut être porté par les marques épigénétiques.**

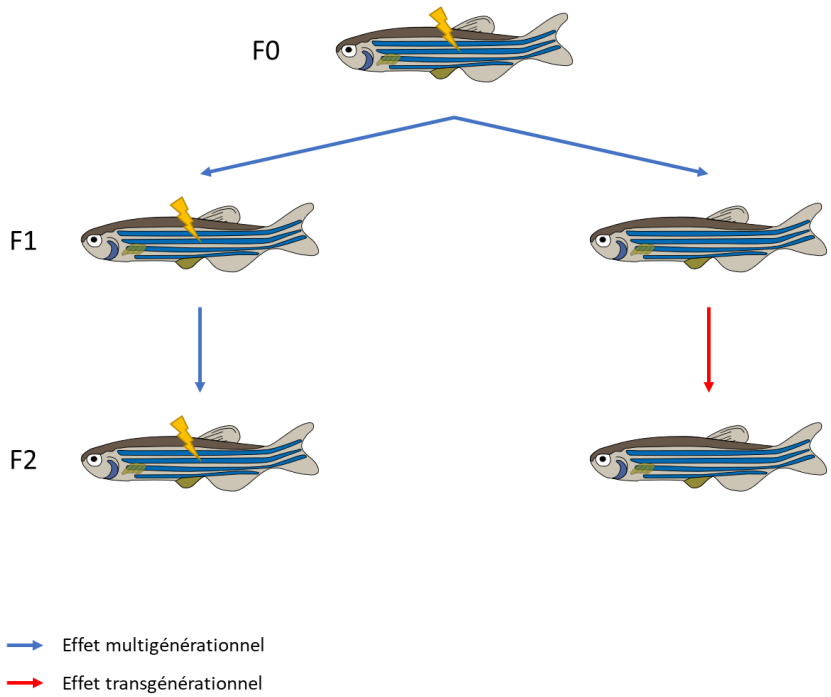


Figure I- 13 : Schéma représentant les effets multigénérationnels et les effets transgénérationnels chez le poisson zèbre. L'éclair représente l'exposition à un stresseur. Adaptation d'après Best et al., 2018.

I.4.2Epigénétique

I.4.2.1 Généralités

Le terme épigénétique a été évoqué par Waddington dans les années 1940 et correspond à la façon dont les gènes d'un organisme et son environnement peuvent interagir pour aboutir à un héritage non mendélien de phénotypes (Waddington, 1940). L'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes, héritables et réversibles, responsables de la modulation de l'expression génique qui ne peuvent être expliqués par des modifications de la séquence d'ADN. Après exposition multigénérationnelle, des stimuli environnementaux peuvent introduire des marques épigénétiques (Best et al., 2018). Ces dernières, dans les cellules somatiques, peuvent être transmises par mitose et conduire à des changements temporels et spatiaux dans l'expression du génome de l'organisme, qui à leur tour peuvent introduire une plus grande plasticité physiologique (Burggren, 2014). L'épigénétique après exposition transgénérationnelle correspond à des modifications épigénétiques au niveau de la lignée germinale qui sont méiotiquement stables et héréditaires. Des manifestations phénotypiques peuvent alors apparaitre dans les générations suivantes jamais exposées au stimuli initial (Best et al., 2018).

Les facteurs moléculaires épigénétiques comprennent :

- La **méthylation de l'ADN** : cette modification est décrite plus en détail dans la partie suivante. Elle intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la différenciation cellulaire, l'empreinte parentale, et l'adaptation à l'environnement. Il s'agit du **facteur épigénétique le plus étudié** (Nilsson et al., 2022).

- Les modifications des histones : L'ADN est enroulé autour des protéines histones pour former des nucléosomes. La modification chimique des histones du nucléosome agit pour réguler l'expression des gènes en modulant la structure de la chromatine et en recrutant des co-facteurs transcriptionnels. Les modifications d'histone post-traductionnelles comprennent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation ou la sumoylation (Nilsson et al., 2022).

- Les ARNs non codants : ils comprennent les micros-ARNs (miARNs), les ARNs interagissant avec piwi (piARNs), les ARNs interférents (siARNs) et les longs ARNs non codants (lncARNs). Ils régulent l'expression des gènes également (Nilsson et al., 2022).

I.4.2.2 Méthylation de l'ADN

Bien que n'importe quel facteur épigénétique puisse être évalué, la méthylation de l'ADN s'est avérée robuste et l'un des processus épigénétiques clés à évaluer (Nilsson et al., 2022). Le processus de méthylation est catalysé par une famille de protéines appelées les ADN méthyltransférases (DNMTs). La méthylation *de novo* établie dans les cellules germinales et embryonnaires repose sur les DNMT3 a et b. Le profil de méthylation est maintenu après chaque division cellulaire grâce aux DNMT1. Enfin, les DNMT2 ne possèdent pas d'activité transférase et méthylent directement l'ADN (Andersen et al., 2013, 2012). Le processus de méthylation de l'ADN le plus largement caractérisé est l'ajout du groupe méthyle au carbone 5 du cycle cytosine conduisant à la formation de 5-méthylcytosine (5-mC) (Kong et al., 2016). La méthylation se produit principalement sur les cytosines des dinucléotides CpG (Cytosine-phosphate-Guanine). Les sites CpG peuvent être regroupés en régions appelées les îlots CpG. En général, les îlots CpG sont peu méthylés et sont localisés à proximité des sites d'initiation de la transcription (Best et al., 2018). Une méthylation sur ces sites spécifiques peut modifier par conséquent la transcription des gènes.

La méthylation est un régulateur de l'expression (Andersen et al., 2013, 2012). Plusieurs mécanismes au niveau des îlots CpG ont été identifiés :

- Blocage direct des promoteurs empêchant la liaison des facteurs de transcription

- Recrutement de protéines au niveau des sites de méthylation : ces protéines forment des complexes de remodelage de la chromatine rendant la zone inaccessible aux protéines de transcription

De plus, une modification épigénétique étant réversible, il existe deux processus de déméthylation :

- La déméthylation passive : la méthylation n'est pas maintenue après réplication de l'ADN. Ce processus peut être lié à une altération de DNMT1

- La déméthylation active selon plusieurs voies :

- La désamination des cytosines par les protéines AID et APOBEC, transformant la 5-méthylcytosine (5mC) en thymine.

- L'hydroxylation et oxydation par les enzymes TET (Ten-Eleven-Translocation) qui catalysent la conversion des 5mC en 5-hydroxym´ethylcytosine (5hmC). Des oxydations conduisent ensuite à la formation de 5-formylcytosine (5fC) et de 5-carboxycytosine (5caC).

- L'hydroxylation par les TET suivie de la désamination des 5hmC par les protéines AID et APOBEC conduit à la formation de 5-hydroxym´ethyluracile (5hmU).

Il existe trois types de modulation de la méthylation (Kong et al., 2016) :

- Hyperméthylation : la méthylation se produit sur des sites non méthylés dans des circonstances normales

- Hypométhylation : fait référence à des pertes de méthylation de l'ADN dans le génome

- Perte d'empreinte : perte d'une modification épigénétique sur des gènes exprimés spécifiquement selon l'origine parentale pouvant altérer le schéma d'expression

Des schémas d'expression spécifique existent également pour des processus particuliers. Dans le cas de la détermination du sexe, le méthylome est différent entre les mâles et femelles. C'est un dimorphisme sexuel (Laing et al., 2018). Ainsi, **la modulation des marques épigénétiques peut entraîner des conséquences**

importantes sur des processus complexes au cours d'exposition sur plusieurs générations.

I.4.2.3 Reprogrammation de l'épigénome

Chez les mammifères, la reprogrammation épigénétique de la méthylation de l'ADN se produit à la fois immédiatement après la fécondation chez l'embryon précoce et dans les cellules germinales en développement au moment de la détermination du sexe des gonades. La reprogrammation en lien avec la différenciation sexuelle est très peu étudiée chez le poisson zèbre (Best et al., 2018). Ainsi, les mécanismes ne sont pas totalement définis. Seuls les gènes à empreinte parentale ne subissent pas de reprogrammation (Nilsson et al., 2022). La synthèse *de novo* lors de la reprogrammation embryonnaire est réalisée de manière tissu-spécifique, ce qui permet aux gènes essentiels pour le développement d'un tissu particulier de rester non-méthylé et d'être ainsi transcriptionnellement actif. A l'inverse, les gènes qui s'opposent au bon développement sont silencieux *via* la méthylation (Potok et al., 2013; Rai et al., 2006). Chez le poisson zèbre, le schéma de méthylation restauré dans les zygotes correspond étroitement au schéma de méthylation du génome du sperme, qui est hyperméthylé par rapport à l'ovocyte hypométhylé. Ainsi, le génome hérité de la mère subit des changements de méthylation de l'ADN pour correspondre au modèle de méthylation paternel, et le modèle de méthylation hérité du père fournit un « modèle » pour l'embryogenèse précoce (Best et al., 2018; Skvortsova et al., 2019). L'héritage parental de la méthylation de l'ADN est donc en contraste avec les résultats des modèles de mammifères, pour lesquels les génomes paternel et maternel subissent à la fois une déméthylation. Chez le poisson zèbre, l'héritage d'un méthylome se fait donc probablement par la voie paternelle. Précédemment, nous avons montré principalement une implication maternelle dans les phénotypes de la descendance. **L'apport épigénétique paternel semble également jouer un rôle primordial pour le développement de la descendance**.

Cependant, chez les souris, certaines régions échappent au remodelage épigénétique dans les CGP. Par exemple, de nombreux ilots CpG méthylés dans les ovocytes ne sont pas complètement déméthylés après la fécondation (Ilnytskyy and Kovalchuk, 2011; Smallwood and Kelsey, 2012), ce qui pourrait influencer les événements précoces de spécification de la lignée. Autre fait important, le modèle d'origine paternelle chez le poisson zèbre se base sur des analyses mélangeant tous les stades cellulaires (stades d'ovocytes) chez les femelles. **Ainsi, une analyse sur le méthylome des CGP uniquement pourrait donner une autre information et conclure à une conservation des marques dans la lignée germinale** (Aharon and Marlow, 2021). De plus, contrairement aux mammifères, le destin des cellules germinales primordiales du poisson zèbre commence tôt dans le développement par le dépôt maternel de composants du plasma germinatif. **Ainsi, la dynamique du méthylome des CGP dans les stades précoces pourrait induire des effets plus**

tardifs, notamment dans la détermination du sexe, avant l'établissement d'un schéma de méthylation de l'ADN paternel (Best et al., 2018). Une étude récente montre qu'aucun effacement global de la méthylation de l'ADN ne se produit à aucun stade du développement de la lignée germinale du poisson zèbre (Aharon and Marlow, 2021). **Toutes ces études montrent que les CGP pourraient permettre de véhiculer des informations et être à l'origine des effets hérités au cours des générations produisant une instabilité génomique. De plus, chez le poisson zèbre, une origine épigénétique maternelle ne peut finalement pas totalement être exclue via les CGP, bien que la majorité des études actuelles présentent un modèle de méthylome paternel**.

I.4.3 Effets générationnels radio-induits sur la méthylation de l'ADN

Dans le cadre d'une exposition à des contaminants sur plusieurs générations, les modifications épigénétiques présentes dans les cellules germinales peuvent transmettre un épigénome altéré à l'embryon, entraînant des modifications de l'expression génique qui conduisent à une altération du phénotype. Ainsi, l'épigénétique est probablement impliquée dans la perpétuation de l'instabilité génomique observée par différentes études après irradiation des parents uniquement (Aypar et al., 2011; Ilnytskyy and Kovalchuk, 2011; Sarapultseva and Gorski, 2013). De plus, les modifications épigénétiques peuvent échapper aux processus normaux de reprogrammation dans l'embryon. Ainsi, l'épigénome des cellules souches embryonnaires est altéré, ce qui a un impact sur tous les types de cellules du fœtus et de l'adulte en développement (Nilsson et al., 2022). De plus, l'étude de l'épigénétique est intéressante dans le cadre d'une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, le stress oxydant a un rôle fondamental dans les modifications épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques semblent provenir des EROs radio-induits, à la base des phénomènes non linéaires observés (Belli and Tabocchini, 2020). Pourtant, l'implication des mécanismes épigénétiques dans la réponse biologique aux rayonnements ionisants n'a pas été aussi largement étudiée que dans d'autres domaines.

La méthylation est très étudiée de manière générale. L'induction de cassures à l'ADN par les rayonnements ionisants peut favoriser une méthylation *de novo* selon Russo et al., 2016. A l'inverse, les rayonnements ionisants X et gamma ont conduit à une hypométhylation globale de l'ADN (Kong et al., 2016), parfois en lien évident avec des altérations radio-induites des méthyltransférases *de novo* (DNMT3). Ces informations montrent que les rayonnements ionisants sont susceptibles d'impacter drastiquement les méthylomes. Pereira et al., 2014 ont montré que l'irradiation gamma augmente la

méthylation globale dans les cellules embryonnaires de fibroblastes de poisson zèbre irradiées. Cette étude a été réalisée sur des cultures cellulaires mais peu d'études portent sur les effets des rayonnements ionisants sur la méthylation de l'ADN chez le poisson zèbre *in toto*. Kamstra et al., 2018 ont identifié 5658 régions différentiellement méthylées chez des embryons issus de parents irradiés à 8.7 $mGy.h^{-1}$ pendant 27 jours. Ces régions sont principalement localisées au niveau de régions régulatrices comme les promoteurs des gènes. Cette étude indique que la modification de la méthylation peut perdurer partiellement jusqu'à la F3. **Cette étude réalisée sur plusieurs générations soulève l'intérêt d'étudier les mécanismes épigénétiques dans les expositions multigénérationnelles après exposition aux rayonnements ionisants.** La plupart des études sur la méthylation de l'ADN après exposition aux rayonnements ionisants est fondée sur des analyses de méthylation globale et s'intéresse peu aux voies biologiques impactées par la méthylation (Belli and Tabocchini, 2020). **Il semble donc intéressant d'analyser la méthylation au niveau des promoteurs de gènes en haut des cascades d'évènements de processus biologiques complexes.**

À *retenir*

- L'étude de l'épigénétique est peu présente en écotoxicologie alors qu'il s'agit d'un processus modulé par l'environnement et l'exposition aux contaminants

- Epigénétique responsable d'héritabilité des effets

- Epigénétique impliquée dans les processus développementaux

- Implication de l'épigénétique sur les mécanismes complexes telle la détermination du sexe à l'âge adulte peu étudiée

LES RAYONNEMENTS IONISANTS IMPACTANT PRINCIPALEMENT LA METHYLATION DE L'ADN AU NIVEAU DES PROMOTEURS, CETTE DERNIERE INFLUENCENT-ELLE LA REGULATION DES GENES « MASTER REGULATOR » DES PROCESSUS BIOLOGIQUES COMPLEXES ?

.

Chapitre II – Objectifs et choix expérimentaux

II.1 Objectifs

Le chapitre I révèle que les effets reprotoxiques de l'irradiation gamma sont encore peu étudiés, notamment chez les vertébrés aquatiques. Nous définissons les effets reprotoxiques, par tous les effets mesurés chez les géniteurs au cours de la gamétogenèse ayant une incidence sur le devenir des populations. Ces données à l'échelle multigénérationnelle sont nécessaires pour établir des valeurs de protection de l'environnement. De plus, peu d'études sont réalisées pour définir les relations doses réponses. Les données disponibles s'appuient sur des protocoles expérimentaux simples, ne permettant pas la prise en compte des situations rencontrées *in situ*, où l'exposition perdure sur plusieurs générations. Les populations sauvages étant exposées sur plusieurs générations, les effets pourraient être transmis, aggravés, réparés au fil des générations. Une étude précédente sur poisson zèbre a montré des effets drastiques sur la descendance issue de parents irradiés (Hurem et al., 2018a), révélant ainsi des effets reprotoxiques ayant une incidence sur la génération suivante. Cette étude est la seule réalisée chez le poisson à l'échelle multigénérationnelle mais n'a pas permis d'identifier les mécanismes à l'origine d'effets hérités. De plus, cette étude est inspirée du test n° 229 de l'OCDE et n'a pas investigué les effets sur les générations suivantes. En effet, l'expérience a été ensuite poursuivie hors irradiation après la première génération. Pourtant dans un contexte post accidentel, les populations de poisson au cycle de vie court comme le poisson zèbre sont exposées sur plusieurs générations. **Ainsi, ce travail de thèse a pour objectif principal d'identifier les effets reprotoxiques de l'irradiation multigénérationnelle à différentes échelles biologiques chez un vertébré aquatique en conditions contrôlées de laboratoire.** Nous avons donc dans un premier temps cherché à mettre en évidence un effet phénotypique puis àidentifier les mécanismes d'action engagés.

Le manque de données existantes souligne la nécessité d'évaluer les effets reprotoxiques à différents débits de dose. Ces données permettent de définir le type de relation dose/réponse. Les expositions multigénérationnelles permettent alors d'englober plusieurs conditions expérimentales. Dans ce contexte, l'irradiation conjointe des parents et de la descendance permet d'évaluer l'aggravation des effets au cours des générations, situation non prise en compte par l'ERE. L'exposition continue sur tout le cycle de vie permet en une seule expérimentation d'évaluer tous les effets classiques de l'ERE (reproduction, mortalité), mais aussi des effets plus subtils comme la vitesse d'éclosion, et des malformations. D'autre part, l'irradiation seule des parents permet d'évaluer l'héritabilité des effets à la descendance. D'un point de vue mécanistique, le chapitre I révèle le manque de connaissance sur les mécanismes moléculaires toxiques et plus particulièrement ceux relatifs aux expositions multigénérationnelles. Pour évaluer les effets reprotoxiques et transmissibles après exposition multigénérationnelle, il est indispensable d'évaluer les effets moléculaires à l'échelle parentale. Plus particulièrement, comme expliqué dans

le chapitre I, le développement des premiers stades de vie reposent principalement sur un apport maternel. Dans un contexte d'exposition multigénérationnelle, il est nécessaire de comprendre comment les effets reprotoxiques peuvent avoir une incidence sur le devenir des générations suivantes. L'héritabilité des effets parentaux repose notamment sur les mécanismes épigénétiques (voir chapitre I). Des évidences récentes semblent pointer une implication de l'épigénique dans les effets radio-induits.

Dans ce contexte, le manuscrit s'articule autour de 3 axes de recherches. Le manuscrit s'appuie sur des articles publiés, soumis ou en finalisation de rédaction. Ces publications présentent les résultats majeurs de ce travail de thèse. Nous avons fait le choix, pour le manuscrit, de détailler toutes les hypothèses et expériences menées afin de définir notre démarche scientifique. Ainsi, à chaque partie sont ajoutés des résultats supplémentaires non publiés.

Axe I – Les effets à l'échelle phénotypique d'une exposition multigénérationnelle. (Chapitre III)

Cet axe est consacré à l'évaluation des effets reprotoxiques à l'échelle phénotypique. Plusieurs conditions expérimentales à différents débits de dose d'irradiation ont été retenues.

Axe II – Les mécanismes moléculaires à l'origine d'effets transmissibles délétères. (Chapitre IV)

Cet axe a pour but d'évaluer, à l'échelle moléculaire et pour différents débits de dose, l'implication maternelle dans les effets transmis.

Axe III – La modulation des marques épigénétiques par l'irradiation. (Chapitre V)

Dans le but d'englober les concepts actuels impliqués dans les effets transmissibles de l'irradiation gamma, cet axe se focalise sur l'étude de la modulation des marques épigénétiques par l'irradiation gamma.

A l'issue, les résultats des expérimentations menées sur différents types d'exposition (tous les stades de vie exposés et évaluation de l'héritabilité) permettent de discuter/challenger de la prise en compte des expositions multigénérationnelles dans l'ERE. De plus, l'exposition à différents débits de dose peut donner une indication sur la relation dose/réponse et vérifier l'adéquation des résultats obtenus avec les valeurs de protection des écosystèmes. Finalement, l'évaluation des effets à l'échelle moléculaire peut permettre de développer de nouveaux outils pour améliorer et faciliter l'évaluation du risque écologique (AOP, biomarqueurs).

II.2 Choix expérimentaux

II.2.1 Modèle biologique

L'évaluation des effets radio-induits a été réalisée sur un vertébré aquatique. Le sous-embranchement des vertébrés a été choisi puisque des effets multigénérationnels après exposition aux rayonnements gamma ont déjà été observés chez les invertébrés (Guédon et al., 2021; Maremonti et al., 2019; Trijau et al., 2018). Nous avons donc choisi le poisson zèbre (*Danio rerio*), organisme modèle. Ce poisson d'eau douce est couramment utilisé en écotoxicologie (51 000 individus utilisés en 2019 (CNRS, 2019)) car son génome est entièrement séquencé. De plus, l'élevage de ces poissons est relativement bien connu et leur petite taille facilite leur maintien dans des conditions de laboratoire. Leur cycle de vie est relativement rapide pour des vertébrés et bien détaillé dans la littérature, rendant cette espèce idéale pour des expositions multigénérationnelles et l'évaluation d'effets sur les différents stades de vie. La Figure II- 1 rappelle le cycle de vie du poisson zèbre précédemment abordé dans le chapitre I. Les reproductions sont faciles et rapides à générer. Les pontes comptent plusieurs centaines d'œufs transparents. Ces qualités permettent un grand nombre d'analyse. Il existe plusieurs souches de poissons zèbres : la souche sauvage (Wild Type WT) et des souches de laboratoires (TU, AB). Nous avons choisi la souche AB. Du fait de son élevage intensif en laboratoire, une sélection s'est créée diminuant ainsi la diversité génétique au sein de cette souche. Ainsi, nous avons choisi une souche AB pour s'affranchir au mieux de la diversité de la réponse entre les individus du point de vue génétique. Bien que les réponses soient donc différentes de celles des espèces sauvages, nos expérimentations représentent une première étape facilement réalisable en laboratoire. Pour ce projet de thèse, cette espèce permet donc l'exposition relativement rapide de plusieurs générations dans notre dispositif d'irradiation.

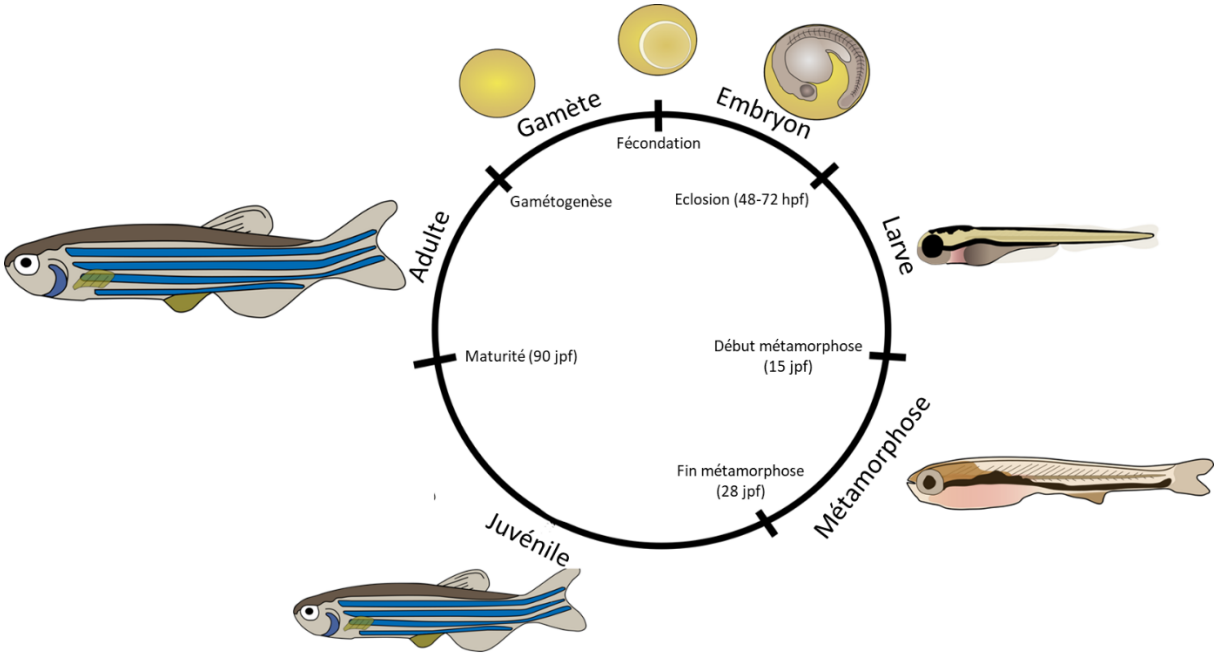


Figure II- 1 : cycle de vie du poisson zèbre. Adaptation d'après Ribas and Piferrer, 2014.

II.2.2 Exposition aux rayonnements ionisants

II.2.2.1Dispositif d'irradiation

La plateforme MICADO'Lab (Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations DOse effet en Laboratoire) a permis l'irradiation gamma externe des poissons adultes, des larves et des œufs. Le dispositif d'irradiation est composé de quatre sou rces de césium 137 d'une activité totale de 370 GBq (Figure II- 2).



Figure II- 2 : Dispositif d'irradiation contenant les sources radioactives.

Il est installé dans un hall suffisamment grand pour entreposer différents dispositifs d'expérimentation à des distances définies des sources afin d'obtenir les débits de dose souhaités. Des dispositifs pour poissons adultes (Zebtec Tecniplast Stand Alone) ont donc pu être positionnés à différents endroits afin d'obtenir différents débits de dose. Des incubateurs (PANASONIC MIR-154) ont également été positionnés pour le suivi des œufs et des larves (Figure II- 3).

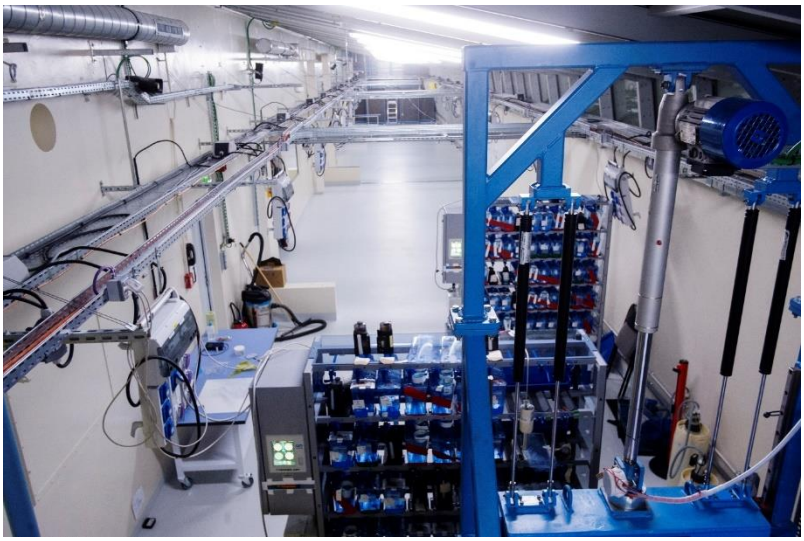


Figure II- 3 : Hall d'irradiation MICADO'Lab avec les dispositifs expérimentaux disposés en fonction du débit de dose souhaité.

II.2.2.2Choix et calculs des débits de doses

II.2.2.2.1 Choix des débits de dose

Plusieurs débits de dose ont été choisis afin d'augmenter les connaissances sur les effets reprotoxiques pour l'ERE (Figure II- 4). Ces expérimentations sont longues et ne peuvent pas être reproduites plusieurs fois au cours de ce travail de thèse. Elles imposent par conséquent de bien choisir les conditions d'irradiation. Le choix des valeurs a été justifié par les seuils de protection établis dans la littérature, comme expliqué dans la synthèse bibliographique et par la détermination de valeurs d'écotoxicité (EC_{10}) propre à l'ERE. Les débits de dose sont également proportionnels entre eux : 0.05, 0.5, 5 et 50 $mGy.h^{-1}$. Le débit de dose le plus faible se situe légèrement au-dessus de la valeur de référence pour la protection des écosystèmes de 10 $\mu Gy.h^{-1}$ (Garnier-Laplace et al., 2006) et dans l'intervalle d'une réduction du succès reproducteur chez les poissons d'eau douce (ICRP, 2008). 0.5 $mGy.h^{-1}$ se situe dans un intervalle de débits de dose pour lequel des effets commencent à être observés et est proche de débit de dose maximal retrouvé à Tchernobyl (0.4 $mGy.h^{-1}$; Kryshev, 1998). Le débit de dose de 5 $mGy.h^{-1}$ se situe dans l'intervalle produisant une « potentielle augmentation de la mortalité ». Enfin, le débit de dose le plus élevé n'est pas écologiquement réaliste. Pour la définition de relation

dose/réponse selon un modèle log-logistique, il est cependant nécessaire d'évaluer les effets sur des débits de dose induisant 100% de dommages, conditionnant le choix de ce débit de dose élevé.

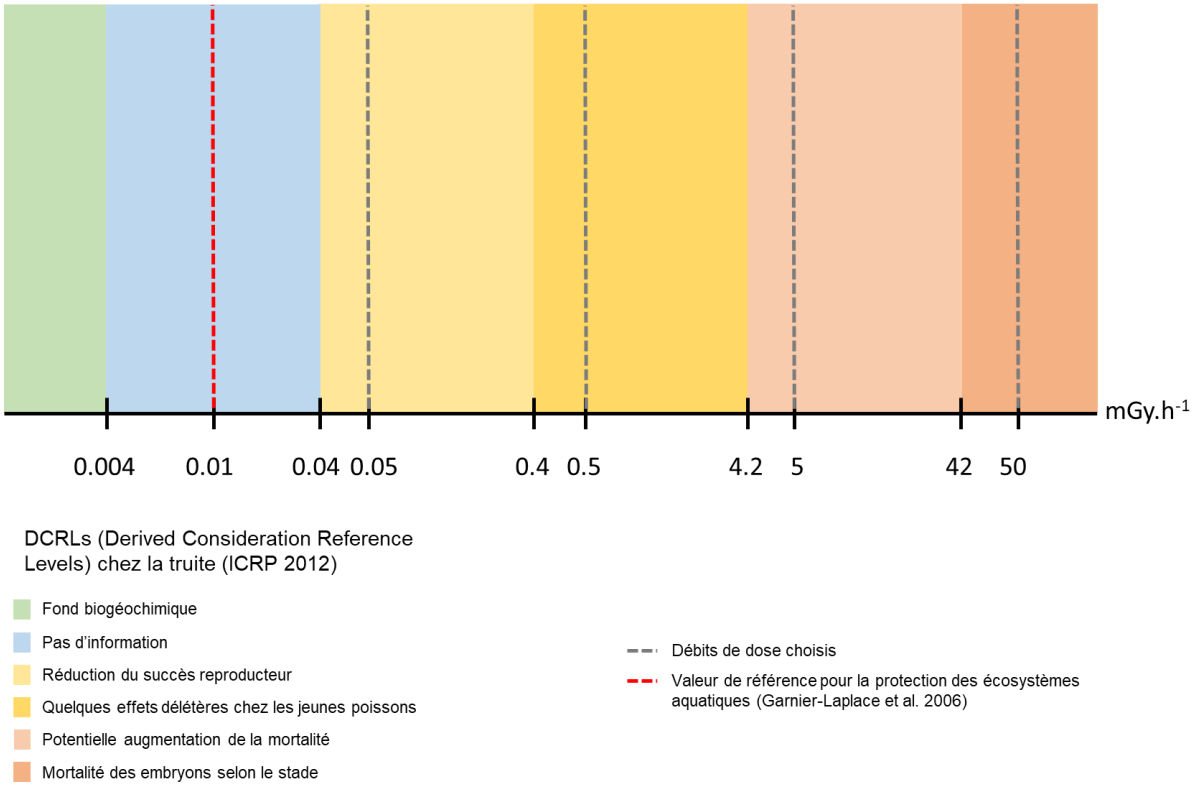


Figure II- 4 : Choix des débits de dose utilisé au cours des différentes expérimentations confronté aux valeurs de protection de la littérature.

II.2.2.2.2 Calculs des débits de dose

Le débit de dose (en $Gy.h^{-1}$) nominal est calculé pour chaque dispositif expérimental en prenant en compte l'atténuation des rayonnements ionisants à travers la matière. Durant l'irradiation, deux dispositifs différents ont été utilisés (aquariums pour les adultes, cristallisoirs dans un incubateur pour les œufs et larves), ce qui a nécessité plusieurs modélisations du débit de dose. Les débits de dose absorbée par le volume des différents dispositifs ont été calculés par simulation numérique. Les calculs ont été réalisés à l'aide du code Monte Carlo d'interaction rayonnement-matière (MCNP) qui permet de modéliser le transport et les interactions des particules chargées ou neutres dans la matière. Ce travail a été réalisé par Nicolas Dubourg (IRSN/LECO). Ces données théoriques sont comparées à des mesures fournies par des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL) placés sur les aquariums (un au niveau de la ligne d'eau et un en bas de chaque aquarium) et sur le haut des cristallisoirs, durant tout le temps d'irradiation. Les données expérimentales et théoriques sont ensuite comparées pour valider le débit de dose (Tableau II- 1). Les unités expérimentales (aquarium) ont été sélectionnées de manière à obtenir des débits de dose très similaires. En effet, il est difficile d'obtenir des débits de dose comparables sur toutes les unités expérimentales

dans les différents aquariums des dispositifs à poisson. Ce choix limite donc le nombre d'unités expérimentales utilisable.

Tableau II- 1 : débits de dose nominaux et mesurés dans les différents dispositifs expérimentaux.

Dispositif	Débit de dose nominal (mGy.h^{-1})	Débit de dose mesurée (mGy.h^{-1})
Aquarium	50	55.3 ± 1.79
Incubateur		49.42 ± 2.40
Aquarium	5	5.15 ± 0.3
Incubateur		5.824 ± 0.01
Aquarium	0.5	0.51 ± 0.03
Incubateur		0.51 ± 0.03
Aquarium	0.05	0.051 ± 0.002
Incubateur		0.059 ± 0.006

II.2.2.3Design expérimental général

Plusieurs expérimentations ont été réalisées en suivant le design expérimental général présenté ci-dessous (Figure II- 5). Ainsi, des individus adultes ont été exposés comme préconisé par le test n°229 de l'OCDE (OECD, 2012). Pour évaluer les effets reprotoxiques ayant une incidence sur la descendance, il est nécessaire de conduire les analyses sur les géniteurs s'étant reproduits et sur leur descendance.

- Deux expérimentations à 50 mGy.h^{-1}. Les F0 ont été irradiés pendant 10 jours et les F1 ont été suivis jusqu'à 120 hpf. Pour une des expérimentations uniquement, des adultes F0 ont été placés en condition contrôle après irradiation, et reproduits après 6, 36 et 63 jours. Les F1 ont été suivis pendant 120 hpf également.

- Une expérimentation (réalisée en amont du projet de thèse au laboratoire) à 0.5 et 5 mGy.h^{-1}. Les F0 ont été irradiés pendant 10 ou 24 jours et les F1 ont été suivis jusqu'à 120 hpf ou 22 jpf.

- Une expérimentation à 0.05 et 5 mGy.h^{-1}. Les F0 ont été irradiés pendant 30 jours. Les F1 ont été suivis quotidiennement jusqu'à maturité sexuelle (131jpf). Les F2 ont été suivis quotidiennement jusqu'à 22 jpf. Cette expérimentation devait être conduite jusqu'à la génération F3 mais a dû être stoppée lors de la crise sanitaire en 2019.

- Une expérimentation à 5 mGy.h^{-1}. Les F0 ont été irradiés pendant 30 jours et les F1 ont été suivis jusqu'à 120 hpf.

Plus de détails sont disponibles dans les publications. De manière générale, deux conditions d'exposition sont indispensables pour discerner les effets transmis des effets aggravés suite à une exposition continue (Figure II- 5) :

- La condition irradiée : tous les stades sont irradiés au fil des générations. Cette condition permet d'observer une aggravation des effets au cours de l'exposition.

- La condition recovery : seule la gamétogenèse « tardive » des premiers géniteurs F0 est irradiée. Ainsi, les effets observés aux générations suivantes sont alloués à l'irradiation des géniteurs F0, suggérant une transmission d'effets.

De telles expériences ont demandé une étape d'ajustement pour optimiser au mieux l'élevage et garantir une survie répondant aux contraintes d'irradiation avant d'engager l'expérimentation multigénérationnelle. La principale contrainte concerne la fréquence d'alimentation des larves jusqu'à 20 jpf. Ainsi, les six premiers mois de thèse ont été dédiés à différents tests d'élevage du stade larvaire (Annexe I). Le protocole final d'élevage comprenant le maintien des poissons, le suivi des paramètres physico-chimiques, le type de nourriture et la fréquence d'alimentation est présenté en Annexe II et dans les différentes publications.

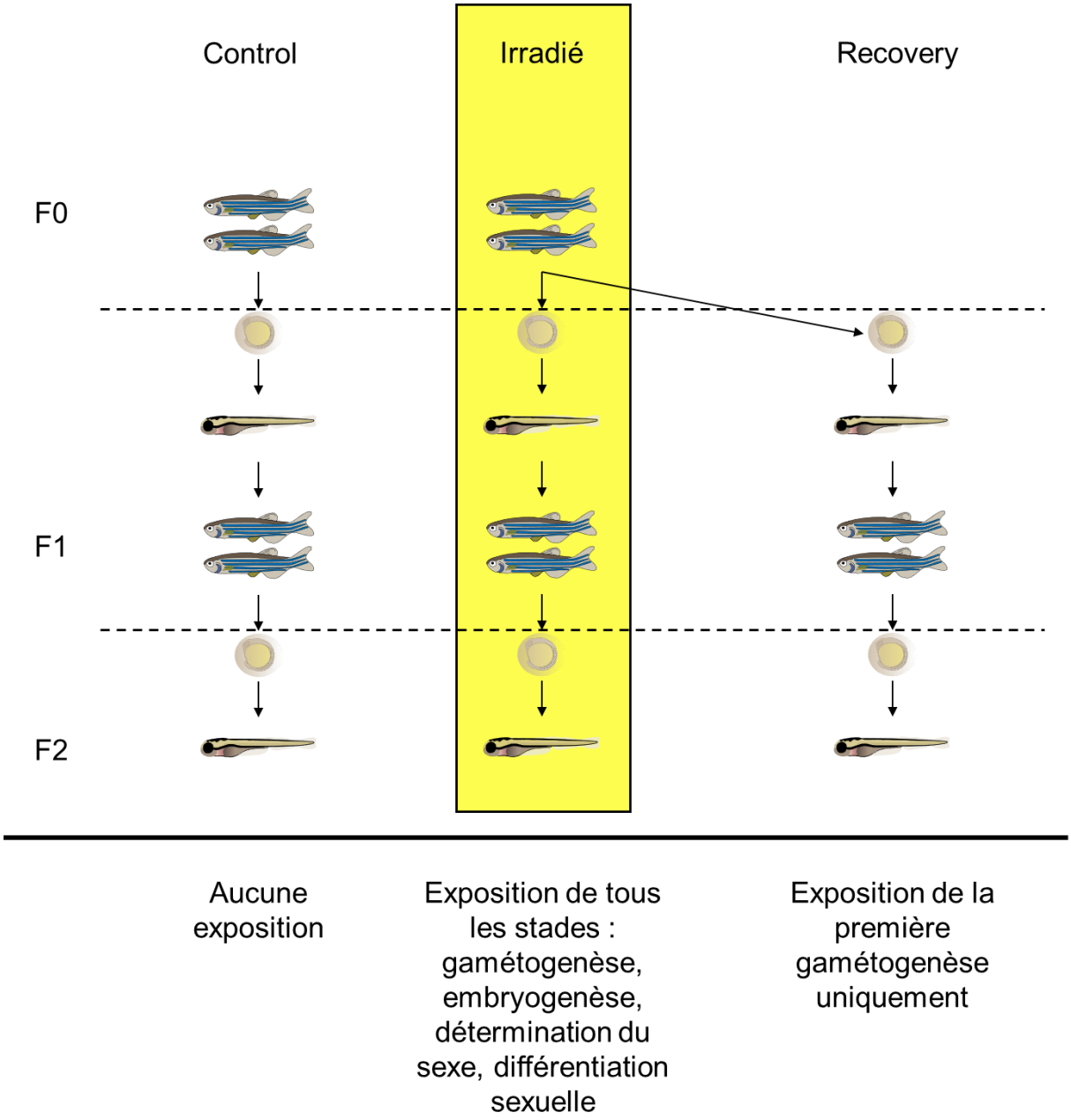


Figure II- 5 : design expérimental général utilisé pour toutes les expérimentations.

II.2.3 Choix des paramètres étudiés

Pour répondre aux différents objectifs de cette thèse, deux approches ont été privilégiées. La première est une approche classique à l'évaluation du risque. Elle consiste à observer des phénotypes après une exposition à un contaminant et à définir des biomarqueurs en lien avec les phénotypes observés. En effet, pour l'ERE, il est plus pertinent d'analyser les effets à l'échelle phénotypique qui sont en lien direct avec le devenir des populations. Dans un deuxième temps, une approche toxicogénomique a été réalisée afin de balayer tous les mécanismes pouvant être observés à l'échelle moléculaire pour différents débits de dose *via* une analyse transcriptomique

(mRNAseq) sans *a priori*. Nous avons réalisé des analyses à plusieurs échelles biologiques. Cette approche intégrative permet de faire le lien entre les effets à l'échelle moléculaire, définis comme plus sensibles et précoces et les effets à l'échelle phénotypique, considéré comme plus tardifs. Ce type d'approche permet le développement d'Adverse Outcome Pathway (AOP). Comme expliqué dans le chapitre I, l'AOP permet d'identifier la cascade d'évènements conduisant à un effet délétère. Le modèle se base sur l'identification d'un événement initiateur à l'échelle moléculaire et cellulaire, jusqu'à la production d'un effet toxique ayant des conséquences écologiques.

Pour le premier axe de recherche, nous avons utilisé des paramètres classiques de l'ERE afin d'apporter de nouvelles données. Ces paramètres sont présentés dans le Tableau II- 2 dans la partie échelle phénotypique. Ils ont permis d'évaluer les performances de reproduction et d'évaluer la transmission d'effets à la descendance. L'échelle cellulaire a également été abordée avec une analyse histologique (Annexe III) pour vérifier l'intégrité des organes reproducteurs (F0). Des analyses transverses à l'échelle moléculaire, témoignant d'une exposition aux rayonnements, ont été ajoutées et ont permis la rédaction de la première publication (Tableau II- 2 ; test des comètes, mesure des EROs). Pour le deuxième axe de recherche, nous avons couplé deux approches différentes comme expliqué précédemment dans le but de définir des biomarqueurs et d'identifier les réponses moléculaires après l'irradiation. Dans un premier temps, un focus a été fait sur un effet fort, apparu à 50 $mGy.h^{-1}$ pour évaluer l'apport maternel dans les effets transmissibles. Pour cela, nous avons analysé deux molécules majeurs maternellement transmises et nécessaires au développement de la descendance. Ces molécules pourraient être *in fine* utilisées comme biomarqueurs. Le cortisol dans les gonades femelles a été mesuré par test ELISA en collaboration avec Benjamin Geffroy (Ifremer Palavas les Flots). La vitellogénine a été observée par analyse western-blot sur les embryons F1 à 24 hpf. Cette analyse a conduit à un stage de master II, co-encandré avec Sandrine Frelon (IRSN LECO). Dans un deuxième temps, une analyse transcriptomique sur les gonades femelles F0 a été réalisée pour 3 débits de dose (Tableau II- 2). Cette analyse a permis une approche globale typique de la toxicogénomique mais également une compréhension des effets transmis puisqu'elle a été réalisée sur les génitrices. Le troisième axe de recherche s'est basé sur l'approche classique de l'ERE. Nous avons utilisé un phénotype à 5 $mGy.h^{-1}$ afin d'évaluer l'implication de la méthylation dans l'altération phénotypique observée. Les analyses ont été réalisées par pyroséquençage (Tableau II- 2), c'est-à-dire que nous avons sélectionné des amorces ciblant des sites CpG dans les promoteurs de gènes d'intérêt. L'objectif était d'évaluer si la modulation de l'expression de gènes ciblés *via* la méthylation de l'ADN pouvait expliquer le phénotype. Les analyses de méthylation ont été réalisées en collaboration avec Fabien Pierron (EPOC équipe EA, Arcachon). Dans cet axe, nous avons également réitéré la mesure de cortisol à 5 $mGy.h^{-1}$ mais également la mesure de l'hormone 11-ketotestostérone via un test ELISA. Enfin, nous

le jeu de données transcriptomiques a permis de balayer tous les processus susceptibles d'expliquer le phénomène observé.

Tableau II- 2 : liste des paramètres biologiques étudiés.

Échelles	Analyses	Mesures	Débits de dose ($mGy.h^{-1}$)	Echantillons
Moléculaire	Test des comètes	Dommages à l'ADN	50	Gonades F0 (♀ et ♂) F1 24 hpf
	Test des comètes	Dommages à l'ADN	0.5 & 5	F1 1, 4 et 10 jpf
	Sonde fluorescente H_2DCFDA	Mesure des ERO	0.5 & 5	F1 96 hpf F1 10 jpf
	RNA-Seq	ARNm	0.05, 5 & 50	Gonades F0 ♀
	Western-blot	Vitellogénine	50	F1 24 hpf
	Test ELISA	Cortisol et 11-ketotestostérone	5 & 50	Gonades F0 ♀
	qRT-PCR	ARNm	0.05, 5 & 50	Gonades F0 ♀
	Pyroséquençage	Méthylation des promoteurs de gènes cibles	0.05 & 50	Gonades F0 et F1 (♀ et ♂)
Cellulaire	Histologie	Etat des gonades	0.5, 5 & 50	Gonades F0 (♀ et ♂)
Phénotypique	Reproduction	Succès reproducteur	0.05, 0.5, 5 & 50	Adultes matures
	Fécondité	Nombre d'œufs pondus	0.05, 0.5, 5 & 50	Œufs 3 hpf
	Survie 3 hpf	Viabilité de la descendance	0.05, 0.5, 5 & 50	Œufs 3 hpf
	Mortalité	Impact sur la descendance	0.05, 0.5, 5 & 50	Suivi quotidien des descendances
	Eclosion	Croissance	0.5, 5 & 50	F1 48, 72 et 96 hpf
	Malformations	Croissance	50	F1 72 hpf
	Sexe ratio	Développement	0.05, 5	F1 131 jpf

Initialement, des analyses transcriptomiques étaient prévues sur toutes les générations (F0 à F3). Suite à la crise sanitaire, il n'a pas été possible d'irradier toutes les générations et de réaliser les analyses associées. L'analyse transcriptomique de la génération F1 est en cours. Nous avons également essayé une nouvelle approche pour les analyses histologiques. En effet, le protocole utilisé au sein du laboratoire, reposant sur l'inclusion en résine Epoxy et sur l'utilisation d'un ultramicrotome pour les coupes, est relativement compliqué. Ainsi, l'inclusion classique en bloc de paraffine avec coupes au microtome a été développée pour l'observation de l'intégrité des gonades (F0 et F1). Dans un premier temps, des échantillons ont été envoyés à l'IRSN de Fontenay aux Roses pour inclusion. Cependant les inclusions avaient été mal réalisées et il était impossible de couper proprement les gonades. Dans un deuxième temps, nous avons fait l'acquisition du matériel nécessaire à l'inclusion en paraffine. Bien que les inclusions étaient mieux réalisées, le matériel est arrivé sur la fin du projet et il n'a pas été possible de finaliser les analyses par manque de temps. Pour les mesures du cortisol, nous souhaitions initialement observer sa métabolisation en mesurant ses métabolites par HPLC/MC. Cependant, la plateforme CriBioM (Marseille) n'est pas parvenue à l'extraction des stéroïdes. Nous souhaitions également évaluer la transmission de cortisol de la mère à la descendance (24 hpf).

Cependant, le matériel biologique dédié s'est avéré être en quantité insuffisante pour entrer dans la gamme de détection du kit de test ELISA pour la mesure du cortisol. La perte de l'expérimentation et l'impossibilité de sa reconduction ne nous a pas permis de réaliser de nouveaux échantillonnages.

Chapitre III – Effets à l'échelle phénotypique d'une exposition parentale au rayonnement gamma : transmission d'effets délétères

III.1 Introduction

Ce chapitre vise à répondre au premier objectif général relatif **aux effets phénotypiques d'une exposition multigénérationnelle à différents débits de dose**. Comme expliqué dans le chapitre I, peu de données existent sur les effets de l'irradiation gamma sur les vertébrés, notamment sur des expositions multigénérationnelles, par rapport aux expositions chimiques (Faßbender and Braunbeck, 2013; Z. Ma et al., 2018; Xie et al., 2019; Zhang et al., 2022). Ainsi, le premier objectif de ce chapitre est de (i) permettre une augmentation du jeu de données après exposition au rayonnement gamma chez le poisson zèbre, sur des traits phénotypiques classiques. Ce premier sous objectif est directement lié à l'évaluation du risque écologique (ERE) pour laquelle l'observation de traits phénotypiques se fait généralement sur un seul stade clé du cycle de vie. Par exemple, les paramètres reproducteurs (fécondité, succès reproducteur, qualité des œufs 3hpf) induisant des effets reprotoxiques (survie de la descendance) sont évalués après exposition d'adultes matures aux contaminants. Cependant, l'exposition sur tout le cycle biologique et sur plusieurs générations conduit à des effets bien supérieurs à ceux d'une exposition sur une période unique. Par exemple, dans le cas du rayonnement, une exposition chronique (4 à 20j) d'œufs (3hpf) de poisson zèbre (0.03 - 50 $mGy.h^{-1}$) n'induit pas de mortalité (Gagnaire et al., 2021; ICRP, 2008; Murat El Houdigui et al., 2019; O. Simon et al., 2011b). Une exposition aigüe à fort débit de dose (1.1633 $Gy.min^{-1}$) et pendant une courte durée (1' à 10') d'œufs (3hpf) induit cependant une mortalité à 120 hpf (Praveen Kumar et al., 2017), bien que ce type de données ne soit pas inclus dans l'ERE. En revanche, l'exposition des adultes puis de la descendance (OECD, 2012) induit de forts taux de mortalité (Buisset-Goussen et al., 2014; Parisot et al., 2015) chez les invertébrés. Ainsi, le deuxième objectif de ce chapitre est (ii) d'évaluer les effets du rayonnement, de tous les stades de développement du poisson zèbre en réalisant une exposition multigénérationnelle. Enfin, les études sur les effets du rayonnement sont principalement disponibles pour des expositions à forts débit de dose (Hu et al., 2016; Pereira et al., 2011; Tsyusko et al., 2011). Dans le cadre de l'ERE, la méthodologie pour la construction de relation dose/réponse, suivant une régression log-logistique, impose des doses élevées pour obtenir 100% d'effet délétère. Ainsi, le troisième objectif de ce chapitre est (iii) d'acquérir des données sur un large panel de débits de dose, afin de confronter les effets à différents débits de dose et de contribuer à la détermination de données d'écotoxicité (EC_{10}).

Ce chapitre permet donc de manière générale de challenger l'ERE et de savoir si l'étude de stades de développement précis et isolés suffit à protéger les écosystèmes. Pour répondre à ces objectifs, plusieurs expérimentations ont été réalisées et présentées dans les deux publications constituant ce chapitre. La première publication concerne des expositions à 3 débits de dose (0.5, 5 et 50 $mGy.h^{-1}$). Des adultes *Danio*

rerio matures, génération F0, ont été irradiés pendant 10 ou 24 jours pour évaluer les effets reprotoxiques. À l'issue de cette irradiation, une reproduction a été réalisée afin d'engendrer une descendance F1 dont les œufs ont été soit exposés (condition irradiée) soit placés en condition non-irradiante (condition recovery) durant les stades embryo-larvaires. La deuxième publication présente également le débit de dose de 5 $mGy.h^{-1}$ mais aussi un débit de dose plus faible de 0.05 $mGy.h^{-1}$, proche de la valeur seuil de protection de l'environnement (0.01 $mGy.h^{-1}$). Au cours de cette expérimentation, la génération F0 a été exposée durant 30 jours avant reproduction. La génération F1 comprend deux conditions (irradiée et recovery), comme expliqué pour la publication précédente. Cette génération a été exposée (pour la condition irradiée) de l'œuf à l'adulte mature pendant 131 jours avant reproduction. Une génération F2 a été produite pour le plus faible débit de dose et a été exposée (condition irradiée et recovery) pendant 22 jours. Pour ces deux publications, la majeure partie des résultats concerne des endpoints classiques de l'ERE : performances de reproduction sur les adultes matures, mortalité pendant les stades embryo-larvaires, taux d'éclosion et malformations des larves. Les publications 1 et 2 sont respectivement publiées dans « Environmental toxicology and chemistry » et dans « Aquatic toxicology ».

Un autre paramètre phénotypique rarement étudié, le sexe-ratio, a été suivi puisque les individus de la génération F1 ont été exposés sur tout le cycle biologique, incluant la détermination et la différentiation sexuelles. À la fin du chapitre, de nouveaux résultats ont été apportés ; ils concernent l'histologie des gonades sur les individus F0 et les taux d'éclosion pour un fort débit de dose.

III.2 Publication 1: « Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance »

Résumé de l'article en français

Des études *in situ* ou en laboratoire, sur les conséquences des expositions parentales, soulignent l'intérêt des études multigénérationnelles en écotoxicologie. Cette étude a principalement permis l'évaluation des effets chroniques de l'irradiation gamma externe (Cs-137) à 4 débits de dose (témoin, 0.5, 5 et 50 $mGy.h^{-1}$) sur des poissons zèbres adultes (F0) exposés pendant 10 jours et leur descendance (F1) exposée ou non exposée pendant 4 à 5 jours. Les principaux critères d'évaluation étudiés comprenaient les performances de reproduction des parents, la survie des embryons et des larves, les altérations de l'ADN et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez les F0 et F1. Aucun effet sur le succès reproducteur, la fécondité ou le taux de fécondation des œufs n'a été observé. Cependant, des effets drastiques ont été observés sur la génération F1 exposée à 50 $mGy.h^{-1}$, entraînant un taux de mortalité de 100 %. Ces effets ont également été observés lorsque la descendance n'était pas irradiée. Il a été démontré que la sensibilité des embryons était principalement due à l'irradiation parentale. De plus, ces effets drastiques induits par l'irradiation des adultes disparaissent dans le temps lorsque les adultes, irradiés pendant 10 jours, sont placés en condition non irradiante. Des altérations de l'ADN ont été observées chez les larves ou les adultes pour les 3 débits de dose, et une augmentation de la production de ERO a également été montrée pour les 2 débits de dose les plus faibles. Cette étude améliore notre compréhension des conséquences des conditions d'exposition des parents sur la descendance. De plus, elle souligne l'intérêt de prendre en compte les effets générationnels transmis dans l'évaluation des risques écologiques.

Abstract

Multigenerational studies have become of great interest in ecotoxicology since the consequence of parental exposure to contaminants on offspring generations was established in situ or in laboratory conditions. The present study mainly examined the chronic effects of external Cs-137 gamma irradiation exposure at 4 dose rates (control, 0.5, 5, and 50 mGy h–1) on adult zebrafish (F0) exposed for 10 d and their progeny

(F1) exposed or unexposed for 4 to 5 d. The main endpoints investigated included parental reproductive performance, embryo-larval survival, DNA alterations, and reactive oxygen species (ROS) production in F0 and F1. No effects on reproductive success, fecundity, or egg fertilization rate were observed. However, drastic effects were observed on F1 exposed to 50 mGy h–1, resulting in a mortality rate of 100%. The drastic effects were also observed when the progeny was not irradiated. It was demonstrated that the sensitivity of the embryos was mainly attributable to parental irradiation. Moreover, these drastic effects induced by adult irradiation dis-appeared over time when 10 d–irradiated adults were placed in a nonirradiated condition. Alterations in larval DNA were observed for the 3 dose rates, and an increase of ROS production was also shown for the 2 lowest dose rates. The present study improves our understanding of the consequences of parental exposure conditions to the progeny. Furthermore, it provides an incentive to take transmitted generational effects into account in ecological risk assessments.

Keywords: Reproduction; Irradiation exposure; Zebrafish; Risk assessment

Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproduction performance

Noémie Guirandy,[a] Béatrice Gagnaire,[a] Sandrine Frelon,[a] Thomas Munch,[a] Nicolas Dubourg,[a] Virginie Camilleri,[a] Isabelle Cavalié,[a] Magali Floriani,[a] Caroline Arcanjo,[a] Sophia Murat El Houdigui,[a] Olivier Armant,[a] Christelle Adam-Guillermin,[a] Patrice Gonzalez,[b] and Olivier Simon[a],*

[a]Institut de Radioprotection et de Surêté Nucléaire, PSE-ENV/SRTE/LECO, Cadarache, Saint Paul-lez-Durance, France [b]Université de Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Pessac, France

Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Houdigui, S.M.E., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environ. Toxicol. Chem. 38, 2556–2567. https://doi.org/10.1002/etc.4562

III.2.1 Introduction

Gamma radiation represents a potential health risk to biota, due to its ability to ionize molecules in tissue. Ionizing radiation is known to induce oxidative stress, DNA damage, and apoptosis, which therefore constitute usual molecular markers for evaluating toxicity mechanisms (Gagnaire et al., 2015; Jaafar et al., 2013; Knowles, 2002; Praveen Kumar et al., 2017; O. Simon et al., 2011b; Sinha et al., 2018). Significant effects in animals (fish, nematode, *Daphnia*) in terms of survival, reproduction, and development have been observed (Adam-Guillermin et al., 2012; Buisset-Goussen et al., 2014; Knowles, 2002; Parisot et al., 2015; O. Simon et al., 2011b). Moreover, damage effects in fish have mainly been observed for early life stages, which are considered to be the most vulnerable to ionizing radiation. Embryogenesis, in addition to gametogenesis and organogenesis, can be affected by ionizing radiation because of the high rate of cell division, proliferation, and differentiation (Hurem et al., 2018b, 2017a) and enable the consequences of irradiation to be assessed.

In terms of ecological risk assessment (ERA), endpoints on the impact on adult reproduction performance (reproductive success, fecundity, fertility) and on development of early stages (growth, survival) remain the main useful ones in characterizing the ecological consequences of pollutants, including ionizing radiation. Radiological protection criteria are largely based on data from acute exposure experiments of adult organisms; thus, information on the effects of ionizing radiation during sensitive life stages and after chronic exposure is lacking (Hurem et al., 2017a, 2017b). Overall, few data are available concerning the effects of ionizing radiation in fish. The ecological screening benchmark for a generic ecosystem of 10 µGy h^{-1} based on the hazardous dose rate for 5% of the species for radioactive substances was built with 5 effect dose rates related to a change of 10% for a particular effect (EDR10) from fish, which involved values ranging from 47 to 20 881 µGy h^{-1} (Garnier-Laplace et al., 2010). This generic benchmark dose rate was proposed by the European project ERICA for the screening of potential radiological effects (Brown et al., 2008). For freshwater and chronic γ external exposure, applying a safety factor of 50 to the lowest EDR10 (reproductive endpoint 516 µGy h^{-1}) led to a predicted-no-effect value of 10 µGy h^{-1} (Garnier-Laplace et al., 2006). Derived consideration reference levels (DCRLs; i.e., "the dose rate band within which there is likely to be some chance of deleterious effects occurring to individuals of such type of a given type of Reference Animal and Plant") indicate a possible reduction of reproductive success for dose rates ranging between 40 and 4000 µGy h^{-1} for trout (International Commission on Radiological Protection, 2012).

Firstly, the EDR10 did not include the assessment of adult reproduction performance. Secondly, none of these fish species belong to the cyprinid family. Thirdly, the

consequences of parental exposure for offspring generations have not yet been taken into account in the ERA. However, multigenerational studies have become of great interest (Buisset-Goussen et al., 2014; Hurem et al., 2017a; Lemos et al., 2017; Parisot et al., 2015). For fish, the progeny of adult zebrafish exposed to 53 mGy h^{-1} (^{60}Co gamma radiation) for 27 d showed a 100% mortality rate occurring at the gastrula stage (Hurem et al., 2017a). Thus, parental exposure can lead to hereditary effects in offspring, probably due to epigenetic mechanisms (Herráez et al., 2017; Hurem et al., 2017a; Lemos et al., 2017)

Because fish are known to be the most radiosensitive organisms among the poikilothermic aquatic animals (Garnier-Laplace et al., 2006), zebrafish (*Danio rerio*) were chosen in the present study as a cyprinid model for assessing gamma-radiation effects on reproduction performance and larval development. Zebrafish have been widely used for examining effects of ionizing radiation (Choi et al., 2010; Choi and Yu, 2015; Gagnaire et al., 2015; Hurem et al., 2017b, 2017a; McAleer et al., 2005; Ng et al., 2017; O. Simon et al., 2011b; Yum et al., 2010) in addition to transgenerational effects (Hurem et al., 2017b; Kamstra et al., 2018)Indeed, breeding success, high fecundity, and rapid development are the main advantages of this model in performing multigenerational studies (Lawrence, 2007; Simon et al., 2014).

In the present study, adult zebrafish were exposed to 4 dose rates (0, 0.5, 5, and 50 mGy h^{-1}, ^{137}Cs gamma radiation) over 10 d. The dose rates were higher than those in "hot spots" measured in freshwater ecosystems around Chernobyl, Pryp'yat', Ukraine (<0.2 mGy h^{-1}; (Bonzom et al., 2016; Fuller et al., 2018; Lecomte-Pradines et al., 2014; Lerebours et al., 2018). Reproduction was initiated, and the progeny were then exposed or not to the same dose rates over 96 to 120 h. The objectives of the present study were to evaluate 1) adult reproductive performance, 2) the effects in the progeny of irradiated parents, and 3) the responses at the molecular and organism levels. Effects on adults were assessed by reproductive performance and genotoxicity (comet assay). Effects on the progeny were assessed using the survival rate (percentage) and the genotoxic and oxidative stress effects. The progeny were also placed in nonirradiated conditions (F1 recovery) over 120 h to evaluate the impact of adult irradiation on the progeny (generational effects).

Complementary objectives concerned the increase of the exposure duration on the effects and the time necessary to obtain reproductive resilience: for the 2 lowest dose rates tested (lowDR; 0.5, 5 mGy h^{-1}), adult F0 exposure duration was increased to 24 d; for the highest dose rate (highDR; 50 mGy h^{-1}), 10 d–irradiated adults (F0) were placed in nonirradiated conditions over 63 d (F0 recovery). Adult performance, progeny survival, and molecular effects were also evaluated during these complementary experiments.

III.2.2 Materials and methods

III.2.2.1 Fish husbandry

The project (APAFIS#15821) was authorized by the Institut de Radioprotection et de Surêté Nucléaire ethics committee no. 81 (EU 0520) in an application under the directive 2010/63/UE relating to animal care. The study was conducted on wild-type zebrafish that were kept, reproduced, and irradiated in a zebrafish housing system (Zebtec Tecniplast Stand Alone) with recirculating fresh water. Adult fish were acclimatized over 2 to 3 wk to tap water + 20% demineralized water renewed daily (Aquadem; pH 7.4 ± 0.2, conductivity = 398 ± 2 µS cm–1, temperature = 28.4 ± 0.3 °C), with a 14:10-h light:dark cycle photoperiod. The fish were fed ab libitum twice a day with commercial flakes (Tetramin®).

III.2.2.2 Adult and embryo exposure

Figure III- 1 shows the exposure duration and endpoints for the experiments. Nominal dose rates were 0.5 and 5 mGy h–1 for the low-dose experiment (lowDR) and 50 mGy h–1 for the high- dose experiment (highDR). Because the 2 experiments (lowDR and highDR) were not carried out at the same time, control fish conditions were implemented for each experiment. Gamma- rays were emitted from a 137Cs source (444 GBq, 662 keV; In¬stitut de Radioprotection et de Surêté Nucléaire MICADO-Lab platform). Dose rates were simulated using MCNP5 software and measured using thermoluminescent dosimeters (Chiyoada Technologies), and the values represented between 91.1 and 100.8% and between 80 and 120% of the nominal lowDR and highDR values, respectively. Two control conditions were kept in a separate room (60–80nGyh–1).

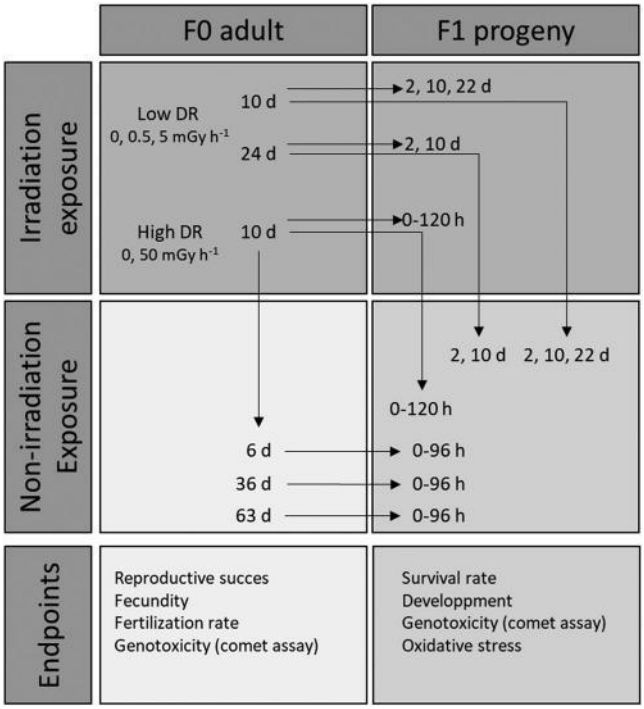


Figure III- 1 : Exposure duration, conditions, and endpoints for low dose rate (DR) and highDR experiments. For each exposure condition, a control condition was included. For the lowDR experiment (0.5, 5 mGy h–1), adults were exposed over 24 d. Reproduction was assessed after 10 and 24 d of irradiation. The progeny were then placed in irradiated and nonirradiated (F1 recovery) exposure conditions over 10 and 22 d. For the highDR ex¬periment (50 mGy h–1), adults were exposed over 10 d. The progeny were then placed in irradiated and nonirradiated (F1 recovery) exposure con¬ditions over 120 h. Adults irradiated for 10 d were placed in nonirradiated exposure (F0 recovery) over 63 d. Reproduction was assessed after 6, 36, and 63 d in F0 recovery conditions. The progeny were placed in nonirradiated exposure conditions over 96 h for each time point (6, 36, and 63 d).

The population density of adult fish was 0.7 L g–1. For the lowDR experiment, 20 adult fish per condition (female: 0.66 ± 0.13 g, n = 24; male: 0.50 ± 0.065 g, n = 11) were irradiated over 10 and 24 d. For the highDR experiment, 24 adult fish per condition (female: 0.38 ± 0.06 g, n = 6; male: 0.40 ± 0.07 g, n = 6) were irradiated over 10 d. To keep the radiation exposure as long as possible, the daily control of abiotic parameters (pH, con¬ductivity, temperature), the animal welfare and the feeding process were carried out in less than 1 h, 5 times per week. During this hour, irradiation was stopped to access the tanks. Food was supplied to the fish twice a day by automatic suppliers. During the weekends, control of these parameters was achieved through the use of cameras, allowing animal welfare to be monitored without interrupting the irradiation. The preparation of reproduction and egg collection required stopping the irradiation for 4 h. After 24 d of exposure, the adults from lowDR were sacrificed and the gonads collected. After 10 d of exposure, 6 adults from highDR were sacrificed and the gonads collected. Six other adults were introduced into non irradiation conditions (F0 recovery).

For each reproduction event, embryos were obtained from 10 spawning genitors (i.e., replicates) for lowDR and 12 genitors (i.e., replicates) for highDR per condition. Each

group, consisting of one male and one female, was placed in specific spawning aquariums to avoid egg predation in the zebrafish housing system. Adults were irradiated during reproduction. After spawning, the egg viability (3–4 h postfertilization [hpf]) of each spawn was confirmed when the blastula stage was reached. The embryos (2.6 mL/egg) were then reintroduced into small beakers (Ø = 9 cm) in the zebrafish housing system to be irradiated at the same dose rate as the adult groups (F1 irradiated group) or without irradiation (F1 recovery group), and larvae were fed starting from 5 d postfertilization (artificial commercial food ST-1; Aqua Schwarz). The culture medium of the embryos was the same as that of the adults, and 10% was replenished daily.

III.2.2.3 Ecologically representative endpoints for adults

For the lowDR experiment, adult F0 reproductive performance (n = 10 couples per condition) was assessed after 10 and 24 dpf exposure for both dose rates tested. Endpoints concerned the reproductive success (number of couples that spawned), the fecundity (number of eggs per female), and the egg survival rate at 3 hpf (fertilization rate). For the highDR experiment, F0 reproductive performance was assessed after 10 d of irradiation (n = 12 couples per condition) and after 6, 36, and 63 d in nonirradiated conditions (F0 recovery, n = 6 couples; Figure III- 1).

III.2.2.4 Ecologically representative endpoints and oxidative stress analysis for progeny

For both experiments, the progeny survival rate was assessed after 24 and 48 h in the control, irradiated, and nonirradiated (recovery) conditions. Complementary experiments consisted of irradiating 3-hpf eggs at 50 mGy h–1 over 96 h (30 eggs from 3 spawns per condition) to measure the survival rate.

For the lowDR experiment, 2 pseudoreplicates of 80 eggs originating from 3 spawns per condition including the control, irradiated, and nonirradiated conditions were followed to measure the progeny survival rate over 1, 2, 10, and 22 d. For the highDR experiment, 30 eggs from 6 spawns of the 3 conditions were tracked over 5 d (120 h).

For the highDR experiment, photographs of 72-hpf larvae were recorded. Morphology (whole body size, surface of yolk reserve), malformations, and cardiac edema were then assessed using software (Danioscope image analysis system, Ver 10.0; Noldus). Analyses were made on ten 72-hpf larvae per condition after 10-d F0 exposure (F0Irr. 10d) and after F0 recovery at 6 d (T10d+R6d) and at 36 d (T10d+R36d).

Reactive oxygen species (ROS) production was measured in F1 progeny from the lowDR experiment using a protocol adapted from Gagnaire et al., 2015 and Hurem et al., 2017. Given the high larval mortality rate, no measurements were made during the

highDR experiment. Production of ROS was determined using the fluorescent probe 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Sigma-Aldrich) in 10 larvae per condition (larvae exposed from 3–4 hpf to 4 or 10 d originating from 10-d adult and 24-d adult reproduction). Through the oxidation of H2DCFDA in dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich) water by ROS (mainly H2O2), the molecule was converted into 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein (DCF), which is highly fluorescent. The reported wavelengths for the measurement of DCF fluorescence are 500 nm for excitation and 525 nm for emission (TECAN Infinite M1000).VA

III.2.2.5 Génotoxic effects in progeny and adult

The genotoxic effects induced by gamma irradiation in the developmental stages (1, 4, and 10 d for lowDR and 1 d for highDR experiments) and in gonads (10 d, highDR experiment) of zebrafish were evaluated using the alkaline comet assay as described in Singh et al., 1988 with modifications (O. Simon et al., 2011a; Simon et al., 2018). After centrifugation (110 g, 10 min, 8 °C; Eppendorf, 5427 R), pellets were suspended in 1 mL of L15-HEPES and used immediately. Cells were counted on a Malassez cell, and their viability was assessed using trypan blue. Two hundred nucleoids per slide were analyzed at ×400 magnification under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600) equipped with a 515- to 560-nm excitation filter. Comet pictures were analyzed using Comet IV software (Perceptive Instruments). This assay was performed on 3 pools of ten 24-hpf eggs, on 10 individual 96-hpf larvae, and on 3 pools of whole gonads per sex and per condition. The tail moment was defined as the percentage of DNA in the tail multiplied by the length between the center of the head and tail.

III.2.2.6 Statistical analysis

All data are presented as means ± SD, with significance taken at $p < 0.05$. A comparison between the control and irradiation or recovery exposures was performed. Before the statistical analyses, the normality and homogeneity of the variance were tested using the Shapiro-Wilks and Fisher tests, respectively. The t test and 1- or 2-way analysis of variances were used when data were normally distributed. The nonparametric test (Kruskal-Wallis) was used when data were not normally distributed.

III.2.3 Results

There were no instances of adult fish mortality during the experimental periods (control, lowDR, and highDR experiments).

III.2.3.1 Cumulative doses after exposure conditions

For the lowDR experiment, cumulative doses in adults ranged between 120 and 2880 mGy after 10 and 24 d of exposure, respectively. For the highDR experiment, the cumulative dose in adults was 12 Gy (SD Tableau III- 1). For the progeny, maximal cumulative doses ranged from 264 to 2640 mGy for the lowDR experiment and 6 Gy for the highDR experiment (SD Tableau III- 1).

III.2.3.2 A Adult performance (reproductive success, fecundity, total egg number, and 3-hpf egg mortality)

For the highDR experiment, all females (n = 12 per condition) spawned after 10 d of exposure. For the lowDR experiment (n = 10 per condition), reproductive success was 100 and 80% for both the irradiated and control conditions, respectively.

Figure III- 2 shows the fecundity (number of eggs per female) after 10 d of exposure for both experiments. High interindividual variability was observed in all conditions. A significant difference (Kruskal-Wallis, p = 0.03) was observed between 0.5 mGy h–1 (240 eggs ± 132) and control (364 eggs ± 123) conditions. In the control lowDR, 43% of all spawns ranged between 101 and 300 eggs, and 57% of spawns had higher than 300 eggs. At 0.5 mGy h–1, 20% of all spawns produced fewer than 100 eggs. At 5 mGy h–1, no significant difference in fecundity (413 eggs ± 148) was observed even though 89% of spawns had more than 300 eggs. At the high dose rate (50 mGy h–1), a change in the size of spawns was also observed, with an increase in the number of spawning events (75%, 9/12), providing between 101 and 300 eggs compared to the control (42%, 5/12).

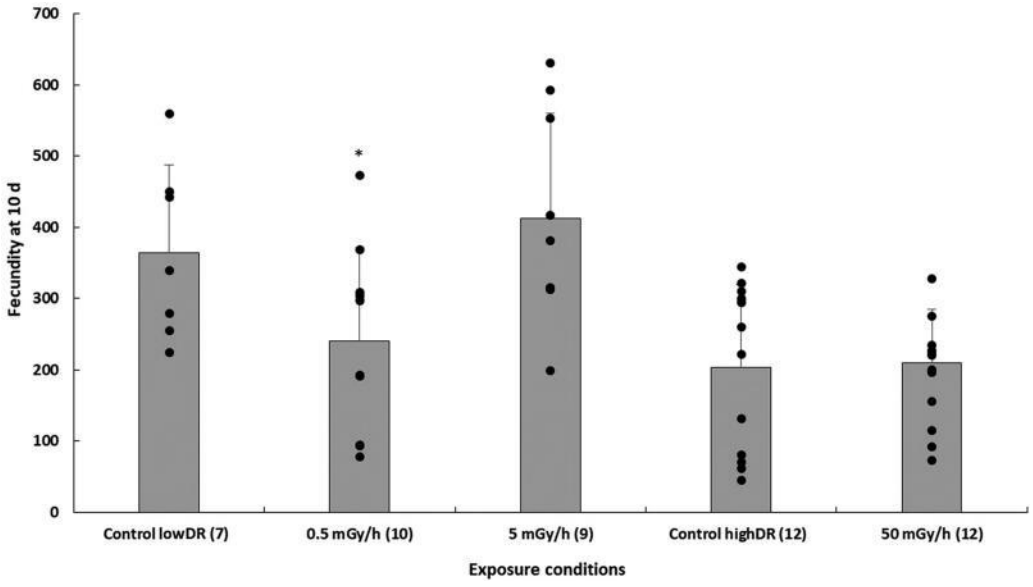


*Figure III- 2 : Individual (points) and average (histogram, means ± standard deviation) fecundity (number of eggs per female) of F0 adults measured after 10 d of exposure for both low–dose rate (DR) and highDR experiments (treatment vs control, *Kruskal-Wallis p = 0.03). ( ) = number of spawns.*

A significant difference was observed between both control fish fecundity (lowDR 364 eggs ± 123 per female [n = 7] vs highDR 203 ± 117 eggs per female [n = 12], p = 0.042 Kruskal-Wallis test) and egg quantity distribution.

The quality of oocytes was assessed by the survival of 3-hpf progeny, indicating the number of fertilized versus nonfertilized eggs. The survival rate at 3 hpf remained high (>89%) without any significant difference between exposure conditions (SD Figure III-1). Of the 50 spawns monitored, only 2 presented a survival rate of <80%. Almost 85% of the spawns presented a survival rate of 90 to 100%.

Reproductive success after 24 d of lowDR exposure was not impacted by irradiation; 80, 90, and 100% of couples reproduced for the controls, 0.5, and 5 mGy h–1, respectively. The significant difference in fecundity previously observed after 10 d between the control and 0.5 mGy h–1 was not observed after 24 d of exposure. Fecundity was 375 ± 102, 289 ± 138, and 357 ± 138 eggs per female for the controls, 0.5, and 5 mGy h–1, respectively. In the controls, 37.5% of spawns contained between 101 and 300 eggs and 62.5% contained more than 301 eggs, as observed after 10 d. At 5 mGy h–1, 75% of spawns presented more than 301 eggs, as previously observed after 10 d of exposure. The survival rate at 3 hpf of eggs was close to the one measured after 10 d of adult exposure.

III.2.3.3 Progeny survival and size

Figure III- 3 shows F1 progeny survival rate (%) measured at 24 and 48 h for all exposure conditions of both experiments. For the lowDR experiment, the survival rate was >87%, with no significant difference between the conditions. For the highDR experiment, a significant difference was observed between the control and larvae exposed to 50 mGy h–1 for 24 h (p = 0.02) and 48 h (p = 0.006). Significant differences were also observed between the control and F1 recovery conditions for both times (p = 0.015 and p = 0.006 for 24 and 48 h, respectively). Figure III- 4 shows the survival rate in F1 progeny originating from the lowDR experiment. Survival rates were >80 and 60% at 2 and 10 d, respectively, for all exposure conditions. No significant effect of treatments and control was observed in the progeny coming from 10 d–irradiated adults. Similar results were observed for the progeny coming from 24 d–irradiated adults. A significant difference was observed between 5 and F1R5 (Kruskal-Wallis test, p = 0.049, n = 6) at 22 d of exposure. No significant differences were observed for the hatching rate (percentage) at 48 h (data not shown).

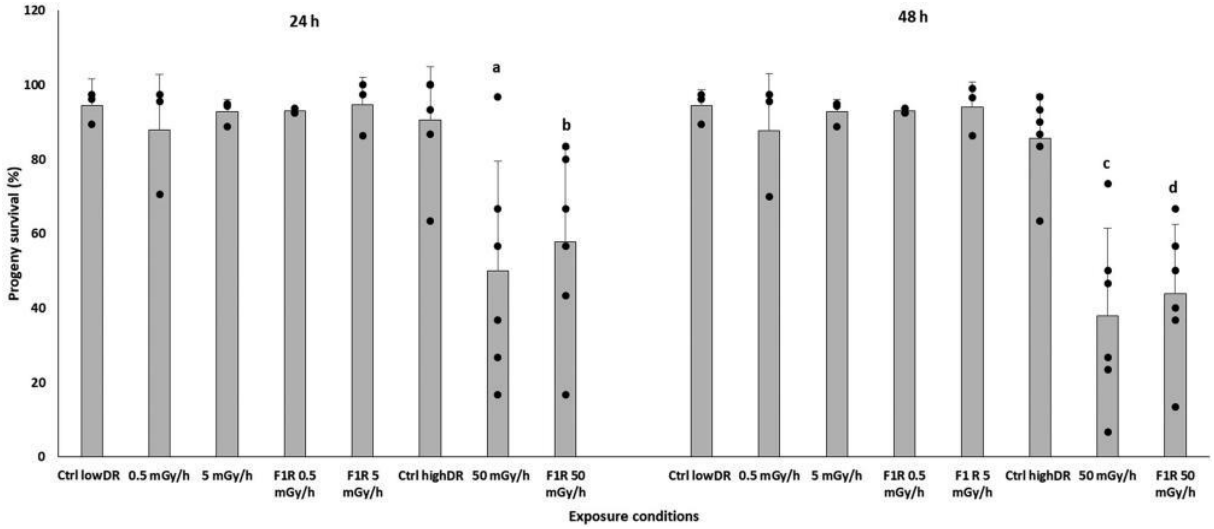


Figure III- 3: Individual (points) and average (histograms, means ± standard deviation) survival rates of F1 progeny at 24 and 48 h. F1 progeny came from adults irradiated over 10 d for all experiments. For the low–dose rate (DR) experiment (control, 0.5, 5, R0.5, R5 mGy h–1), survival rate was calculated from 3 spawns (with 2 pseudoreplicates, 1 male + 1 female). For the highDR experiment (control, 50, R50 mGy h–1), survival rate was calculated from 6 spawns (1 male + 1 female). (Kruskal-Wallis test: treatment vs control, $^{a}p = 0.024$, $^{b}p = 0.015$, $^{c}p = 0.006$, $^{d}p = 0.006$). F1R = F1 recovery condition, i.e., progeny spawned by irradiated adults and placed in nonirradiated conditions.

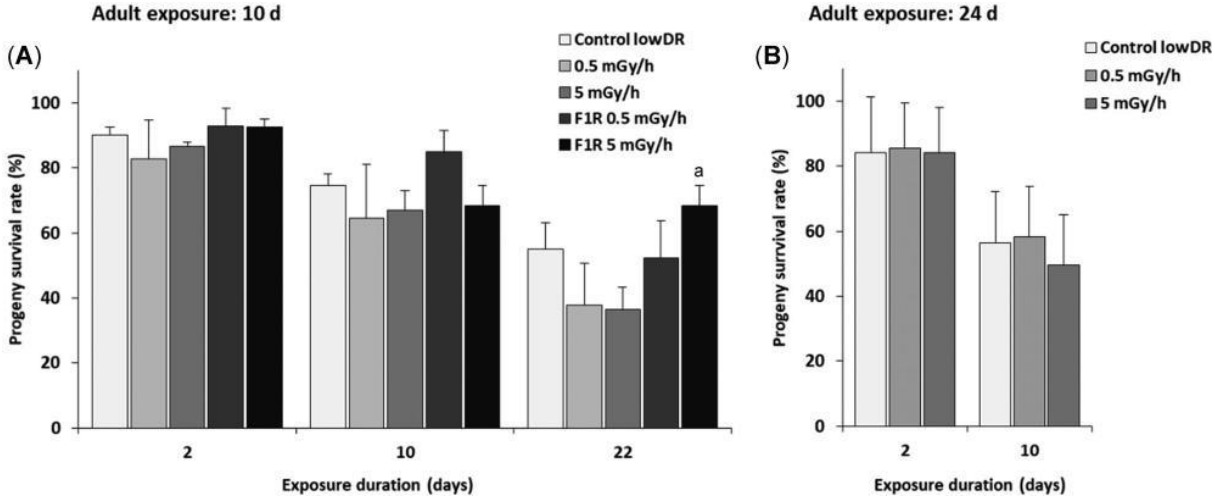


Figure III- 4: Survival rate of F1 progeny over time for the low–dose rate (DR) experiment. Data are means ± standard deviation of 2 replicates of 80 eggs for 3 spawns per condition (Kruskal-Wallis test: 5 vs F1R, ap = 0.049, n = 6). (A) F1 progeny coming from adults irradiated over 10 d. Immediately after spawning, F1 progeny was placed in irradiated and in nonirradiated (F1R recovery) exposure conditions for 22 d. (B) F1 progeny coming from adults irradiated for 24 d. Immediately after spawning, F1 progeny was placed in irradiated exposure conditions for 10 d. F1R = F1 recovery condition, i.e., progeny spawned by irradiated adults and placed in nonirradiated conditions.

For the irradiated and nonirradiated (F1 recovery) larvae (Figure III- 5), 100% died after 120 h of highDR exposure, although the average survival rate for the control condition was 84 ± 11%. In the control condition, the mortality rate was low and remained constant from 24 hpf. The F1 irradiated (51%) and F1 recovery (58%) survival rates at 24 hpf were low compared to the control and ranged between 16 to 96%, indicating a high spawn variability (SD Figure III- 2). Drastic effects seemed to appear more rapidly for F1 irradiated larvae than for F1 recovery larvae (SD Figure III- 2).

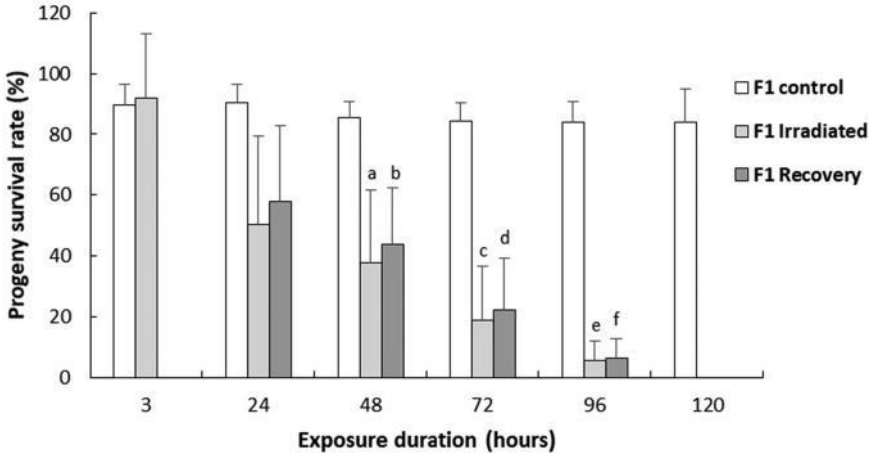


Figure III- 5 : Survival rate (n = 6) of F1 progeny (3–4 h postfertilization) over time. Progeny came from 10 d–irradiated adults for high–dose rate experimentation. F1 progeny were placed in irradiated and nonirradiated (F1R, recovery) exposure conditions over 120 h. (Kruskal-Wallis test: treatment vs control, ap = 0.006, bp = 0.006, cp = 0.003, dp = 0.003; ep = 0.003, fp = 0.003).

Figure III- 6 shows the survival rate in F1 progeny coming from the highDR experiment where adults were placed in nonirradiated exposure conditions (F0 recovery) over 63 d. Fish were induced to spawn after 6, 36, and 63 d. Drastic effects of adult irradiation on survival progeny rate lasted for at least 6 d (35 ± 22, $n = 11$ spawns) and until 36 d (48 ± 37, $n = 8$ spawns). All larvae alive at 48 h from F0R 0d, F0R 6d, and F0R 36d died at 96 h. After 63 d in nonirradiated conditions, the progeny survival rate remained high (>85%, $n = 11$ spawns), and no significant difference was observed compared to the control until 96 h.

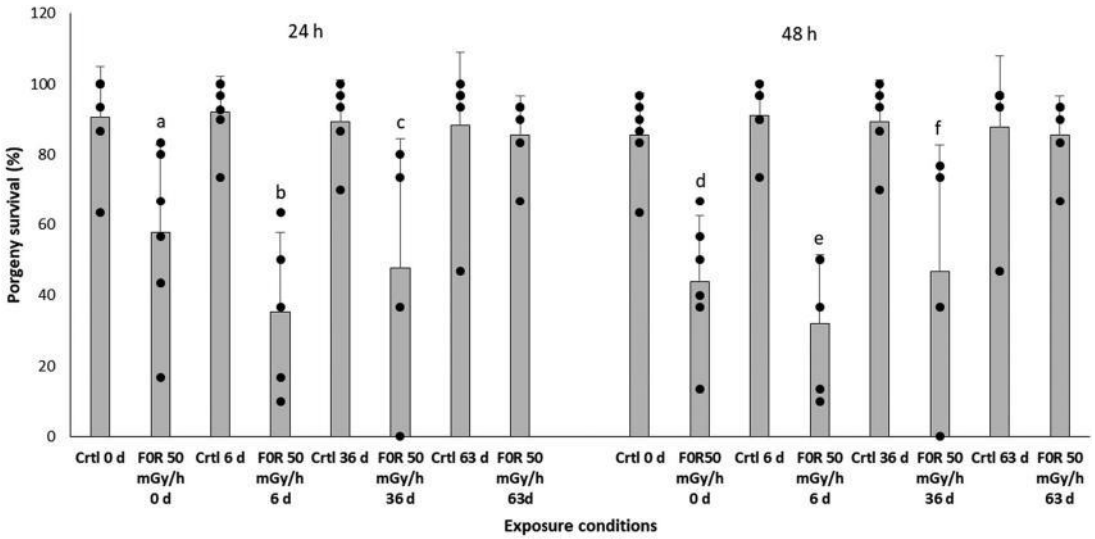


Figure III- 6 : Individual (points) and average (histograms, means ± standard deviation) survival rates (n = 4-6) of F1 progeny after 24 and 48 h. Progeny came from adults irradiated for 10 d and then placed in nonirradiated conditions (F0R, recovery) for 63 d. (Kruskal-Wallis test, treatment vs control, $^{a}p = 0.015$, n = 12; $^{b}p = 0.0060$, n = 11; $^{c}p = 0.05$, n = 8; $^{d}p = 0.006$, n = 11; $^{e}p = 0.0058$, n = 11; $^{f}p = 0.05$, n = 11).

For the highDR experiment, the body sizes of F1 irradiated and F1 recovery larvae decreased significantly compared to the control (Figure III- 7). Similar results were also observed for nonirradiated 72-h larvae originating from F0 recovery conditions after 6 d. After 36 d in nonirradiated conditions (F0R 36d), the body sizes of nonirradiated

progeny showed no significant difference compared to the controls, although 100% of mortality at 120 h was observed. The surface of the vitellus and the pericardia area also showed no statistical difference with the controls (data not shown).

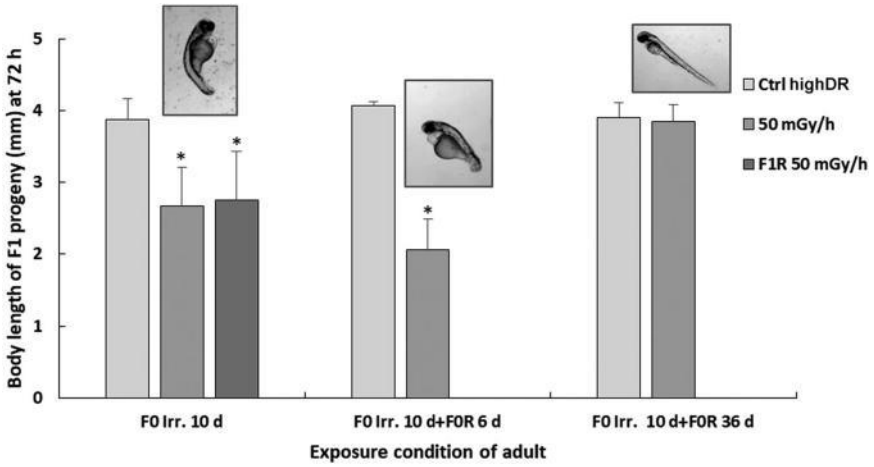


*Figure III- 7 : Body length and typical aspect of F1 progeny at 72 h. F1 progeny came from adults exposed for 10 d (Irr. 10d) and 10 d followed by 6 d (F0Irr. 10d+F0R 6d) and 36 d in nonirradiated (F0Irr. 10d+F0R 36d) conditions. (Kruskal-Wallis test, treatment vs control, *p < 0.05; F0Irr. 10d, p = 0.002, n = 20; p = 0.0049, n = 20; F0Irr. 10d+F0R 6d, p = 0.00007, n = 33; F0Irr. 10d+F0R 36d, p = 0.077, n = 85).*

III.2.3.4 Oxidative stress

Figure III- 8 shows ROS production in F1 progeny coming from the lowDR experiment. Irradiation at 5 mGy h–1 led to an increase of ROS production in 4 d–exposed larvae coming from 24-d adult exposure. However, F1 R progeny exposed over 4 d at both dose rates showed a significant increase in ROS production for larvae coming from 10- and 24-d adult exposure. No effects were observed in larvae (irradiated and recovery) exposed over 10 d (Figure III- 8B).

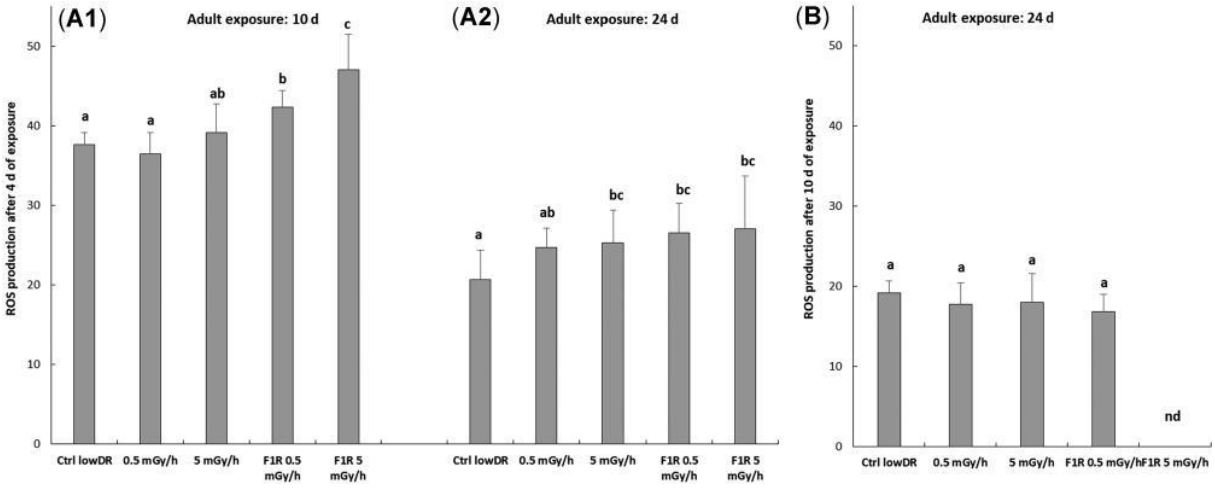


Figure III- 8 Reactive oxygen species production measured in larvae exposed for 4 d coming from F0 adults exposed for 10 (A1) and 24 (A2) d and in larvae exposed for 10 d coming from F0 adults exposed for 24 d (B) of low–dose rate experiments. n = 20 per condition, analysis of variance $_{a,b,c}p < 0.05$. DR = dose rate; nd = not determined; ROS = reactive oxygen species.

III.2.3.5 Genotoxic effects

Figure III- 9 shows DNA damage measured in progeny coming from 24-d adults in the lowDR experiment, expressed by the tail moment. The progeny were placed in irradiated and nonirradiated conditions (F1 recovery) over 10 d. Significant DNA damage was noticed at 4 d for irradiated (0.5 mGy h–1, 11.3 ± 4.3%; 5 mGy h–1, 14.4 ± 2.1%) and nonirradiated (F1R 0.5 mGy h–1, 8.4 ± 3%) larvae compared to the controls (×10). At 10 d, the tail moment showed no difference between the conditions.

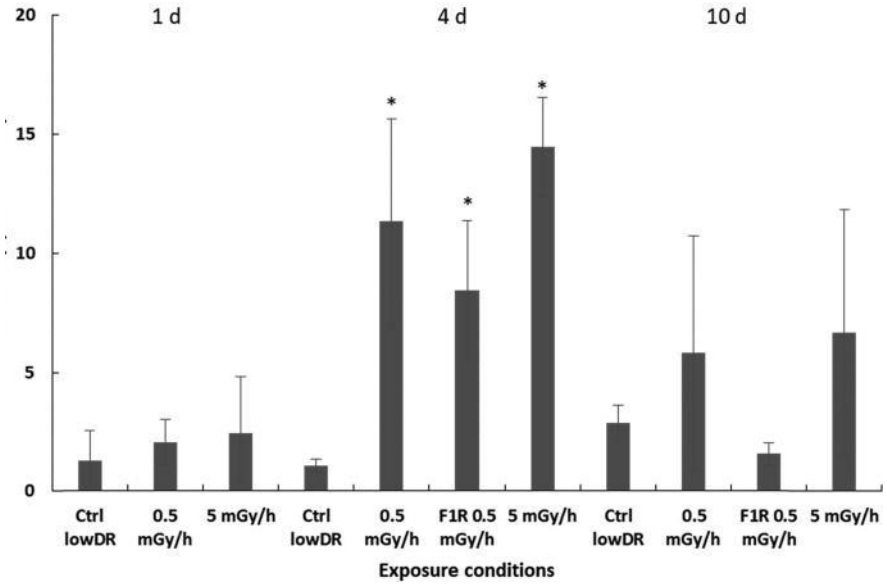


*Figure III- 9 : : F1 progeny DNA damage (tail moment) after 1, 4, and 10 d of exposure. Progeny came from adults irradiated for 24 d for the low–dose rate experiment. Progeny (3–4 h postfertilization) were placed in irradiated and nonirradiated (F1R, recovery) conditions. Kruskal-Wallis test, *p < 0.05. DR = dose rate.*

Figure III- 10 shows DNA damage expressed by the tail moment in the progeny coming from 10-d adult fish from the highDR experiment. The progeny was collected in irradiated and nonirradiated conditions (F1 recovery) for 24 h. The high mortality rate did not allow larval collection at 4 and 10 d. A significant increase of the tail moment was observed between the control, irradiated (×6.5), and nonirradiated (×5) conditions. Figure III- 10B,C shows DNA damage in the gonads of males and females after 10 d of irradiation. The DNA damage increased for both sexes compared to the control. The effects were more pronounced for males (×3) than for females (×1.7).

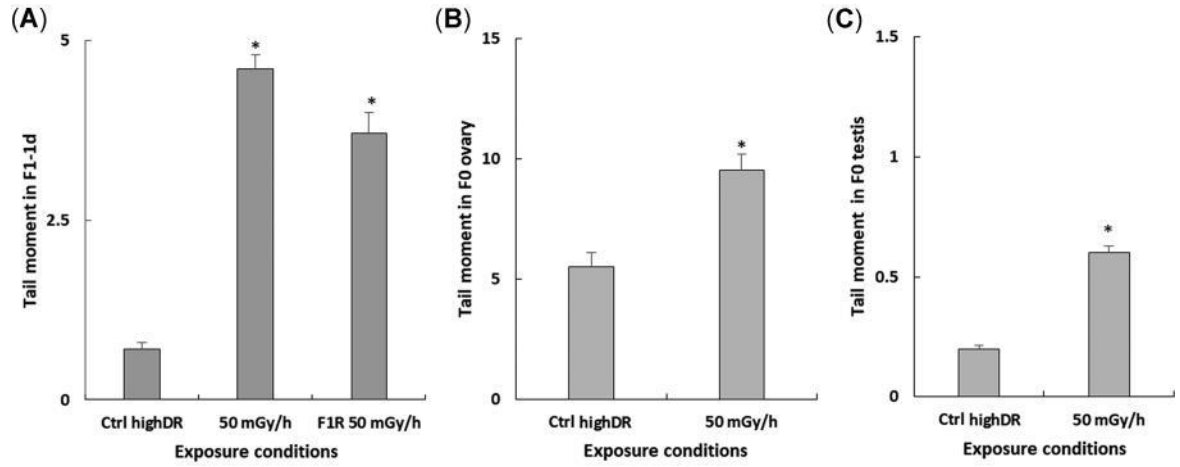


*Figure III- 10 : Progeny DNA damage (tail moment) in (A, 1 d, irradiated and nonirradiated exposure [F1R, recovery]) and in gonads of F0 adults (B, female; C, male) coming from the high–dose rate experiment. Kruskal-Wallis test, *p < 0.05. DR = dose rate.*

III.2.4 Discussion

In the present study, embryo-larval and adult fish stages were exposed to 0.5, 5, and 50 mGy h^{-1} (^{137}Cs gamma radiation) to augment the data set of gamma ray effects after parental and progeny exposure.

III.2.4.1 Zebrafish as a relevant model for multigenerational studies

Reproduction was achieved for almost all couples and with a high egg survival rate (93 ± 7% at 3 hpf for both control conditions, $n = 19$), confirming the relevance of this model for multigenerational studies (Lawrence et al., 2012; Simon et al., 2014). Differences in reproductive performances were observed between the controls used in both lowDR and highDR experiments. The body weights of the control adults in both experiments was significantly different and could explain the differences in fecundity. Indeed, zebrafish fecundity, and more generally reproduction performance, can be influenced by the quality of the diet, the female body size, and environmental enrichment (Karga and Mandal, 2017; Lawrence, 2007; Lawrence et al., 2012; Wafer et al., 2016). It is important to note that although zebrafish reproduce easily in laboratory conditions, assessing interindividual variability of reproductive performances requires a large number of couples.

III.2.4.2 No effect of irradiation was observed on adult reproduction performance

For the testes dose rates, irradiation did not alter the reproductive capacity. Many pollutants which contribute to oxidative stress are known to alter reproductive performance, indicating that this physiological function may be sensitive to changes in the environment (Faßbender and Braunbeck, 2013; Newman et al., 2015; Simon et al.,

2014; J. Wang et al., 2011). Perturbation of reproduction was previously observed in other fish species. Rackham and Woodhead, 1984 demonstrated that the total fecundity of guppies (*Poecilia reticulata*) was markedly reduced at dose rates of 1.7, 4, and 12.7 mGy h^{-1} without drastic impacts on the mortality rate and survival of offspring. Rackham and Woodhead, 1984 demonstrated that spermatogenesis of adult butterfly splitfins (*Ameca splendens*) was disrupted (no production of sperm) after 7.3 mGy h^{-1} of exposure over 52 d and that developing oocytes were less sensitive to the effects of radiation than spermatogenesis. Knowles, 2002 observed a significant decrease in adult zebrafish in the mean number of eggs per spawn after 30 d at 7.4 mGy h^{-1}. Compared to the present study, the toxic modes of action seem to be strongly influenced by the biological model and the experimental conditions of the dose rates. Under our experimental conditions, adult zebrafish stage did not exhibit sensitivity.

III.2.4.3 Drastic effects from irradiation on progeny survival were observed and transferred from adult fish

Drastic effects on progeny were only observed after high dose rate exposure and certainly had a detrimental effect at the population level. After exposure of adults to 5 mGy h^{-1} over 10 or 24 d (cumulative dose rates of 1.2 and 2.8 Gy, respectively), no effect on progeny survival rate was observed until after 22 d. The range of these induced effects (5–50 mgGy h^{-1}) is narrow and encourages us to more precisely determine the EDR10. The nonirradiated progeny of 27-d F0 exposed to 53 mGy h^{-1} (34.3 Gy) previously showed a 100% mortality rate occurring at the gastrulation stage (8 hpf;Hurem et al., 2017). In the present study, drastic effects appeared at a lower cumulative dose (12 Gy) for the same dose rate. These results raise questions regarding the best criteria (cumulative dose vs dose rate) for measuring gamma-radiation exposure in the ERA.

The experimental design for the lowDR and highDR experiments did not allow the identical cumulative dose to be obtained. It could potentially be beneficial to vary the duration of exposure (1 d at 50 mGy h^{-1}, 100 d at 0.5 mGy h^{-1}) to compare the effects obtained at the same cumulative dose.

Adverse effects seemed to be due to adult exposure because 1) irradiated and recovery progeny showed identical effects compared to the control, and 2) direct irradiation of embryos at this high dose rate did not cause significant mortality, as confirmed in the present study and by Simon et al. (2011a). Vertebrate embryos are particularly sensitive to ionizing radiation because of their high rate of cell division and migration (Hu et al., 2016; Hurem et al., 2017a; Jarvis and Knowles, 2003; Rhee et al., 2012). The sensitivity of early stages (development and antioxidant enzymes activities) has already been demonstrated; 6-hpf embryos were more sensitive than 12- and 24-hpf embryos to gamma irradiation (0.01–1 Gy;Hu et al., 2016). However, we

demonstrated in the present study that the sensitivity of the progeny to ionizing radiation was particularly high when they originated from irradiated parents.

Parental effects observed in the highDR experiment were reversible because they disappeared when adults were placed in nonirradiated conditions for between 36 and 63 d. These results suggest F0 recovery of reproductive capacity. The F0 adult zebrafish exposed to 53 mGy h^{-1} for 27 d (31 Gy) and placed in nonirradiated conditions failed to produce viable offspring 1.5 yr after irradiation (Hurem et al., 2017a). The differences in terms of experimental design and cumulative dose between the present study and that of Hurem et al., 2017 encouraged us to elucidate the mechanisms behind the transfer from adult to progeny and the F0 recovery induction over time.

The earliest stages of embryonic development rely on maternal products that are generated during oogenesis and supplied to the egg. Yolk lipoprotein nutrients, vitamins, hormones, mRNA transcripts, and DNA methylation statuses have been identified as markers of egg quality. Damage to these maternal products could also explain the drastic effects observed in the progeny. Note that the period of maternal control of embryonic development varies among animals and could explain difference of ionizing radiation effects between species (Abrams and Mullins, 2009; Vastenhouw et al., 2019). Among transferred maternal products, cortisol is essential for early development (Faught et al., 2016; Nesan and Vijayan, 2016, 2013). Then, de novo synthesis of cortisol starts after hatching (48 hpf;Nesan and Vijayan, 2016). Finally, elevated cortisol levels in embryos lead to the same effects (mortality, pericardial edema, and heart malformation;Nesan and Vijayan, 2012) observed in the present study. Moreover, high levels of cortisol in females may directly impact estradiol production, possibly affecting vitellogenin production and its incorporation into the oocyte, leading to drastic effects in the progeny. In the present study, we hypothesize that the high dose rates of gamma irradiation could have led to an alteration of cortisol deposition and its transfer to eggs, which may have resulted in altered offspring phenotypes.

III.2.4.4 ROS production and genotoxicity after irradiated and recovery conditions

From potentially toxic mechanisms, the genotoxicity and ROS induction were assessed. Gamma irradiation is known to induce ROS formation in zebrafish larvae (Gagnaire et al., 2015; Jarvis and Knowles, 2003). In the present study, ROS production compared to the control was increased after 4 d of exposure of larvae originating from adults exposed for 10 and 24 d. Recovery larvae showed ROS production without being irradiated, and ROS production was higher in F1 recovery larvae than in irradiated larvae (originating from F0 10d). Once again, adult exposure led to high ROS production in larvae. This would seem to be a consequence of an

effect inherited from the parents. Results were similar to those observed in other exposure conditions (dose rate, recovery duration) by Hurem et al., 2017.

Because no effect was observed in 10-d larvae, the oxidative stress induced by gamma irradiation seems to be transitory. The activities of antioxidant enzymes are known to change in a developmental stage–dependent manner. However, larval ROS production in 4-d larvae was increased by gamma irradiation and persisted in the F1 recovery condition. We hypothesized that, under our experimental conditions, irradiation of the progeny led to an induction of protective agents that could counteract ROS production and reestablish a healthy cellular redox balance. Antioxidant enzyme activities could be assessed in further experiments in 10 d–irradiated larvae to test this hypothesis.

Significant genotoxic effects were observed in 4 d–irradiated and nonirradiated progeny coming from adults exposed in the lowDR experiment (0.5 and 5 mGy h^{-1}) for 24 d. High interindividual variability was, however, observed for the lowDR experiment, preventing the highlighting of significant differences.

Genotoxicity has previously been demonstrated in eggs exposed to gamma rays in chronic or acute experiments (Gagnaire et al., 2015; Praveen Kumar et al., 2017; O. Simon et al., 2011b) or to nonradioactive pollutants (Kosmehl et al., 2008; Vicquelin et al., 2011). In the present study, tail moment values were comparable to those measured in eggs and larvae exposed over 4 d at 24 mGy h^{-1} (Gagnaire et al., 2015). Thus, the present results suggest an increase in the intensity of genotoxic effects attributable to parental irradiation and confirm the molecular effects inherited from the parents. The genotoxic effects decreased at 10 d, suggesting a better efficiency of DNA repair mechanisms at this larval stage, potentially related to a better efficiency of the antioxidant system. It would be interesting to measure some of the DNA repair mechanisms (such as gamma H_2AX activity) to confirm this hypothesis.

Irradiation of adults at high dose rates led to significant genotoxic effects on irradiated and nonirradiated progeny as early as 1 d, unlike results obtained at lower dose rates. However, the levels of genotoxic effects at 1 d remained lower than those measured at 4 d in the lowDR experiment, which did not lead to a high mortality rate. Comparison between the different stages of development remains difficult, and we have to take into account possible differences in reparation mechanism induction between the different stages to explain the relationship between mortality and genotoxicity effects. We suggest that the early life stage could be more sensitive than the later life stage.

High irradiation exposure led to significant genotoxic effects on adult gonads. However, the effects were lower than those measured after low uranium waterborne exposure (Simon et al., 2018). Significant differences were also observed in the controls between

males and females, as previously observed in other studies (Simon et al., 2018). Moreover, irradiation effects seemed more pronounced for males than for females. Further studies may be completed by the determination of genotoxicity levels in zebrafish sperm, allowing a better link with genotoxicity observed in the progeny, as proposed by Reinardy et al., 2013. Indeed, during spermatogenesis, chromatin is processed and packaged, and contact between DNA and nuclear matrix is reorganized. Furthermore, the epigenetic pattern is also totally remodeled, and transcription is stopped. All of these events contribute to the control of embryo development in the early life stages (Herráez et al., 2017).

III.2.5 Conclusion

These results on fish reproductive performance after gamma irradiation provide additional information for ERA. Drastic effects on progeny and consequently on population levels were observed at dose rates between 5 and 50 mGy h^{-1}, confirming the DCRL values. However, it is important to note a difference in the sensitivity between the trout reference organism and *D. rerio*, the model organism in the present study. Moreover, the present study highlights that parental exposure leads to significant effects in the progeny at the molecular level (ROS, genotoxicity), even at low dose rate (0.5 mGy h^{-1}). The consequences of these molecular effects will need to be studied following chronic exposure. The results encourage us to take into account the consequences of transmitted generational (i.e., heritable) effects for the determination of DCRL values. The present study improves our understanding of the consequences of multigenerational exposure conditions for a better radioprotection of aquatic ecosystems. It confirms the difference in sensitivity of model species and identifies a narrow range of occurrence of drastic effects. It also acts as an incentive to acquire new data from multigenerational chronic exposure at low dose levels.

III.2.6 References

Gagnaire B, Cavalié I, Pereira S, Floriani M, Dubourg N, Camilleri V, Adam-Guillermin C. 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 169:69-78.

Simon O, Massarin S, Coppin F, Hinton TG, Gilbin R. 2011. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of γ irradiation on zebrafish eggs. J Environ Radioact 102:1039-1044.

Praveen Kumar MK, Shyama SK, Kashif S, Dubey SK, Avelyno D, Sonaye BH, Kadam Samit B, Chaubey RC. 2017. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicol Environ Saf 142:95-101.

Jaafar L, Podolsky RH, Dynan WS. 2013. Long-Term Effects of Ionizing Radiation on Gene Expression in a Zebrafish Model. PLoS ONE 8.

Environment Agency, R&D Technical Report P3-053/TR, Bristol, UK.

Sinha P, Arunachalam KD, Annamalai SK. 2018. Radio-protective dosimetry of Pangasius sutchi as a biomarker, against gamma radiation dosages perceived by genotoxic assays. Ecotoxicol Environ Saf 164:629-640.

Adam-Guillermin C, Pereira S, Della-Vedova C, Hinton T, Garnier-Laplace J. 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. Rev Environ Contam Toxicol 220:67-103.

Parisot F, Bourdineaud JP, Plaire D, Adam-Guillermin C, Alonzo F. 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in Daphnia magna during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. Aquatic Toxicology 163:27-36.

Buisset-Goussen A, Goussen B, Della-Vedova C, Galas S, Adam-Guillermin C, Lecomte-Pradines C. 2014. Effects of chronic gamma irradiation: A multigenerational study using Caenorhabditis elegans. J Environ Radioact 137:190-197.

Hurem S, Gomes T, Brede DA, Lindbo Hansen E, Mutoloki S, Fernandez C, Mothersill C, Salbu B, Kassaye YA, Olsen AK, Oughton D, Aleström P, Lyche JL. 2017. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ Res 159:564-578.

Hurem S, Martín LM, Lindeman L, Brede DA, Salbu B, Lyche JL, Aleström P, Kamstra JH. 2018. Parental exposure to gamma radiation causes progressively altered transcriptomes linked to adverse effects in zebrafish offspring. Environmental Pollution 234:855-863.

Hurem S, Martín LM, Brede DA, Skjerve E, Nourizadeh-Lillabadi R, Lind OC, Christensen T, Berg V, Teien HC, Salbu B, Oughton DH, Aleström P, Lyche JL. 2017. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. PLoS ONE 12.

Garnier-Laplace J, Della-Vedova C, Andersson P, Copplestone D, Cailes C, Beresford NA, Howard BJ, Howe P, Whitehouse P. 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. J Radiol Prot 30:215-233.

Brown JE, Alfonso B, Avila R, Beresford NA, Copplestone D, Pröhl G, Ulanovsky A. 2008. The ERICA Tool. J Environ Radioact 99:1371-1383.

Garnier-Laplace J, Della-Vedova C, Gilbin R, Copplestone D, Hingston J, Ciffroy P. 2006. First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. Environmental Science and Technology 40:6498-6505.

ICRP. 2012. Protection of the environment under different exposure situtations.

Lemos J, Neuparth T, Trigo M, Costa P, Vieira D, Cunha L, Ponte F, Costa PS, Metello LF, Carvalho AP. 2017. Single Low-Dose Ionizing Radiation Induces Genotoxicity in Adult Zebrafish and its Non-Irradiated Progeny. Bull Environ Contam Toxicol 98:190-195.

Herráez MP, Ausió J, Devaux A, González-Rojo S, Fernández-Díez C, Bony S, Saperas N, Robles V. 2017. Paternal contribution to development: Sperm genetic damage and repair in fish. Aquaculture 472:45-59.

Choi VWY, Cheng SH, Yu KN. 2010. Radioadaptive response induced by alpha-particle-induced stress communicated in vivo between zebrafish embryos. Environmental Science and Technology 44:8829-8834.

Choi VWY, Yu KN. 2015. Embryos of the zebrafish Danio rerio in studies of non-targeted effects of ionizing radiation. Cancer Lett 356:91-104.

McAleer MF, Davidson C, Davidson WR, Yentzer B, Farber SA, Rodeck U, Dicker AP. 2005. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. Int J Radiat Oncol Biol Phys 61:10-13.

Yum EHW, Li VWT, Choi VWY, Cheng SH, Yu KN. 2010. Effects of alpha particles on zebrafish embryos. Applied Radiation and Isotopes 68:714-717.

Ng CYP, Cheng SH, Yu KN. 2017. Photon hormesis deactivates alpha-particle induced bystander effects between zebrafish embryos. Radiation Physics and Chemistry 133:72-80.

Kamstra JH, Hurem S, Martin LM, Lindeman LC, Legler J, Oughton D, Salbu B, Brede DA, Lyche JL, Aleström P. 2018. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. Scientific Reports 8.

Lawrence C. 2007. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269:1-20.

Simon O, Floc'h E, Geffroy B, Frelon S. 2014. Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity. Environ Toxicol Chem 33:1817-1824.

Fuller N, Ford AT, Nagorskaya LL, Gudkov DI, Smith JT. 2018. Reproduction in the freshwater crustacean Asellus aquaticus along a gradient of radionuclide contamination at Chernobyl. Sci Total Environ 628-629:11-17.

Lerebours A, Gudkov D, Nagorskaya L, Kaglyan A, Rizewski V, Leshchenko A, Bailey EH, Bakir A, Ovsyanikova S, Laptev G, Smith JT. 2018. Impact of Environmental Radiation on the Health and Reproductive Status of Fish from Chernobyl. Environmental Science and Technology 52:9442-9450.

Lecomte-Pradines C, Bonzom JM, Della-Vedova C, Beaugelin-Seiller K, Villenave C, Gaschak S, Coppin F, Dubourg N, Maksimenko A, Adam-Guillermin C, Garnier-Laplace J. 2014. Soil nematode assemblages as bioindicators of radiation impact in the Chernobyl Exclusion Zone. Sci Total Environ 490:161-170.

Bonzom JM, Hättenschwiler S, Lecomte-Pradines C, Chauvet E, Gaschak S, Beaugelin-Seiller K, Della-Vedova C, Dubourg N, Maksimenko A, Garnier-Laplace J, Adam-Guillermin C. 2016. Effects of radionuclide contamination on leaf litter decomposition in the Chernobyl exclusion zone. Sci Total Environ 562:596-603.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-191.

Simon O, Floriani M, Cavalie I, Camilleri V, Adam C, Gilbin R, Garnier-Laplace J. 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve Corbicula fluminea. J Environ Radioact 102:766-773.

Simon O, Gagnaire B, Camilleri V, Cavalié I, Floriani M, Adam-Guillermin C. 2018. Toxicokinetic and toxicodynamic of depleted uranium in the zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 197:9-18.

Lawrence C, Best J, James A, Maloney K. 2012. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (Danio rerio). Aquaculture 368-369:103-108.

Karga J, Mandal SC. 2017. Effect of different feeds on the growth, survival and reproductive performance of zebrafish, Danio rerio (Hamilton, 1822). Aquac Nutr 23:406-413.

Wafer LN, Jensen VB, Whitney JC, Gomez TH, Flores R, Goodwin BS. 2016. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 55:291-294.

Newman TAC, Carleton CR, Leeke B, Hampton MB, Horsfield JA. 2015. Embryonic oxidative stress results in reproductive impairment for adult zebrafish. Redox Biology 6:648-655.

Wang J, Zhu X, Zhang X, Zhao Z, Liu H, George R, Wilson-Rawls J, Chang Y, Chen Y. 2011. Disruption of zebrafish (Danio rerio) reproduction upon chronic exposure to TiO2 nanoparticles. Chemosphere 83:461-467.

Faßbender C, Braunbeck T. 2013. Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. Ecotoxicology 22:825-837.

Woodhead DS. 1977. The effects of chronic irradiation on the breeding performance of the guppy, poecilia reticulata (osteichthyes Teleostei). Int J Radiat Biol 32:1-22.

Rackham BD, Woodhead DS. 1984. Effects of Chronic γ-irradiation on the Gonads of Adult Ameca Splendens (Osteichthyes: Teleostei). International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine 45:645-656.

Jarvis RB, Knowles JF. 2003. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate γ-radiation: detection by the alkaline comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 541:63-69.

Hu M, Hu N, Ding D, Zhao W, Feng Y, Zhang H, Li G, Wang Y. 2016. Developmental toxicity and oxidative stress induced by gamma irradiation in zebrafish embryos. Radiat Environ Biophys 55:441-450.

Rhee JS, Kim BM, Kang CM, Lee YM, Lee JS. 2012. Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, Kryptolebias marmoratus embryo. Environ Toxicol Chem 31:1745-1753.

Abrams EW, Mullins MC. 2009. Early zebrafish development: It's in the maternal genes. Current Opinion in Genetics and Development 19:396-403.

Vastenhouw NL, Cao WX, Lipshitz HD. 2019. The maternal-to-zygotic transition revisited. Development (Cambridge, England) 146.

Faught E, Best C, Vijayan MM. 2016. Maternal stress-associated cortisol stimulation may protect embryos from cortisol excess in zebrafish. Royal Society Open Science 3.

Nesan D, Vijayan MM. 2013. Role of glucocorticoid in developmental programming: Evidence from zebrafish. Gen Comp Endocrinol 181:35-44.

Nesan D, Vijayan MM. 2016. Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish. Scientific Reports 6:22582.

Nesan D, Vijayan MM. 2012. Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. Mol Cell Endocrinol 363:85-91.

Kosmehl T, Hallare AV, Braunbeck T, Hollert H. 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (Danio rerio) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 650:1-14.

Vicquelin L, Leray-Forget J, Peluhet L, LeMenach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J. 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquatic Toxicology 105:235-245.

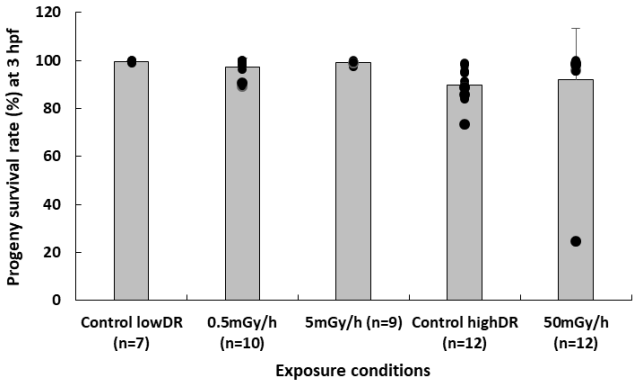
Reinardy HC, Syrett JR, Jeffree RA, Henry TB, Jha AN. 2013. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (Danio rerio), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. Aquatic Toxicology 126:224-230.

III.2.7 Supporting information

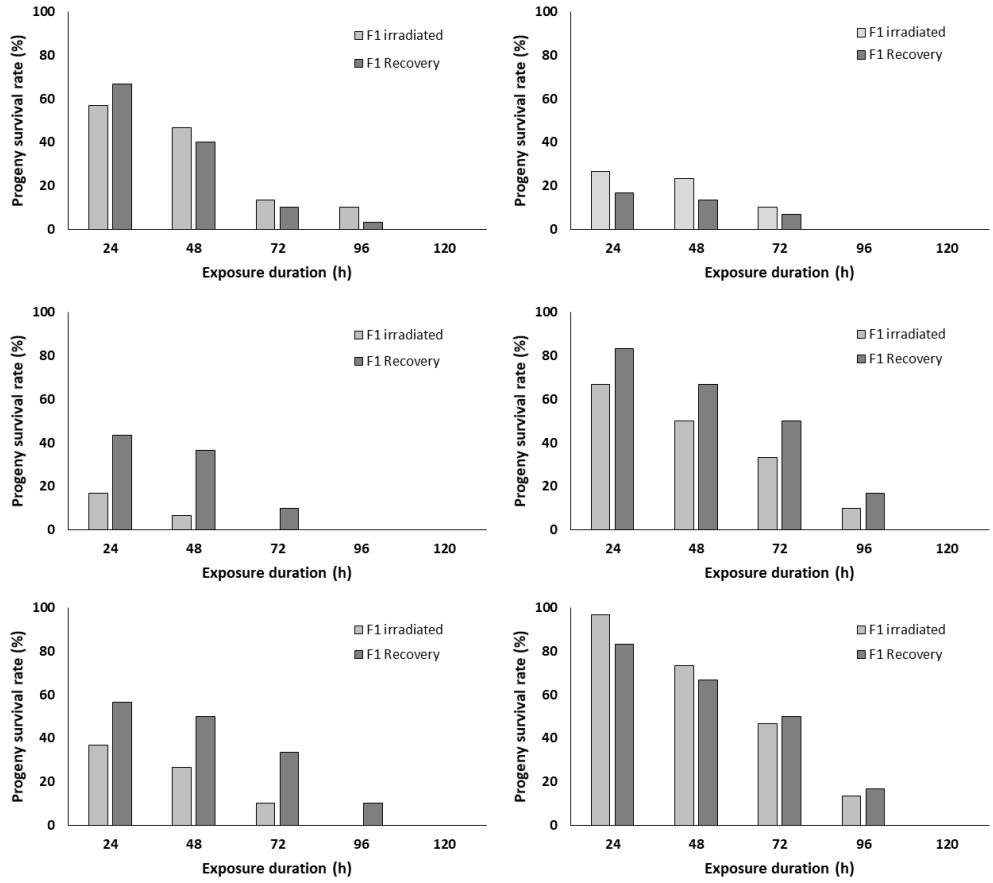
SD Tableau III- 1 : Cumulative dose (mGy) for adult and progeny after lowDR and highDR experiments.

Cumulated dose (mGy)

Biological stage		Adult FO		Progeny F1				
Exposure duration (d)		10	24	1	4	5	10	22
Dose rate (mGy h^{-1})	0.5	120	288	12	48	60	120	264
	5	1200	2880	120	480	600	1200	2640
	50	12000	-	1200	4800	6000	-	-



SD Figure III- 1 : Progeny survival rate (individual (points) and mean ± SD (histogram), %) measured at 3-4 hpf. n= number of spawns.



SD Figure III- 2 : Individual survival rate (%) of 6 F1 progeny (3-4 hpf) over 120 h. Progeny came from 10d-irradiated adults for highDR experimentation. F1 Progeny were placed in irradiated and non-irradiated (F1R, Recovery) exposure conditions over 120 h.

III.3 Publication 2: «Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish».

Résumé de l'article en français

Les études multigénérationnelles représentent un intérêt en écotoxicologie et des études précédentes ont montré l'importance de ces études pour l'évaluation de la toxicité des rayonnements chez les poissons. Dans notre étude, le premier objectif était d'étudier les stades précoces de développement (stades embryo-larvaires) et les fonctions physiologiques critiques telles que la reproduction (qui sont généralement étudiées dans le cadre de l'évaluation des risques écologiques (ERE)), afin d'évaluer la sensibilité du poisson zèbre aux rayonnements ionisants. Le deuxième objectif était de mettre en évidence l'existence d'effets phénotypiques à certains stades de vie au fil des générations. A notre connaissance, c'est la première fois que l'irradiation du poisson zèbre (0.05 et 5 mGy.h^{-1}) jusqu'à la génération F2 est maintenue avec les deux conditions d'exposition suivantes : (1) recovery, seuls les géniteurs F0 étaient irradiés et la descendance était placée en condition contrôle, (2) condition irradiée, toutes les générations ont été exposées. L'irradiation multigénérationnelle a mis en évidence une altération de la capacité de reproduction des parents F1 (succès de reproduction), principalement au cours du premier cycle de reproduction (104j), ainsi que du taux de survie des larves. Des effets inattendus mais significatifs sur le sexe-ratio ont été observés chez la descendance F1 après irradiation parentale (principalement à 5 mGy.h^{-1}). Ces effets ont été observés pour les deux conditions - irradiée et recovery - suggérant des effets transmis des géniteurs F0 à la descendance F1. Tous les stades de vie ont été impactés par les rayonnements ionisants (RI), suggérant une altération des fonctions physiologiques (reproduction et détermination sexuelle). Ces résultats proposent l'hypothèse selon laquelle les RIs affectent la dynamique des populations. De plus, les effets transmis suggèrent une aggravation des effets à l'échelle de la population au fil des générations. Ces modalités d'exposition se rapprochent des conditions environnementales rencontrées sur le terrain pour évaluer le devenir des populations sauvages, et soulignent ainsi l'importance des études multigénérationnelles pour soutenir l'ERE des rayonnements ionisants chez les poissons.

Abstract

Mutigenerational studies are now of great interest in ecotoxicology and previous studies have shown the importance of conducting multigenerational studies when

assessing radiation toxicity in fish. In our study, the first objective was to study the early life stages (embryo-larval stages) and critical functions such as reproduction (which are generally studied in the context of ecological risk assessment (ERA)), in order to assess the sensitivity of zebrafish to ionizing radiation. The second objective was to assess acquisition of phenotypic effects at select life stages over generations. To our knowledge, this was the first time that irradiation of zebrafish (0.05 and 5 mGy.h− 1) up to generation F2 was maintained with the following two exposure conditions: (1) recovery, only F0 genitors were irradiated and the progeny were placed in control condition, (2) irradiated condition, all generations were exposed. Multigenerational irradiation affected F1 parental reproductive capacity (reproductive success) mainly over the first reproductive cycle (104d) and larval survival rate. Unexpected yet significant effects on sex ratio were observed in F1 progeny after parental irradiation (mainly at 5 mGy.h− 1). These effects were observed for both conditions -irradiated and recovery- suggesting transmitted effects from F0 genitors to offspring. All studied life stages were affected by ionizing radiation (IR), suggesting an alteration of vital physiological functions (reproduction and sexual determination). Such results highlight the hypothesis that IR affects population dynamics. In addition, the clear evidence of transmitted effects suggests worsening of effects at the population scale over generations. This approach is closer to environmental conditions to assess wild population fate, and thus highlights the importance of multigenerational studies to support ERA of ionizing radiation in fish.

Keywords: Multigenerational ; Mortality ; Sex ratio ; Zebrafish ; Irradiation ; Transmitted effect

Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish

Guirandy Noëmie[a*], Gagnaire Béatrice[a], Camilleri Virginie[a], Cavalié Isabelle[a], Pierron Fabien[b], Gonzalez Patrice[b], Simon Olivier[a]

[a] IRSN/PSE-ENV/SRTE/LECO, Centre de Cadarache-B.P. 3 – Bat 183 – 13115 St Paul Lez Durance, France

[b] Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

*Corresponding author.

E-mail addresses: noemie.guirandy@irsn.fr

Guirandy, N., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Pierron, F., Gonzalez, P., Simon, O., 2022. Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish. Aquat. Toxicol. 244, 106101. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106101

III.3.1 Introduction

Exposure to ionizing radiation (IR) is reported to induce a variety of biological effects in fish (Anbumani and Mohankumar, 2012; Rhee et al., 2012). In most cases, the effects after gamma irradiation are assessed at specific sensitive stages, such as the embryo-larval stage, because they are considered to be most vulnerable to ionizing radiation (Gagnaire et al., 2015; Hu et al., 2016; Lerebours et al., 2020; Pereira et al., 2011; Praveen Kumar et al., 2017; O. Simon et al., 2011b). However, focusing on just one sensitive stage of life is not enough to obtain a comprehensive understanding of the effects of irradiation in fish (Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2018b, 2017a). For example, at 50 to 53 mGy h^{-1}, F1 irradiated and non-irradiated progeny from F0 irradiated zebrafish (*Danio rerio*) showed 100% mortality, providing evidence of transmitted effects from parents to progeny and thus the importance of assessing multigeneration studies These dose rates are not environmentally relevant but contribute to the development of the dose-responses relationships necessary for ERA. Further studies at lower dose rates also need to be considered. At a lower dose rate (5 to 8.6 mGy h^{-1}), parental exposure led to significant effects at the molecular levels in progeny, via multiple processes, such as epigenetic mechanisms (Hurem et al., 2018b, 2017b; Kamstra et al., 2018). Moreover, multigenerational studies assessed over an entire life span should be done to represent at most the environmental conditions; indeed, higher ecological radiosensitivity was observed in Chernobyl wildlife (Hazard dose rate affecting 50% of species at their 50% effect) compared to laboratory conditions.

The Chernobyl and Fukushima accidents released considerable amounts of radionuclides into the environment and have provided a strong impetus to better address the ecosystems affected by chronic exposure to gamma radiation (Bréchignac et al., 2016; Lerebours et al., 2016). However, traditional environmental risk assessment (ERA) approaches do not generally consider multigenerational exposure when predicting impacts on ecosystems. Therefore, classical ERA benchmarks might not be adequate for assessing irradiation effects in wild fish populations. Indeed, as for other pollutants, effects of IR are mainly assessed based on classical endpoints (reproductive success, fecundity, fertility, survival) measured at one stage of life, without considering the effects across multiple generations. The lack of data on toxicity after multigenerational exposure have encouraged the scientific community and policymakers to address laboratory multigenerational studies (Whitehouse et al., 2011)(, which has led to the development of the "Test No.443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study" (OECD, 2018) on fish. . However, multigeneration studies on IR are scarce but they demonstrated that multigenerational exposure can lead to harmful effects and highlights new toxic mechanisms (see Guirandy et al., 2019). These studies suggested that IR can induce (i) epigenetic

alterations, such as DNA methylation located on gene promoters and enhancers, which can be inherited by future generations and (ii) altered transcriptomes.

Beyond studied parameters, selecting an appropriate exposure dose or dose rate exposure is also very important to increase the relevance of ecotoxicity datasets. Frequently, irradiation effects on fish focus exclusively on acute and short-term exposures (Hu et al., 2016; Pereira et al., 2011; Tsyusko et al., 2011), which is not environmentally realistic and not suitable for assessing chronic effects. Low dose rates must also be studied to complete the dose/response relationship and more precisely represent the environmental conditions. A generic screening value of 10 µGy h^{-1} has been defined as protected dose rate for terrestrial and aquatic ecosystems (Garnier-Laplace et al., 2010). Environmental protection by International Commission on Radiological Protection (ICPR) referred to the Derived Consideration Reference Levels (DCRL), corresponding to a dose rate band where deleterious effects can appear. A possible reduction in reproductive success for dose rates between 40 and 4000 µGy h^{-1} was retained for freshwater fish (Reference Animals and Plant: trout) (International Commission on Radiological Protection, 2012).

In this study, we investigated whether multigenerational gamma irradiation (^{137}Cs) of zebrafish (*Danio rerio*) can affect the reproductive performances of animals and induce effects on F1 and F2 progenies (Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2018b, 2017a; Kamstra et al., 2018). We hypothesized that IR can influence reproductive performance across generations. Therefore, a multigenerational experiment on fish covering three generations (F0 exposed at adult stage, F1 and F2) was performed at a low dose rate of 0.05 mGy h^{-1}, close to the generic screening value (0.01 mGy h^{-1}, (Garnier-Laplace et al. 2006)) and lower DCRL range. A second dose rate of 5 mGy h^{-1} was studied to challenge the drastic effects on progeny previously determined in experiments focusing on high irradiated parental exposure (50 mGy h^{-1}) (Guirandy et al., 2019) and represents the upper dose rate of the DCRL. We used domesticated zebrafish (*Danio rerio* AB strain), which develop rapidly, have high fecundity, and are well described in the literature (Lawrence, 2007). *Danio rerio* is often used in ecotoxicology, for the assessment of stress effects in general and more recently for the characterization of multi-or transgenerational effects of stressors (Baker et al., 2014; Lin et al., 2020; Pierron et al., 2021; Siegenthaler et al., 2017; Simon et al., 2014). Moreover, zebrafish have been already used in studies assessing the effects of ionizing radiation(Epperly et al., 2012; Gagnaire et al., 2015; Hurem et al., 2017a, 2018b; Kamstra et al., 2018; Kong et al., 2016; Murat El Houdigui et al., 2020, p. 2; O. Simon et al., 2011b). This study was designed to answer several questions: (i) How does gamma radiation impact different generations and how is this impact transmitted across generations? (ii) What are the sensitive endpoints to radiation at low doses or dose rate?

We reared F1 and F2 progenies from F0 adult irradiated for 30d. Two irradiation conditions were defined: (i) irradiated (I) where each generation was irradiated over time to observe any possible worsening of effects over the 2 generations and (ii) recovery (R) where only the F0 adult was exposed, progenies were in non-irradiated conditions to observe any possible parental transmission of effects. Adult reproductive performances, progeny survival, and progeny development were evaluated and compared to previous experiments performed at a high dose rate (50 mGy h^{-1}) (Guirandy et al., 2019).

III.3.2 Materials and methods

III.3.2.1 Adult fish husbandry

Project #20995 was authorized by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) ethics committee no. 81 (EU 0520, C13-013-07) and complied with French regulations on performing experiments on animals in application of directive 2010/63//UE relating to animal protection. The study was conducted on wild-type zebrafish that were kept, reproduced, and irradiated in a zebrafish housing system (Zebtec Tecniplast Stand Alone) with recirculating oxygenated freshwater. Adult fish were acclimatized for 3 weeks to tap water + 20% demineralized water renewed daily (Aquadem; pH = 7.4 ± 0.4, conductivity = 398 ± 12 µS cm^{-1}, temperature = 28.4 ± 1.3 °C), with a 12:12-h light:dark cycle photoperiod. The fish were fed *ab libitum* three times a day with GEMMA Wean (Skretting®).

III.3.2.2 Fish rearing

The rearing method under controlled conditions was optimized based on different tests performed before the experimentation (choices of food, cleaning of devices, density of individuals, and water renewal for better survival), not presented here. From 0 hpf to 20 days post-fertilization (dpf), progeny were kept in crystallizing glass dishes (diameter 9 cm) in groups of 50 fish. The water used in crystallizing dishes was the same as that used for F0 adult fish. Crystallizing dishes were kept in an incubator (PANASONIC MIR-154), with nominal constant temperature of 28°C and a 12:12-h light:dark cycle photoperiod. From 15 dpf to 20 dpf, the water level in the crystallizing dishes was raised by 0.5 centimeter every day. Crystallizing dishes were cleaned daily. At 20 dpf, progeny were transferred to an aquarium (3.5L, Zebtec Tecniplast Stand Alone) with a low water flow to avoid disrupting larvae locomotion. At adult age, water flow wasincreased to ensure appropriate water quality. From 7 dpf to 50 dpf, larvae were fed twice a day with 24h-old *Artemia salina* Nauplii and once a day with Gemma Micro ZF (Skretting®). Past this age, fish were fed *ad libitum* three times a day with GEMMA Wean (Skretting®) with a food dispenser. The same protocol was used for breeding the F2 generation from F1 adults.

III.3.2.3 Adult and embryo exposure

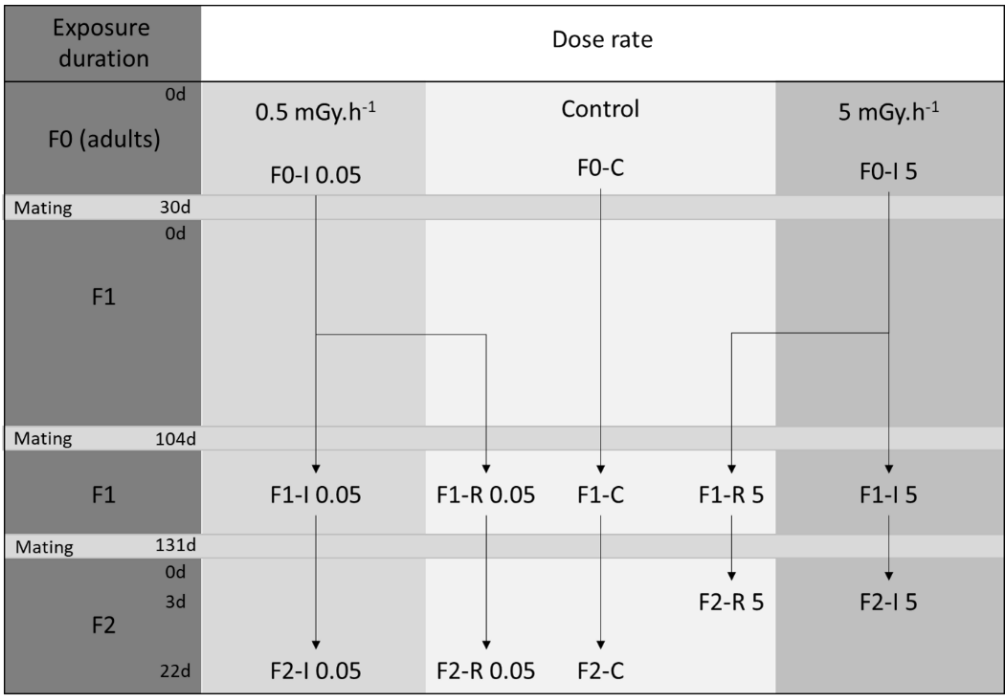


Figure III- 11 : Experimental design and exposure conditions (duration (d) and dose rate (mGy h^{-1}) used for the multigenerational experiment. F0 adults were exposed over 30 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated (F1-I0.05, F1-I5) and non-irradiated (recovery, F1-R0.05, F1-R5) exposure conditions over 131 days. Mating was performed at 104 and 131d. F2 progenies (F2-I0.05, F2-I5) from F1 irradiated adults were irradiated over 22 days. F2 progenies (recovery, F2-R0.05,) from F1 recovery adult were placed in non-irradiated exposure over 22 days. F2 progenies (recovery, F2-R5) from F1 recovery adults were placed in non-irradiated exposure conditions over 72 hours. M: mating.

Nominal dose rates were 60–80 nGy.h^{-1} (control-C), 0.05 (I0.05) and 5 (I5) mGy h^{-1}. Gamma-rays were emitted from a ^{137}Cs source (444 GBq, 662 keV; IRSN, MICADO-Lab platform). Dose rates were simulated using MCNP5 software and measured using thermoluminescent dosimeters (Chiyoada Technologies), and the values represented between 98% and 108 % of the nominal values. Control dishes were kept in a separate room.

The population density of adult fish was 4 fish per liter. 30 couples of F0-adult fish per condition (F0-C, F0-I0.05, F0-I5) were exposed over 30 days. Daily controls and feeding were conducted as described in Guirandy et al., 2019. Adult mass (g, fresh mass) was measured after dissecting the fish.

For F0 reproduction, F1 offspring were obtained from 15 spawning couples (30 fish, 1 female: 1 male) (i.e., replicates) per condition. Mating and viability were determined as described in Guirandy et al., 2019. The embryos from 3 spawns per condition were separated into 2 groups per spawn. The first one was kept in crystallizing dishes with a density of 50 eggs per dish. The F1 embryos (F1-I0.05, F1-I5) from 3 spawns from

across all 15 spawning couples were then positioned in an incubator and irradiated at the same irradiation conditions as for F0. The second group (F1 recovery embryos (F1-R0.05; F1-R5)) was placed in non-irradiated conditions. F1 offspring were irradiated over 131 days. Several reproduction assays were initiated between 104 and 131d to assess the reproductive capacity of all F1 fish. For the reproductions performed at 104, 105, 111, 112d and 131d, the couples (1 female: 1 male) were formed from the observation of secondary sexual characteristics. During the last reproductive cycle carried out at 131d, the sexes were checked during the dissection of the fish.

For F1 reproduction, there were at least 8 spawning couples (1 female: 1 male) per spawn and condition, except for F1-I5 (n=5). F2 offspring was then kept in the same conditions as F1 embryos until 22 days (F2-I0.05 F2-R0.05) of exposure and until 72 hours (F1-I5 and F2-R5) of exposure. F2-I0.05 and F2-I5 came from the irradiated F1 generation. F2-R0.05 and F2-R5 came from the F1 recovery condition, where only the F0 adults were irradiated. All fish from irradiated conditions were reproduced under irradiation.

III.3.2.4 Ecologically representative endpoints for adults and for progeny

Reproductive success (number of couples that spawned), the fecundity (number of eggs per female) of adults (F0 and F1) and the quality of 4 hpf-eggs were assessed.

For each generation (F1 and F2), the progeny survival rate (%) was assessed daily until the stage with no more death (22 dpf) for all conditions. Three technical replicates of 50 eggs originating from 3 different spawns from across all 15 spawning couples per condition were tested. Survival rate was presented for 3 stages: 4 dpf, 8 dpf and 22 dpf. They were chosen because 4 dpf is a commonly studied stage for ecotoxicity bioassays; 8 dpf is a critical stage that corresponds to the beginning of the self-feeding period without a yolk sac, and 22 dpf is the stage at which spontaneous embryo mortalities seizes.

For the F1 generation, the male-female distribution was assessed based on observable sexual characteristics for the remaining individuals (n: F1-C = 194; F1-R0.05 = 124; F1-R5 = 136; F1-I0.05 = 127; F1-I5 = 119).

III.3.2.5 Theoretical population size

Theoretical fish production was estimated for the F1 and F2 generations and for each condition. At the beginning, there were 60 individuals per condition for the F0 generation. The total effective population was calculated with the product of number of females, reproductive success rate, mean number of viable eggs and survival rate of progeny (at 22 dpf or 72 hpf for F2) (Olivier Simon et al., 2011). Error bars correspond

to incertitude from mean number of viable eggs number and survival rate: $\Delta TP = TP(\frac{\Delta \text{Mean number of eggs}}{\text{Mean number of eggs}} + \frac{\Delta \text{ survival rate}}{\text{survival rate}})$.

III.3.2.6 Statistical analysis

All data are presented as mean values ± SD, with significance taken as $p < 0.05$. For both F0 and F1 masses, conditions were compared using Anova with BoxCox transformation when normality and homogeneity were not verified. Concerning data relating to the F0 generation, conditions were compared using a GLM (Generalized Linear Model, glm function in R). Poisson and binomial distributions were selected for fecundity and reproductive success parameters respectively. Concerning data relating to the F1 and F2 generations, conditions were compared using a GLMM (Generalized Linear Mixed Model, glmm function in R). This model integrates the non-independence of data. Our data are linked by spawn, corresponding to the three spawns chosen for breeding embryos. The spawn was chosen as a "random" effect. The binomial distribution was used to analyze all the parameters (reproductive success, sex ratio, survival rate) expect for the fecundity parameter for which a Poisson distribution was preferred. For reproductive success of F1 131 dpf, as the dataset represented can be defined as quasi-complete separation, because of zero values, the invariant Jeffreys prior method was used with the brglm package. The analyses were performed using R software (R Core Team, 2021) with the following packages : "tidyverse", "here", "knitr", "lme4", "MASS","car".

III.3.3 Results

Regardless of treatment groups, no adult fish mortality was observed during the experimental period.

III.3.3.1 Cumulative doses after exposure conditions

Measured dose rates (0.051 ± 0.002 and 5.15 ± 0.3 mGy h^{-1}, n=10) were close to nominal dose rates. For the F0 generation, cumulative doses, based on nominal dose rate, in adults ranged between 0.036 and 3.6 Gy (Tableau III- 1). Higher cumulative doses (0.16 and 15.7 Gy) were measured after 131d of F1 exposure.

Tableau III- 1 : Cumulative doses (Gy) calculated from the nominal dose rate for each condition (control, dose rate of 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I) and Recovery (R) and each generation (F0, F1, F2).

	Cumulative dose (Gy)		
Dose rate (mGy h^{-1})	**F0**	**F1**	**F2**

	30d	131d	72h	22d
Control	5.8E-05	2.5E-04	5.8E-06	4.2E-05
I 0.05	3.6E-02	1.6E-01	3.6E-03	2.6E-02
I 5	3.6E+00	1.6E+01	3.6E-01	-
R 0.05	-	2.5E-04	4.2E-05	4.2E-02
R 5	-	2.5E-04	5.8E-03	-

III.3.3.2 Adult reproductive performances

*Tableau III- 2 : Mass (g, fresh weight), reproductive success (%) and fecundity of F0 and F1 adults after exposure to control (C), 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I) and Recovery (R) conditions * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

Condition	Age at reproduction (days)	Mass (fw, g)			Number of couples	Reproductive success (%)	Fecundity	Survival at 4 hpf (%)
		Male	Female	n				
F0 – C		0.59 ± 0.10	0.76 ± 0.21	28	30	57	362 ± 175	90.67 ± 12.48
F0 – I 0.05	**270**	0.53 ± 0.09	0.76 ± 0.21	27	30	47	247 ± 127*	99.90 ± 0.27
F0 – I 5		0.53 ± 0.06	0.64 ± 0.17	29	30	43	206 ± 128**	95.90 ± 15.40
F1 – C		-	-		20	75	178 ± 85	97.56 ± 5.72
F1 – I 0.05		-	-		32	53**	271 ± 152	97.30 ± 4.13
F1 – I 5	**104**	-	-		20	15***	243 ± 46	63.60 ± 13.28
F1 – R 0.05		-	-		20	35***	80 ± 95	81.63 ± 21.16
F1 – R 5		-	-		29	10***	179 ± 192	97.50 ± 2.20
F1 – C		0.43 ± 0.06	0.62 ± 0.17	8	15	80	399 ± 223	92.42 ± 21.62
F1 – I 0.05		0.40 ± 0.09	0.49 ± 0.12	8	15	67	298 ± 162	99.56 ± 0.53
F1 – I 5	**131**	0.52 ± 0.05	1.02 ± 0.41	5	5	60	245 ± 233	99.22 ± 0.77
F1 – R 0.05		0.47 ± 0.06	0.61 ± 0.14	8	15	100	283 ± 153	92.49 ± 24.68
F1 – R 5		0.55 ± 0.14	0.85 ± 0.17	8	12	33*	291 ± 204	81.37 ± 26.82

Adult genitors showed relatively homogeneous masses for both males and females for generations F0 and F1 (Tableau III- 2). Concerning F0 reproduction, the reproductive success (RS) of F0 - I5 adults was lower (43%), but not significantly different compared to the control (57%). The egg quality expressed by the survival rate at 4 hpf was not impacted by gamma irradiation (p.val>0.05), however, fecundity was impacted (p.val<0.05). Concerning F1 reproduction, differences were observed between the two reproductive tests. For the first reproduction test (104d), the RS for all irradiated conditions were lower compared to control conditions, in particular for F1-I5 (15%) and F1-R5 (10%), which were significantly different from the control values. For the second reproduction test (131d), F1 - I0.05 and F1 - R0.05 showed a RS similar to F1-C, but with a high reproduction for F1-R0.05 (100%). RS in the F1-R5 group (33%, n=12) was significantly different from control values (80%, n=15), and there was a decreasing trend compared to the F1-I5 (60%, n = 5) group, although this was not statistically significant. Also, for this generation, no significant difference was observed regarding the fecundity among treatment groups.

Egg quality (survival at 4 hpf) was greater than 90% and was not impacted by exposure to IR; however a decreasing trend was observed for the first reproductive cycle of F1-I5 (63.6%), F1-R0.05 (81.6%) and for the second reproductive cycle of F1-R5 (81.4%). High variability among couples was observed, which reduced statistical power and is likely the reason for the lack of significant effects. Gamma irradiation could lead to a decrease in RS (from -10% to -60%). Note that for the 2nd reproductive cycle, females from F1-I5 were as few as 5 because only 5 females were able to reproduce from the tested adult fish.

No relationship was observed between egg quality, fecundity and RS.

III.3.3.3 Larval stage

III.3.3.3.1 For F1

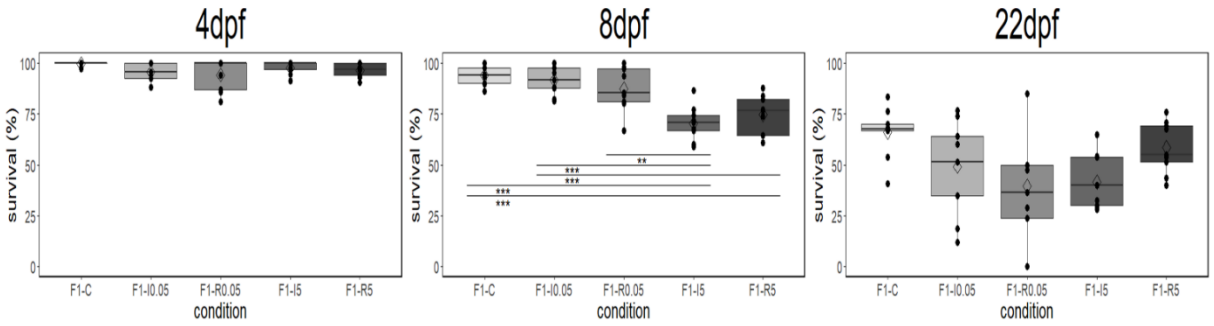


*Figure III- 12 : Box-plot of survival rate of progeny (%) over time tor the 1st generation (F1) at 4, 8 and 22 dpf after control (C), dose rate exposures to 0.05 and 5 mGy h^{-1}(I) and recovery (R) conditions. The boxplot represent the 25th and the 75th percentile with the median indicated by blackline. Dots represent individual data. Means are indicated as empty lozenge. For each condition, n = 9, * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

At 4 dpf, the average percentage of survival observed was high and between 94.2 and 99.7% for all exposure conditions (Figure III- 12). No significant difference was observed among treatment groups when comparing more than 2 conditions. However, a high individual variability was observed for F1-R0.05 group (SD = 7.66). At 8 dpf, the average percentage of survival in F1-I5 (70.4%) and F1-R5 (74.6%) conditions was significantly lower than the controls. A trend towards increased survival rate was observed for F1-R5 vs F1-I5. At 22 dpf, the average percentage of survival observed was 66.0, 49.2, 39.6, 41.5 and 58.5% for F1-C, F1-I0.05, F1-R0.05, F1-I5 and F1-R5, respectively and showed high individual variability (SD between 12.4 and 31.2), which may explain the lack of statistical differences among conditions. The highest variability for F1-R0.05 occurred in two replicates. Finally, the decrease in survival rate over time was more significant for irradiated conditions than control conditions. No further mortalities were observed after 22dpf until 131dpf.

III.3.3.3.2 For F2

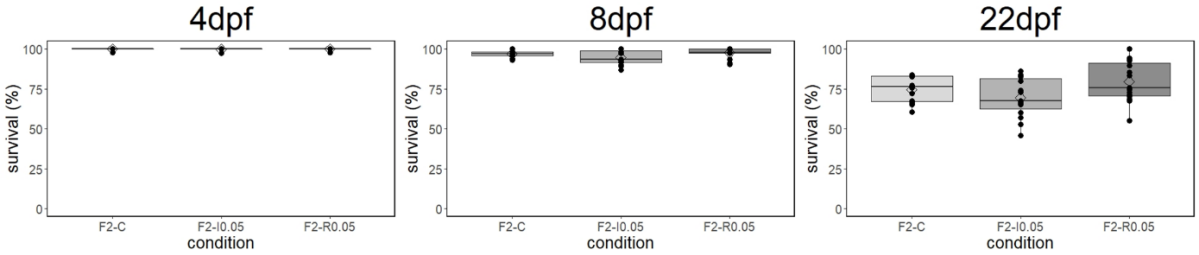


*Figure III- 13 : Box-plot of survival rate of progeny (%) over time for the 2nd generation (F2) at 4, 8 and 22 dpf after control (C), dose rate exposures to 0.05 and 5 mGy h^{-1}(I) and recovery (R) conditions. The boxplot represent the 25th and the 75th percentile with the median indicated by blackline. Dots represent individual data. Means are indicated as empty lozenge. For each condition, n = 15, * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

Concerning F2 generation survival (reproduction at 131d), the individual range of variability was low for the first stages (Figure III- 13) but increased at 22 dpf; however variability was clearly lower than for the F1 generation. No significant difference of survival rate was observed among F1-I0.05, F1-R0.05 and control values. The effect of irradiation in the F2 generation appeared less noticeable than that measured in the F1 generation. The survival rate (%) was only assessed at 3 dpf for F2-I5 (53.3%, n=3 breeding pairs) and was lower than that measured for the first reproductive cycle (data not shown).

III.3.3.4 Adult stage of F1 generation

III.3.3.4.1 Sex ratio

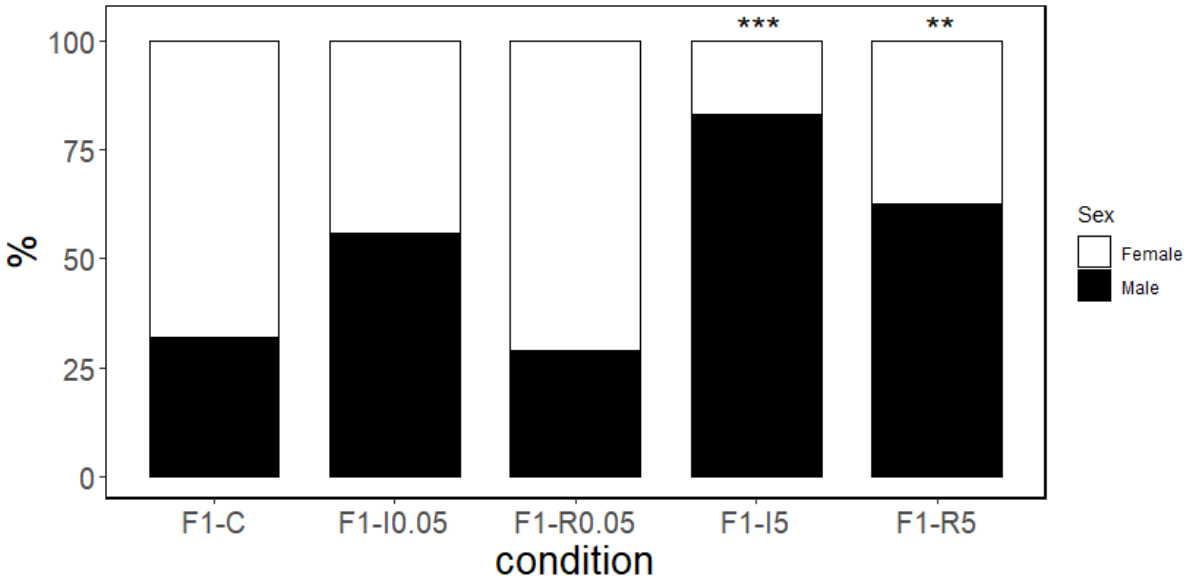


*Figure III- 14 : Female and male F1 adult distribution (%) in control (C), 0.05 and 5 mGyh^{-1} irradiated (I) and in recovery (R) conditions. at 131 days. Total number of adult fish; F1-C = 194; F1-R0.05 = 124; F1-R5 = 136; F1-I0.05 = 127; F1-I5 = 119. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

Significant differences were observed concerning the male and female distribution for the F1 adults (Figure III- 14). Greatest female (%) disruption was for F1-I5 (17%, 20 females) and F1-R5 (37%) compared to F1-C (68%). No difference was observed between F1-I5 and F1-R5, whereas a significant difference was seen between F1-I0.05 and F1-R0.05. The percentage of females was higher for F1-R0.05 than for F1-I0.05 and showed a comparable pattern to F1-C (68%).

III.3.3.5 Population size

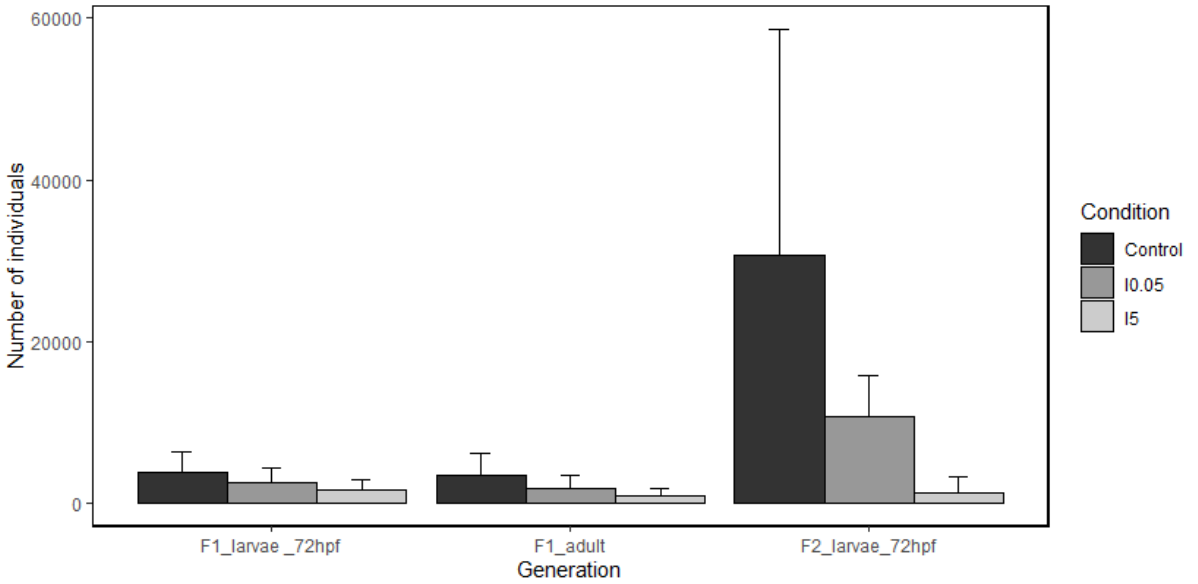


Figure III- 15 : Estimation of population of F1 and F2 generations after irradiation exposures (Control conditions (C), to 0.05 and 5 mGy h^{-1} (I). At the beginning, 60 fish were present (sex ratio = 1 male: 1 female) per condition for the F0 generation. The total effective population was calculated with the product of number of females, reproductive success rate, fecundity (mean number of viable eggs) and the survival rate of progeny (at 3 and 22 dpf for F1 and 3 dpf for F2).

For the F1 generation, the average population of F1-C (3493 individuals) was higher than F1-I0.05 (x2), and F1-I5 (x3.8) (Figure III- 15). At 72 hpf, data were identical to 22 dpf for F1 – C (22 dpf: 3493; 72 hpf: 3715). Thus, it was decided to use survival at 72 hpf to include a condition with 5 mGy h^{-1} irradiation in the description of variation in population. For the F2 generation, the theoretical population of F2-C (30701 individuals) was much higher than that of F2-I0.05 (x2.9) and F2-I5 (x26.3). Note that for F2-I5, RS was done only for females previously able to reproduce. The most severe effects were observed for condition I5 while a slight improvement was observed for condition I0.05 between the two generations. By projecting the values of endpoints measured in the second generation, up to the third generation, the number of adult fish is 12 times lower for condition I0.05 and more than 600 times lower for condition I5 compared to control conditions.

III.3.4 Discussion

After gamma irradiation exposure to 0.05 and 5 mGy h-1 over two generations, adverse effects were shown in F1 generation. All life stages were affected with early mortality, poor RS in first reproduction and altered male biased sex ratio.

III.3.4.1 Multigenerational effects

Significant decreases in reproductive success (RS) (30% for F1-I0.05, 80% for F1-I5 compared to F1-control conditions) were observed for the first F1 reproductive cycle (104d) compared to the F0 reproductive cycle (18% for F0-I0.05, 25% for F0-I5, compared to F0-control). Only 15% of all F1-I5 couples was able to reproduce with low egg quality (64±13%).

Reproduction was tested at 104d, an age greater than the age of sexual maturity (90d) in the Danio (Lawrence, 2007). Since all fish were under the same reproductive conditions, the hypothesis was that irradiation during the entire oocytes development cycle of F1 adults would impair reproduction. This is also justified by the fact that between the first reproduction (104 days), for which all mature oocytes have been expelled, and the second reproduction (131 days), for which the mature II oocytes were irradiated only for 27 days, an improvement of RS was observed; however, RS of irradiated F1 adults was still lower than the control values (Tableau III- 2). Effects on reproductive capacities have already been observed for other contaminants such as endocrine pollutants (Li et al., 2019), which are widely studied, when compared to IR. Since nuclear power plants are widely used for energy production, it appears necessary to study the impacts of radionuclide releases more extensively. As effects are observed even from low doses, with a decrease in reproductive success, the question of the consequences on population dynamics may arise. For zebrafish, the irradiation time for developing mature oocytes is short (27 days) and this results in an insignificant decrease in RS. In contrast, after 104 days of irradiation of mature oocytes, a significant decrease in RS was observed. For wild fish species, which often have a long maturation time with just one reproduction per year, a decrease in reproductive success could have severe consequences.

A significant effect on F1-I5 (70%) and F1-R5 (75%) survival rates was observed at 8 dpf compared to control conditions (90%), a key stage of development (Geffroy and Simon, 2013; Lawrence, 2007) whereas no effect was observed when embryos from unexposed parents were chronically irradiated at this dose rate (Gagnaire et al., 2015; Hurem et al., 2017b; Murat El Houdigui et al., 2020; O. Simon et al., 2011b). The same was found for other species of fish (Guppy embryos (up to 8.4 Gy) or mosquito fish (12-50 Gy)) (ICRP, 2008). Mortality for *D. rerio* larvae was only observed after acute and short-term irradiation (10 Gy, 1.16 Gy/min) (Pereira et al., 2011; Praveen Kumar

et al., 2017). At 8 dpf, the survival rate at the lower dose rate was identical to the control group, suggesting a tolerance to lower dose rates. We hypothesize that no significant effect was observed at 5 mGy h^{-1} and 22 dpf because of high individual variability among F1 individual eggs. Number of individuals and technical replicates were sufficient but eggs originated from only 3 genitors, and some genitors produced eggs of poorquality. Moderate effects were still observed even when progeny was not irradiated. However, these results were different to those observed previously, although a comparable trend with a decrease of survival rate had been observed at 22d (5 mGy h^{-1},(Guirandy et al., 2019)). We hypothesized that this difference may be a function of differences in sensitivity of the batches of fish (backgroung of different genitors, age, strains) used for the different experiments. For the second generation, F2-I5 showed a low survival rate (53%; 3dpf) obtained only from 3 spawns.Additional investigations will be necessary to confirm the trend in survival rate observed for F1-I0.05 and F1-R0.05.

Results indicated that parental exposure had consequences on the survival rate of progeny, as also observed for other biological models (Buisset-Goussen et al., 2014; Gilbin et al., 2008; Parisot et al., 2015). Parental exposure could be considered as a critical window of sensitivity in F1 development (Ivy et al., 2017) since effects were observed at the phenotypic scale but also at the molecular scale after genitor irradiation (Hurem et al., 2017a) .

For ERA, life stage specific sensitivity must be considered alongside exposure conditions to define threshold values. Here, effects at 5 mGy.h-1 were significant but much less than at 50 mGy.h^{-1} (Guirandy et al., 2019). So, it would be worthwhile to conduct experiments with dose rates between 5 and 50 mGy h^{-1} to confirm this gap in survival rate after parental irradiation.

No mortality was observed from 22 to 104/131 dpf, suggesting that direct or indirect (transgenerational) effects of IR only affected early development stages. The results confirm the sensitivity of early embro-larval stage of *D. rerio* after parental exposure.

Unexpected effects were observed at the highest dose rate (5 mGy h^{-1}). Selection of couples based on secondary sexual characteristics had been proven to be difficult, and when sex was determined after dissection of adults, the sex ratio was significantly biased in favor of males, with 4 and 1.8 times lower numbers of females for F1-I5 and for F1-R5, respectively. Irradiation could affect sex differentiation as previously observed after exposure to hypoxia, high temperature and pollutants in zebrafish (Brion et al., 2004; Pierron et al., 2021; Valdivieso et al., 2020; M. Wang et al., 2011). Exposure to heat in fish is usually known to increase the number of males. The zebrafish housing system (Zebtec Tecniplast Stand Alone) used recirculating oxygenated freshwater that prevents hypoxia and temperature variation. Responses to environmental changes can be mediated by epigenetic mechanisms as discussed

by Pierron et al. (2021) and Valdivieso et al. (2020). Significant effects were obtained without progeny irradiation (F1-R5) but were higher when the progeny were also irradiated (F1-I5). F0 adult irradiation affected the non-exposed F1 generation. The sex ratio expected for zebrafish reared under control laboratory conditions is theoretically 50:50 (female to male) or with a small predominance of males (40:60) (Santos et al., 2017; Simon et al., 2014). This was not the case in our study, where females were predominant (68%). Previous studies have shown that sex ratio was linked with maintenance conditions, such as temperature, density and nutrition (Pierron et al., 2021). In our case, control and recovery group were maintained under the same conditions. Therefore, the significant difference in the sex ratio between these two conditions can be attributed to the irradiation and not to the bias of the sex ratio of our population.

In gonochoric species such as zebrafish, the gonads are "ovary-like" before genetic determination and then differentiation into male or female gonads. Since zebrafish sex is determined by genetic factors (genetic sex-determination (GSD)) and irradiation targets the genome, larval mortality and disruption of sex ratio effects at 5 mGy h-1 could be induced by genetic mechanisms.

Moreover, zebrafish sex determination could be influenced by environmental factors (environmental sex-determination (ESD)) such as hypoxia, temperature, EDCs, population density, and food (Santos et al., 2017; Valdivieso et al., 2020). The precise mechanisms of these environmental factors are not understood, but studies suggest that the endocrine stress-axis could play a critical role. In medaka, a GSD species, temperature induces masculinization through an increase in cortisol (Fernandino et al., 2012; Hayashi et al., 2010). It has also been shown that cortisol was able to induce the masculinization of both behavioral and morphological traits of female *Gambusia affinis* (Geffroy and Bardonnet, 2016).Moreover, many studies have pointed out that cortisol is able to alter the production of gonadal steroids, because the enzymes involved in their synthesis (11-βHSD) are also involved in producing/inactivating glucocorticoid. Cortisol suppresses the brain-pituitary-gonadal (BPG) axis in females, leading to lower pituitary gonadotropin content, reduced plasma sex steroid levels, and decreased gonadal weight (Tovo-Neto et al., 2020). In trout (*Salmo gairdneri*), adding cortisol to water during sexual differentiation triggered testis differentiation and leads to a male-biased population. Moreover, cortisol inhibited aromatase production, which in turn resulted in male-biased offspring. Aromatase expression and/or activities in zebrafish have been shown to be disrupted by environmental pollutants (Hinfray et al., 2018). Since RI at high dose rates produce a stressful environment, we hypothesized that RI can stimulate cortisol production, which is the stress hormone produced under stressed environment. These observations strongly encourage us to measure the level of cortisol.

Cumulative effects on RS, sex ratio and survival rate observed at 5 mGy h^{-1} led to a significant decrease in effective population (x26.3). Note that the impact on the population was calculated from F1 effects observed during the second reproductive cycle. Greater effects on the F1 generation observed during the first reproductive cycle led to a more significant decrease in effective population. Effects on the F2 population only affected the survival rate (72hpf), which decreased compared to F1 and should be confirmed with more replicates and life stages since we stopped the experiment at 72hpf. Beyond the decrease in effective population, disturbing the sex ratio can have major consequences for mating competition and success, and on the behavior of territorial males and female aggressiveness. The sex ratio for the R5 condition was also significantly biased, leading to an imbalance in the population. At 0.05 mGy h^{-1}, an insignificant decreasing trend in the population size was observed.

Multigenerational exposure was also used to assess the worsening of effects over generations. The decrease in RS compared to control values was observed over the two generations in comparable proportions (I0.05: 0.82; I5: 0.75, Tableau III- 2) between F0 and the second F1 reproduction. The worsening of the effects of irradiation on this parameter for both dose rates was observed when F1 reproduced for the first time. Concerning the fitness of the larval stage, the F2-I5 survival rate was low and only evaluated at 3 dpf. Effects appears earlier during development for F2 generation compared to F1 generation, highlighting a worsening effect. Since these results were preliminary, effects on F2 survival should be confirmed. For the lower dose rate, no effect on F2-I0.05 survival rate was observed, rather indicating an improvement despite irradiation. Finally, the disruption of the sex ratio confirms the worsening of the effects between the 2 generations. Future studies should determine sex in the F2 generation to confirm this effect.

The survival rate showed slight improvement under the recovery conditions. Note that recovery fish were only exposed during the F0 generation. Although no significant difference was observed, the survival rate was slightly better for F1-R5 than for F1-I5. This observation could not be confirmed for 0.05 mGy h^{-1} because of the high levels of variability for the F1-R0.05 condition. It would be worth assessing potential repair mechanisms at the molecular scale between these two types of exposure scenarios. Reversible effects could also be explained by epigenetic mechanisms. However, some epigenetic marks appeared to persist over multiple generations at 8.7 mGy h^{-1} (Kamstra et al., 2018). Molecular effects, due to their high sensitivity, could persist longer while phenotypic effects are more prone to recover over time.

III.3.4.2 Irradiation-impacted stages of life or physiological functions

The recovery condition was studied to show differences between irradiated and non-irradiated progeny born from irradiated couples. It should be kept in mind that the irradiation of early stages from parents not exposed to these dose rates does not affect

the survival of the embryos (Gagnaire et al., 2015; Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2017a; Murat El Houdigui et al., 2020; O. Simon et al., 2011b). Parental exposure led to great or moderate effects on survival rate at 50 (Guirandy et al., 2019) and 5 mGy h^{-1} (this study) of F1 progeny, respectively. This confirms the sensitivity of this biological stage. However, as survival rate and sex ratio were also affected in the recovery condition, we can hypothesize that the irradiation mainly affects late gametogenesis in adults, where it leads to effects on progeny after exposure to 5 and 50 mGy h^{-1}. Stage III of oogenesis is the process of vitellogenesis, in which the oocyte begins to incorporate Vtg and several maternally-transferable compounds (Faught and Vijayan, 2018). The latter are involved in various key processes such as cortisol and thyroid hormone regulation, immunological responses, endocrine stress axis development, epigenetic (*de novo* DNA methyltransferases) and post-transcriptional (miRNA pathway components and specific miRNAs) regulation of gene expression (Vera-Chang et al., 2019). The alteration of these maternally- transferable compounds, as observed for different molecular markers (Guirandy et al., 2019; Hu et al., 2016; Hurem et al., 2017a, p. 201; Kamstra et al., 2018) after parental irradiation can have late repercussions on zebrafish development.

III.3.5 Conclusion

This paper investigated the effects of gamma irradiation on *Danio rerio* after multigenerational exposure to two dose rates (0.05 and 5 mGy h^{-1}). It needs to be acknowledged that the Danio model cannot represent all fish species, especially with regard to effects on reproductive processes. This study completed a previous study that focused on the effects of a high dose rate (50 mGy h-1) on the same biological model. The results obtained provide comprehensive insights into the diversity of the responses to gamma irradiation dose rates. Moreover, this study answered many questions concerning irradiation methods that should be taken into account in future studies: (i) Multigeneration exposure shows The survival rate showed slight improvement under the recovery conditions that each generation was impacted differently or was not impacted at the phenotypic scale. Irradiation (0.05 and 5 mGy h^{-1}) may affect different life stages (adult: reproductive success, sex ratio and larval mortality). These findings emphasize an impact on some physiological functions (gametogenesis, sexual determination). Such effects can also affect population dynamics. Further experimentation is required to confirm these results. Moreover, due to the diversity of responses from one dose to another, it is necessary to study a wide panel of doses.

(ii) Multigenerational exposure makes it possible to acquire data on the reproductive capacities of adults exposed throughout their lifespan and on the fitness of the embryo-larval stages. These data, with high ecological value, can be used to roughly assess population dynamics and the worsening (or not) of the effects. Performing assays that

assess effects of IR at different biological stages of *Danio rerio* separately could provide less realistic information than a single multigenerational assay.

Since wild populations are suspected to be more sensitive to radiation than laboratory populations, this could partly be explained by worsening effects after exposure over generations although model species have a lower polymorphism than wild species.

III.3.6 Acknowledgements

We would like to acknowledge the technical staff and Cantabella Elsa, of the two laboratories IRSN/PSE-ENV/SRTE/LECO and IRSN/PSE-ENV/SRTE/LR2T for the use of the MICADO'lab platform and dissection days. We would like to acknowledge the Agency Walker Services - Traduction for English language assistance and Shramana Dey for final proofreading and English corrections.

III.3.7 Funding sources

Funding: This work was supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN).

III.3.8 References

Anbumani, S., Mohankumar, M.N., 2012. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish Catla catla. Aquatic Toxicology 122-123, 125-132.

Baker, T.R., Peterson, R.E., Heideman, W., 2014. Using zebrafish as a model system for studying the transgenerational effects of dioxin. Toxicological Sciences 138, 403-411.

Bréchignac, F., Oughton, D., Mays, C., Barnthouse, L., Beasley, J.C., Bonisoli-Alquati, A., Bradshaw, C., Brown, J., Dray, S., Geras'kin, S., Glenn, T., Higley, K., Ishida, K., Kapustka, L., Kautsky, U., Kuhne, W., Lynch, M., Mappes, T., Mihok, S., Møller, A.P., Mothersill, C., Mousseau, T.A., Otaki, J., Pryakhin, E., Rhodes, O.E., Jr., Salbu, B., Strand, P., Tsukada, H., 2016. Addressing ecological effects of radiation on populations and ecosystems to improve protection of the environment against radiation: Agreed statements from a Consensus Symposium. Journal of Environmental Radioactivity 158-159, 21-29.

Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17β-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology 68, 193-217.

Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: A multigenerational study using Caenorhabditis elegans. Journal of Environmental Radioactivity 137, 190-197.

EC-TG N°27, 2011. European commission, technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards. Guidance Document N°27.

Epperly, M.W., Bahary, N., Quader, M., DeWald, V., Greenberger, J.S., 2012. The zebrafish- Danio rerio - Is a useful model for measuring the effects of small-molecule mitigators of late effects of ionizing irradiation. In Vivo 26, 889-897.

Faught, E., Vijayan, M.M., 2018. Maternal stress and fish reproduction: The role of cortisol revisited. Fish and Fisheries 19, 1016-1030.

Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kishii, A., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2012. The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: The 11β-hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. Endocrinology 153, 6003-6011.

Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 169, 69-78.

Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailes, C., Beresford, N.A., Howard, B.J., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. Journal of Radiological Protection 30, 215-233.

Geffroy, B., Bardonnet, A., 2016. Sex differentiation and sex determination in eels: Consequences for management. Fish and Fisheries 17, 375-398.

Geffroy, B., Simon, O., 2013. Effects of a Spirulina platensis-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. Cybium 37, 31-38.

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

Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Murat El Houdigui, S., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environmental Toxicology and Chemistry 38, 2556-2567.

Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T., 2010. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Molecular Reproduction and Development 77, 679-686.

Hinfray, N., Sohm, F., Caulier, M., Chadili, E., Piccini, B., Torchy, C., Porcher, J.M., Guiguen, Y., Brion, F., 2018. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line. General and Comparative Endocrinology 261, 179-189.

Houdigui, S.M.E., Adam-Guillermin, C., Armant, O., 2020. Ionising radiation induces promoter dna hypomethylation and perturbs transcriptional activity of genes involved in morphogenesis during gastrulation in zebrafish. International Journal of Molecular Sciences 21.

Hu, M., Hu, N., Ding, D., Zhao, W., Feng, Y., Zhang, H., Li, G., Wang, Y., 2016. Developmental toxicity and oxidative stress induced by gamma irradiation in zebrafish embryos. Radiation and Environmental Biophysics 55, 441-450.

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.K., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017a. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environmental Research 159, 564-578.

Hurem, S., Martín, L.M., Brede, D.A., Skjerve, E., Nourizadeh-Lillabadi, R., Lind, O.C., Christensen, T., Berg, V., Teien, H.C., Salbu, B., Oughton, D.H., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017b. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. PLoS ONE 12.

Hurem, S., Martín, L.M., Lindeman, L., Brede, D.A., Salbu, B., Lyche, J.L., Aleström, P., Kamstra, J.H., 2018. Parental exposure to gamma radiation causes progressively altered transcriptomes linked to adverse effects in zebrafish offspring. Environmental Pollution 234, 855-863.

ICPR, 2008. Environmental Protection-the concept and use of reference animals and plants. ICPR publication 108.

ICRP, 2012. Protection of the Environment undier different exposure conditions. Annals of the ICRP

Ivy, C.M., Robertson, C.E., Bernier, N.J., 2017. Acute embryonic anoxia exposure favours the development of a dominant and aggressive phenotype in adult zebrafish. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 284.

Kamstra, J.H., Hurem, S., Martin, L.M., Lindeman, L.C., Legler, J., Oughton, D., Salbu, B., Brede, D.A., Lyche, J.L., Alestrom, P., 2018. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. Scientific Reports 8.

Kong, E.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2016. Zebrafish as an in vivo model to assess epigenetic effects of ionizing radiation. International Journal of Molecular Sciences 17.

Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269, 1-20.

Lerebours, A., Nagorskaya, L., Gudkov, D., Smith, J., 2016. Effect of radiation on the health of fish from Chernobyl, COMET workshop 30 years after the Chernobyl accident what do we know about the effects of radiation on the environment ?

Lerebours, A., Robson, S., Sharpe, C., Smith, J.T., 2020. Subtle effects of radiation on embryo development of the 3-spined stickleback. Chemosphere 248.

Li, S., Wu, Q., Sun, Q., Coffin, S., Gui, W., Zhu, G., 2019. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. Aquatic Toxicology 211, 116-123.

Lin, W., Guo, H., Wang, L., Zhang, D., Wu, X., Li, L., Qiu, Y., Yang, L., Li, D., Tang, R., 2020. Parental Transfer of Microcystin-LR-Induced Innate Immune Dysfunction of Zebrafish: A Cross-Generational Study. Environmental Science and Technology 54, 1014-1023.

OECD, 2018. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. OECD guidelines for the testing of chemical, section 4. .

Parisot, F., Bourdineaud, J.P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in Daphnia magna during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. Aquatic Toxicology 163, 27-36.

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

Pierron, F., Lorioux, S., Héroin, D., Daffe, G., Etcheverria, B., Cachot, J., Morin, B., Dufour, S., Gonzalez, P., 2021. Transgenerational epigenetic sex determination: Environment experienced by female fish affects offspring sex ratio. Environmental Pollution 277.

Praveen Kumar, M.K., Shyama, S.K., Kashif, S., Dubey, S.K., Avelyno, D., Sonaye, B.H., Kadam Samit, B., Chaubey, R.C., 2017. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicology and Environmental Safety 142, 95-101.

R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Rhee, J.S., Kim, B.M., Kang, C.M., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2012. Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, Kryptolebias marmoratus embryo. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 1745-1753.

Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. Aquatic Toxicology 191, 141-163.

Siegenthaler, P.F., Zhao, Y., Zhang, K., Fent, K., 2017. Reproductive and transcriptional effects of the antiandrogenic progestin chlormadinone acetate in zebrafish (Danio rerio). Environmental Pollution 223, 346-356.

Simon, O., Floc'h, E., Geffroy, B., Frelon, S., 2014. Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1817-1824.

Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T.G., Gilbin, R., 2011a. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of γ irradiation on zebrafish eggs. Journal of Environmental Radioactivity 102, 1039-1044.

Simon, O., Mottin, E., Geffroy, B., Hinton, T., 2011b. Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success-of the fish Danio rerio. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 220-225.

Tovo-Neto, A., Martinez, E.R.M., Melo, A.G., Doretto, L.B., Butzge, A.J., Rodrigues, M.S., Nakajima, R.T., Habibi, H.R., Nóbrega, R.H., 2020. Cortisol directly stimulates spermatogonial differentiation, meiosis, and spermiogenesis in Zebrafish (Danio rerio) testicular explants. Biomolecules 10.

Tsyusko, O., Glenn, T., Yi, Y., Joice, G., Jones, K., Aizawa, K., Coughlin, D., Zimbrick, J., Hinton, T., 2011. Differential genetic responses to ionizing irradiation in individual families of Japanese medaka, Oryzias latipes. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 718, 18-23.

Valdivieso, A., Ribas, L., Monleón-Getino, A., Orbán, L., Piferrer, F., 2020. Exposure of zebrafish to elevated temperature induces sex ratio shifts and alterations in the testicular epigenome of unexposed offspring. Environmental Research 186.

Vera-Chang, M.N., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2019. Ancestral fluoxetine exposure sensitizes zebrafish to venlafaxine-induced reductions in cortisol and spawning. Endocrinology 160, 2137-2142.

Wang, M., Chen, J., Lin, K., Chen, Y., Hu, W., Tanguay, R.L., Huang, C., Dong, Q., 2011. Chronic zebrafish PFOS exposure alters sex ratio and maternal related effects in F1 offspring. Environmental toxicology and chemistry 30, 2073-2080.

III.4 Synthèse du chapitre

III.4.1 L'exposition d'adultes matures sexuellement

Les deux publications montrent que l'exposition des poissons zèbre pendant seulement 10 ou 24 jours au stade adulte n'altère pas leurs capacités de reproduction (succès reproducteur, fécondité, viabilité de la descendance à 3 heures post-fécondation (hpf)) quel que soit le débit de dose (Figure III- 2, Tableau III- 2). Ainsi, ces « endpoints » de l'ERE ne sont pas impactés pas l'irradiation. Un effet a cependant été observé avec une diminution de la fécondité après exposition pendant 10 jours à 0.5 $mGy.h^{-1}$. Ce résultat n'a pourtant pas été confirmé pour le même débit de dose après exposition durant 24 jours. La fécondité est un paramètre très individu dépendant chez le poisson zèbre sur lequel il est difficile de conclure compte tenu des effectifs engagés. Ainsi, la pertinence de ce paramètre pour l'ERE est discutable.

La reproduction ne semblant pas être impactée après exposition du stade adulte, des coupes histologiques sur les gonades femelles ont été réalisées après 10 jours d'irradiation à 50 $mGy.h^{-1}$ et après 25 jours d'irradiation à 0.5 et 5 $mGy.h^{-1}$, afin de vérifier leur état tissulaire. Tous les types d'ovocytes ont pu être observés dans des proportions similaires entre les différentes conditions. Les photos présentées dans la Figure III- 16A-D représentent des ovocytes vitellogéniques témoignant d'une structure similaire entre les conditions, pour des ovocytes à un stage déjà avancé. Ceci montre que les éléments nécessaires à la reproduction ne sont pas altérés. Pourtant, Hurem et al., 2018 ont montré une altération des organes reproducteurs à 53 $mGy.h^{-1}$, ainsi que des proportions des différents d'ovocytes différentes par rapport aux contrôles à 8.7 $mGy.h^{-1}$. La Figure III- 16E montre qu'à 50 $mGy.h^{-1}$, dans notre cas, tous les types d'ovocytes sont présents. L'histologie ayant été réalisée sur des gonades après reproduction et donc après expulsion des ovocytes donnant un phénotype altéré, il conviendrait de réaliser des coupes également avant reproduction afin d'observer de potentielles altérations des structures sur l'ensemble des ovocytes, en particulier ceux engendrant les futurs œufs. A ce stade des analyses et dans nos conditions d'exposition, l'irradiation ne semble pas impacter les gonades parentales et la reproduction.

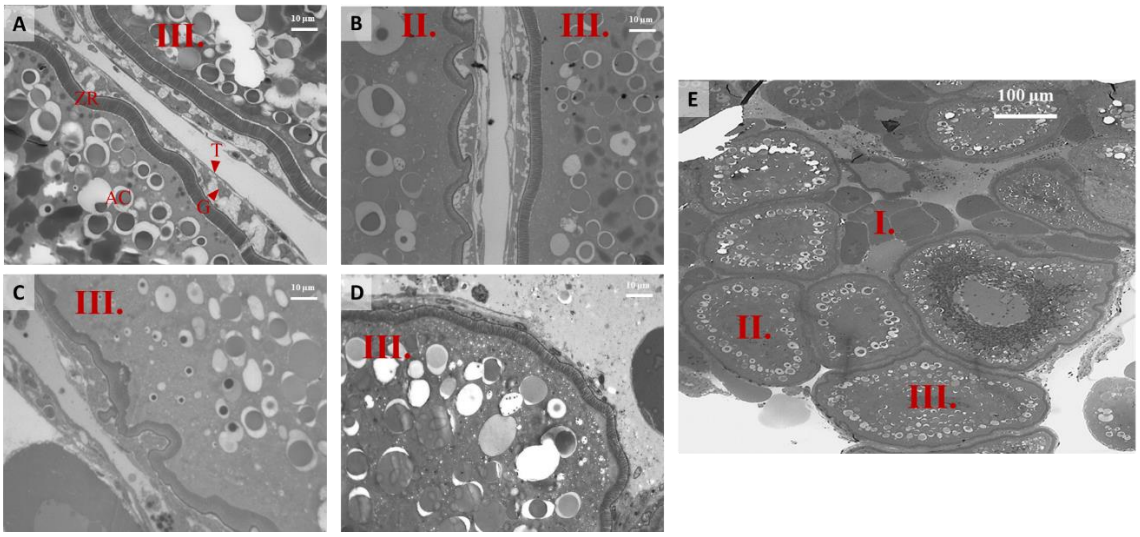


Figure III- 16 : Coupes histologique en microscopie optique de gonades femelles F0 aux différents débits de dose. A : Contrôle B : 0.5 mGy.h^{-1} C : 5 mGy.h^{-1} D : 50 mGy.h^{-1} E : 50 mGy.h^{-1}. I = Stade I, croissance primaire, II = Stade alvéolaire cortical, III= Ovocyte vitellogénique. ZR = zona radiata, T = thèque, G = granulosa, AC = alvéole corticale.

Cependant, chez d'autres organismes, tel *C. elegans*, une perturbation de la fécondité après irradiation gamma est observée (Guédon et al., 2021; Maremonti et al., 2020) . Dans ces 2 études, les individus ont été exposés durant tout leur cycle de vie. Aussi, une comparaison entre exposition chronique et aigüe du stade adulte a montré des effets reprotoxiques uniquement pour l'exposition chronique (Maremonti et al., 2019). La publication 2 semble montrer également que l'exposition de tout le cycle de vie peut entrainer des effets reprotoxiques. En effet, une exposition de l'embryon à l'adulte entraine une altération du succès reproducteur lors de la reproduction chez les F1, pour les 2 débits de dose (0.05 et 5 mGy.h^{-1}) (Tableau III- 2). L'irradiation depuis le stade embryonnaire induit donc des effets reprotoxiques en perturbant la première reproduction des individus. Ainsi, l'exposition d'un stade de vie recommandée par l'ERE (exposition d'adultes matures par exemple) semble moins pertinente que l'exposition de tout un processus physiologique (gamétogenèse). Les expositions depuis le stade embryonnaire sont donc à prendre en compte pour évaluer les performances de reproduction dans l'ERE.

III.4.2 Des effets phénotypiques d'origine parentale chez la descendance

Aucun effet sur la survie de la descendance n'a été observé pour les plus faibles débits de dose (0.05, 0.5 et 5 mGy.h^{-1}) à 24 et 48 hpf (Figure III- 4, Figure III- 5, Figure III-12). Ainsi, l'irradiation n'affecte pas la survie des stades très précoces de l'embryon après irradiation parentale, même à un débit de dose modéré non retrouvé dans l'environnement (5 mGy.h^{-1}). L'hypothèse d'une sensibilité élevée des stades précoces ne semble donc pas être vérifiée après irradiation gamma à l'échelle individuelle. En revanche, la deuxième publication montre un effet significatif sur la survie à 8 jpf pour le débit de dose de 5 mGy.h^{-1}. Ce résultat n'a pas été retrouvé dans les mêmes conditions pour la première publication (à 10 jpf). Cependant, tous les stades n'ont pas été observés pour cette dernière. L'expérimentation de la deuxième publication a permis une mesure quotidienne de la survie (Figure III- 17), permettant de révéler des effets plus subtils sur un jour précis.

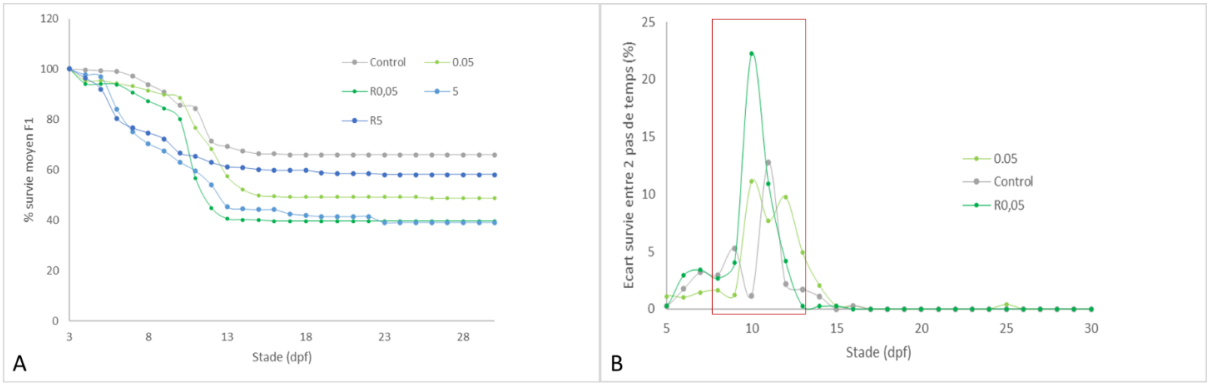


Figure III- 17 : (A) pourcentage de survie moyen de la génération F1 au cours du temps. (B) visualisation du pic de mortalité, correspondant à l'écart entre 2 pas de temps.

Aucun effet n'a été observé sur la survie (10 et 22 jpf), de même manière que pour la première expérimentation. Une nouvelle expérimentation non publiée réalisée dans les mêmes conditions a permis de montrer les mêmes résultats concernant l'effet sur le stade 8 jpf (Tableau III- 3), bien qu'ils soient non significatifs.

Tableau III- 3 : pourcentage de survie de la génération F1 à 5 mGy.h^{-1}, après irradiation des F0 parents pendant 30 jours.

Condition	N	Survie (%)	se	pval (vs. Control)	pval (vs. I5)
Control	15	81.09	8.39	/	0.07
I5	13	66.23	3.41	0.07	/
R5	10	68.60	5.06	0.08	0.58

Le suivi à l'échelle de plusieurs jours a permis de mettre en évidence des effets plus subtiles, soulignant une nouvelle fois l'intérêt de réaliser des expositions chroniques afin d'évaluer la sensibilité de tous les stades. En effet, la mortalité est souvent très importante vers 8-10 jpf, coïncidant avec le début de la nutrition autonome des larves (Annexe I, Figure III- 17). En effet, sur la Figure III- 17A, les courbes bleues (5 $mGy.h^{-1}$, irradié et recovery) présentent une décroissance progressive de la survie dès le début de l'expérimentation. A l'inverse, pour le faible débit de dose et les contrôles (courbes vertes et grise), la mortalité survient subitement aux alentours de 8-10 jpf, ce constat est illustré sur la Figure III- 17B représentant la différence de survie entre deux pas de temps. Les courbes vertes et grises présentent alors un pic dans l'écart entre deux jours vers 10 jpf. Ainsi, cette période semble sensible et permettait la mise en évidence d'un effet additif de l'irradiation. Le suivi quotidien n'ayant pas permis de révéler une sensibilité du stade 96 hpf, sa pertinence dans la préconisation des tests normalisés (OECD, 2019) peut être remise en cause. Finalement, la survie tardive à 22 jpf n'est pas significativement impactée à 0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$. Cependant, la variabilité de la réponse étant très dispersée, il serait nécessaire d'augmenter les effectifs puisque la tendance montre une diminution de la survie finale à 22 jpf (Figure III- 12).

L'exposition à un fort débit de dose (50 $mGy.h^{-1}$) a montré une mortalité de la descendance dès 24 hpf conduisant à 100% de mortalité à terme. Ce résultat a été observé que la descendance soit irradiée ou non, suggérant un impact de l'irradiation sur les parents entraînant des répercussions sur la descendance. Des résultats similaires, dans d'autres conditions d'irradiation, ont déjà été observés précédemment chez le poisson zèbre après irradiation à 53 $mGy.h^{-1}$ (Hurem et al., 2017a). Par ailleurs, des résultats supplémentaires (Figure III- 18) montrent qu'une irradiation directe sur la descendance pour ces mêmes débits de dose n'influence pas la survie des embryons (Murat El Houdigui et al., 2019; O. Simon et al., 2011b). La viabilité 3 hpf étant correcte, nous supposons que la fécondation se passe normalement. Ainsi, l'explication de la mortalité observée réside dans le développement précoce et jusqu'à 24 hpf. Ce constat suggère un défaut dans la formation des gamètes (gamétogenèse, précisément ovogenèse) qui apportent les éléments nécessaires au développement précoce de la descendance.

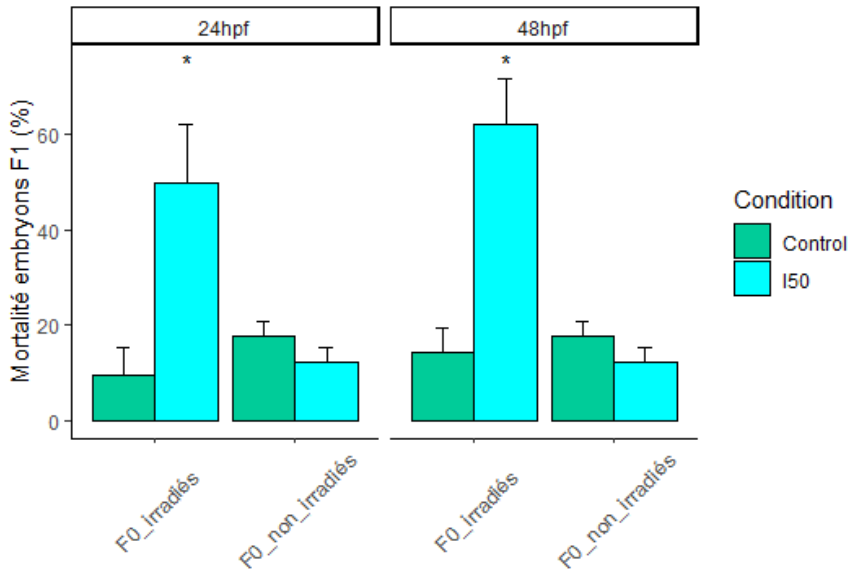


*Figure III- 18 : évaluation de l'effet maternel. % de mortalité F1 irradiée à 50 mGy.h^{-1} après irradiation (F0_irradiés, n=6) ou non (F0_non_irradiés, n=3) des parents F0. Un test glm avec distribution binomiale a été réalisé (détaillé dans les publications). * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

Une expérimentation visant à tester la résilience des effets observés a été réalisée en plaçant la génération F0 (50 mGy.h^{-1}) en condition non irradiante afin de générer de nouvelles reproductions après 6, 36 et 63 jours (Figure III- 6). La mortalité précoce continue d'être observée après 6 et 36 jours. En revanche, il n'y a plus de mortalité après 63 jours. Il semblerait donc qu'une réparation s'opère chez les parents après les avoir placés en zone non irradiante. Il se pourrait que la réparation ait lieu après 6 cycles d'ovogenèse (10 jours/cycle chez le poisson zèbre (Welch et al., 2017)), temps nécessaire pour la réparation de tous les ovocytes matures et non matures présents durant les 10 jours d'irradiation. Ce résultat révèle un effet direct de l'irradiation sur les ovocytes et confirme l'hypothèse d'une altération de la gamétogenèse. Ce résultat est aussi observé pour les substances chimiques comme le sélénium et le benzo[a]pyrène (Cheng et al., 2022; Corrales et al., 2014). La qualité de la descendance étant très dépendante des facteurs maternels (Abrams and Mullins, 2009; Dosch, 2015; "Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition," n.d.; Pelegri, 2003), un effet de l'irradiation sur les ovocytes en maturation semble avoir lieu. Ainsi, les effets multigénérationnels pourraient être dus à une transmission de matériels défectueux nécessaire à la descendance. Ceci souligne l'intérêt d'étudier l'implication maternelle.

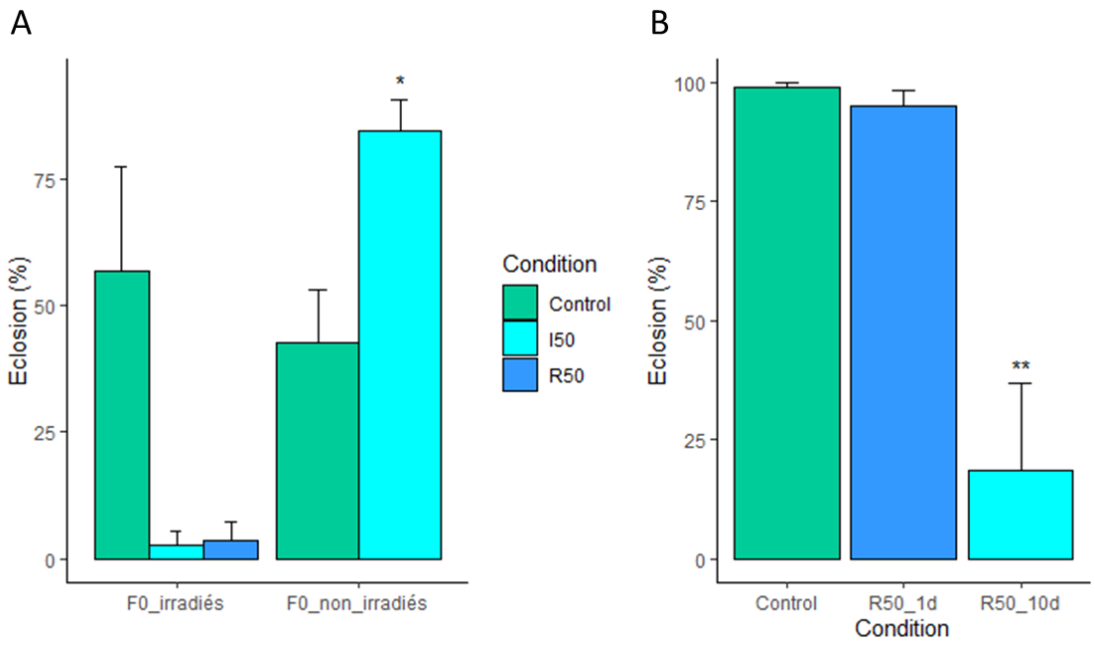


*Figure III- 19 : Pourcentage d'éclosion : nombre d'éclos divisé par le nombre de vivant à 48 hpf (A) et 72 hpf (B). (A) présente le pourcentage après irradiation des parents (F0_irradiés) ou avec irradiation unique de la descendance (F0_non_irradiés), N=3 pontes. (B) présente le pourcentage d'éclosion des F1 recovery selon le temps d'irradiation des parents F0 (1 jour, N=11 ; 10 jours, N=3). Un test glm avec distribution binomiale a été réalisé. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).*

Dans la publication 1, il est stipulé qu'aucun effet sur l'éclosion à 0.5 et 5 mGy.h^{-1} n'a eu lieu. Des études précédentes ont montré que la vitesse d'éclosion était accélérée suite à l'irradiation directe d'embryons (Gagnaire et al., 2015; Pereira et al., 2011; O. Simon et al., 2011b). Ces études soumettent l'hypothèse d'une accélération du métabolisme avec consommation rapide des ressources énergétiques en réponse au stress radio-induit et proposaient de suivre ce paramètre comme marqueur de stress. Des expériences complémentaires ont été réalisées pour tester cette hypothèse. La Figure III- 19A présente une augmentation du taux d'éclosion à 48 hpf après irradiation directe des embryons à 50 mGy.h^{-1}. En revanche, l'effet étant mesuré sur un seul temps, 48 hpf correspondant au début de l'éclosion (Kimmel et al., 1995), il n'est pas possible de conclure sur une accélération de l'éclosion mais simplement sur un taux d'éclosion plus important au début du processus. A l'inverse, lorsque les parents sont irradiés, un taux d'éclosion plus faible a été observé, bien que significatif uniquement à 72 hpf (Figure III- 19B). Le résultat étant similaire entre les deux conditions irradiée et recovery (Figure III- 19A), l'hypothèse d'une altération parentale est encore soulignée. Un retard d'éclosion a également été observé chez des F1 issus de parents exposés au zinc (Zheng et al., 2022). Enfin, une expérimentation à 50 mGy.h^{-1} avec seulement 1 jour d'exposition des parents a permis de comparer les effets du temps d'exposition (dose cumulée ; 1 jour à 50 mGy.h^{-1} = 1.2 Gy, 10 jours à 50 mGy.h^{-1} = 12 Gy) et du débit de dose utilisé (Figure III- 19B). Après un jour d'irradiation des parents, le taux d'éclosion n'est pas différent de celui de la condition contrôle. La réponse de ce marqueur biologique semble fortement influencée par les conditions d'exposition, réduisant son utilisation comme marqueur d'exposition. La dose cumulée plutôt que le débit de dose, semble conditionner l'éclosion de la génération F1. Pour précision, les

couples F0 ont été reproduits avant le début de l'irradiation, pour éliminer un maximum d'ovocytes matures. Plus généralement, il semblerait donc que le temps d'exposition des gamètes, donc de la gamétogenèse soit déterminant dans les effets retrouvés chez la descendance. Ainsi, la variation du temps d'exposition inclut d'une part différentes doses ressenties et d'autres part, différents processus biologiques sensibles exposés (embryogenèse, détermination sexuelle, différentiation sexuelle et gamétogenèse, …). Pour définir une relation dose-réponse, il est donc difficile de s'affranchir de cette notion de sensibilité des processus biologiques. L'ERE devrait cibler, l'exposition de processus biologiques (gamétogenèse, neurogenèse) plutôt que de stade de vie (embryons, juvéniles, adultes), dont la durée varie selon l'espèce considérée. Dans l'environnement, les populations sont exposées sur le long terme avec des débits de dose différents dus à la décroissance radioactive. Ainsi, selon le cycle de vie de l'espèce et donc la dose absorbée pendant les processus biologiques complexes, des sensibilités inter-espèces différentes pourraient être retrouvées.

III.4.3 Relation dose/réponse

Aucune mortalité précoce n'a été observée à 0.05, 0.5 et 5 mGy.h^{-1} avec un facteur 10 entre chaque débit de dose. Pourtant, un effet drastique à 50 mGy.h^{-1} est observé. Ces données ne permettent pas de calculer la LC_{10} selon la méthodologie européenne. Il semblerait donc que la relation dose-réponse ne suive pas un modèle log-logistique avec une accentuation des effets entre 5 et 50 mGy.h^{-1}. Un débit de dose de 50 mGy.h^{-1} entrainant 100% de mortalité contre aucun effet pour les autres débits de dose à ce stade, il semble que la relation dose/réponse suit un modèle exponentiel. Le rayonnement à faible et fort débits de dose ne semble ainsi pas uniforme dans ses effets. Précédemment, nous avons déduit que le temps d'exposition et plus précisément la dose cumulée devaient être pris en compte dans l'ERE.

Tableau III- 4 : débits de dose, temps d'exposition et doses cumulées des adultes F0 ainsi que la mortalité de la descendance à 24 hpf pour les différentes expérimentations.

Dose rate (mGy/h)	Exposure time (day)	Cumulated dose (Gy)	Survival (24 hpf) ± se
Control	-	-	76.67 ± 3.00
0,05	30	0.036	80.89 ± 4.41
5	30	3.6	80.22 ± 2.72
Control	-	-	94.38 ± 4.38
0,5	10	0.12	96.56 ± 1.33
5	10	1.2	92.71 ± 3.44
Control	-	-	75.55 ± 6.08
50	1	1.2	81.98 ± 2.35
Control	-	-	90.58 ± 5.85
50	10	12	50.03 ± 12.02

La Tableau III- 4 regroupe donc les doses cumulées des adultes F0 ainsi que le phénotype mortalité associé pour les différentes expérimentations afin de comprendre

la relation dose-réponse. Pour un même débit de dose de 50 mGy.h^{-1}, une différence sur la survie à 24 hpf est observée avec des pourcentages de 80 et 50% pour des doses cumulées de respectivement, 1.2 Gy (F0 1j) et 12 Gy (F0 10j), ce qui confirme donc l'effet du temps d'exposition et donc de la dose cumulée. Pour des débits de dose allant de 0.05 à 5 mGy.h^{-1}, correspondant à des doses cumulées allant de 0.036 Gy (F0 30j) à 3.6 Gy (F0 30j), le taux de survie à 24 hpf n'est pas aggravé pour une dose plus élevée. De même, à 5 mGy.h^{-1}, pour deux doses cumulées (1.2 et 2.9 Gy, (Guirandy et al., 2019)), aucune aggravation sur l'effet survie n'a été observée. La relation dose-réponse après irradiation gamma ne semble donc pas suivre un modèle log-logistique. La Figure III- 20 présente la relation dose/réponse en considérant la dose cumulée comme la dose cumulée reçue par les géniteurs plus la dose cumulée reçue par la descendance. Nous considérons que ces deux doses cumulées peuvent être additionnées puisque la descendance est irradiée dans les géniteurs *via* les gamètes. La relation dose/réponse semble suivre un modèle exponentiel (R^2=0.93). Cependant, cette courbe prend en compte plusieurs temps d'exposition or précédemment, nous avons évoqué la possibilité qu'un temps plus long soit plus susceptible d'impacter des processus sensibles. Ainsi, il serait intéressant de réaliser des expérimentations à des débits de doses entre 5 et 50 mG.h^{-1} afin de vérifier cette relation pour un même temps d'exposition (c'est-à-dire exposition des mêmes stades), mais également à 50 mGy.h^{-1} sur plusieurs temps d'exposition. Nos résultats montrent que la valeur repère de protection de 10 µGy.h^{-1} permet la protection des écosystèmes. Cependant, il faut tenir compte du temps d'exposition, notamment car les individus sont exposés sur le long terme dans l'environnement.

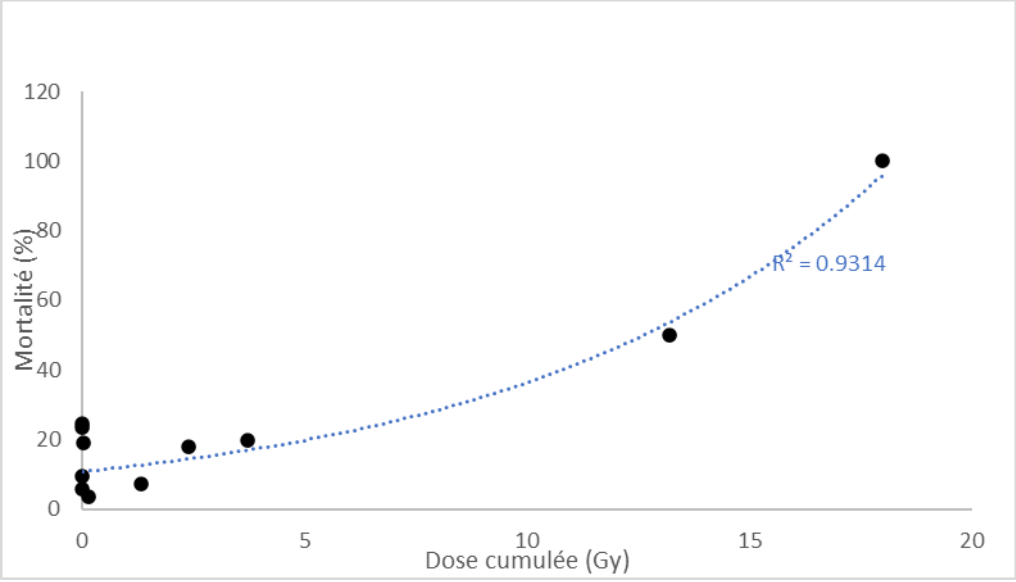


Figure III- 20 : Courbe de la relation dose-réponse avec droite de régression exponentielle.

III.4.4 Conclusion

Ces effets drastiques (mortalité embryo-larvaire, altération du sexe ratio, Figure III- 21) après irradiation parentale sont retrouvés pour la première fois à notre connaissance, permettant ainsi d'augmenter les savoirs sur les effets de l'irradiation gamma de vertébrés aquatiques. De manière générale, l'irradiation sur des poisons adultes et matures n'altère pas les paramètres mesurés dans l'ERE. En revanche, une exposition de l'embryon jusqu'au stade adulte montre un effet sur ces mêmes paramètres, à savoir une diminution du succès reproducteur lors de la première reproduction des poissons. Ces effets phénotypiques (mortalité, sexe ratio) semblent hérités. Il semblerait que l'approche classique de l'ERE sur un stade précis ne suffise pas à observer les conséquences d'une exposition au rayonnement gamma. En effet, il semblerait que le stress du rayonnement sur un processus biologique spécifique (gamétogenèse, détermination sexuelle) mène à des effets délétères contrairement à un stress sur un stade de vie précis (embryon, stade adulte). Cela souligne l'intérêt des expositions multigénérationnelles où tout le cycle de vie est exposé. La transmission de matériels parentaux défectueux évoquée conforte cet intérêt. Finalement, les expositions multigénérationnelles permettent également de se rapprocher des conditions rencontrées dans les populations sauvages. Enfin, l'ERE pour le rayonnement est fondée sur l'ERE pour les chimiques qui suivent souvent des modèles log-logistiques. Or, la relation semble tendre vers un modèle exponentiel entre les effets à différentes doses cumulées.

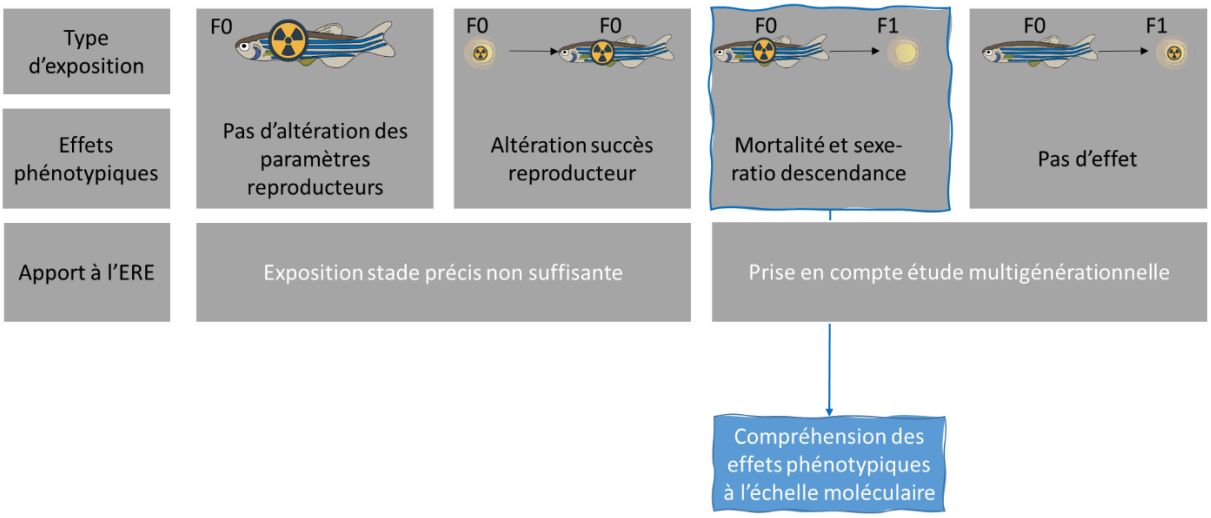


Figure III- 21 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre III

Les études sur les effets multigénérationnelles sont peu réalisées, particulièrement dans la cadre des RI. Ainsi, les mécanismes sous-jacents d'effets transmissibles ne sont pas ou peu connus. Dans l'objectif d'apporter des réponses aux observations de ce chapitre, les chapitres suivants abordent l'identification des mécanismes moléculaires des effets phénotypiques transmis observés. Les expérimentations étant

réalisées à différents débits de dose, permettent également d'évaluer la linéarité de la relation dose-réponse à l'échelle moléculaire. Précédemment, une implication maternelle forte a été évoquée. Ainsi, le focus a été réalisé sur l'apport maternel à l'échelle moléculaire.

Chapitre IV – De l’individu à la molécule : implication maternelle dans la mortalité précoce de la descendance

IV.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, une mortalité précoce (24 hpf) de la descendance issue de parents irradiés pendant 10 jours à 50 mGy.h^{-1} a été observée sans altération des performances de reproduction des adultes. Cet effet a été observé après irradiation de la descendance (condition irradiée) ou sans irradiation de cette dernière (condition recovery), suggérant une atteinte de la gamétogenèse des parents. Un tel constat a également été observé sur d'autres paramètres comme les malformations du stade précoce à fort débit de dose et la perturbation du sexe-ratio chez les adultes F1 à débit de dose modéré. Des études précédentes ont montré une descendance non viable après irradiation gamma des parents (Hurem et al., 2018a, 2017a). Les expérimentations réalisées aux différents débits de dose ont mis en évidence des effets sur la descendance. Ces effets phénotypiques (mortalité, sexe ratio) semblent hérités.

Ce chapitre répond donc au deuxième objectif de thèse à savoir, **quels sont les mécanismes moléculaires à l'origine des effets phénotypiques transmis**. L'expérience à 50 mGy.h^{-1} a été reproduite afin de (i) confirmer plus précisément les effets observés précédemment (mortalité, surface de la réserve vitelline et de l'aire péricardique) à l'échelle individuelle. Cela a permis de renforcer l'hypothèse d'un effet issu de l'irradiation parentale. Les analyses se sont focalisées sur (ii) l'implication maternelle dans les effets observés chez la descendance comme évoqué précédemment. Premièrement, les femelles contiennent les futurs œufs, sur lesquels les RI induisent un stress oxydatif et des dommages à l'ADN (Chen et al., 2015; Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2018a, 2017a; Vuori et al., 2008). Deuxièmement, certaines macromolécules essentielles au développement de l'embryon sont fournies par les mères ("Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition," n.d.). Deux macromolécules présentent un intérêt particulier et ont étudiées. D'une part, la VTG est la source d'énergie principale des organismes ovipares lors du développement. La VTG doit être clivée par la cathepsine D pour former le corps jaune (Carnevali et al., 2006; Finn, 2007; Follo et al., 2011; Yilmaz et al., 2018; Yoshizaki and Yonezawa, 1994). Un défaut de la quantité de VTG ou de sa métabolisation pourrait être une cause de mortalité précoce (Soares et al., 2009; Yilmaz et al., 2018). D'autre part, le cortisol, principale hormone du stress chez les poissons (Sadoul and Geffroy, 2019), pourrait être surproduite en cas d'exposition au rayonnement gamma. Une concentration de cortisol modifiée pourrait également jouer un rôle clé dans les effets décrits, car une quantité appropriée fournie par la mère est nécessaire pour le développement précoce de l'embryon (Faught and Vijayan, 2018; McCormick, 1999; Nesan and Vijayan, 2016, 2012).

Troisièmement, les ARNm maternels soutiennent le développement embryonnaire jusqu'à l'activation du génome du zygote (Abrams and Mullins, 2009; "Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition," n.d.) et conditionnent par

conséquent, le développement ultérieur de l'embryon. L'évaluation de l'apport maternel semble donc inévitable car les mères fournissent non seulement du matériel génétique (ADN) mais également de nombreux composants cytoplasmiques ainsi que des ARNm nécessaires au développement embryonnaire. Ces ARNm s'accumulent dans le corps Balbiani (Bb) de l'ovocyte avant d'être dispersés vers leur localisation fonctionnelle dans l'embryon (voir chapitre I, Jamieson-Lucy and Mullins, 2019; Marlow, 2010). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle primordial des ARNm maternels et plus généralement du Bb dans la formation des axes embryonnaires et la survie de la descendance (Abrams and Mullins, 2009; Flores et al., 2008; Langdon and Mullins, 2011)Ainsi, le focus a été fait sur la formation du Bb ainsi que sur les ARNm nécessaires au développement, et plus précisément pour la formation des axes.

Enfin, le chapitre précédent suppose que le type de relation dose-réponse après irradiation gamma, est exponentiel. Ainsi, en plus des analyses réalisées à 50 $mGy.h^{-1}$, des analyses moléculaires ont été réalisées sur les débits de dose plus faibles (0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$), pour permettre également (iii) d'évaluer la relation dose-réponse à l'échelle moléculaire.

Pour répondre à ces objectifs, les analyses suivantes ont été réalisées :

- Performances de reproduction sur les adultes (F0) à 50 $mGy.h^{-1}$
- Mortalité et malformations pendant les stades embryo-larvaires (F1) à 50 $mGy.h^{-1}$
- Mesure du taux de cortisol sur les gonades femelles F0 à 50 $mGy.h^{-1}$ (test ELISA)
- Visualisation de la VTG sur les embryons F1 (24 hpf) à 50 $mGy.h^{-1}$ (Western-blot)
- Séquençage des ARNm sur les gonades femelles F0 à 0.05, 5 et 50 $mGy.h^{-1}$

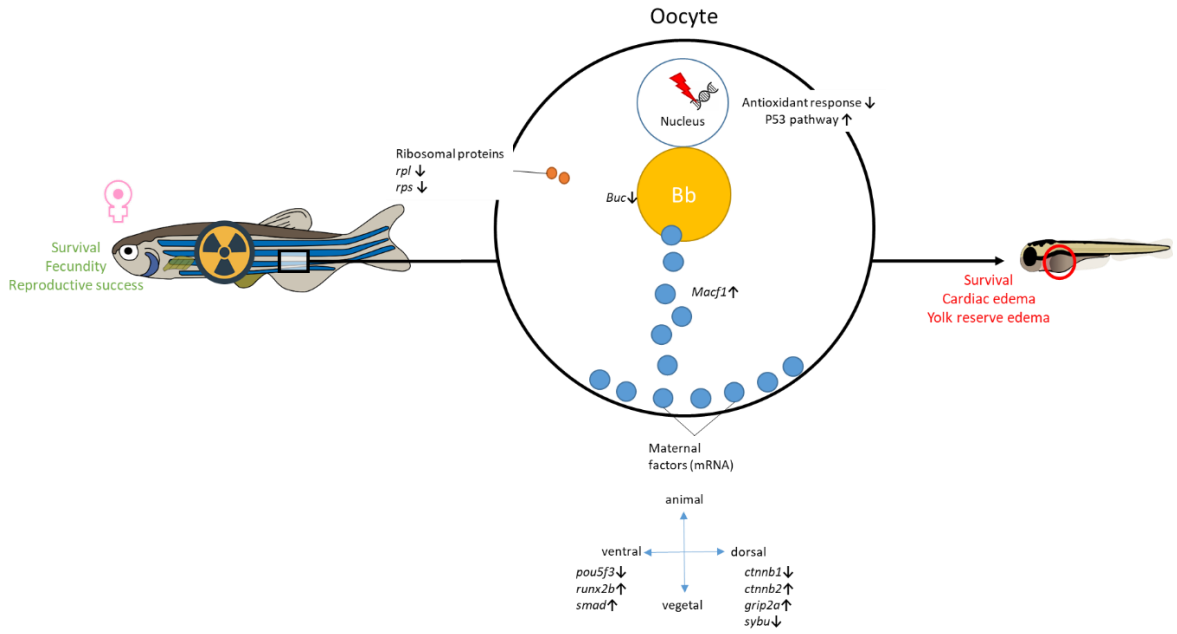
Ce chapitre s'articule en deux parties. Tout d'abord, la troisième publication traite les phénotypes de la descendance et l'implication maternelle dans ces effets. La synthèse du chapitre réunit ensuite des résultats supplémentaires permettant d'évaluer la relation dose-réponse à l'échelle moléculaire.

IV.2 Publication 3: « Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish »

Résumé de l’article en français

Des études récentes portant sur l'irradiation gamma ont démontré des effets phénotypiques drastiques après exposition multigénérationnelle. Dans l'évaluation du risque écologique (ERE), ce type d'exposition n'est pas pris en compte et les études n'investissent que des stades de vie isolés. La reproduction des géniteurs (F0) et le développement précoce de la progéniture (F1) ont été étudiés. L'objectif était d'étudier les mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués dans les effets phénotypiques. Ainsi, les F0 ont été irradiés pendant dix jours jusqu'à reproduction et l'implication maternelle dans le développement de la progéniture a été évaluée dans un premier temps. Aucun effet de l’irradiation à l'échelle phénotypique n'a été observé pour la génération F0 (performances de reproduction) tandis qu'une mortalité précoce et des malformations ont été observées chez les descendants F1, qu'ils aient été irradiés ou non. Les niveaux de cortisol et de vitellogénine fournis par la mère, nécessaires au développement de l'embryon, n'ont pas été affectés par l'irradiation. Cependant, le transcriptome maternel a mis en évidence l'effet de l'irradiation sur les processus impliqués dans le développement des ovocytes, ainsi que sur les facteurs maternels nécessaires au développement de la descendance. Par conséquent, cette étude a mis en évidence l'importance de l'exposition des géniteurs, dans ce cas précis l'exposition maternelle, sur le devenir de la descendance.

Graphical abstract



Abstract

Recent studies focusing on gamma irradiation demonstrated drastic phenotypic effects at multigenerational scale. In environmental risk assessment (ERA), this kind of exposure is not considered while studies investigate only isolated key life stages. With the aim of merging the reality of wild populations over several generations and the key stages of ERA, reproduction of genitors (F0) and early development of offspring (F1) were studied. The objective was to study molecular mechanisms likely to be involved in phenotypic effects. Thus, F0 were irradiated for ten days until reproduction and maternal involvement in offspring development was assessed as a first step. No irradiation effect at phenotypic scale was observed for F0 (reproductive performances) while early mortality and malformations were observed in F1 offspring whether they were irradiated or not. Levels of maternal provided cortisol and vitellogenin, needed for embryo development, were not impacted by irradiation. However, maternal transcriptome highlighted irradiation effect on processes involved in oocyte development, as well as on maternal factors needed for offspring development. Therefore, this study highlighted the importance of genitor exposure, in this specific case maternal exposure, on offspring fate.

Keywords: multigenerational, cortisol, vitellogenin, zebrafish, irradiation, maternal transcripts

Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish

Guirandy Noëmie[a]*, Armant Olivier[a], Frelon Sandrine[a], Pierron Fabien[b], Geffroy Benjamin[c], Daffe Guillemine[b], Houdelet Camille[c], Gonzalez Patrice[b], Simon Olivier[a]

[a] IRSN/PSE-ENV/SRTE/LECO, Centre de Cadarache-B.P. 3 – Bat 183 – 13115 St Paul Lez Durance, France

[b] Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

[c] MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Palavas-Les-Flots, France

*Corresponding author.

E-mail addresses: noemie.guirandy@hotmail.fr

Article soumis dans Journal of Hazardous Materials

IV.2.1 Introduction

In ecotoxicology, assessing biological effects of chemical pollutant exposure is a typical and established approach. Yet, much less is known regarding the effects of ionizing radiations (IRs) over generations, while nuclear accidents such as Chernobyl and Fukushima did (and does) emit such IRs and represent an ecological threat for wild populations (Beresford et al., 2020b; Car et al., 2022; Cunningham et al., 2021; Geras'kin et al., 2021).

Simulating exposures to IRs are not easy to perform, such that most experiments are mainly conducted on model organisms (e.g. zebrafish) in laboratory conditions. We previously showed that artificial exposure of adult zebrafish to high dose rate of IRs (50mGy.h^{-1}, 12 Gy) for 10 days did not alter their reproductive performances nor survival (Guirandy et al., 2019). But it is likely that effects would be more tenuous since DNA damages and oxidative stress were already detected following IRs exposure (O. Simon et al., 2011b). Moreover, these subtle effects could be maternally transmitted, with potential consequences on offspring fitness. We indeed reported that the irradiated or non-irradiated (recovery condition) offspring from irradiated genitors at a high dose rate showed a high mortality from 24 hours post fertilization (hpf) (Guirandy et al., 2019). Similar results were observed by Hurem et al., 2017a after an exposition to 53 mGy.h^{-1}, which induced non-viable offspring. Another study at a lower dose rate (5 mGy.h^{-1}, 30d, 3.6 Gy) showed an impact of IR on the irradiated or non-irradiated offspring leading to high mortality rates at early stages of development (8 days post fertilization (dpf)) as well as male-biased sex ratio at adulthood (Guirandy et al., 2022b). All these studies highlighted a high mortality of the offspring from irradiated parents. The exact mechanisms responsible still remain unclear.

Strong maternal effects are likely to occur following exposure to IRs since mothers not only provide genomic material but also many essential cytoplasmic components and mRNA needed to achieve the proper embryonic development of the offspring. First, females contain the future eggs, on which IR may induce oxidative stress and DNA damages (Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2018a, 2017a). Damaged eggs would then suffer higher mortality, as observed by Chen et al., 2015 and Vuori et al., 2008. Secondly, some essential macro-molecules are provided by mothers and are needed for embryo development ("Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition," n.d.). Two macro-molecules are of particular interest, namely vitellogenin (VTG) and cortisol (the main stress hormone in fish (Sadoul and Geffroy, 2019). VTG is the yolk egg precursor and the developing offspring of oviparous animals are entirely dependent on this energy store. VTG needs to be cleaved by cathepsin D in order to form the yolk egg (Finn, 2007; Yilmaz et al., 2018). A defect in VTG quantity or in its metabolism could be a cause of early mortality (Soares et al., 2009; Yilmaz et al., 2018). Altered cortisol concentration could also play a key role in the described effects

since a proper maternally-provided quantity of cortisol is needed for early embryo development (Faught and Vijayan, 2018; McCormick, 1999; Nesan and Vijayan, 2016, 2012). Finally, maternal mRNAs support embryonic development until activation of the zygote genome (Abrams and Mullins, 2009; “Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition,” n.d.). Indeed, good quality eggs production begins with oocyte development in females. Particularly, formation of the Balbiani body (Bb) in developing oocytes allows establishment of the first polarity (animal/vegetal) (Jamieson-Lucy and Mullins, 2019; Marlow, 2010).Two genes are particularly involved in Bb formation; (i) *buc*, which allows Bb assembly and (ii) *macf1*, which allows Bb translocation and dispersal. Maternal mRNA needed later for embryo development are accumulated in the Bb before to be dispersed to their functional localization. For instance, many studies highlighted the primordial role of maternal mRNAs and more generally of the Bb in embryo axis establishment and progeny survival (Abrams and Mullins, 2009; Flores et al., 2008; Langdon and Mullins, 2011).

Here, we assessed maternally transmitted effects following parental exposure to gamma irradiation with no offspring irradiation of (recovery) as well as irradiation of both genitors and offspring (irradiated). Maternal factors were then determined to assess get mechanistic insights into the impact of irradiation. Hence, after a gamma irradiation performed at 50 $mGy.h^{-1}$ for 10 days, we sampled ovaries and eggs to study irradiation-induced impacts (i) maternaly deposited material through cortisol and VTG measurements, (ii) on oocyte development and (iii) on maternal factors needed for offspring development by analysing ovary transcriptome (RNA-Seq) in order to get insights into the mechanisms that could explain the transmitted effects from genitors to offspring.

IV.2.2 Materials and methods

IV.2.2.1 Fish husbandry

The project (APAFIS#15821) was authorized by the Institut de Radioprotection et de Surêté Nucléaire ethics committee no. 81 (EU 0520) in an application under the directive 2010/63/UE relating to animal care. The study was conducted on AB strain zebrafish that were kept, reproduced, and irradiated in a zebrafish housing system (Zebtec Tecniplast Stand Alone) with recirculating oxygenated freshwater. Adult fish were acclimatized over 3 weeks to tap water + 20% demineralized water renewed daily (Aquadem; pH 7.4 ± 0.2, conductivity = 398 ± 2 µS cm–1, temperature = 28.4 ± 0.3 °C), with a 12:12-h light:dark cycle photoperiod. The fish were fed ab libitum three times a day with GEMMA Wean (Skretting®).

IV.2.2.2 Adult and embryo exposure

Nominal dose rate was 50 mGy.h^{-1} for the irradiated condition. Gamma-rays were emitted from a 137Cs source (444 GBq, 662 keV; Institut de Radioprotection et de Surêté Nucléaire MICADO-Lab platform). Dose rate was simulated using MCNP5 software and measured using thermoluminescent dosimeters (Chiyoada Technologies), and the values represented between 80 and 120% of the nominal values. Control condition was kept in a separate room (60–80 nGy.h^{-1}). The population density of adult fish was 0.7 L.g^{-1}.

Twenty-four adult fish per condition (12 females : 12 males) were irradiated over 10 d. Daily controls and feeding were conducted as described in Guirandy et al., 2019.

F1 offspring were obtained from 12 F0 spawning couples (24 fish, 1 female:1 male) (i.e., replicates) per condition. Mating and eggs viability were determined as described in Guirandy et al., 2019. The 3hpf-embryos from 6 spawns per condition were separated into 2 groups of 30 eggs per clutch. The first one F1 embryos were then positioned in an incubator and irradiated at 50 mGy.h^{-1} (irradiated) (Figure IV- 1). The second group was placed in non-irradiated incubator (recovery). F1 embryos were maintained in both conditions over 6days. The same culture medium was used for embryos and adults and 10% was replenished daily.

F0 adults were then placed in control condition and reproduction was done as explained before, at 6 days (resilience_6d) and 36 days (resilience_36d). Each F1 obtained offspring were kept in control conditions for 4 days.

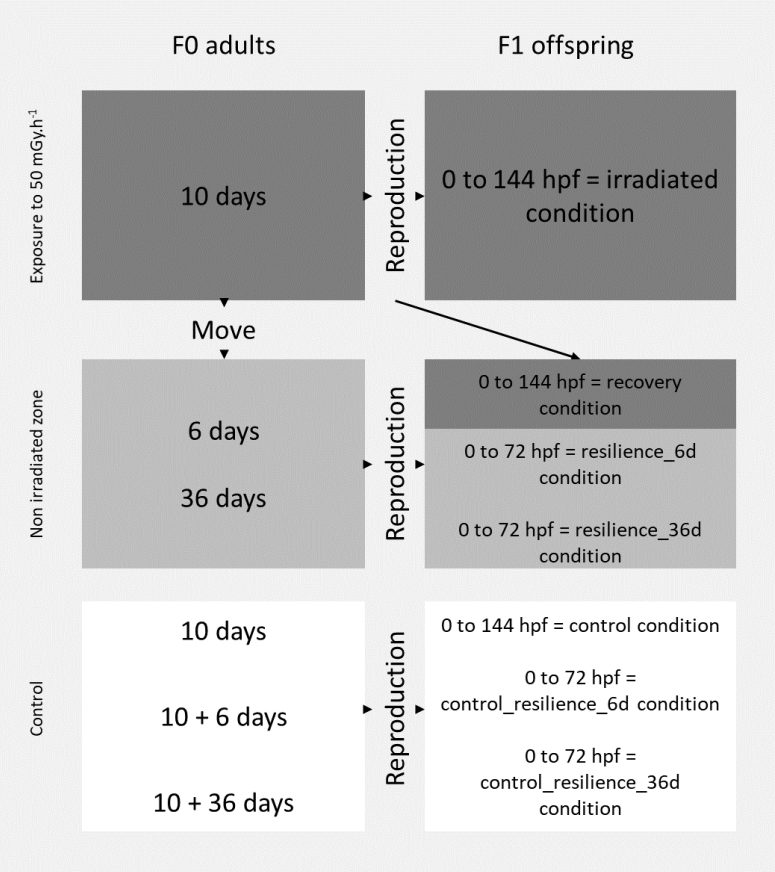


Figure IV- 1 : Experimental design and exposure conditions (duration and dose rate (mGy.h^{-1}). F0 adults were exposed over 10 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated (irradiated condition) and non-irradiated (recovery condition) exposure conditions over 6 days. F0 adults were then moved to non-irradiated condition for 6 and 36 days before reproduction. F1 progenies from 6 days F0 (resilience_6d condition) and from 36 days F0 (resilience_36d condition) were then placed in control condition.

IV.2.2.3 Ecologically endpoints and morphological analysis

Reproductive performances (reproductive success, fecundity: number of eggs laid per female) of adults were measured after 10 days of exposure.

The progeny survival rate was assessed from 24 to 96 hours post fertilization (hpf) in the control, irradiated, and non-irradiated (recovery) conditions (30 eggs from 6 spawns per condition).

Photographs of F1 larvae were recorded at 72hpf (6 to 30 larvae per condition) under a stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to a high-resolution camera (acA1300-60gm, Basler, Germany). Recording was performed using Media Recorder Software (v.4.0.542.1, Noldus Information Technology, Netherlands) and the analysis of photos was performed using the DanioScope Software (v.1.1.110, Noldus Information Technology, Netherlands) in order to assess morphology measurements (surface of yolk reserve) and malformations (cardiac edema). Analyses were made for F1 irradiated, F1 recovery, F1 resilience 6d and F1 resilience 36d.

IV.2.2.4 Sequencing library and transcriptomic analysis of ovaries

Ovaries were dissected after reproduction and gonads were kept in RNALater® (Sigma-aldrich) at -80°C until analysis. RNA extractions were made from female gonads (8 per condition). Each sample was homogenized in 600 µL of ice-cold RTL buffer (Qiagen) with 6 µL of β-mercaptoethanol using a tissue homogenizer for 3 times 15s. Following centrifugation, DNA and RNA were extracted from the homogenate using the AllPrep DNA/RNA kit (Qiagen) according to manufactures' guidelines, with DNAseI's treatment (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations.

Libraries were generated from 1 µg of total RNA following the TruSeq mRNA stranded protocol (Illumina). RNA integrity (RIN) assessed using RNA Nano Chips (Bioanalyzer 2100, Agilent) did not show any sign of degradation (RIN > 7). Librarie quality and concentration were measured on DNA1000 Chips (Bioanalyzer 2100, Agilent) and sequenced on a NovaSeq 6000 platform to produce 50 bases long paired-end reads (Clinical Research Sequencing Platform, Broad Institute, MIT, Cambridge, USA). Good-quality reads (Q > 30) were produced for each sample (SD Tableau IV- 1). Quality check of paired end reads and quantification of the RNAseq data were performed as described before (Murat El Houdigui et al., 2019). Briefly, read quality was assessed with FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), adapter sequences were removed with TrimGalore! v0.6.4 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) and mapped against the GRCz11 zebrafish reference genome using RNA-STAR v020201 and the known exon–exon junctions from Ensembl release 103. Normalization and differential expression analysis were performed with DESeq2 v1.26.0. Genes with adjusted p-value < 0.05 (false discovery rate) were considered as differentially expressed in all analysis (DEG). Genes with |log2FoldChcange| ≥ 1 and adjusted p-value < 0.05 (false discovery rate) were considered as up or down regulated.

IV.2.2.5 Enrichment analysis

ClusterProfiler, a R package, was used to perform pathway enrichment using Gene ontology terms (GO terms), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway (KEGG pathway) on the DEG obtained from DESeq2 (SD Tableau IV- 2). Enrichments with p-value from Fisher's exact test ≤ 0.05 were considered significant. Dot plots were produced using the R package ggplot2.

IV.2.2.6 RT-qPCR analysis

RNA extraction for qPCR was performed as for the RNA-seq. A total of 1 µg of RNA was used to synthesize first-strand cDNA using the GoScript Reverse Transcription System (Promega), according to the manufacturer's guidelines. cDNA was then diluted

40-fold. Real-time PCR reactions were then performed in a thermocycler (LC480, Roche; 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min). Each 15 µL reaction contained 7.5 µL of GoTaq qPCR master mix (Promega), 5 µL template and the specific primer pairs at a final concentration of 0.33 µM each. Amplification efficiencies for all primer sets were calculated to allow direct comparison of amplification plots according to the ΔΔCt method (Livak and Schmittgen, 2001). Relative quantification of gene expression was achieved by amplification of endogenous control genes chosen from our RNAseq dataset, i.e. genes for which their transcription level was not impacted by irradiation (*aspa*, *pdia6*). During our experiment, total RNAs were quantified and the same quantity was used to be reverse-transcribed. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycles of the endogenous controls were examined, no significant difference was observed on the output cycle of *aspa* and *pdia6* among conditions. The mean Ct value of the two latter genes was used as reference. Primers used are available in SD Tableau IV- 3and are involved in oogenesis and sex determination. Log2FC from RNAseq and qPCR analysis were compared in order to validate RNAseq data (SD Figure IV- 1); they varied similarly between the two analyses.

IV.2.2.7 Steroid extraction and cortisol measurement

A half female's gonad per replicate was flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until extraction. Gonads were then thawed and transferred in sodocalcic glass tube. 1ml of ethyl acetate/cyclohexane (50:50) was added per sample before grinding for 2 min in a potter (Eurostardigital, IKA Labortechnik,) at 2000 Tr/min. Lysate was then transferred to new sodocalcic glass tube. This step was carried out twice in order to recover a maximum of material as recommended in Sadoul and Geffroy, 2019. Tubes were vortexed for 10 sec then centrifuged for 5 min at 5000G. Supernatant was collected in a sodocalcic glass tube. This step was performed twice. Each sample was evaporated to dryness under nitrogen at 40 °C and resuspended in buffer from the "Cortisol Express ELISA Kit" from Cayman Chemical. Cortisol assay were then performed according to manufacturer's guidelines.

IV.2.2.8 Protein extraction and VTG western blot analysis of 24hpf eggs

Twenty 24hpf-eggs per replicate were quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. For protein extraction, samples were placed in a modified RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich; with anti-protease mixture), with 0.5-mm diameter zirconium beads and homogenized by three 5000-rpm cycles at 4°C in a Precellys grinder system (Ozyme). After 30mn incubation on ice, crude extracts were centrifuged for 10 minutes at 4°C at 5000g. Protein concentration was determined using the BCA kit (Thermo Scientific) with BSA as a standard, according to the manufacturer's instructions and then adjusted to a same concentration to ensure the loading of the same amount of proteins for western blot analysis. After denaturation (15mns, 95°C with Laemli buffer (Tris (0,31M), DTT (0,25M), BBP (0,02%), SDS (10%) and glycerol)

9µg of proteins from each sample were loaded in precast gels (4-20%? TGX Biorad) and electrophoresis was run in TGS buffrer during 50min (80V for 15 min and 150V 35min). 5µL of load marker (RNP800E, ECL Plex Fluo rainbow) were added in one well. After migration, gel was transferred on a polyvinylidene fluoride (PDVF, GE Healthcare) membrane (1h, 4°C, transfer buffer (TGS 1X, ethanol (20%)), for 1 hours at 100V. Membrane was then blocked with BSA 1% (TBST-BSA buffer (TBS1X, pH=7.5 – Tween 0.1% - 1% filtered BSA) for 1hand incubated overnight at 4°C in primary mouse antibody JE-10D4 (Abcam ab36804, dilution 1:1000 in TBST-BSA) followed by incubation in secondary anti-mouse antibody Cy5 (® (Goat Anti-Mouse IgG H&L preadsorbed (ab6563), dilution 1:6000 in TBST-BSA) for 2h at 4°C. Membrane was finally rinsed and results were visualized with Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) at 670nm, PMT ().Integrations of bands (volume without background) were done using ImageQuantTL software (1D gel analysis module). Recent bibliography shows that the use of housekeeping protein to normalization is difficult (Eaton et al., 2013; Moritz, 2017). These findings were proved in our case with traditional proteins (β-actin and α-tubulin) which were highly impacted by gamma irradiation (SD Figure IV- 2). Reproducibility of lane was proved by multiple gel migrations, as described by (Eaton et al., 2013; Moritz, 2017; Richon et al., 2000), using total protein gel stained in parallel (SD Tableau IV- 4) since the use of housekeeping protein to normalization is difficult after exposure to a stressor (Eaton et al., 2013; Moritz, 2017). Homogeneity of variances was tested using bartlett's test for each membrane (*p-val>0.05*) and variances of two gels were tested using Anova (*p-value>0.05*).

IV.2.2.9 Statistical analysis

For F1 survival rate, F1 morphology, F1 maturation products of vitellogenin intensity and F0 cortisol concentrations, data were presented as mean values ± SE, with significance taken as $p < 0.05$. For F1 vitellogenin ratio, results were presented by the ratio 30kDa band/ 26kDa band. Concerning data relating to the F1 generation (survival rate and vitellogenin ratio), conditions were compared using a GLM (Generalized Linear Model, glm function in R) with binomial distribution. Concerning data related to morphology, vitellogenin density results and cortisol, conditions were compared using Anova with BoxCox transformation when normality and homogeneity were not verified. A TukeyHSD, post-hoc test, was then used. Concerning qPCR data, data were presented as log2FoldChange where FoldChange (FC) = (mean $2^{-\Delta Ct_{irradiated}}$ - mean $2^{-\Delta Ct_{control}}$)/ mean $2^{-\Delta Ct_{control}}$. Conditions were compared using Anova with BoxCox transformation when normality and homogeneity were not verified. A Tukey (HSD), post-hoc test, was then used. When normality was not verified even after data transformation, a non-parametric test was used (kruskal wallis). A Dunnet test with Bonferroni correction was then used as post hoc test.

The analyses were performed using R software (R Core Team, 2021) with the following packages : “tidyverse”, “here”, “knitr”, “lme4”, “MASS”,”car”. Figures were produced using the package “ggplot2”.

IV.2.3 Results

IV.2.3.1 F0 reproductive performances and F1 survival

F0 adult fish and F1 embryos were irradiated to a cumulative dose of 12Gy and 4.8Gy, respectively. The direct exposure to IRs did not induce F0 adult mortality over the experiment. The reproductive success (RS) of F0 irradiated adults was lower (n=12 mating pairs, 75%), but not significantly different to control fish (n=12, 92%). No effect on fecundity was observed after exposure to gamma irradiation (n=9, 367±170), compared to the control group (n=11, 344±153).

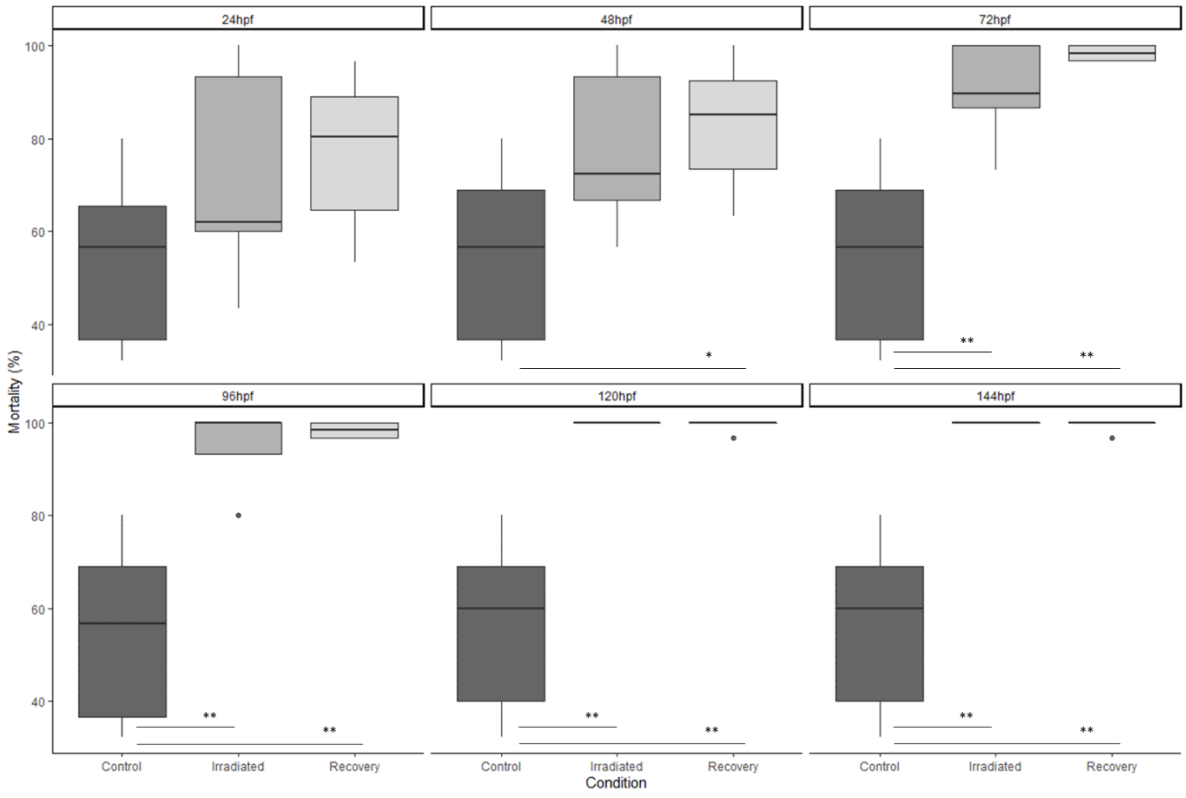


*Figure IV- 2 : Box-plot of cumulative mortality rates of F1 (%)) at 24, 48, 72, 96, 120, 144 hpf after control, dose rate exposure to 50 mGy.h^{-1} (irradiated) and recovery conditions. The boxplot represents the 25th and the 75th percentile with the median indicated by the horizontal black line. For control, irradiated and recovery, n=9, n=5, n=6, respectively. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).*

At 24 hpf, the percentage of F1 mortality for control, irradiated and recovery groups reached 54.9%±5.6, 71.7%±10.7 and 77.0%±7.0, respectively (Figure IV- 2). Despite enhanced mortality for both irradiated and recovery conditions, no significant difference was observed compared to the control group. However, an important variability was

observed for all groups. The same trend was observed at 48 hpf (control: 56.1%±5.9; irradiated: 77.8%±8.2; recovery: 83.0%±5.7), but a significant difference ($p < 0.05$) was observed only for the recovery condition. A significant difference in mortality ($p < 0.05$) was observed from 72 hpf for both irradiated (89.9%±4.9) and recovery (98.4%±0.7) groups compared to controls (56.1% ± 5.9). Nostatistical difference was observed between the irradiated and recovery conditions. Control's mortality remained similar until the last day (6 dpf) of the experiment (57.2%±5.7), whereas it reached 100% for the irradiated group and 99.5%±0.5 for the recovery group.

IV.2.3.2 F1 abnormalities after parental exposure

Malformations (pericardium edema and yolk reserve edema) were observed in F1 72 hpf larvae after parental exposure to IRs (Figure IV- 3A). A significant increase ($p < 0.05$) of yolk reserve area was observed in both conditions, irradiated (0.319mm² ± 0.007) and recovery (0.349mm² ± 0.019), compared to the control group (0.244mm² ± 0.014), with no difference between them (Figure IV- 3B). After setting F0 irradiated adult fish in control condition for 6 days, their offspring (Resilience_6d) still showed a significant increase ($p < 0.05$) in yolk reserve area (0.400mm² ± 0.020) compared to the control group (0.241mm² ± 0.009). On the other hand, after 36 days of setting the adults in control condition, no morphological defects were observed in their offspring (Resilience_36d). For pericardial area, statistical difference ($p < 0.05$) was observed only for resilience_6d compared to control group (Figure IV- 3C).

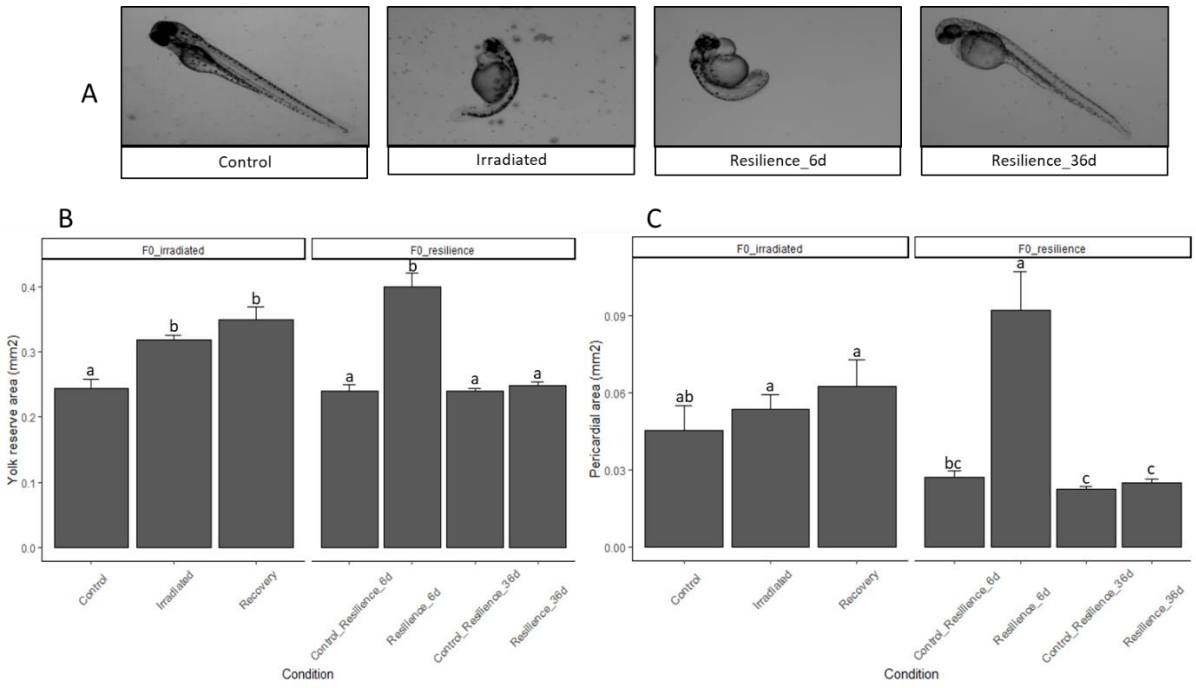


Figure IV- 3 : (A) Photographs of F1 larvae at 72 hpf after Control, F0 exposure to 50 mGy.h^{-1} (10 days) with F1 exposure to 50 mGy.h^{-1}(Irradiated), F0 exposure to 50 mGy.h^{-1} (10 days) follow by non-irradiation 6 days (Resilience_6d) or 36 days (Resilience_36d). (B and C) Bar plot of yolk reserve area (mm²) and pericardial area (mm²) for control (n=6), control_resilience_6d (n=11), control_resilience_36d (n=45), irradiated (F0 + F1 exposed to 50 mGy.h^{-1}, n=9), recovery (F0 exposed to 50 mGy.h^{-1}, F1 non-

irradiated, n=12), resilience_6d (F0 exposed to 50 mGy.h^{-1} follow by non- irradiation exposure 6 days, F1 non-irradiated, n=11), resilience_36d (F0 exposed to 50 mGy.h^{-1} follow by non-exposure 36 days, F1 non-exposed, n=32). Letters indicate statistical differences (pl<0.05) among conditions (Anova test and Tukey post-hoc).

IV.2.3.3 Transmitted macro-molecules from F0 to F1

IV.2.3.3.1 Glucocorticoid regulation in the gonad

Cortisol concentration in F0 female gonads after reproduction was not impacted by IR (Figure IV- 4A). Indeed, its concentration reached 0.036ng.mg^{-1} ± 0.005 for irradiated group and 0.041ng.mg^{-1} ± 0.006 for control group. However, at the transcriptional level (RNAseq), a down-regulation of *nr3c1*, the glucocorticoid receptor, was observed in F0 female gonads after irradiation (Figure IV- 4B). Moreover, many genes involved in cortisol biosynthesis were also down-regulated (*cyp11a1, cyp11a2*, *apoa1a*, *apoeb*, *npc2*, *fdx1, fdx1b*).

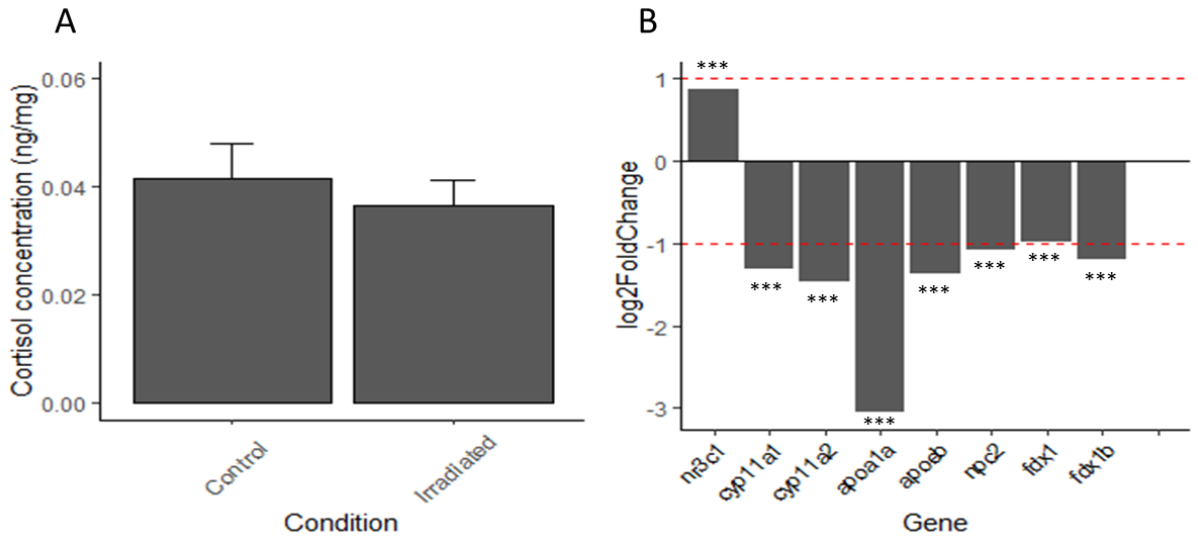


*Figure IV- 4 : (A) Bar plot of F0 ovaries cortisol concentration after control and exposure to 50 mGy.h^{-1} (irradiated), n=6 per condition. (B) Barplot of log2FoldChange (as compared to controls) for genes involved in cortisol metabolism. Data came from transcriptomic data on F0 ovaries. Red line represents cut off value chosen for interpretation of gene regulation. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).*

IV.2.3.3.2 VTG analysis in eggs

Western-blot analysis, using an anti-VTG antibody on 24 hpf F1 embryos, revealed two bands at around 26 and 30 kDa (SD Figure IV- 3), but not the band corresponding to the whole VTG (around 150 kDa). Whatever the band considered, i.e. total one, 30kDa band intensity or 26 kDa band intensity, or the ratio between intensities, no significant difference was observed between control and irradiated groups (SD Figure IV- 4). However, the transcription level of the gene encoding for the enzyme responsible for VTG cleavage, cathepsin D (*ctsd*), was down-regulated (Log2FoldChange= -0.5, FDR <0.01).

IV.2.3.4 Ovarian transcriptome and maternal factors

Differential gene expression was assessed in pairwise comparison between irradiated and control ovaries. The total number of Differentially Expressed Genes (DEG) (FDR < 0.05), up and down regulated genes with a fold change superior to 2 (|log2fold change| ≥ 1 and FDR < 0.05), up regulated genes (log2fold change ≥ 1 and FDR < 0.05) and down regulated genes (log2fold change ≤ 1 and FDR < 0.05) reached 9182, 5348, 3234 and 2114, respectively. Pathways enrichment analyses were then performed using GO repositories (with zebrafish orthologues) and the KEGG database (with human orthologous genes).

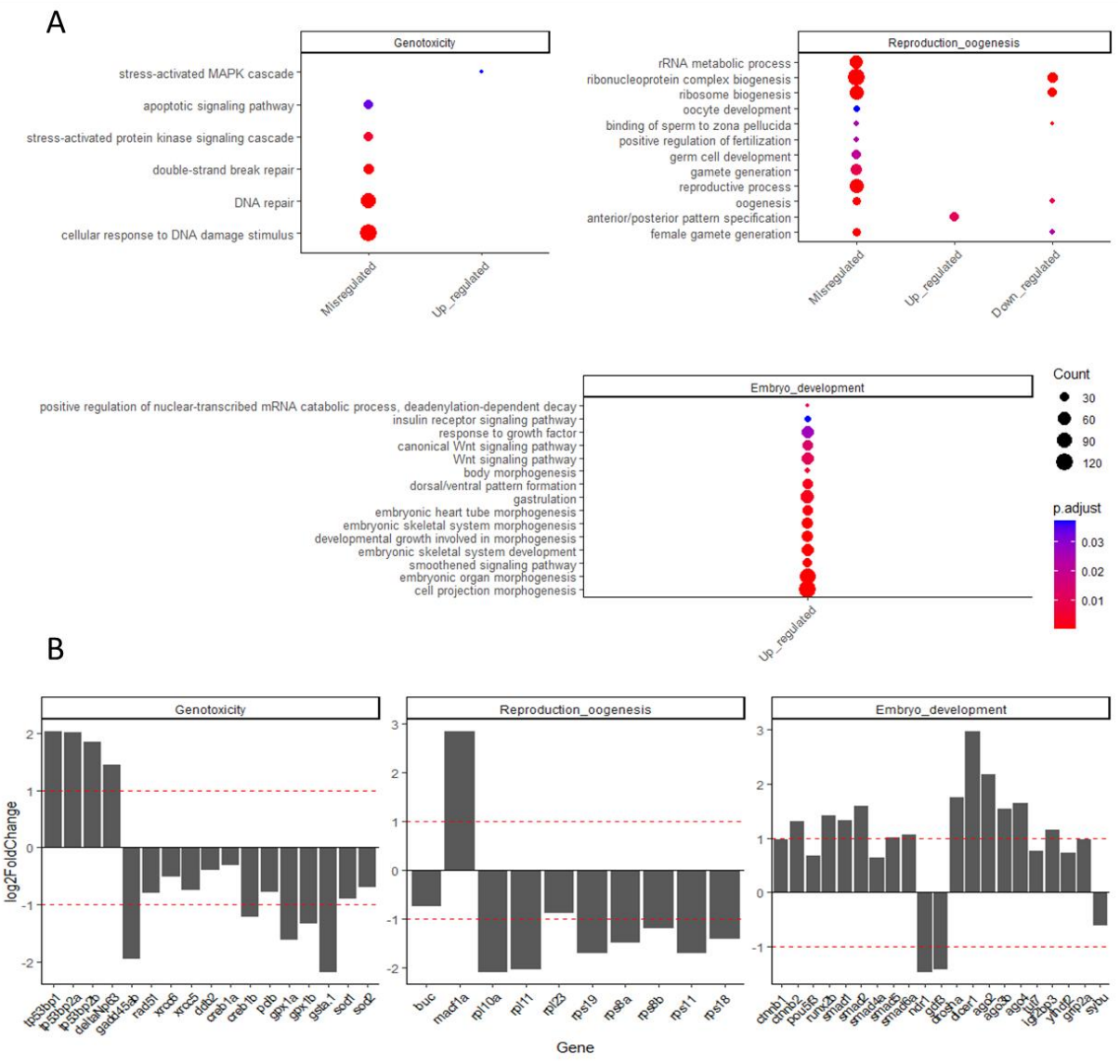


Figure IV- 5 : (A) Dot plot of selected GO (Gene Ontology) term enrichment from dysregulated, up and down genes in exposed F0 ovaries. Colours indicate the p-values from Fisher's exact test, and dots size is the number of genes constituting the given pathway. (B) Change in gene transcription levels (FC as compared to controls) in female gonad F0 from transcriptomic data. For all genes, FDR<0.01. Red line represents cut off value chosen for interpretation of gene regulation.

Considering all dysregulated genes (FDR <0.05) or only up regulated or down regulated genes (|log2fold change| ≥ 1 and FDR < 0.05), 304, 394 and 83 GO terms were enriched, respectively (SD Tableau IV- 4). The most dysregulated pathways from dysregulated genes were related to ribosomes (GO:0022613, ribonucleoprotein complex biogenesis, p.adjust=1.74E-22) and DNA damage (GO:0006281, DNA repair, p.adjust= 7.25E-11) (Figure IV- 5A). GO terms linked to ribosomes synthesis were principally represented by down regulated genes (GO:0042254, ribosome biogenesis, p.adjust= 5.28E-09). We also found other GO terms associated with DNA damage and genotoxicity that were highly dysregulated (GO:0051403, stress-activated MAPK cascade, p.adjust= 0.02; GO:0097190, apoptotic signalling pathway, p.adjust= 0.02; GO:0006302, double-strand break repair, p.adjust= 2.72E-04). For DNA damage group, transcripts of the p53 pathway were all up-regulated (Figure IV- 5B, *tp53bp1*, *tp53bp2a*, *tp53bp2b*, *deltaNp63*) while other genes involved in DNA repairs were down-regulated (*gadd45ab*, *rad51*, *xrcc6*, *xrcc5*, *ddb2*, *creb1a*, *creb1b*, *polb*). Transcripts involved in the fight against oxidative stress were also down-regulated (*gpx1a*, *gpx1b*, *gsta.1*, *sod1*, *sod2*).

GO terms linked to reproduction (GO:0022414, reproductive process, p.adjust= 6.21E-04; GO:0048477, oogenesis, p.adjust= 3.12E-04) and germ line production (GO:0007281, germ cell development, p.adjust=0.03) were also impacted by irradiation.

Dysregulated genes involved in oogenesis and ribosomes are presented in Figure IV-5B. They were mostly down-regulated (*buc*, *rpl, rps*) while *macf1a* was up-regulated.

Among the upregulated genes, many were involved in morphogenesis (GO:0060560, developmental growth involved in morphogenesis, p.adjust= 1.13E-04) and embryo axis establishment (GO:0009952, anterior/posterior pattern specification, p.adjust=0.01; GO:0009953, dorsal ventral pattern formation, p.adjust= 2.73E-03, GO:0016055, Wnt signaling pathway, p.adjust= 9.96E-03). Transcripts related to embryonic development, and in particular in axis development, were mainly up-regulated (Figure IV- 5B, *ctnnb2*, *runx2b, smad* genes), but some important factors for axis establishment were down-regulated (*grip2a*, *sybu*, *pou5f3*, *ndr1*, *gdf3*). Transcripts related to the maternal to zygotic transition (MZT) stage were also up-regulated (*drosha*, *dicer1*, *ago2*, *ago3b*, *ago4*, *ythdf2*).

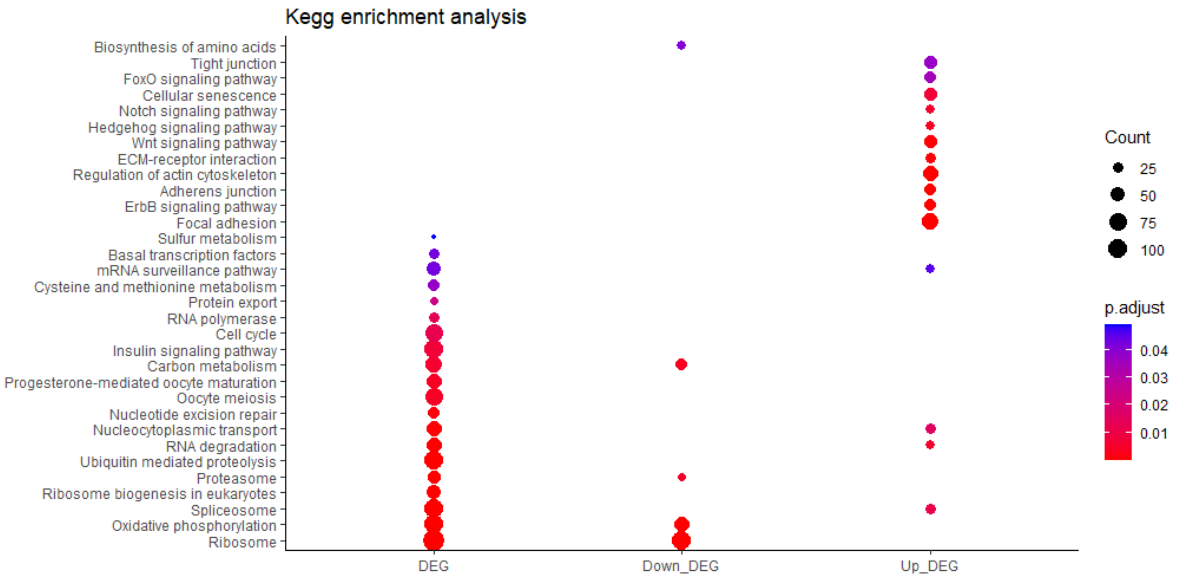


Figure IV- 6 : Dot plot of selected KEGG enrichment using human orthologues from misregulated, up and down genes in irradiated ovaries. Colours indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test, and dots size is the number of genes constituting the given pathway.

Considering dysregulated genes (FDR <0.05), or only up regulated genes or down regulated genes 20, 15 and 5 KEGG pathways were enriched, respectively and are presented in Figure IV- 6. KEGG enrichment analysis with only upregulated genes were consistent to GO terms enrichment since pathway linked to embryo development were impacted (dre04068, FoxO signaling pathway, p.adjust= 0.04; dre04330, Notch signaling pathway, p.adjust= 4.88E-03; dre04340, Hedgehog signaling pathway, p.adjust= 3.53E-03; dre04310, Wnt signaling pathway, p.adjust= 3.90E-04; dre04012, ErbB signaling pathway, p.adjust= 1.56E-05). As previously described, many dysregulated genes or down regulated genes were involved in oogenesis (dre04914, Progesterone mediated oocyte maturation, p.adjust= 4.23E-03; dre04114, Oocyte meiosis, p.adjust= 4.23E-03) and ribosomes (dre03008, Ribosome biogenesis in eukaryotes, p.ajust= 3.61E-06).

IV.2.4 Discussion

In order to investigate the molecular cascade that induce drastic effects on offspring, a high dose rate of 50 $mGy.h^{-1}$ was purposely chosen. Here we detected significant differences on offspring survival rates at 72 hpf (Figure IV- 2). Moreover, malformations, mainly yolk reserve edema, were observed for irradiated, recovery and resilience_6d conditions after parental irradiation (Figure IV- 3). Offspring effects were therefore observed even when only genitors were irradiated. Moreover, Resilience_6d condition show altered offspring, while genitors were in control condition. This supports that deleterious effects in genitors induce non-viable offspring. Several maternal factors being transmitted to embryo could explain these phenotypes.

IV.2.4.1 IR altered maternal provided molecules

IV.2.4.1.1 IR led to oxidative stress and DNA damages in ovary

The RNAseq analysis on female gonads showed an evidence of DNA damage, confirming previous results using COMET assay (Guirandy et al., 2019; Hurem et al., 2018a). Enrichment analysis on GO terms (Figure IV- 5A) revealed typical biological processes related to DNA damage (« double-strand break repair », « DNA repair, cellular response to DNA damage »), and oxidative stress (« stress-activated MAPK cascade »). Enrichment analysis on KEGG pathways (Figure IV- 6) showed IR-induced effects on « FoxO signaling pathway » and « ErbB signaling pathway », which are involved in oxidative stress and cancer development, respectively, and already known to be impacted by radiations (Dent et al., 2003; Luo et al., 2007).

Several genes involved in apoptosis via the P53 pathway (*tp53bp1*, *tp53bp2*, *deltaNp63*) (Elersek et al., 2022) were up-regulated (Figure IV- 5B). p53 genes, required for radiation-induced apoptosis in mouse (Lowe et al., 1993), are involved in cell cycle arrest but also in damage repair in zebrafish (Canedo and Rocha, 2021; Sandrini et al., 2009). However, several genes involved in DNA repair mechanisms, mainly in double strand break reparation (Canedo and Rocha, 2021; Reinardy et al., 2013b; Sandrini et al., 2009) were also down regulated (Figure IV- 5B, *gadd45ab*, *rad51*, *xrcc6*, *xrcc5*, *ddb2*, *creb1a*, *creb1b*, *polb*). In addition, genes involved in the fight against oxidative stress (Figure IV- 5B, *gpx1a*, *gpx1b*, *gsta.1*, *sod1*, *sod2*) were down regulated, suggesting an alteration of the antioxidant response and ROS imbalance. The altered oxidative balance in genitors did not seem to disturb the reproductive performances of adults but could contribute to adverse effects on oocyte DNA, as explain before, or on offspring development, as proposed by Huang et al., 2020. Thus, a direct effect of ROS or an induced effect on the integrity of the maternal DNA in oocytes could occur, thereby producing a future non-viable offspring. However, fertilization and first stages of embryo development (gastrulation) seemed to occur normally.

IV.2.4.1.2 IR did not impact cortisol and VTG

Maternal cortisol is necessary for proper embryo development (Colson et al., 2015; Faught and Vijayan, 2018). Altered maternal concentration of cortisol may yield cardiac oedema as described by Nesan and Vijayan, 2012. In our study, even if cardiac oedema were observed in offspring at 72 hpf for resilience-6d (Figure IV- 3), no effect was observed in ovarian cortisol level (Figure IV- 4A). However, maternal glucocorticoid receptor transcripts (*nr3c1 or gr*), that participate in the maternal programming of embryo development (Pikulkaew et al., 2011), were down regulated in female gonads (Figure IV- 4B). Furthermore, other transcripts involved in cortisol biosynthetic process were also differentially regulated (Figure IV- 4B, *cyp11a1*, *cyp11a2*, *apoa1a*, *apoeb*, *npc2*, *fdx1*, *fdx1b*) (Facchinello et al., 2017; Nesan and

Vijayan, 2012). Thus, even if these molecular effects were not associated with changes at the metabolite level, an effect of cortisol could not be totally discarded.

Moreover, yolk reserve oedemas (Figure IV- 3) were observed in offspring at 72 hpf for irradiated, recovery and resilience-6d, suggesting a nutrient reserve disruption (observed for many pollutants in fish). The gene encoding for the enzyme responsible for VTG cleavage, cathepsin D (*ctsd*), was down regulated, suggesting less VTG conversion into storage forms that are required for early development (Yilmaz et al., 2018). However, the total quantity of vitellogenin products that can bind to the antibody was not impacted by irradiation, and yolk reserve areas were higher after irradiation suggesting rather a non-consumption of reserves in larvae from irradiated parents. Since maternally-provided *ctsd* transcripts allows proper treatment and consumption of yolk proteins by embryos (Follo et al., 2011), down-regulation of this gene could explain the non-consumption. Cortisol and VTG were non-impacted by IRs and cannot explain mortality and malformation. Molecular alteration on cortisol biosynthesis and VTG degradation encourage us to further investigations.

Another hypothesis to identify mechanisms of transmitted effects was that altered maternal transcriptome, after irradiation exposure, could have early and delayed consequences on embryo development.

IV.2.4.2 IR altered oocyte development

Enrichment analysis showed GO terms and KEGG pathways linked to reproduction and oogenesis, including « oocyte meiosis » and «oocyte development » (Figure IV- 5A, Figure IV- 6). Embryo development success is dependent on mRNA, molecules, germplasm and organelles (golgi and mitochondria) aggregated in the Balbiani body (Bb) during maternal oogenesis (Jamieson-Lucy and Mullins, 2019; Marlow, 2010). Three maternal genes are involved in Bb development (Marlow, 2010). Among them, *bucky ball* (*buc*), that is necessary to establish the polarity of the egg (animal-vegetal axis), was down regulated after irradiation (Figure IV- 5B) (Marlow, 2010). Maternal *buc* deficiency is known to induce polyspermy with normal cell division after fertilization and ultimately embryo death (Jamieson-Lucy and Mullins, 2019). This could explain death at around 72 hpf here and at around 24 hpf in the study of Guirandy et al., 2019. Microtubule actin crosslinking factor 1 (*macf1*) is critical for Bb disassembly ensuring the dispersion of mRNA along the animal-vegetal axis (Jamieson-Lucy and Mullins, 2019). In our study, *macf1a* was up-regulated (Figure IV- 5B), potentially leading to disturbed mRNA distribution and finally to embryo death.

Oogenesis also allows the accumulation of maternal ribosomal proteins (RP) in order to support early embryo development until zygotic genome activation (ZGA) (Mercer et al., 2021). Precise control of ribosome biogenesis is vital for cell survival (Danilova et al., 2008) and therefore for preventing abnormalities during zebrafish embryonic

development. For example, a deficiency in *rpl11* induces an increase in yolk reserve size in mutants, reflecting a slow metabolism, and a decrease in larvae size (Palasin et al., 2019). These two phenotypes were also observed in this study and by Guirandy et al., 2019. Enrichment analysis (Figure IV- 5A, Figure IV- 6) highlighted different processes linked to ribosome synthesis (« ribonucleoprotein complex biogenesis », « ribosome biogenesis », « Ribosome biogenesis in eukaryotes »). Several RP transcripts that were down-regulated (Figure IV- 5B, *rpl10a, rpl11*, *rpl23*) are known to activate the p53 pathway (Chakraborty et al., 2009; Palasin et al., 2019). Down-regulation of *rps19*, *rps8a, rps8b, rps11* and *rps18* were associated with an up-regulation of deltaNp63, as previously observed (Danilova et al., 2008). RP deficiency via its impact on cell division and on the p53 pathway, could represent a further explanation for the observed early effects on offspring after maternal gamma irradiation.

It is clear that irradiation altered proper oocyte development. Thus, it could produce defective offspring. Next, we wondered if altered maternal mRNAs could induce later, i.e; after spawning and fertilization, effects in addition to direct impacts on oocytes.

IV.2.4.3 IR altered maternal mRNAs needed for offspring development

IV.2.4.3.1 Embryo axis establishment

Other maternal mRNAs needed for embryo development were also impacted by irradiation. Among them, many are accumulated in Bb and are involved in embryo axis establishment (Marlow, 2010). Enrichment analysis revealed GO terms and KEGG pathways involved in embryo development (Figure IV- 5A, Figure IV- 6), in particular with genes that were up-regulated. Several biological processes concerning the morphogenesis were impacted (“cell projection morphogenesis”, “embryonic organ morphogenesis”, “dorsal/ventral pattern formation”,”Wnt signaling pathway”). Since oocyte polarity and maternal mRNAs were impacted, it appears not aberrant that maternal mRNAs governing embryo axis establishment were also disturbed.

Maternal β-catenin and *grip2a* are the first indication of dorso-ventral polarity (Langdon and Mullins, 2011). β-catenin genes (*ctnnb1* and *ctnnb2*) were down-regulated and up-regulated, respectively (Figure IV- 5B). *ctnnb1* is known to act upstream at the molecular level and *ctnnb2* then acts on the physical establishment of the axis. Opposite regulations for these two key stages could alter proper embryo development (Zhang et al., 2012). For example, up-regulation of β-catenin leads to hyper-dorsalization (Kelly et al., 1995; Nojima et al., 2004; Sumoy et al., 1999). *grip2a* that acts upstream or in parallel to maternal β-catenin was down-regulated (Figure IV- 5B). In the same way, *syntabulin* (*sybu*) was down regulated (Figure IV- 5B) and loss of maternal *sybu* was found to induce ventralization and failure to activate the Wnt

signalling pathway, which is required to initiate dorsal cell fate specification (Langdon and Mullins, 2011).

In contrast, the Bone Morphogenetic Protein signalling pathway, involved in ventral axis specification, was not impacted. However, an initiator gene of this pathway, *pou5f3* (Abrams and Mullins, 2009; Flores et al., 2008; “Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition,” n.d.) was down-regulated (Figure IV- 5B). Moreover, several ventral genes were also dysregulated (Figure IV- 5B, *runx2b*, smad1, *smad2*, *smad4a*, *smad5*, *smad6a*) (Pelegri, 2003). As for dorsal axis specification, genes involved in ventral axis specification seemed to be highly dysregulated that could lead to the observed malformations and non-viable embryos.

Finally, the left/right axis, needed to organ asymmetry such as brain and heart, is mainly governed by the nodal signalling pathway (Bisgrove et al., 2017; Miccoli et al., 2017), which was not impacted. However, a key gene of this pathway, *ndr1* was down-regulated (Figure IV- 5B). This was not surprising since its positive co-factor, *gdf3* (Bisgrove et al., 2017), was also down-regulated. *Gdf3* mutation leads to embryo death. Gamma irradiation thus impacted maternal transcripts necessary to asymmetry development and could explain observed mortality.

IV.2.4.3.2 Maternal mRNA degradation

Failure of maternal mRNA degradation concomitantly to zygotic genome activation (ZGA) can lead to miscoordinated gene expression (Chang et al., 2018; Walser and Lipshitz, 2011). The best-known degradation mechanism is deadenylation. The majority of maternal transcripts are therefore deadenylated and degraded between 4 and 6 hpf (Chang et al., 2018; Walser and Lipshitz, 2011) at the same time as ZGA. Interestingly, enrichment analysis showed an impact on the biological process "positive regulation of nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay" (Figure IV- 5), which could reflect a deregulation of maternal mRNA catabolic process after irradiation. We also detected the deregulation of many factors involved in the maturation of miRNA (*drosha, dicer1, ago2, ago3b, ago4*) as mentioned after parental irradiation in Martín et al., 2021. As MiR-430 facilitates the deadenylation of maternal mRNAs (Giraldez et al., 2006; Laue et al., 2019; Liu et al., 2020; Yao et al., 2014), it is possible that deregulation of miRNA production contribute to the increased in embryonic mortality . Another degradation way during maternal to zygotic transition stage is uridylation, done by *tut7* which was down regulated (Figure IV- 5B) (Chang et al., 2018). Furthermore, *igf2bp3,* a gene encoding for a protein involved in maternal mRNA stability (Ren et al., 2020), was up-regulated (Figure IV- 5B). whereas *ythdf2*, involved in maternal transcript degradation, was down-regulated (Figure IV- 5B) (Ren et al., 2020). These results suggest a disturbed mRNA degradation process in female gonads. Maternal mRNA could thus be rapidly degraded and could not support early

development or could alter the temporal pattern of gene expression during early development.

IV.2.5 Conclusions

This paper highlighted transmitted effect from genitors to offspring after 10 days of gamma irradiation at 50 $mGy.h^{-1}$. No phenotypic effect was observed in genitors, notably on reproductive performances (reproductive success and fecundity). Early mortality in offspring in link to parental transmitted effects was observed as no difference was observed between irradiated and recovery conditions. Moreover, early malformations were observed in offspring after parental irradiation. The main objective was to get mechanistic insights into the impacts of irradiation at the cellular and molecular levels in order to identify mechanisms behind phenotypic effects on offspring.

Cortisol level in F0 female gonads after reproduction was not impacted by irradiation. However, it should be necessary to measure cortisol in embryos to refute its involvement in F1 mortality. Despite a down-regulation of cathepsin D in maternal gonads, VTG analysis in embryos did not highlight any different amount nor distribution of maturation products which suggests no nutrition defect for embryos. This non-effect should be however confirmed by measuring the whole VTG protein. Oogenesis and maternal factors (mRNA) required for production of viable offspring and their development were significantly altered, supporting maternal transmission of IR-induced effects.

This first approach to link phenotype to molecular events highlighted an important effect of female irradiation on offspring viability with (i) an impact of irradiation on oocyte development and (ii) an impact on maternal mRNAs needed later for embryonic development. However, paternal contribution should not be excluded and should be investigated in future studies, since they were also exposed. Further experiments would be to perform a cross-exposure (only female exposed) to assess maternal role. Finally, offspring transcriptomic analysis before and after the maternal-to-zygotic transition should be interesting to define more precisely the role of maternal mRNAs. Our data could be used to improve the Adverse Outcome Pathways and challenge the risk assessment method currently deployed.

IV.2.6 References

Abrams, E.W., Mullins, M.C., 2009. Early zebrafish development: It's in the maternal genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 19, 396–403. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.002

Beresford, N.A., Horemans, N., Copplestone, D., Raines, K.E., Orizaola, G., Wood, M.D., Laanen, P., Whitehead, H.C., Burrows, J.E., Tinsley, M.C., Smith, J.T., Bonzom, J.-M., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Gashchak, S., Jha, A.N., de Menezes, A., Willey, N., Spurgeon, D., 2020. Towards solving a scientific controversy – The effects of ionising radiation on the environment. J. Environ. Radioact. 211, 106033. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106033

Bisgrove, B., Su, Y.-C., Yost, H., 2017. Maternal Gdf3 is an obligatory cofactor in Nodal signaling for embryonic axis formation in zebrafish. eLife. https://doi.org/10.7554/eLife.28534

Canedo, A., Rocha, T.L., 2021. Zebrafish (Danio rerio) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. Sci. Total Environ. 762, 144084. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084

Car, C., Gilles, A., Armant, O., Burraco, P., Beaugelin-Seiller, K., Gashchak, S., Camilleri, V., Cavalié, I., Laloi, P., Adam-Guillermin, C., Orizaola, G., Bonzom, J.-M., 2022. Unusual evolution of tree frog populations in the Chernobyl exclusion zone. Evol. Appl. 15, 203–219. https://doi.org/10.1111/eva.13282

Chakraborty, A., Uechi, T., Higa, S., Torihara, H., Kenmochi, N., 2009. Loss of Ribosomal Protein L11 Affects Zebrafish Embryonic Development through a p53-Dependent Apoptotic Response. PLOS ONE 4, e4152. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004152

Chang, H., Yeo, J., Kim, J.-G., Kim, H., Lim, J., Lee, M., Kim, H.H., Ohk, J., Jeon, H.-Y., Lee, H., Jung, H., Kim, K.-W., Kim, V.N., 2018. Terminal Uridylyltransferases Execute Programmed Clearance of Maternal Transcriptome in Vertebrate Embryos. Mol. Cell 70, 72-82.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.004

Chen, M.-F., Huang, C.-Z., Pu, D.-Y., Zheng, C.-Y., Yuan, K.-M., Jin, X.-X., Zhang, Y.-G., Jin, L., 2015. Toxic effects of CdSe/ZnS QDs to zebrafish embryos. Huanjing KexueEnvironmental Sci. 36, 719–726. https://doi.org/10.13227/j.hjkx.2015.02.046

Colson, V., Valotaire, C., Geffroy, B., Kiilerich, P., 2015. Egg Cortisol Exposure Enhances Fearfulness in Larvae and Juvenile Rainbow Trout. Ethology 121, 1191–1201. https://doi.org/10.1111/eth.12437

Cunningham, K., Hinton, T.G., Luxton, J.J., Bordman, A., Okuda, K., Taylor, L.E., Hayes, J., Gerke, H.C., Chinn, S.M., Anderson, D., Laudenslager, M.L., Takase, T., Nemoto, Y., Ishiniwa, H., Beasley, J.C., Bailey, S.M., 2021. Evaluation of DNA damage and stress in wildlife chronically exposed to low-dose, low-dose rate radiation from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. Environ. Int. 155, 106675. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106675

Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S., 2008. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. Blood 112, 5228–5237. https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132290

Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M.P., Grant, S., Schmidt-Ullrich, R., 2003. Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellular Signaling Pathways1. Radiat. Res. 159, 283–300. https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0283:SARIAO]2.0.CO;2

Eaton, S.L., Roche, S.L., Hurtado, M.L., Oldknow, K.J., Farquharson, C., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., 2013. Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. PLOS ONE 8, e72457. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072457

Facchinello, N., Skobo, T., Meneghetti, G., Colletti, E., Dinarello, A., Tiso, N., Costa, R., Gioacchini, G., Carnevali, O., Argenton, F., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2017. Nr3c1 null mutant zebrafish are viable and reveal DNA-binding-independent activities of the glucocorticoid receptor. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04535-6

Faught, E., Vijayan, M., 2018. Maternal stress and fish reproduction: The role of cortisol revisited. Fish Fish. https://doi.org/10.1111/FAF.12309

Finn, R.N., 2007. Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins1. Biol. Reprod. 76, 926–935. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059766

Flores, M.V.C., Lam, E.Y.N., Crosier, K.E., Crosier, P.S., 2008. Osteogenic transcription factor Runx2 is a maternal determinant of dorsoventral patterning in zebrafish. Nat. Cell Biol. 10, 346–352. https://doi.org/10.1038/ncb1697

Follo, C., Ozzano, M., Mugoni, V., Castino, R., Santoro, M., Isidoro, C., 2011. Knock-Down of Cathepsin D Affects the Retinal Pigment Epithelium, Impairs Swim-Bladder Ontogenesis and Causes Premature Death in Zebrafish. PLOS ONE 6, e21908. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021908

Geras'kin, S.A., Fesenko, S.V., Volkova, P.Yu., Isamov, N.N., 2021. What Have We Learned about the Biological Effects of Radiation from the 35 Years of Analysis of the Consequences of the Chernobyl NPP Accident? Biol. Bull. 48, 2105–2126. https://doi.org/10.1134/S1062359021120050

Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., Schier, A.F., 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. Science 312, 75–79. https://doi.org/10.1126/science.1122689

Guirandy, N., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Pierron, F., Gonzalez, P., Simon, O., 2022. Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish. Aquat. Toxicol. 244, 106101. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106101

Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Houdigui, S.M.E., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environ. Toxicol. Chem. 38, 2556–2567. https://doi.org/10.1002/etc.4562

Huang, W., Zheng, S., Wang, X., Cai, Z., Xiao, J., Liu, C., Wu, K., 2020. A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 205. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111165

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.-K., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ. Res. 159, 564–578. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.053

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Mayer, I., Lobert, V.H., Mutoloki, S., Gutzkow, K.B., Teien, H.-C., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2018. Gamma irradiation during gametogenesis in young adult zebrafish causes persistent genotoxicity and adverse reproductive effects. Ecotoxicol. Environ. Saf. 154, 19–26. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.031

Jamieson-Lucy, A., Mullins, M.C., 2019. Chapter One - The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity, in: Lehmann, R. (Ed.), Current Topics in Developmental Biology, The Immortal Germline. Academic Press, pp. 1–34. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.003

Kelly, G.M., Erezyilmaz, D.F., Moon, R.T., 1995. Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of β-catenin. Mech. Dev. 53, 261–273. https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00442-4

Langdon, Y.G., Mullins, M.C., 2011. Maternal and zygotic control of zebrafish dorsoventral axial patterning. Annu. Rev. Genet. 45, 357–377. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132517

Laue, K., Rajshekar, S., Courtney, A.J., Lewis, Z.A., Goll, M.G., 2019. The maternal to zygotic transition regulates genome-wide heterochromatin establishment in the zebrafish embryo. Nat. Commun. 10, 1551. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09582-3

Liu, Y., Zhu, Z., Ho, I.H.T., Shi, Y., Li, J., Wang, X., Chan, M.T.V., Cheng, C.H.K., 2020. Genetic Deletion of miR-430 Disrupts Maternal-Zygotic Transition and Embryonic Body Plan. Front. Genet. 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00853

Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., Jasper, H., 2007. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. EMBO J. 26, 380–390. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601484

Marlow, F.L., 2010. Oocyte Polarity and the Embryonic Axes: The Balbiani Body, an Ancient Oocyte Asymmetry, Maternal Control of Development in Vertebrates: My Mother Made Me Do It! Morgan & Claypool Life Sciences.

Martín, L., Kamstra, J.H., Hurem, S., Lindeman, L.C., Brede, D.A., Aanes, H., Babiak, I., Arenal, A., Oughton, D., Salbu, B., Lyche, J.L., Aleström, P., 2021. Altered non-coding RNA expression profile in F1 progeny 1 year after parental irradiation is linked to adverse effects in zebrafish. Sci. Rep. 11, 4142. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83345-3

Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition [WWW Document], n.d. URL https://www.elsevier.com/books/maternal-effect-genes-in-development/marlow/978-0-12-815220-1 (accessed 2.9.22).

McCormick, M.I., 1999. Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. Oecologia 118, 412–422. https://doi.org/10.1007/s004420050743

Mercer, M., Jang, S., Ni, C., Buszczak, M., 2021. The Dynamic Regulation of mRNA Translation and Ribosome Biogenesis During Germ Cell Development and Reproductive Aging. Front. Cell Dev. Biol. 9. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710186

Miccoli, A., Dalla Valle, L., Carnevali, O., 2017. The maternal control in the embryonic development of zebrafish. Gen. Comp. Endocrinol. 245, 55–68. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.028

Moritz, C.P., 2017. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. PROTEOMICS 17, 1600189. https://doi.org/10.1002/pmic.201600189

Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Loro, G., Arcanjo, C., Frelon, S., Floriani, M., Dubourg, N., Baudelet, E., Audebert, S., Camoin, L., Armant, O., 2019. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. Sci. Rep. 9, 20241. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2016. Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish. Sci. Rep. 6, 22582. https://doi.org/10.1038/srep22582

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2012. Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. Mol. Cell. Endocrinol. 363, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.07.010

Nojima, H., Shimizu, T., Kim, C.-H., Yabe, T., Bae, Y.-K., Muraoka, O., Hirata, T., Chitnis, A., Hirano, T., Hibi, M., 2004. Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish. Mech. Dev. 121, 371–386. https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.02.003

Palasin, K., Uechi, T., Yoshihama, M., Srisowanna, N., Choijookhuu, N., Hishikawa, Y., Kenmochi, N., Chotigeat, W., 2019. Abnormal development of zebrafish after knockout and knockdown of ribosomal protein L10a. Sci. Rep. 9, 18130. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54544-w

Pelegri, F., 2003. Maternal factors in zebrafish development. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 228, 535–554. https://doi.org/10.1002/dvdy.10390

Pikulkaew, S., Benato, F., Celeghin, A., Zucal, C., Skobo, T., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2011. The knockdown of maternal glucocorticoid receptor mRNA alters embryo development in zebrafish. Dev. Dyn. 240, 874–889. https://doi.org/10.1002/dvdy.22586

R Core Team, R.C.T., 2021. R: A language and environment for statistical ## computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW Document]. URL URL https://www.R-project.org/

Reinardy, H.C., Syrett, J.R., Jeffree, R.A., Henry, T.B., Jha, A.N., 2013. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (Danio rerio), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. Aquat. Toxicol. 126, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.007

Ren, F., Lin, Q., Gong, G., Du, X., Dan, H., Qin, W., Miao, R., Xiong, Y., Xiao, R., Li, X., Gui, J.-F., Mei, J., 2020. Igf2bp3 maintains maternal RNA stability and ensures early embryo development in zebrafish. Commun. Biol. 3, 94. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0827-2

Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., Marks, P.A., 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 10014–10019. https://doi.org/10.1073/pnas.180316197

Sadoul, B., Geffroy, B., 2019. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. J. Fish Biol. 94, 540–555. https://doi.org/10.1111/jfb.13904

Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F., 2009. Time-course Expression of DNA Repair-related Genes in Hepatocytes of Zebrafish (Danio rerio) After UV-B Exposure. Photochem. Photobiol. 85, 220–226. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00422.x

Soares, J., Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., Monteiro, N.M., Vieira, M.N., Oliveira, J.M.A., Guedes-Dias, P., Fontaínhas-Fernandes, A., Parra, S.S., Carvalho, A.P., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2009. Disruption of zebrafish (Danio rerio) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. Aquat. Toxicol. 95, 330–338. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.021

Sumoy, L., Kiefer, J., Kimelman, D., 1999. Conservation of intracellular Wnt signaling components in dorsal-ventral axis formation in zebrafish. Dev. Genes Evol. 209, 48–58. https://doi.org/10.1007/s004270050226

Vuori, K.A., Kanerva, M., Ikonen, E., Nikinmaa, M., 2008. Oxidative stress during baltic salmon feeding migration may be associated with yolk-sac fry mortality. Environ. Sci. Technol. 42, 2668–2673. https://doi.org/10.1021/es702632c

Walser, C.B., Lipshitz, H.D., 2011. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. Curr. Opin. Genet. Dev., Differentiation and gene regulation 21, 431–443. https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.03.003

Yao, Y., Ma, L., Jia, Q., Deng, W., Liu, Z., Zhang, Y., Ren, J., Xue, Y., Jia, H., Yang, Q., 2014. Systematic characterization of small RNAome during zebrafish early developmental stages. BMC Genomics 15, 117. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-117

Yilmaz, O., Patinote, A., Nguyen, T., Bobe, J., 2018. Multiple vitellogenins in zebrafish (Danio rerio): quantitative inventory of genes, transcripts and proteins, and relation to egg quality. Fish Physiol. Biochem. 44, 1509–1525. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0524-y

Zhang, M., Zhang, J., Lin, S.-C., Meng, A., 2012. β-Catenin 1 and β-catenin 2 play similar and distinct roles in left-right asymmetric development of zebrafish embryos. Development 139, 2009–2019. https://doi.org/10.1242/dev.074435

IV.2.7 Appendix A. Supplementary material

SD Tableau IV- 1 describes the overall Read statistics and yield obtained for each sample. The phred score (Q) indicates the quality of the bases. For Q=30, the probability of incorrect base call is P=0.001.

Name	Total	%>Q30	Name	Total	%>Q30
Sample L019 17.R1 val 1.fq.gz	26560260	99.99	Sample L019 17.R2 val 2.fq.gz	26560260	99.99
Sample L019 18.R1 val 1.fq.gz	15405855	99.99	Sample L019 18.R2 val 2.fq.gz	15405855	99.99
Sample L019 19.R1 val 1.fq.gz	19272474	99.99	Sample L019 19.R2 val 2.fq.gz	19272474	99.99
Sample L019 20.R1 val 1.fq.gz	13960688	100	Sample L019 20.R2 val 2.fq.gz	13960688	100
Sample L019 21.R1 val 1.fq.gz	18932451	99.97	Sample L019 21.R2 val 2.fq.gz	18932451	99.97
Sample L019 22.R1 val 1.fq.gz	14941226	100	Sample L019 22.R2 val 2.fq.gz	14941226	100
Sample L019 23.R1 val 1.fq.gz	18257442	99.98	Sample L019 23.R2 val 2.fq.gz	18257442	99.98
Sample L019 24.R1 val 1.fq.gz	14760177	99.98	Sample L019 24.R2 val 2.fq.gz	14760177	99.98
Sample L019 25.R1 val 1.fq.gz	18468181	99.99	Sample L019 25.R2 val 2.fq.gz	18468181	99.99
Sample L019 26.R1 val 1.fq.gz	10444906	99.98	Sample L019 26.R2 val 2.fq.gz	10444906	99.98
Sample L019 27.R1 val 1.fq.gz	18545142	99.99	Sample L019 27.R2 val 2.fq.gz	18545142	99.99

Sample 1.fq.gz	L019	28.R1	val	31109544	99.99	Sample 2.fq.gz	L019	28.R2	val	31109544	99.99
Sample 1.fq.gz	L019	29.R1	val	23225805	99.99	Sample 2.fq.gz	L019	29.R2	val	23225805	99.99
Sample 1.fq.gz	L019	30.R1	val	14281877	99.99	Sample 2.fq.gz	L019	30.R2	val	14281877	99.99
Sample 1.fq.gz	L019	31.R1	val	16597174	99.99	Sample 2.fq.gz	L019	31.R2	val	16597174	99.99
Sample 1.fq.gz	L019	32.R1	val	14008458	99.99	Sample 2.fq.gz	L019	32.R2	val	14008458	99.99

SD Tableau IV- 2 : Gene ontology terms (GO terms) enrichment using the zebrafish differential expressed genes (DEG) obtained from DESeq2

ID	Description	p.adjust
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	1.74E-22
GO:0034660	ncRNA metabolic process	5.94E-21
GO:0034470	ncRNA processing	3.22E-15
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	4.99E-15
GO:0042254	ribosome biogenesis	6.80E-15
GO:0043632	modification-dependent macromolecule catabolic process	2.87E-14
GO:0019941	modification-dependent protein catabolic process	1.85E-13
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.81E-13
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	3.14E-13
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	4.18E-12
GO:0016072	rRNA metabolic process	7.35E-12
GO:0006325	chromatin organization	1.28E-11
GO:0006281	DNA repair	7.25E-11
GO:0008380	RNA splicing	8.34E-11
GO:0033365	protein localization to organelle	5.03E-10
GO:0006364	rRNA processing	1.44E-09
GO:0006397	mRNA processing	6.91E-09
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	6.91E-09
GO:0051169	nuclear transport	6.91E-09
GO:0007005	mitochondrion organization	1.02E-08
GO:0007059	chromosome segregation	2.74E-08
GO:0034248	regulation of cellular amide metabolic process	4.90E-08
GO:0006417	regulation of translation	5.58E-08
GO:0032259	methylation	1.76E-07
GO:0072594	establishment of protein localization to organelle	1.84E-07
GO:0010498	proteasomal protein catabolic process	2.07E-07
GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	2.07E-07
GO:0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	2.07E-07
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	2.07E-07
GO:0006401	RNA catabolic process	3.56E-07
GO:0010564	regulation of cell cycle process	3.91E-07
GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis	4.11E-07

GO:0098813	nuclear chromosome segregation	8.67E-07
GO:0006403	RNA localization	9.09E-07
GO:0016569	covalent chromatin modification	1.14E-06
GO:0000819	sister chromatid segregation	1.30E-06
GO:1903047	mitotic cell cycle process	1.30E-06
GO:0006402	mRNA catabolic process	1.30E-06
GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	1.77E-06
GO:0016570	histone modification	2.16E-06
GO:0048285	organelle fission	3.26E-06
GO:0043631	RNA polyadenylation	4.16E-06
GO:0031123	RNA 3'-end processing	5.66E-06
GO:0051170	import into nucleus	5.66E-06
GO:0034504	protein localization to nucleus	5.66E-06
GO:0017038	protein import	6.53E-06
GO:0051983	regulation of chromosome segregation	8.59E-06
GO:0006399	tRNA metabolic process	9.16E-06
GO:0051236	establishment of RNA localization	9.35E-06
GO:0034249	negative regulation of cellular amide metabolic process	9.45E-06
GO:0017148	negative regulation of translation	9.68E-06
GO:0006606	protein import into nucleus	9.68E-06
GO:0043414	macromolecule methylation	1.07E-05
GO:0050657	nucleic acid transport	1.57E-05
GO:0050658	RNA transport	1.57E-05
GO:0000280	nuclear division	1.71E-05
GO:0006413	translational initiation	2.22E-05
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	2.93E-05
GO:0006354	DNA-templated transcription, elongation	3.28E-05
GO:0042255	ribosome assembly	3.28E-05
GO:0010948	negative regulation of cell cycle process	4.71E-05
GO:0031124	mRNA 3'-end processing	4.73E-05
GO:0006378	mRNA polyadenylation	5.19E-05
GO:0033044	regulation of chromosome organization	5.70E-05
GO:0045333	cellular respiration	6.83E-05
GO:0000075	cell cycle checkpoint	6.91E-05
GO:0051321	meiotic cell cycle	7.28E-05
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	7.28E-05
GO:0044770	cell cycle phase transition	8.86E-05
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	8.86E-05
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	8.95E-05
GO:0033045	regulation of sister chromatid segregation	9.60E-05
GO:0007292	female gamete generation	9.70E-05
GO:0002181	cytoplasmic translation	9.87E-05
GO:0030490	maturation of SSU-rRNA	0.00010084
GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	0.000116748
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	0.000116748

GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	0.000120298
GO:0006119	oxidative phosphorylation	0.000129825
GO:0033047	regulation of mitotic sister chromatid segregation	0.000142683
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.000144875
GO:0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	0.000146196
GO:0016579	protein deubiquitination	0.000193737
GO:1903046	meiotic cell cycle process	0.000193992
GO:0006302	double-strand break repair	0.000272254
GO:0006482	protein demethylation	0.000299895
GO:0008214	protein dealkylation	0.000299895
GO:0048477	oogenesis	0.000312236
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metabolic process	0.000319242
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.000319242
GO:0032786	positive regulation of DNA-templated transcription, elongation	0.000321032
GO:0032446	protein modification by small protein conjugation	0.000322552
GO:1901991	negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	0.000329955
GO:0016073	snRNA metabolic process	0.000329955
GO:0022904	respiratory electron transport chain	0.000353696
GO:0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	0.000366567
GO:0009451	RNA modification	0.000411496
GO:0140014	mitotic nuclear division	0.000411496
GO:0015931	nucleobase-containing compound transport	0.000411496
GO:0022900	electron transport chain	0.000472084
GO:1901988	negative regulation of cell cycle phase transition	0.000510391
GO:1903311	regulation of mRNA metabolic process	0.000510391
GO:0006405	RNA export from nucleus	0.000582904
GO:0006368	transcription elongation from RNA polymerase II promoter	0.000587206
GO:1903313	positive regulation of mRNA metabolic process	0.000589029
GO:0051726	regulation of cell cycle	0.000599795
GO:0022414	reproductive process	0.000620531
GO:0070646	protein modification by small protein removal	0.000630794
GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic process	0.000646573
GO:0045930	negative regulation of mitotic cell cycle	0.00068982
GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic process	0.000697288
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	0.000697288
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	0.000697288
GO:0007088	regulation of mitotic nuclear division	0.000697288
GO:0000003	reproduction	0.000697288
GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport	0.000737831
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination	0.000773659
GO:0000725	recombinational repair	0.000773659
GO:0008033	tRNA processing	0.000826577
GO:1901990	regulation of mitotic cell cycle phase transition	0.000841697
GO:0032543	mitochondrial translation	0.000948275
GO:0034968	histone lysine methylation	0.000948275
GO:1901987	regulation of cell cycle phase transition	0.000948275

GO:0006310	DNA recombination	0.000950144
GO:0032784	regulation of DNA-templated transcription, elongation	0.000976265
GO:0046034	ATP metabolic process	0.00129924
GO:0018022	peptidyl-lysine methylation	0.001313646
GO:0016571	histone methylation	0.001321798
GO:0051783	regulation of nuclear division	0.001321798
GO:0042775	mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	0.001369875
GO:0000470	maturation of LSU-rRNA	0.001585121
GO:0051168	nuclear export	0.001671184
GO:0000028	ribosomal small subunit assembly	0.001678851
GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	0.001678851
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	0.001694735
GO:0010965	regulation of mitotic sister chromatid separation	0.001735324
GO:0006338	chromatin remodeling	0.001735324
GO:0048193	Golgi vesicle transport	0.001743939
GO:0000462	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	0.001743939
GO:0006479	protein methylation	0.001743939
GO:0008213	protein alkylation	0.001743939
GO:0098781	ncRNA transcription	0.002527478
GO:0031098	stress-activated protein kinase signaling cascade	0.002611455
GO:0007093	mitotic cell cycle checkpoint	0.002878059
GO:0044839	cell cycle G2/M phase transition	0.002880347
GO:0010389	regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	0.00323436
GO:0061014	positive regulation of mRNA catabolic process	0.00323436
GO:0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle	0.003253207
GO:1902749	regulation of cell cycle G2/M phase transition	0.003253207
GO:1905818	regulation of chromosome separation	0.003253207
GO:0007091	metaphase/anaphase transition of mitotic cell cycle	0.003253207
GO:0051298	centrosome duplication	0.003253207
GO:0051306	mitotic sister chromatid separation	0.003253207
GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	0.003253207
GO:0016567	protein ubiquitination	0.003316459
GO:0006260	DNA replication	0.003499428
GO:0006888	ER to Golgi vesicle-mediated transport	0.003533394
GO:0010923	negative regulation of phosphatase activity	0.003660532
GO:0006979	response to oxidative stress	0.00366681
GO:0007098	centrosome cycle	0.004158617
GO:0140053	mitochondrial gene expression	0.004158617
GO:0043087	regulation of GTPase activity	0.004190845
GO:0032968	positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	0.004210367
GO:0018205	peptidyl-lysine modification	0.004210367
GO:0090068	positive regulation of cell cycle process	0.004717515
GO:0051301	cell division	0.004779822
GO:0071166	ribonucleoprotein complex localization	0.004919916

GO:0071426	ribonucleoprotein complex export from nucleus	0.004919916
GO:0009060	aerobic respiration	0.005011865
GO:0031023	microtubule organizing center organization	0.005011865
GO:0030865	cortical cytoskeleton organization	0.00510339
GO:0006515	protein quality control for misfolded or incompletely synthesized proteins	0.005211663
GO:0030866	cortical actin cytoskeleton organization	0.005290321
GO:0006611	protein export from nucleus	0.005517166
GO:0044784	metaphase/anaphase transition of cell cycle	0.005607834
GO:0030071	regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	0.005705978
GO:0031503	protein-containing complex localization	0.005847675
GO:0022412	cellular process involved in reproduction in multicellular organism	0.006309869
GO:0061982	meiosis I cell cycle process	0.006408553
GO:0033108	mitochondrial respiratory chain complex assembly	0.006840059
GO:0061013	regulation of mRNA catabolic process	0.007096802
GO:0006457	protein folding	0.007099166
GO:0009070	serine family amino acid biosynthetic process	0.007099166
GO:0071108	protein K48-linked deubiquitination	0.007099166
GO:0043484	regulation of RNA splicing	0.008019653
GO:0046700	heterocycle catabolic process	0.008164729
GO:0140013	meiotic nuclear division	0.008164729
GO:0000288	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay	0.008164729
GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	0.008348916
GO:0035803	egg coat formation	0.008348916
GO:2000241	regulation of reproductive process	0.009637405
GO:0050684	regulation of mRNA processing	0.009670866
GO:0006605	protein targeting	0.009670866
GO:0006446	regulation of translational initiation	0.009752634
GO:1902099	regulation of metaphase/anaphase transition of cell cycle	0.009752634
GO:0033046	negative regulation of sister chromatid segregation	0.009752634
GO:0033048	negative regulation of mitotic sister chromatid segregation	0.009752634
GO:2000816	negative regulation of mitotic sister chromatid separation	0.009752634
GO:0016180	snRNA processing	0.009943675
GO:0034661	ncRNA catabolic process	0.010017508
GO:0046148	pigment biosynthetic process	0.010017508
GO:2000243	positive regulation of reproductive process	0.010075366
GO:0051052	regulation of DNA metabolic process	0.010364423
GO:0032504	multicellular organism reproduction	0.010364423
GO:0045454	cell redox homeostasis	0.010809282
GO:0080135	regulation of cellular response to stress	0.011010345
GO:0007276	gamete generation	0.011394436
GO:0045787	positive regulation of cell cycle	0.011434826
GO:0007062	sister chromatid cohesion	0.012369542
GO:0043628	ncRNA 3'-end processing	0.012369542
GO:0006400	tRNA modification	0.013287891

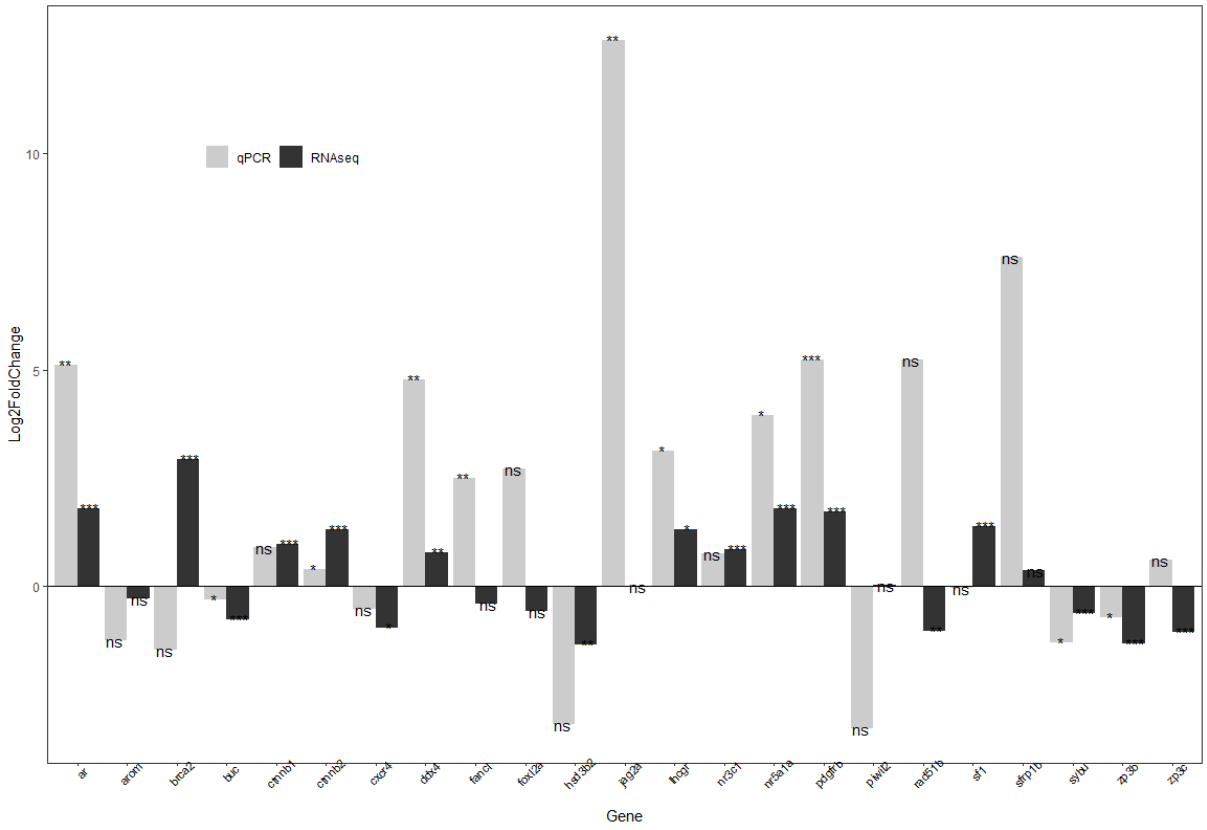
GO:0048609	multicellular organismal reproductive process	0.013859775
GO:0000463	maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	0.014493124
GO:0000209	protein polyubiquitination	0.014493124
GO:0070585	protein localization to mitochondrion	0.014805433
GO:0072655	establishment of protein localization to mitochondrion	0.014805433
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	0.015419644
GO:0051784	negative regulation of nuclear division	0.015892024
GO:0000291	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, exonucleolytic	0.016318674
GO:0016074	snoRNA metabolic process	0.016318674
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	0.016356413
GO:0060249	anatomical structure homeostasis	0.016408054
GO:0034243	regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	0.017497033
GO:0045839	negative regulation of mitotic nuclear division	0.017497033
GO:0051028	mRNA transport	0.017497033
GO:0007094	mitotic spindle assembly checkpoint	0.017497033
GO:0009988	cell-cell recognition	0.017497033
GO:0031577	spindle checkpoint	0.017497033
GO:0045841	negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	0.017497033
GO:0071173	spindle assembly checkpoint	0.017497033
GO:0071174	mitotic spindle checkpoint	0.017497033
GO:0006783	heme biosynthetic process	0.017497033
GO:0043588	skin development	0.017497033
GO:0051985	negative regulation of chromosome segregation	0.017497033
GO:1905819	negative regulation of chromosome separation	0.017497033
GO:0006626	protein targeting to mitochondrion	0.017980488
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	0.018799062
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	0.019042307
GO:0097190	apoptotic signaling pathway	0.019581537
GO:0001510	RNA methylation	0.01994622
GO:0051304	chromosome separation	0.01994622
GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	0.020279976
GO:0051248	negative regulation of protein metabolic process	0.020714859
GO:0000245	spliceosomal complex assembly	0.022598733
GO:0000723	telomere maintenance	0.022598733
GO:0032200	telomere organization	0.022598733
GO:0009303	rRNA transcription	0.023753316
GO:0071712	ER-associated misfolded protein catabolic process	0.023753316
GO:0019953	sexual reproduction	0.025323567
GO:0007281	germ cell development	0.026562534
GO:1903008	organelle disassembly	0.026612691
GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	0.027854138
GO:0043144	snoRNA processing	0.028370918
GO:0000027	ribosomal large subunit assembly	0.029064007
GO:0016226	iron-sulfur cluster assembly	0.030243239

GO:0031163	metallo-sulfur cluster assembly	0.030243239
GO:1903320	regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	0.030243239
GO:0060216	definitive hemopoiesis	0.030243239
GO:0010257	NADH dehydrogenase complex assembly	0.030243239
GO:0032981	mitochondrial respiratory chain complex I assembly	0.030243239
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	0.030243239
GO:0060046	regulation of acrosome reaction	0.030243239
GO:1903321	negative regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	0.030243239
GO:2000344	positive regulation of acrosome reaction	0.030243239
GO:1902100	negative regulation of metaphase/anaphase transition of cell cycle	0.030614319
GO:0000422	autophagy of mitochondrion	0.030614319
GO:0061726	mitochondrion disassembly	0.030614319
GO:0010921	regulation of phosphatase activity	0.031224024
GO:1905516	positive regulation of fertilization	0.031224024
GO:0007339	binding of sperm to zona pellucida	0.031308209
GO:0016075	rRNA catabolic process	0.031308209
GO:0035036	sperm-egg recognition	0.031308209
GO:0070972	protein localization to endoplasmic reticulum	0.032954616
GO:0044703	multi-organism reproductive process	0.033183775
GO:0032386	regulation of intracellular transport	0.035604455
GO:0045185	maintenance of protein location	0.035794556
GO:2001251	negative regulation of chromosome organization	0.035828389
GO:0032269	negative regulation of cellular protein metabolic process	0.036397832
GO:0002183	cytoplasmic translational initiation	0.038776531
GO:0006414	translational elongation	0.039126223
GO:0009894	regulation of catabolic process	0.039126223
GO:0000302	response to reactive oxygen species	0.041722804
GO:0032507	maintenance of protein location in cell	0.041722804
GO:0007224	smoothened signaling pathway	0.041842427
GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process	0.042773431
GO:0045132	meiotic chromosome segregation	0.042919748
GO:0031570	DNA integrity checkpoint	0.043594094
GO:0034250	positive regulation of cellular amide metabolic process	0.044091435
GO:0045727	positive regulation of translation	0.044091435
GO:0000387	spliceosomal snRNP assembly	0.044094824
GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	0.044094824
GO:0048872	homeostasis of number of cells	0.044094824
GO:1990542	mitochondrial transmembrane transport	0.04543716
GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	0.04543716
GO:0019439	aromatic compound catabolic process	0.04543716
GO:0000460	maturation of 5.8S rRNA	0.046411719
GO:0006779	porphyrin-containing compound biosynthetic process	0.046411719
GO:0006891	intra-Golgi vesicle-mediated transport	0.046411719
GO:0048599	oocyte development	0.046411719

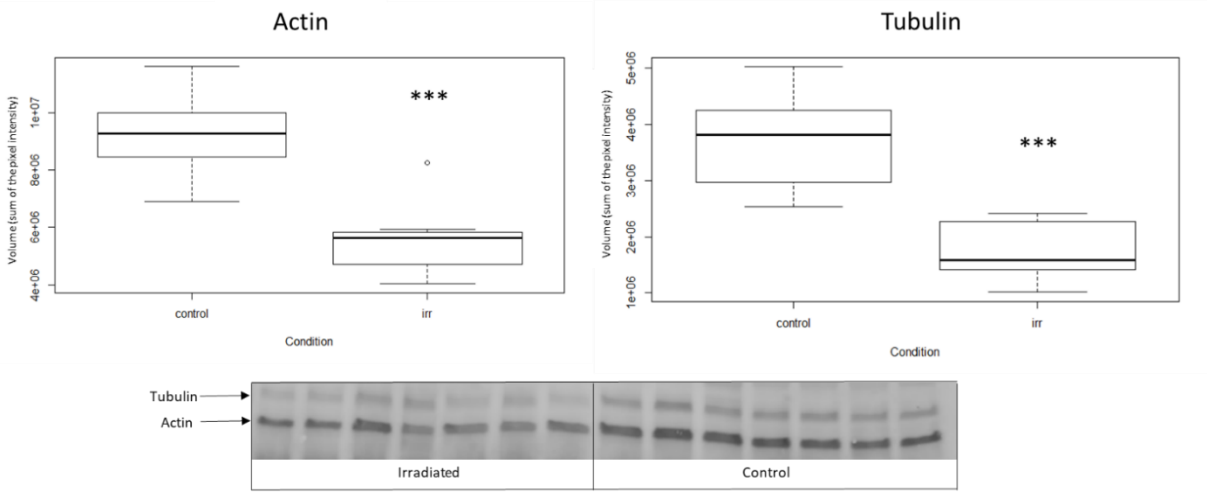
GO:0006563	L-serine metabolic process	0.047345561
GO:0051984	positive regulation of chromosome segregation	0.047345561
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	0.048212461
GO:0034472	snRNA 3'-end processing	0.04903872
GO:1902750	negative regulation of cell cycle G2/M phase transition	0.04903872

SD Tableau IV- 3 : Primers used for qPCR analyses.

Gene	Forward	Reverse
ar	CCTGCCGTCTGAAGAAGTGT	CTGCGAGTGGAAAGTCAGGT
aspa	CCGCTATGAGTTCGCGTACT	GTGTCGATGTACCTGGTGCA
brca2	ATTTCGCAATGATCGTGCCG	GGGTCTCAACAGCAGCATCT
buc	TCTGTTGCCCCCACAAAACT	GCCCTGGAACAACTTCGAGA
ctnnb1	CTCTGGGGCCACAACTACTG	GCAGAGTCGAACTGTGTGGA
ctnnb2	GAGATCGTAGAGGGCTGCAC	GCAGTTCAGTGAGTGGAGCT
cxcr4a	TGCTCACTCTGCCATTCTGG	GAAGTTTCCTCGGACCCTGG
ddx4	GCTCAGGATTTGGAGGTGCT	CACCACGTCCTTTTCCTCGA
fancl	CCTCTGGTCATCACGTGGAC	GCAGCATTTTGGGGTGTCTG
foxl2a	CATCGCTAAGCCAAGTAGCC	AGGGCCCAATTATTCACTCC
hsd11b2	CTGGCAAGACTGGTCCTCTG	AAATGCTTGGCTCCCTCTCC
hsd3b2	GCCGCACATCAGCTATTGTG	TCGAGGACTGTACCCGAACT
jag2a	GCCGCTGCACTGATAATTGG	GCCAGACTCACATGAGCTGT
lhcgr	CTGTGCATGGCGCCTATTTC	AAGGCTCTGGTGAAGATGGC
nr3c1	ACCACTTCAAGCGGACAGAG	GCTGTCTTCAGGCCTGGAAT
nr5a1a	GAAGTGTCTGAGTGTCGGCA	CCTCCAGTTTGAAGCCGCTA
pdgfrb	ATCCCCATCCCTGATCCCAA	TTCCAGAGTGTTCGGTCAGC
pdia6	CTCTCCTGTGGATGAGGGGA	GTGTGCGTGTGTGAGAGAGA
piwil2	GCTGCTGCACAACATCAACA	ACCAGTCTACTGCCGGAGAT
rad51b	GTGGATCAGCAGCTTGTCCT	CAGTCAGGGTCAAGAAGCGT
sf1	ATATCGCACGCGCAAGAAAC	CGTGGCCCAATTAAAAGCCC
sfrp1b	GCACAAAGCCTGTCACAAGG	TCTTGGTGGCGTTCGATGAA
sybu	CGTGATGCAGAGCTTTACGC	GCTTGGTCTTGAGGTGTCGA
zp3b	TTTCAGGTGACGATTCCGCA	GTTCCGCAGTCTTGGAGTGA
zp3c	GCACAAACACCTGAAGCTGG	CACTCCAGTGGACACAGGTC



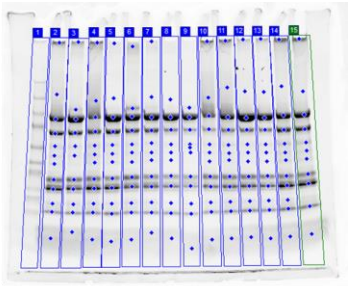
*SD Figure IV- 1 : Bar plot of Log2FC from RNAseq (black) and qPCR analysis (grey) in F0 ovaries. For RNAseq data, FDR < 0.05 *, FDR < 0.01 **, FDR < 0.001 ***. For qPCR data, irradiated and control reach n= 7 and n=9, respectively. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001). ns = non significant.*



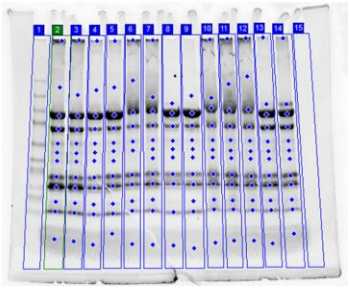
*SD Figure IV- 2 : Boxplot of α-tubulin and β-actin volumes (western-blot) after F1-24hpf exposure to 50 mGy.h^{-1}. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).*

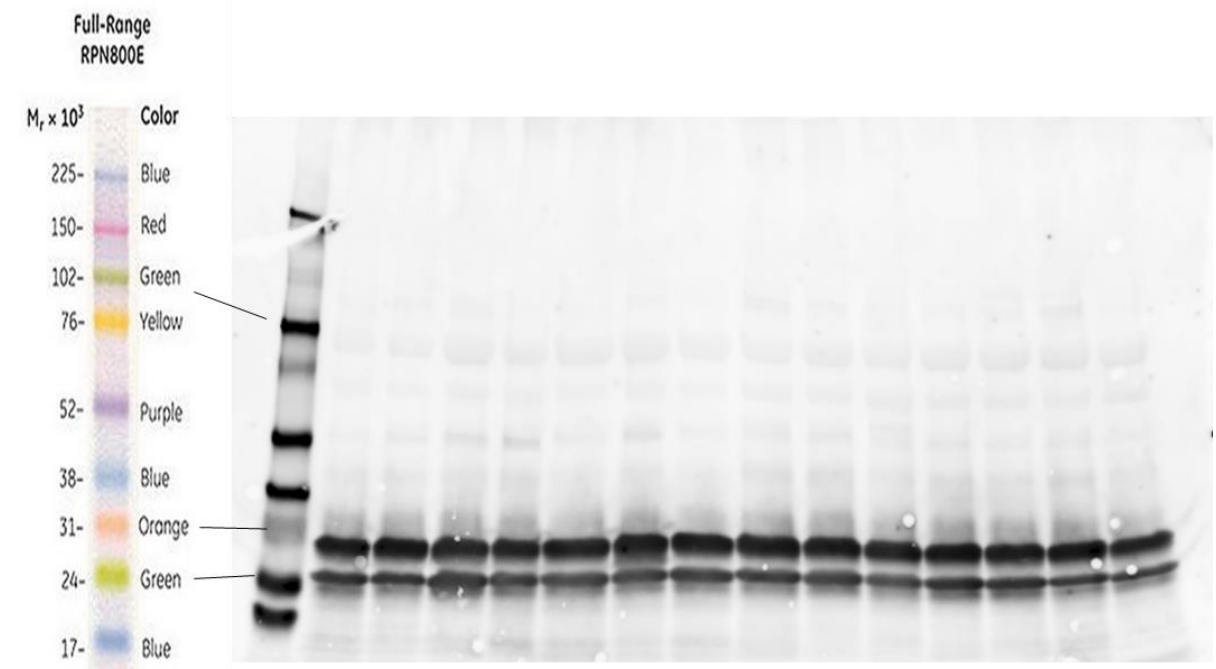
SD Tableau IV- 4 : Tables of total protein (volume) gel stained in parallel per replicate with gel photographs from F1-24hpf.

Band No	control	control	control	control	control	control	irradiated	irradiated	irradiated	irradiated	irradiated	irradiated
1	2.93E+07	2.57E+07	3.66E+07		1.88E+07				3.09E+07	3.10E+07	1.49E+07	1.42E+07
2	1.83E+07	1.34E+07	9.75E+06	1.27E+07	2.18E+07	1.36E+07	8.70E+07	7.23E+07	4.49E+06	1.66E+07	5.67E+06	6.57E+06
3	8.36E+07	8.67E+07	5.54E+07	9.62E+07	7.96E+07	8.68E+07	2.77E+07	1.87E+07	5.83E+07	8.24E+07	1.10E+08	9.09E+07
4	4.80E+07	4.22E+07	4.13E+07	4.89E+07	3.85E+07	3.99E+07	5.49E+06	2.66E+06	1.62E+07	2.75E+07	3.10E+07	2.61E+07
5	5.96E+06	4.38E+06	7.09E+06	6.19E+06	4.75E+06	5.43E+06	2.49E+06	9.36E+05	3.80E+06	5.16E+06	3.27E+06	4.49E+06
6	4.35E+06	3.21E+06	5.84E+06	4.35E+06	4.36E+06	4.33E+06	2.57E+06	2.29E+06	2.78E+06	2.51E+06	1.82E+06	3.08E+06
7	2.22E+06	3.11E+07	4.22E+06	2.36E+06	2.15E+06	2.76E+06	2.04E+07	1.69E+07	1.58E+06	1.79E+06	1.25E+06	1.74E+06
8	3.20E+07	4.42E+07	3.37E+07	2.34E+07	3.40E+07	2.35E+07	3.30E+07	2.38E+07	3.09E+07	3.03E+07	3.02E+07	2.33E+07
9	5.48E+07	6.53E+06	5.64E+07	5.35E+07	4.09E+07	3.91E+07	1.99E+06	2.92E+06	3.37E+07	4.05E+07	4.35E+07	3.58E+07
10	7.80E+06	1.80E+07	5.71E+06	4.96E+06	7.17E+06	5.33E+06	1.60E+07	1.18E+07	3.55E+06	6.13E+06	5.00E+06	4.30E+06
11	1.97E+07		1.93E+07	2.27E+07	1.83E+07	1.66E+07			1.51E+07	2.10E+07	2.06E+07	1.86E+07
Tot	3.06E+08	2.75E+08	2.75E+08	2.75E+08	2.70E+08	2.37E+08	1.97E+08	1.52E+08	2.01E+08	2.65E+08	2.67E+08	2.29E+08

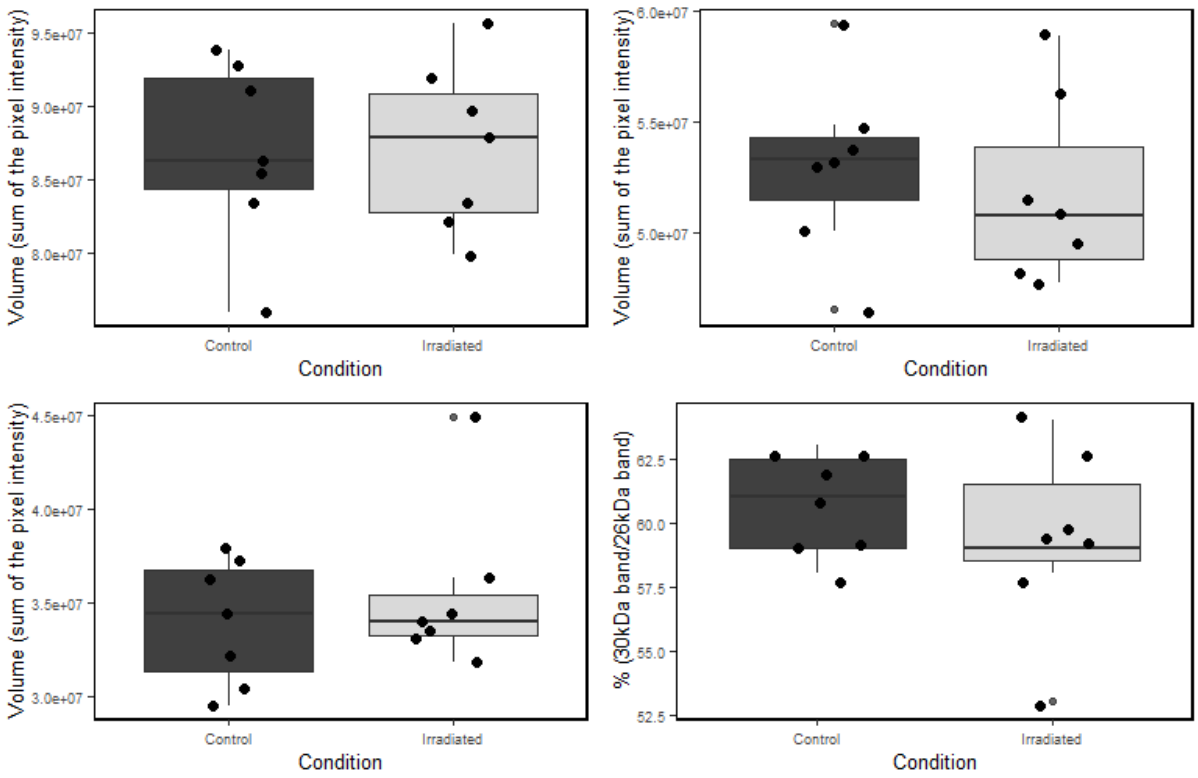


Band No	Irradiated	Irradiated	Irradiated	Irradiated	Irradiated	Irradiated	Control	Control	Control	Control	Control
1	1.46E+07	1.48E+07	3.06E+07	2.86E+07			3.09E+07	4.72E+07	3.76E+07		1.82E+07
2	7.01E+06	1.32E+07	1.99E+07	2.86E+07	2.19E+07	9.85E+07	2.47E+07	3.54E+07	6.43E+06	7.37E+06	2.19E+07
3	7.88E+07	1.14E+08	5.27E+07	6.35E+07	7.63E+07	3.49E+07	4.98E+07	6.37E+07	6.91E+07	8.22E+07	7.63E+07
4	1.91E+07	3.19E+07	1.87E+07	2.95E+07	3.69E+07	6.27E+06	3.13E+07	3.36E+07	3.52E+07	3.80E+07	3.69E+07
5	4.44E+06	6.10E+06	4.58E+06	5.58E+06	3.94E+06	2.19E+06	4.60E+06	4.60E+06	3.34E+06	4.18E+06	3.94E+06
6	2.60E+06	4.80E+06	5.78E+06	3.02E+06	2.83E+06	2.80E+06	3.21E+06	3.81E+06	1.98E+06	4.52E+06	2.83E+06
7	2.90E+06	2.61E+06	2.93E+07	1.39E+06	1.57E+06	2.32E+07	1.56E+06	1.65E+06	9.73E+05	2.32E+06	1.57E+06
8	2.00E+07	3.08E+07	3.12E+07	2.49E+07	2.99E+07	3.77E+07	2.82E+07	3.52E+07	2.59E+07	2.45E+07	2.99E+07
9	3.07E+07	4.13E+07	5.09E+06	3.85E+07	3.67E+07	2.30E+06	3.32E+07	3.66E+07	3.51E+07	4.13E+07	3.67E+07
10	2.73E+06	5.23E+06	1.36E+07	2.37E+06	7.88E+06	1.79E+07	4.32E+06	6.97E+06	5.16E+06	5.30E+06	7.88E+06
11	1.62E+07	2.17E+07		1.60E+07	1.39E+07		1.48E+07	1.51E+07	1.35E+07	1.61E+07	1.39E+07
Tot	1.99E+08	2.86E+08	2.11E+08	2.42E+08	2.32E+08	2.26E+08	2.27E+08	2.84E+08	2.34E+08	2.26E+08	2.50E+08





SD Figure IV- 3: PVDF membrane after western-blot, using an anti-VTG antibody on 24 hpf F1, with load marker data sheet.



SD Figure IV- 4 : (A) Box-plot of additional 26kDa band and 30 kDa band volume from F1-24hpf (B) Box-plot of 26kDa volume from F1-24hpf (C) Box-plot of 30 kDa band volume from F1-24hpf (D) Box-plot of 26kDa band compared to 30 kDa band volume from F1-24hpf. For A, B and C: Anova test; For D: Glm test with binomial distribution. For all figures dots represent individual data.

IV.3 Synthèse du chapitre

IV.3.1 Effets à l'échelle individuelle

La mortalité des stades précoces est confirmée dans cette nouvelle étude pour les conditions irradiée et recovery. Toutefois, la mortalité de la descendance après irradiation des parents pendant 10 jours à 50 $mGy.h^{-1}$ est significativement différente de la condition contrôle à partir de 72 hpf (Figure IV- 2) et jusqu'à la fin de l'expérimentation (6jpf). Dans le chapitre précédent, la première publication présentait une mortalité significative de la descendance dès 24 hpf, dans les mêmes conditions d'exposition. L'absence de différence statistique à 24 hpf pourrait être due à la mortalité plus élevée observée pour les control (54.9%), qui est inhabituelle. Aucune mortalité supplémentaire n'a été observée les jours suivants pour cette condition contrairement aux conditions irradiées (89%) et Recovery (98%). En parallèle de cette mortalité tardive, une variation de la surface de la réserve vitelline a été observée (Figure IV- 3) chez la descendance irradiée, recovery et resilience_6d. Dans le chapitre précédent, l'hypothèse d'une accélération en lien avec une consommation rapide des ressources énergétiques a été évoquée. Or, à 50 $mGy.h^{-1}$ bien que peu d'individus survivent, diminution du taux d'éclosion semble apparaitre. Ainsi, les malformations de la surface vitelline observée pourraient expliquées ce retard par la non-consommation des réserves. Taux d'éclosion et surface de la réserve vitelline pourraient être étroitement liés. La surface de l'aire péricardique n'est, en revanche, plus grande que pour la condition resilience_6d. Cette altération n'a pas été observée pour les conditions irradiée et recovery, probablement parce que l'aire péricardique de la condition contrôle de cette expérimentation était de base plus grande que celle des contrôles des conditions résilience. Comme dans le chapitre précédent, les malformations ne sont plus observées après 36 jours de résilience des parents (Figure IV- 3), ce qui conforte nos hypothèses précédemment évoquées sur le temps de réparation des effets. De manière générale, tout comme pour les deux précédentes publications, les effets observés semblent être dus à l'irradiation des parents.

IV.3.2 Apport parental dans les effets observés

IV.3.2.1 Implication maternelle

Cette troisième publication s'est focalisée sur l'impact de l'irradiation sur les apports maternels. L'analyse transcriptomique (mRNAseq) sur les gonades femelles F0 a permis de mettre en évidence un impact de l'irradiation sur les processus biologiques en lien avec les dommages à l'ADN (Figure IV- 5, double-strand break repair, DNA repair, cellular response to DNA), ce qui corrobore les résultats des tests des comètes

de la première publication réalisés dans les larves et les gonades (Figure III- 10). En effet, après une exposition à 50 $mGy.h^{-1}$, les gonades femelles et mâles présentaient une augmentation de dommages à l'ADN. Un résultat similaire a été observé dans d'autres études (Bourrachot et al., 2014; Lemos et al., 2017; Simon et al., 2018) et notamment après irradiation durant 27 jours chez le poisson zèbre (Hurem et al., 2018a). Les transcrits impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure IV- 5, *gadd45ab*, *rad51*, *xrcc6*, *xrcc5*, *ddb2*, *creb1a*, *creb1b*, *polb*) sont principalement sous-exprimés, ce qui pourrait laisser des dommages considérables dans les ovocytes matures et ainsi affecter la descendance. Les gènes impliqués dans la réponse antioxydante sont eux aussi sous-exprimés (Figure IV- 5, *gpx1a*, *gpx1b*, *gsta.1*, *sod1*, *sod2*) suggérant un déséquilibre des ERO. Dans la première publication, les ERO ont été mesurés directement dans les larves F1 à des débits de doses plus faibles (Figure III- 8). ERO et dommages à l'ADN semblent étroitement liés dans nos expérimentations, bien qu'il s'agisse également de dommages classiques rencontrés pour d'autres polluants (Y.-B. Ma et al., 2018; Zhang et al., 2016b). Tous ces processus impactés peuvent témoigner d'une atteinte de l'ADN suite à l'irradiation transmettant ainsi un ADN altéré à la descendance et pourraient suggérer un effet génétique.

Il parait difficile d'envisager une fécondation après tant de dommages au niveau de l'ADN. Pourtant aucun effet n'a été mis en évidence sur les performances de reproduction. Une limite à ces analyses concerne la diversité des stades ovocytaires. Ici, les ovocytes matures ont été expulsés lors de la reproduction. Les analyses concernent donc les ovogonies, les ovocytes primaires et secondaires pré-vitellonéniques qui pourraient être plus sensibles et incapables de générer, à terme, une descendance viable. Ici, une reproduction a été générée avant le début de l'irradiation afin de recommencer un cycle de gamétogenèse (Welch et al., 2017), signifiant ainsi que la descendance obtenue est tout de même issue de stades ovocytaires précoces irradiés. Le poisson zèbre étant une espèce asynchrone, il est possible de retrouver différents stades de maturation au premier jour d'irradiation (Figure IV- 7). Les mécanismes de réparation de l'ADN et du stress oxydant pourraient varier au cours de la maturation des ovocytes. La Figure IV- 7 propose une hypothèse afin d'expliquer que la descendance soit viable à 3 hpf bien que l'irradiation des ovogonies semble très délétère.

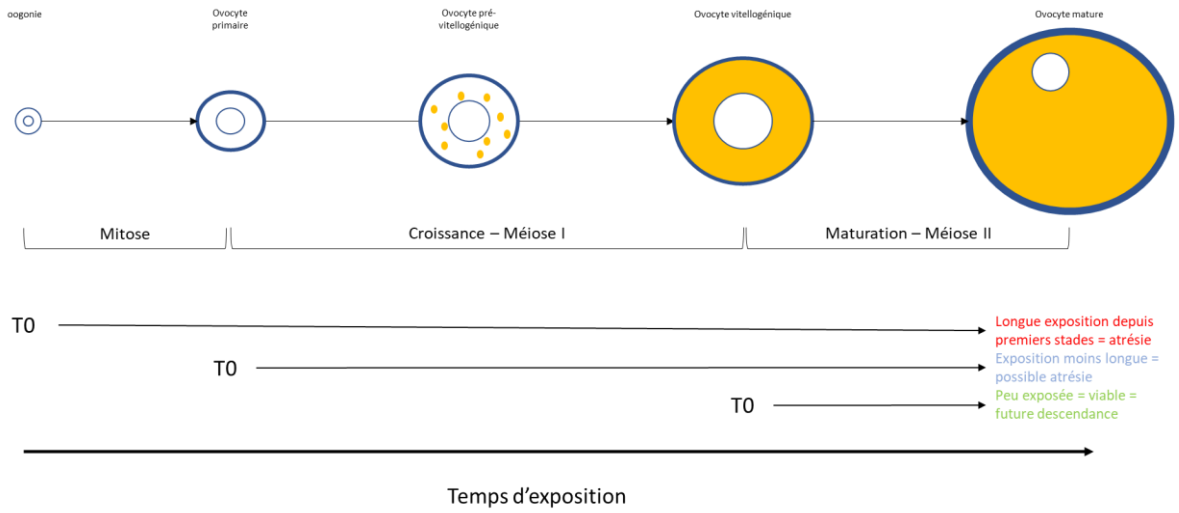


Figure IV- 7 : schéma représentant l'hypothèse de la sensibilité des différents stades ovocytaires exposés au rayonnement gamma. Les différents stades ovocytaires sont détaillés dans le chapitre I. T0 correspond au début de l'irradiation. Du fait de l'asynchronité de cette espèce, plusieurs types d'ovocytes peuvent être présents à T0. Les stades précoces sont donc exposés tout le long de leur maturité.

Au premier jour d'irradiation, plusieurs stades de développement des ovocytes pourraient être retrouvés (Figure IV- 7), les premiers stades pouvant être plus sensibles à l'irradiation. Ces derniers, exposés durant tout le cycle, seront jugés non viables et entreront alors en atrésie afin de ne pas produire des œufs de mauvaise qualité. L'irradiation est notamment connue pour augmenter la quantité d'ovocytes en atrésie (Hurem et al., 2018a; Morais et al., 2012). Ces hypothèses soulignent l'intérêt de continuer les investigations sur les coupes histologiques. Les stades plus tardifs, potentiellement moins sensibles, pourront donner une descendance viable. Etant donné que le poisson zèbre est asynchrone, il est difficile de tester cette hypothèse avec le type d'expérimentation réalisé au cours de ce projet. En revanche, l'analyse transcriptomique a été réalisée sur des gonades de femelles s'étant reproduites. Il conviendrait de réitérer les analyses sur des gonades de femelles non encore reproduites pour évaluer les éventuelles différences de sensibilité entre les ovocytes matures et les autres stades de maturation. L'analyse des effets sur les ovocytes matures seraient plus en lien avec les effets observés chez l'embryon. Ces premiers résultats nous indiquent donc qu'une fécondation et une descendance 3 hpf sont possibles. Dans le cadre de ce projet de thèse, cette hypothèse de sensibilité des stades ovocytaires ne peut être vérifiée. Ainsi, l'altération de molécules maternelles nécessaires au développement précoce, pouvant expliquer les effets retrouvés chez la descendance, a été analysée.

Les mesures du taux de cortisol sur les gonades femelles F0 après irradiation n'ont révélé aucun effet (Figure IV- 4A) bien que le transcrit du récepteur aux glucocorticoïdes (*nr3c1*) soit sur-exprimé (Figure IV- 4B). Pourtant, les récepteurs aux glucocorticoïdes sont généralement surexprimés en cas d'excès de cortisol, afin de réguler des gènes sensibles aux glucocorticoïdes pour maintenir l'homéostasie cellulaire pendant le stress chez les poissons (Sathiyaa and Vijayan, 2003). La

technique employée (test ELISA) permet de montrer qu'aucun effet sur le taux de cortisol n'est observé dans les gonades maternelles après irradiation. En revanche, la mesure dans les œufs de la descendance n'a pas abouti par manque de matériel biologique et devrait être réalisée pour confirmer qu'un taux important de cortisol n'a pas été transféré aux embryons, pouvant expliquer la mortalité précoce (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016). Par ailleurs, les taux de cortisol sont souvent atténués après exposition chronique (Cohen et al., 2012; Ribas et al., 2017b), notamment via sa transformation en cortisone (forme inactive). Ainsi, une analyse des métabolites secondaires (cortisol > cortisone > 11-deoxycortisol > progestérone > estradiol) permettrait de comprendre le métabolisme du cortisol après un stress chronique comme dans notre cas. Finalement, le suivi des gènes de la biosynthèse du cortisol, par RT-qPCR, pourrait être pertinent afin de comprendre son implication après irradiation, d'autant plus qu'une partie des gènes est impactée par l'irradiation (Figure IV- 4B). L'analyse western-blot de la vitellogénine n'a également pas mis en évidence des effets. Il a été possible de conclure que la proportion reste inchangée entre les métabolites révélés (SD Figure IV- 4) dans les embryons F1-24hpf. Cette technique a permis de révéler uniquement deux métabolites de la VTG. Ainsi, une analyse protéomique permettrait de révéler tous les sous-produits de la VTG. Finalement, la surface de la réserve vitelline anormalement grande ainsi que la sous expression de la cathepsine D (*ctsd*) questionnent quant à la dégradation de la VTG, utile à la nutrition embryonnaire (Carnevali et al., 2006; Yoshizaki and Yonezawa, 1994), bien que les proportions des deux sous-produits restent inchangées. En effet, après exposition à des perturbateurs endocriniens, l'activité de cette enzyme est réduite (Yang et al., 2006), suggérant une atteinte de la métabolisation de la VTG. Une analyse dans les gonades maternelles serait pertinente afin d'observer que la quantité de VTG soit la même entre les conditions contrôles et irradiées. Cependant, l'expression de l'ARNm de la cathepsine D ne coïncide pas forcément avec son niveau d'activité (Carnevali et al., 2006), expliquant ainsi l'absence d'effet sur les deux produits de dégradation. Ainsi, la mauvaise dégradation de la VTG reste une hypothèse à vérifier. Outre ces deux molécules (cortisol et VTG) essentielles au développement embryonnaire, les ARNm maternels jouent un rôle primordial dans le développement de la descendance.

L'analyse transcriptomique a mis en évidence des processus biologiques impliqués dans l'ovogenèse (Figure IV- 5). C'est au cours de ce processus que se met en place le corps Balbiani (Bb) qui contient tous les composants nécessaires à la descendance (Jamieson-Lucy and Mullins, 2019; Marlow, 2010). Deux des trois gènes principaux qui permettent sa formation et son utilisation sont impactés par l'irradiation (*buc* est sous exprimé, *macf1a* est surexprimé). Ces deux gènes, conditionnant le devenir des transcrits maternels nécessaires au développement embryonnaire, pourraient être utilisés comme biomarqueur pour évaluer les effets d'une exposition multigénérationnelle. Cependant, comme expliqué précédemment, les analyses ont été réalisées après reproduction, ne reflétant pas directement le futur œuf. Ainsi, il serait nécessaire de vérifier l'impact de l'irradiation sur ces deux gènes sur des

femelles non reproduites et sur des embryons issus de femelles irradiées avant l'activation du génome zygotique.

La troisième publication met notamment en évidence l'altération des transcrits nécessaires à la formation et la maturation des ARN non codants dont les miARN (*drosha, dicer1, ago2, ago3b, ago4,* (Martín et al., 2021)). Les miARN représentent une voie d'étude nécessaire puisqu'ils participent à la régulation de l'expression des gènes (Wei et al., 2012), notamment après irradiation gamma parentale (Martín et al., 2021). Ainsi, il semble indispensable d'analyser les miARN maternels transmis qui pourraient impacter l'expression des ARNm maternels jusqu'à l'activation du génome zygotique (Tang et al., 2007; Wei et al., 2012). En effet, les miARN régulent le développement précoce *via* notamment les voies de signalisation Hedgehog et Notch signaling pathway (Thatcher et al., 2007) qui ressortent de notre analyse (Figure IV-6). Nos résultats questionnent sur l'implication de ces ARN non codants (marques épigénétiques) dans les phénotypes observés au fil des générations. Ainsi, l'étude des ARN non codants semble représenter une voie intéressante pour la compréhension des effets.

Enfin, la mortalité précoce observée chez la descendance pourrait être due à une mauvaise dégradation des ARNm maternels au moment de l'activation du génome zygotique (Chang et al., 2018; Walser and Lipshitz, 2011) puisque les mécanismes de dégradation sont impactés selon l'analyse d'enrichissement (Figure IV- 5). Cette perturbation de la dégradation pourrait modifier le schéma temporel de l'expression génique au cours du développement précoce et participer par conséquent aux effets phénotypiques observés.

IV.3.2.2 Implication paternelle

Le développement de l'ovocyte a lieu principalement dans la mère, permettant l'apport de nombreuses molécules comme expliqué précédemment. Cependant, l'apport paternel concernant l'ADN, quelques transcrits et l'épigénome, ne doit pas être négligé (Herráez et al., 2017). Des premières hypothèses existent concernant l'implication de l'épigénome paternel dans le développement de la descendance, notamment *via* l'organisation de la chromatine qui permettrait l'activation séquentielle des gènes paternels au cours du développement (Wu et al., 2011). L'impact le plus étudié et le plus avéré concerne les dommages à l'ADN au niveau des gamètes mâles. Tout comme l'hypothèse des effets d'irradiation directe sur l'ovogenèse, le rayonnement peut produire des dommages à l'ADN au cours de la spermatogenèse (Wdowiak et al., 2019), produisant ainsi des dommages qui ne peuvent être réparés (Cabrita et al., 2011; Herráez et al., 2017; Hulak et al., 2013). En effet, Fernández-Díez et al., 2018 ont montré une augmentation de la mortalité embryonnaire à partir de l'organogenèse (24 hpf) après atteinte génotoxique des gamètes mâles, associée à une diminution de l'éclosion et des malformations sévères, comme observé dans nos études. Cependant,

il semblerait qu'une fécondation peut tout de même avoir lieu lorsque les gamètes males présentent un ADN dégradé (Herráez et al., 2017; Pérez-Cerezales et al., 2010). Aussi, les ovocytes contiennent les ARNm et les protéines nécessaires aux mécanismes de réparation de l'ADN et sont capables de gérer les dommages à l'ADN au niveau des gamètes mâles après fécondation (Fernández-Díez et al., 2018; Herráez et al., 2017). Ce constat souligne une nouvelle fois le rôle prépondérant de la mère, dont les mécanismes de réparation de l'ADN sont significativement impactés dans notre étude (Figure IV- 5). Il n'est donc pas impossible que la fécondation se passe normalement et que les effets soient impactant seulement au cours du développement précoce (Devaux et al., 2011; Santos et al., 2013b, 2013a).

Quoi qu'il en soit la mortalité peut être due (i) à l'altération des molécules maternelles nécessaires au développement embryonnaire, (ii) à des dommages à l'ADN dans les gamètes mâles, et (iii) à un effet combiné de dommages à l'ADN des gamètes mâles qui ne peuvent pas être supportés par les mécanismes de réparation maternelle. Finalement, une façon relativement simple de comprendre l'implication parentale serait un seul des géniteurs avant reproduction.

IV.3.3 Relation dose-réponses à l'échelle moléculaire de différents de débits de dose

L'analyse transcriptomique réalisée dans le cadre de la troisième publication portait sur le plus fort débit de dose de 50 mGy.h^{-1}. Cependant, les analyses ont également été réalisées pour deux débits de dose plus faibles (0.05 et 5 mGy.h^{-1}), résultats non présentés dans les articles. Un nombre très élevé de gènes sont dérégulés à 50 mGy.h^{-1} (9182) par rapport à 5 (181) et 0.05 (33) mGy.h^{-1}. Tout comme pour les effets à l'échelle phénotypique, il semblerait donc que la relation dose-réponse ne suit pas un modèle log-logistique avec une accentuation très marquée des effets entre 5 et 50 mGy.h-1. La Figure IV- 8 présente le nombre de gènes dérégulés, en comparaison aux contrôles en fonction des doses cumulées (0.036, 3.6 et 12 Gy) afin d'être en adéquation avec la démarche adoptée dans le chapitre précédemment. Entre 0.036 et 3.6 Gy, 5 fois plus de gènes sont dérégulés, tandis qu'entre 3.6 et 12 Gy, 50 fois plus de gènes sont dérégulés. La relation dose-réponse dans le nombre de gènes impactés par l'irradiation suit une régression exponentielle (R^2=1). En revanche, seulement trois points sont présents ce qui ne suffit pas pour conclure sur le type de relation dose-réponse. Comme précédemment évoqué, il serait nécessaire de réaliser des expérimentations entre 5 et 50 mGy.h^{-1}. Le nombre de gènes dérégulés augmente donc avec le débit de dose, comme observé suite à une exposition directe d'embryons (Hurem et al., 2017b). Un tel constat a également été observé chez des embryons

issus de parents irradiés à 53 et 8.7 mGy.h^{-1}, avec respectivement 5079 et 39 gènes modulés (Hurem et al., 2018b).

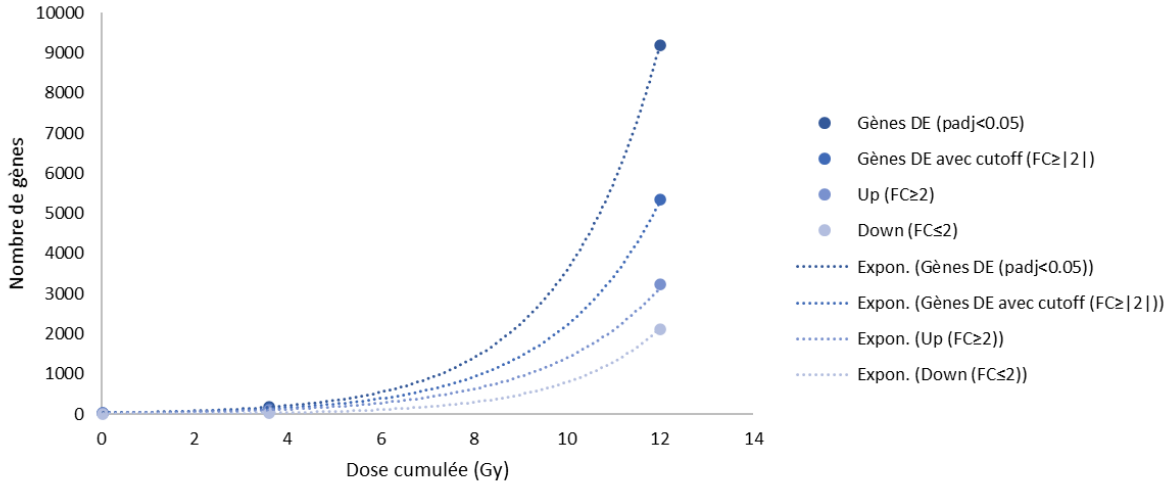


Figure IV- 8 : Nombre de gènes (ENSEMBL) en fonction de la dose cumulée. DE = différentiellement exprimés, FC = FoldChange. Les courbes en pointillées représentent les régressions exponentielles.

Face à la quantité exponentielle de gènes dérégulés à fort débit de dose, il est primordial d'identifier la nature des gènes impactés et leur réponse en fonction des différents débits de dose. Pour répondre à cette question, les diagrammes de Venn (Figure IV- 9) représentent les gènes communs aux différents débits de dose.

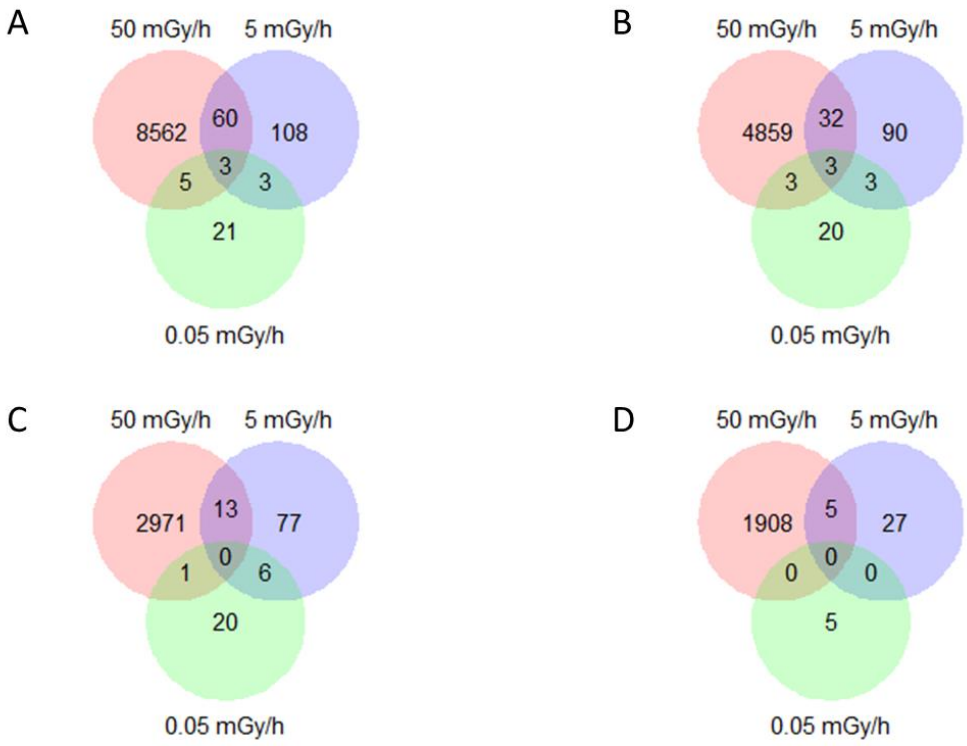


Figure IV- 9 : Diagrammes de Venn montrant les gènes communs entre les trois débits de dose après annotation zfin. (A) correspond aux gènes différentiellement exprimés (padjust<0.05) sans valeur de

cutoff), (B) correspond aux gènes différentiellement exprimés avec valeur de cutoff (pajust <0.05, FC≥|2|), (C) correspond aux gènes surexprimés (pajust < 0.05, FC ≥2, (D) correspond aux gènes sous exprimés (padjut <0.05, FC ≤-2).

A 50 mGy.h^{-1}, 45% des gènes de l'univers (19170) sont dérégulés avec une padjust<0.05 et 25 % sont sur ou sous exprimés selon la valeur de CutOff considérée. Ceci souligne le nombre considérable de gènes dérégulés après exposition à un fort débit de dose. L'irradiation à 50 mGy.h^{-1} semble donc impacter de très nombreux mécanismes (SD Tableau IV- 2), pouvant théoriquement englober alors le peu de mécanismes impactés à plus faibles débits de dose. Or, seulement 36% (63/171) de gènes dérégulés à 5 mGy.h^{-1} et 25% (8/32) des gènes dérégulés à 0.05 mGy.h^{-1} sont communs avec le fort débit de dose.

De plus, l'analyse d'enrichissement GO-term n'a révélé que 5 processus biologiques impactés en communs entre ces deux doses (Tableau IV- 1). Une étude (Martín et al., 2021) après irradiation à 8.7 mGy.h^{-1} a cependant révélé des processus biologiques retrouvés également à 50 mGy.h^{-1}, concernant la synthèse des ribosomes (Figure IV-5). Sur la Figure IV- 9B, prenant en compte les gènes sur et sous exprimés (FC≥|2|), 35 gènes sont communs entre 5 et 50 mGy.h^{-1}. Pourtant, lorsque les gènes sur-exprimés ou les gènes sous-exprimés sont regroupés (Figure IV- 9C et D), seulement 18 gènes communs sont retrouvés entre les deux débits de dose. Outre le fait que les mécanismes impactés ne semblent pas tous les mêmes, il semblerait que pour les gènes communs entre forte et faible débits de dose, la réponse face au rayonnement est différente (gène sur-exprimé pour un débit de dose, et sous-exprimé pour l'autre débit de dose). Ces résultats sembleraient indiquer que les mécanismes impactés ne sont étonnamment pas les mêmes. Seulement 3 gènes (*ckba*, *slc5a8l*, *tnfrsf9a*) sont communs aux 3 doses, indiquant que la majorité des gènes dérégulés ne sont pas les mêmes et que leur réponse est différente.

Tableau IV- 1 : Analyse d'enrichissement révélant les processus biologiques communs entre 50 et 5 mGy.h^{-1}.

ID	Description
GO:0061014	positive_regulation_of_mRNA_catabolic_process
GO:1903313	positive_regulation_of_mRNA_metabolic_process
GO:0061013	regulation_of_mRNA_catabolic_process
GO:0017148	negative_regulation_of_translation
GO:0034249	negative_regulation_of_cellular_amide_metabolic_process

Peu de processus biologiques sont retrouvés en commun (Tableau IV- 1). Rappelons ici que les analyses d'enrichissement ne permettent pas de mettre en évidence des processus biologiques significativement impactés au débit de dose de 0.05 mGy.h^{-1}. Pourtant, la plupart des gènes communs entre 5 et 50 mGy.h^{-1} représentent des marqueurs d'une expositions aux RI, puisqu'ils sont impliqués dans le stress oxydant (*prdx1* (Ho et al., 2013), *sh3pxd2b* (www.zfin.org), *tnfrsf9a* (Münch et al., 2017)) et

dans les dommages à l'ADN (*rad51b* (Reinardy et al., 2013a)). Notre étude montre que ces mécanismes peuvent être de bons marqueurs de l'irradiation à débits de dose modéré et fort. Il sera important de rechercher ces marqueurs pour un débit de dose rencontré *in situ*, en situation post accidentelle (0.5 $mGy.h^{-1}$, (Lerebours et al., 2018)). Deux des 3 gènes communs présentant une réponse opposée et sont impliqués dans le métabolisme énergétique (*ckba* (Yilmaz et al., 2021), *slc5a8l* (López-Barradas et al., 2016)). Pour des débits de dose faible et modéré, les gènes sont sur exprimés tandis qu'ils sont sous exprimés à forte de dose. De plus les gènes dérégulés en commun entre 0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$ sont tous sur-exprimés et liés au métabolisme énergétique (*entpd2a.1* (www.zfin.org), *nr1d1* (Huang et al., 2016)). Outre le stress oxydant et les dommages à l'ADN, le métabolisme énergétique semble être une cible de l'irradiation, comme proposé précédemment. Enfin, des gènes impliqués dans le déterminisme sexuel (*pdgfrb*, *zp3c* et *zp3b*) sont dérégulés à 5 et 50 $mGy.h^{-1}$ pouvant apporter des réponses quant au phénotype sexe-ratio observé. Cette hypothèse sera abordée dans le chapitre suivant.

IV.3.4 Conclusion

De manière générale, l'hypothèse d'une implication parentale sur les effets à l'échelle individuelle de la descendance est renforcée (Figure IV- 10). L'analyse moléculaire des gonades femelles F0 a mis en évidence des impacts majeurs sur des facteurs maternels essentiels au développement embryonnaire. Ceci confirme donc l'hypothèse émise dans le chapitre précédent : l'implication parentale dans les effets est liée à la transmission de matériels défectueux (ARNm maternels, ADN parental, épigénome-ncARN) en lien avec l'exposition de la gamétogenèse aux RI. Enfin, comme dans le chapitre précédent, il semblerait que la réponse à l'échelle moléculaire soit exponentielle. Cependant des marqueurs de l'exposition aux rayonnements gamma (stress oxydant, apoptose, dommages ADN, métabolisme énergétique) restent observés pour toutes les doses avec des réponses parfois différentes entre forte et faible débits de dose.

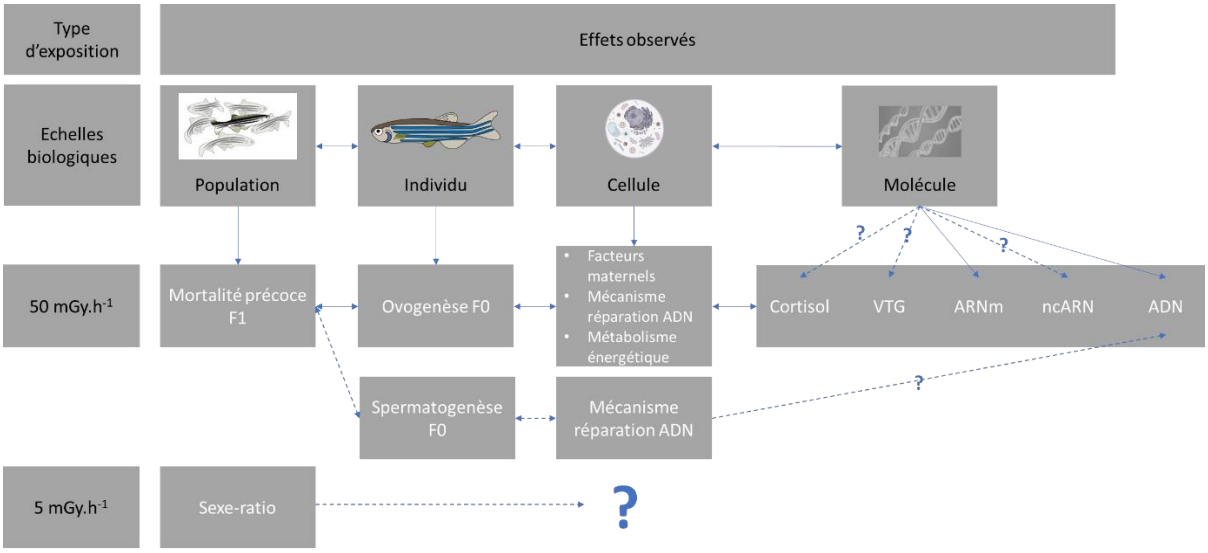


Figure IV- 10 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre IV.

Face à l'évidence d'effets transmissibles, il semble indispensable d'intégrer une approche épigénétique, marques héritées au cours des générations chez le poisson zèbre. Ces marques, connues pour être modulées par l'environnement et donc par de nombreux stresseurs, jouent un rôle majeur dans les mécanismes d'adaptation/acclimatation des populations. Ainsi, le prochain chapitre s'attarde à définir l'implication de l'épigénétique, plus précisément de la méthylation de l'ADN, et des autres mécanismes potentiellement impliqués sur les effets hérités.

Chapitre V– Implication de la méthylation de l'ADN dans les effets phénotypiques observés après irradiation gamma

V.1 Introduction

Le chapitre précédent a permis de confirmer la transmission d'effets délétères à la descendance et d'identifier des mécanismes potentiellement à l'origine de la mortalité. Il est évident que l'apport parental joue un rôle prépondérant dans ces effets. Outre les molécules maternelles et les ADN parentaux, les géniteurs véhiculent des informations héritables responsables de la modulation de l'expression génique. Ce sont les marques épigénétiques qui peuvent être modulées lors d'expositions à des stresseurs afin de permettre une adaptation de l'organisme à l'environnement (Best et al., 2018).

Ce chapitre vise donc à répondre au troisième objectif de cette thèse, à **savoir si l'exposition aux RI est capable d'altérer les marques épigénétiques**. La part de l'épigénétique dans la transmission des effets est évaluée sur le phénotype sexe-ratio biaisé car l'épigénétique figure parmi les mécanismes impliqués dans l'altération du sexe-ratio après exposition à des facteurs biotiques et abiotiques (Navarro-Martín et al., 2011; Pierron et al., 2021; Shao et al., 2014) chez les poissons. L'analyse épigénétique s'appuie sur la méthylation de l'ADN puisqu'il s'agit de marques héritées à travers les cycles de réplication de l'ADN et qu'elle joue un rôle important dans le développement des cellules germinales chez le poisson zèbre (Kremsky and Corces, 2020; Wang et al., 2021). Ce chapitre permettra donc d'évaluer si l'étude des marques épigénétiques est pertinent dans le cas des expositions chroniques au RI.

Pour cela, la méthylation des promoteurs de gènes clés dans la détermination du sexe (*cyp19a1a*, *foxl2a*, *foxl2b*, *dmrt1*, *pdgfrb*) est étudiée à plusieurs débits de dose (0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$). Le choix de ces gènes a été réalisé sur la base de la littérature impliquant les altérations de sexe-ratio (Navarro-Martín et al., 2011; Pierron et al., 2021; Schmahl et al., 2008; Shao et al., 2014; Webster et al., 2017; Yang et al., 2017), mais également en sélectionnant des gènes directement modulés après irradiation dans notre jeu de données RNAseq. La première partie de ce chapitre est consacré (i) à la mesure des niveaux de méthylation sur les générations F0 et F1 dans les gonades. De plus, le chapitre précédent n'ayant pas permis de conclure sur l'implication parentale (maternelle, paternelle, ou les deux), la méthylation sera suivie sur les gonades femelles et mâles. Si l'épigénétique est au cœur de ce chapitre, les autres hypothèses mécanistiques couramment émises dans la littérature ne peuvent être écartées. Ainsi, un second focus (ii) concerne l'implication maternelle et la voie des stéroïdes, sélectionnes à partir du jeu de données transcriptomique à 5 $mGy.h^{-1}$. Finalement, cette étude mécanistique permet (iii) d'obtenir de nouvelles données afin de développer les AOPs pour évaluer les conséquences sur le devenir des populations pour la protection des écosystèmes.

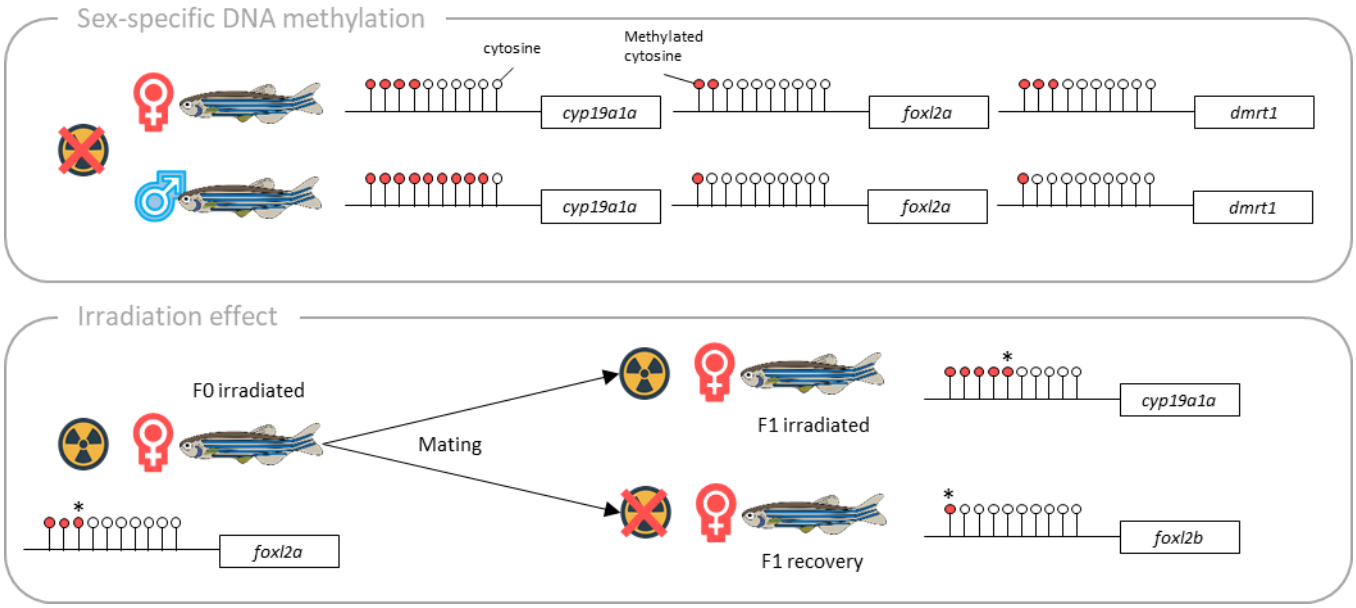
La première partie de ce chapitre est consacrée à la mesure des niveaux de méthylation. Un article a été rédigé. La rédaction reste à finaliser avant soumission dans un journal. La seconde partie (synthèse du chapitre) aborde les niveaux de méthylation à faible débit de dose, les autres hypothèses mécanistiques et l’apport à l’ERE.

V.2 Publication 4: « Zebrafish Female gamma irradiation exposure impacts methylation marks involved in offspring sex determination »

Résumé de l'article en français

Le sexe ratio est un paramètre écologique majeur puisque sa perturbation peut avoir des effets drastiques sur les populations. De nouvelles preuves suggèrent l'implication de signaux environnementaux dans la détermination du sexe chez les poissons (ESD). Les études portant sur ce sujet ont évalué principalement les expositions aux produits chimiques et à la température. Cependant, les effets biologiques de l'irradiation gamma restent encore peu étudiés. Récemment, nous avons montré que l'exposition à l'irradiation conduit à la masculinisation de la descendance F1. L'objectif, ici, était d'étudier les événements moléculaires à l'origine du phénotype sexe ratio biaisé. Dans un premier temps, les taux de cortisol, connus pour être impliqués dans l'ESD, ont été mesurés dans les gonades femelles F0 mais ne semblent pas impactés. Deuxièmement, la méthylation au niveau des promoteurs de gènes clés étant suspectée d'être impliquée dans l'ESD, trois gènes ont été étudiés dans les gonades femelles et mâles (*foxl2a*, *cyp19a1a*, *dmrt1*) et deux autres uniquement chez les femelles (*foxl2b*, *pdgfrb*). Les mesures ont été effectuées pour la génération F0 (témoin et irradié) et la génération F1 qui comprenait la condition irradiée et la condition recovery, après irradiation parentale. Une différence des taux de méthylation entre mâle et femelle a été observée pour ces gènes. Ces gènes connus pour être impliqués dans la détermination du sexe présentent une méthylation de l'ADN spécifique au sexe, ce qui permet d'étudier la méthylation en tant qu'événement clé moléculaire. L'irradiation a augmenté le niveau de méthylation de *foxl2a* et *cyp19a1a* dans les générations F0 et F1, respectivement. À l'inverse, *foxl2b* était hypo-méthylé dans la génération F1 recovery, qui n'a pas été exposée à l'irradiation gamma. Ainsi, l'exposition parentale pourrait modifier le sexe ratio de la progéniture en induisant des changements de méthylation dans les gonades parentales, en particulier les mères.

Graphical abstract



Abstract

Sex ratio is a relevant ecological parameter since its disruption can have drastic effects on populations. Emerging evidences suggested environmental cues involvement in sex determination in fish, i.e. environmental sex determination (ESD). Studies focusing on this topic assessed principally chemical and temperature exposures. However, biological effects of gamma irradiation remain still understudied. Recently, we reported that irradiation exposure can lead to masculinization of F1 offspring. The objective was to investigate the molecular events at the origin of the irradiated male biased sex ratio, First, cortisol levels, known to be involved in ESD, were measured in female F0 gonads but remained non-impacted. Secondly, since promoter methylation of key genes was suspected to be involved in ESD, three genes were studied in female and male gonads (*foxl2a*, *cyp19a1a*, *dmrt1*) and two others only in females (*foxl2b*, *pdgfrb*). Measures were done for F0 generation (control and irradiated) and F1 generation which included irradiated and recovery group after parental irradiation. A clear sexual differentiation was observed for these genes. Irradiation increased methylation level of *foxl2a* and *cyp19a1a* in F0 and F1 generations, respectively. Conversely, *foxl2b* was hypo-methylated in F1 recovery generation, which was not exposed to gamma irradiation. Therefore, these genes known to be involved in sex determination exhibit sex-specific DNA methylation, which makes it possible to study methylation as a potential molecular key event. Studied genes were impacted by irradiation on their methylation levels. Especially, offspring was impacted independently of their irradiation, suggesting that parental exposure could alter offspring sex ratio by inducing methylation changes in parent gonads, especially mothers.

Keywords: sex determination, methylation, cortisol, zebrafish, irradiation, multigenerational

Zebrafish female gamma irradiation exposure impacts methylation marks involved in offspring sex determination

Guirandy Noëmie[a]*, Simon Olivier[a], Geffroy Benjamin[b], Daffe Guillemine[c], Daramy Flore[c], Houdelet Camille[b], Gonzalez Patrice[c], Pierron Fabien[c]

[a] IRSN/PSE-ENV/SRTE/LECO, Centre de Cadarache-B.P. 3 – Bat 183 – 13115 St Paul Lez Durance, France

b MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Palavas-Les-Flots, France

c Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

*Corresponding author.

E-mail addresses: noemie.guirandy@hotmail.fr

Article en préparation. Journal ciblé : Environmental Research

V.2.1 Introduction

Sex ratio emerges as a major issue of population fate since it reflects population reproductive capacity (Mizoguchi and Valenzuela, 2016; Norrgren, 2012; Wedekind, 2017). Differentiation as a male or female (sex differentiation) across species were obtained thanks to activating and repressing ovary or testis pathways. Despite processes are unexpectedly diverse among species, common genes are conserved as well as steroid pathway that corresponds to sex determination. Sex determination is basically represented by two mechanisms across species. The first – genetic sex determination (GSD) – under genetic control which allows sexual differences (Anastasiadi et al., 2018; Piferrer, 2013; Santos et al., 2017), includes chromosomal sex determination (CSD), as in mammalian with a major sex locus and polygenic sex determination (PSD), where genes influencing sex determination are distributed throughout the genome (Bulmer and Bull, 1982). The second – environmental sex determination (ESD) – depends on environmental cues. However, recent studies support a coexistence of these two mechanisms in fish (Hattori et al., 2020). Thus, it is not uncommon to see, in GSD species, altered sex ratio when early life stages, during which sexual determination takes place, are exposed to stressors (Ribas et al., 2017a). This phenomenon was mainly observed after exposure to various temperatures – temperature sex determination (TSD) (Lu et al., 2022). Recent evidences suggest that epigenetic mechanisms could play a crucial role since they regulate gene transcription and respond to environmental factors (Best et al., 2018). Over the three major epigenetic mechanisms, DNA methylation is the most studied in fish and previous works highlighted its potential role in sex determination in diverse fish species, including zebrafish (Navarro-Martín et al., 2011; Pierron et al., 2021; Shao et al., 2014).

These emerging concepts in ecotoxicology stimulate the interest in identifying the mechanisms at the molecular scale involved in a phenotype. Guirandy et al., 2022b reported a male-biased sex ratio in adult zebrafish offspring from irradiated genitors at moderate dose rate (5 mGy.h-1). In this study, adult zebrafish were exposed for 30 days and their offspring were irradiated or not (recovery) throughout their life until produced the next generation. Whether offspring were irradiated or not, sex ratios were altered in both conditions, suggesting that genitor irradiation induced this effect. As explain above, sex determination could be impacted by temperature, but also biotic factors (density) and other abiotic factors (hypoxia, pH, light) (Hattori et al., 2020). In general, stressful environments induce masculinization in fish (Navarro-Martín et al., 2011; Ribas et al., 2017b; Santos et al., 2017). To our knowledge, this was the first time that such an effect has been observed after gamma irradiation. Despite the sex of domesticated zebrafish strains is primarily determined by genetic factors (PSD; (Kossack and Draper, 2019)), SD is known to be also influenced by environmental factors (Pierron et al., 2021; Santos et al., 2017; Wilson et al., 2014). Sex determination is the result of particular transcriptome, with potential involvement of epigenetic, as

well as the steroid pathways. Since cortisol is a steroid and is involved in the stress-axis pathway after exposure to stressors, it had been proposed to be involved in offspring masculinization (Geffroy et al., 2021; Ribas et al., 2017b). Moreover, cortisol is maternally provided and is needed for early offspring development (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016, 2012). In another way, maternal effect was suspected to be the origin of altered sex ratio in offspring (Pierron et al., 2021). Since epigenetic marks are heritable and had been proposed to play role in TSD (Piferrer, 2013; Shao et al., 2014), it would be essential to investigate this mechanism. Thus, promoter methylation and transcription levels were measured in F0 and F1 gonads for five genes (*cyp19a1a*, *dmrt1*, *foxl2a*, *foxl2b*, *pdgfrb*) involved in sex determination and gonad maintenance (Shao et al., 2014). *cyp19a1a*, also known as aromatase, is involved in androgen-to-estrogen conversion. Altered methylation of this transcript showed male-biased sex ratio in TSD species (Navarro-Martín et al., 2011). Doublesex and mad-3 related transcription factor 1 (*dmrt1*) allows testis development (Webster et al., 2017). Forkhead box L2 (*foxl2*) are involved in early ovarian differentiation and maintenance (Yang et al., 2017). The platelet-derived growth factor receptor b (*pdgfrb*) is involved in steroidogenesis control (Schmahl et al., 2008).

V.2.2 Materials and methods

V.2.2.1 Experimental design and sampling

This study followed that of Guirandy et al., 2022b. Project #20,995 was authorized by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) ethics committee no. 81 (EU 0520, C13-013-07) and complied with French regulations on performing experiments on animals in application of directive 2010/63//UE relating to animal protection. Briefly, F0 adult zebrafish (AB strain) were exposed to 5 $mGy.h^{-1}$ gamma irradiation and control condition for 30 days (F0 control and F0 I5) (Figure V- 1). F1 offspring were then obtained from 15 spawning F0 couples. F1 from irradiated F0 (F0 I5) were separated into two groups: (i) F1 were continuously irradiated at 5 $mGy.h^{-1}$ until 131 day post fertilization (dpf), that corresponds to F1 I5; (ii) F1 were placed in non-irradiated condition until 131 dpf, that corresponds to F1 recovery. Dissections were done on sexually mature adults at 30 days post irradiation and 131 dpf for F0 and F1 generations, respectively. Female and male gonads from each generation were sampled and fixed into RNALater or flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until extraction.

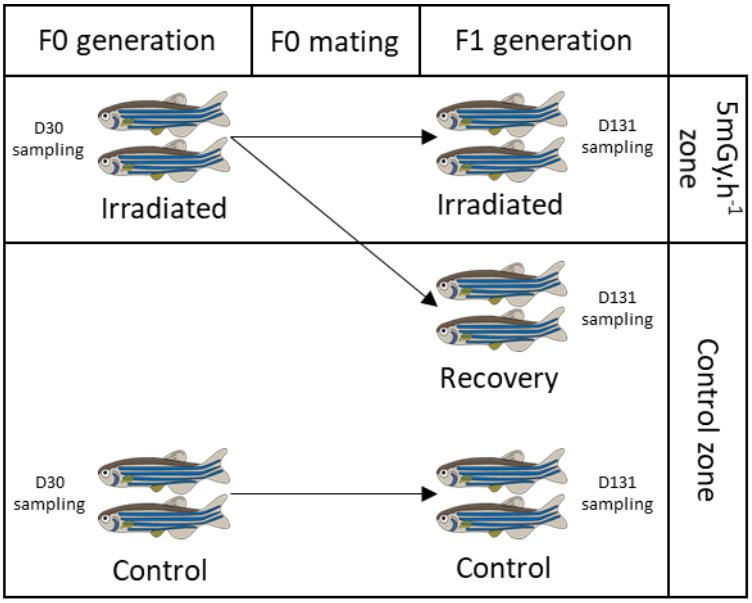


Figure V- 1: Experimental design and exposure conditions (duration and dose rate ($mGy.h^{-1}$). D corresponds to exposure time in days with gonad sampling at the end. F0 adults were exposed over 30 days until reproduction. F1 progenies were then placed in irradiated condition and control condition (recovery) for 131 days until sexual maturity.

V.2.2.2 DNA and RNA extraction

Eight female and male gonads from each generation and condition were sampled. At least, efficiency extractions were good for fewer samples. DNA and RNA extractions were performed as described by Guirandy et al., 2022a using the AllPrep DNA/RNA kit (Qiagen) and according to manufactures' guidelines.

V.2.2.3 Promotor methylation levels

Quantification of single cytosine percent methylation at specific sites in five genes (*cyp19a1a*, *foxl2a*, *foxl2b*, *dmrt1*, *pdgfrb*) was performed using the bisulfite-pyrosequencing method, as described by (Pierron et al., 2019). Primers were designed from the Pyromark assay design software (Tableau V- 1). For *cyp19a1a*, *foxl2a* and *dmrt1*, same primer and CpG analysed as (Pierron et al., 2021) were used. For *foxl2b* and *pdgfrb*, the mean methylation percent of all CpG sites was used, corresponded to three and five sites respectively. The average methylation level of one CpA was measured to confirm great conversion after bisulfite treatment (SD Figure V- 2).

*Tableau V- 1 : primer list for methylation and transcriptomic analyses. F, R, S and * correspond to forward, reverse, sequencing and biotinylated sequences, respectively.*

Gene	Coordinates GRCz11	Sequencing primers	RT-qPCR primers
cyp19a1a	NC_007129.7 39636332-39636181	F: ATGTAGTTGTTGGGATATAAAAGTG R*: CTTTAAATAAAAAAATCCACCACAACC S: TGTTGGGATATAAAAGTGT	F: AAAGGGCTCATAACGGCACT R: TGTGTGGTCGATGGTGTCTG
foxl2a	NC_007126.7 7054447-7054695	F: TTTGTTTTGTTTTGAATGGGGATT R*: TCTCCCACCAACTCTAAAATACACAAATT	F : CATCGCTAAGCCAAGTAGCC R: AGGGCCCAATTATTCACTCC

dmrt1	NC_007116.7 44944800-44944918	S: TGTTTTGAATGGGGATTA F: AGGAGAGAGGGGAAAGATAG R*: AATTTTTTCCCTCTTCAAATATAATTTCAC	F: AAGTCCTGCAATGTCCAGCA R: GGAGGAGTATGGAGTGGGCT
foxl2b	NC_007113.7 58257650-58257750	S: GAGGGGAAAGATAGG F : GGATTGTTTTGGATTGTTGTAAGG R* : CTTTCCTCACTTCTCTCTTCTATTTTACC	F : GCCTGCGAGGATATGTTCGA R : GTTCATGAAGCCCGACTGGA
pdgfrb	NC_007125.7 3229650-3229800	S : GGAAAAATATAAATATAAAGTGTTA F* : GGGAAATGAGATGGATTTTGGTAG R : ACATTTTCCATTTTTCCCCAATT S : CCATTTTTCCCCAATTTA	F : ATCCCCATCCCTGATCCCAA R: TTCCAGAGTGTTCGGTCAGC
aspa			F: CCGCTATGAGTTCGCGTACT R: GTGTCGATGTACCTGGTGCA
pdia6			F: CTCTCCTGTGGATGAGGGGA R: GTGTGCGTGTGTGAGAGAGA

V.2.2.4 RT-qPCR analysis

Gene transcription was measured by RT-qPCR as explained in Guirandy et al., 2022a. The mean Ct value of the two genes (*aspa*, *pdia6*) not impacted by irradiation in this study was used as reference. Primers used are available in Tableau V- 1.

V.2.2.5 Steroid extraction and cortisol measurement

Steroid extraction was done as explain by Guirandy et al., 2022a and Sadoul and Geffroy, 2019. After sample evaporation under nitrogen at 40°C, cortisol measure was performed with Cortisol ELISA Kit Neogen, according to manufacturer's guidelines.

V.2.2.6 Statistical analysis

For all measured parameters data are presented as mean values ± SE, with significance taken as $p < 0.05$. Irradiation effect on cortisol and gene transcription levels were assessed using Anova and with BoxCox transformation when normality and homoscedasticity of the error terms were not verified. When assumptions were not met after transformation, a non-parametric test was used (kruskal wallis). For parametric and non-parametric test, TukeyHSD and Dunnet test with Bonferroni correction were used respectively as post hoc test. Irradiation effect on F0 methylation and sex differentiation for F0 and F1 methylation were assessed using GLM with binomial distribution. Irradiation effect on F1 methylation was assessed using a GLMM (Generalized Linear Mixed Model, glmm function in R), with binomial distribution and with spawn as a random effect as explained by Guirandy et al., 2022b. The analyses were performed using R software (R Core Team, 2021) with the following packages :

"tidyverse", "here", "knitr", "lme4", "MASS","car". Figures were produced using the package "ggplot2".

V.2.3 Results

As a reminder, our previous study (Guirandy et al., 2022b) highlighted male-biased sex ratio on F1 generation after F0 exposure and F1 exposure at 5 mGy.h^{-1}, but also after non-irradiated F1 (recovery). Sex-ratio (female percent) was 68%, 17% and 37% for F1 control, F1 irradiated and F1 recovery, respectively.

V.2.3.1 F0 female gonads cortisol

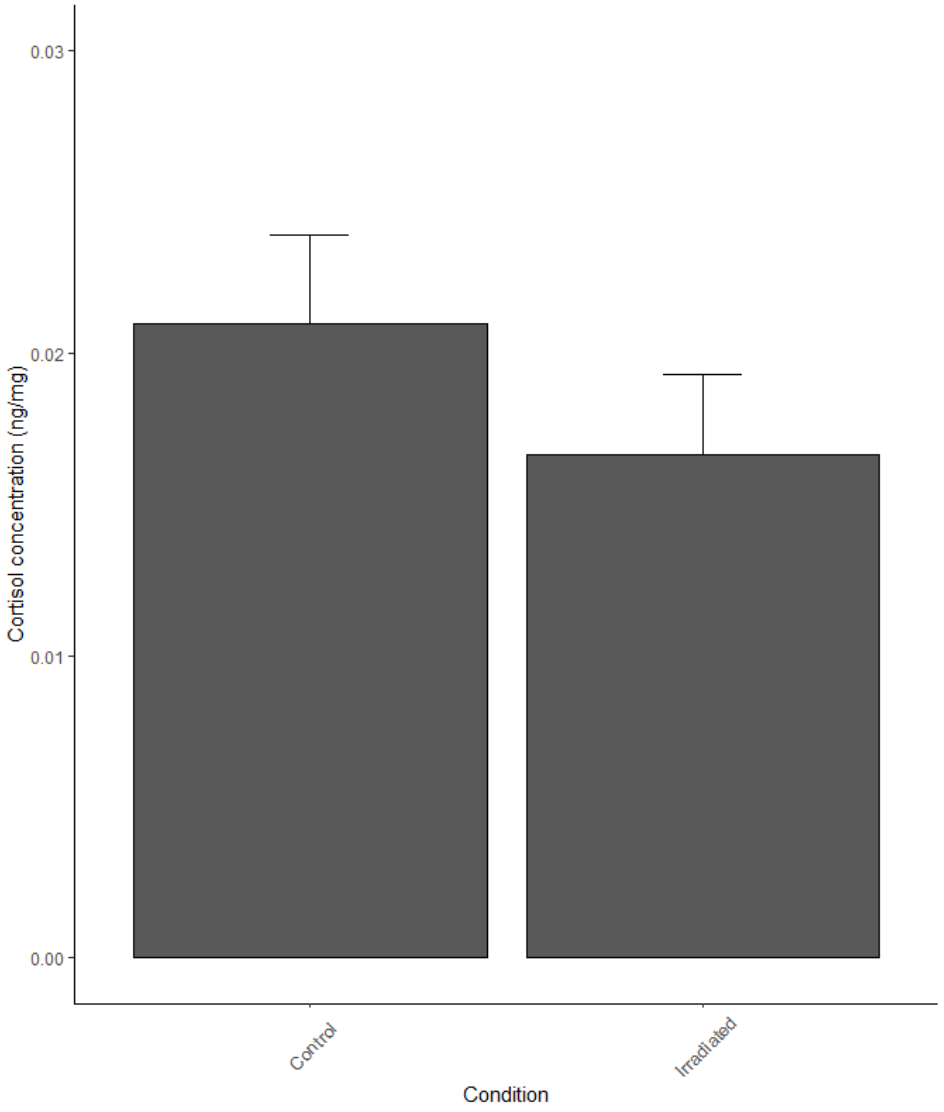


Figure V- 2 : Bar plot of F0 ovaries cortisol concentration after control and exposure to 5 mGy.h^{-1} (irradiated). n=14 and n=8 for control and irradiation groups, respectively.

Cortisol concentration in F0 female gonads after exposure to 5 mGy.h^{-1} gamma irradiation (Figure V- 2) reached 0.021 ng.mg^{-1}±0.003 and 0.017 ng.mg^{-1}±0.003 for control and irradiated groups, respectively. No statistical difference was observed between conditions.

V.2.3.2 Evidence of sex differentiation at methylation levels

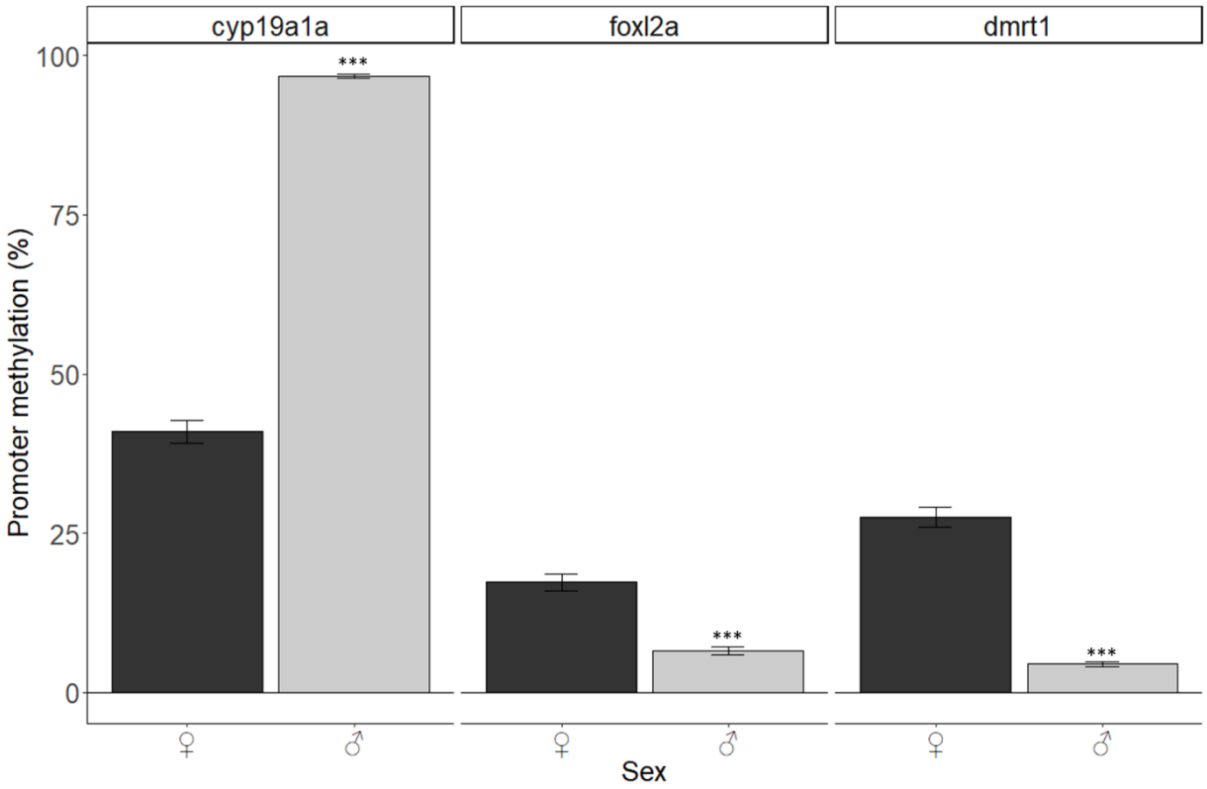


*Figure V- 3 : Barplot of DNA methylation at different CpG sites of specific promoter genes for males and females. For each sex, all individuals from F0 and F1 control groups were considered. N = 22. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).*

Considering control individuals of the two generations, a significant difference was observed between females and males for the three genes studied (Figure V- 3). Indeed, a higher average methylation percent was found in males for *cyp19a1a* (♀:41.0%±1.8; ♂: 96.7%±0.3). Conversely, average methylation percent of males was significantly lower for *foxl2a* (♀: 17.3%±1.4; ♂: 6.6%±0.6) and *dmrt1* (♀: 27.6%±1.6; ♂: 4.5%±0.4).

V.2.3.3 Female gonad promoter methylation and gene transcription levels after gamma irradiation

Analysis were also performed on F0 and F1 male gonads but no significant difference was observed (data not shown).

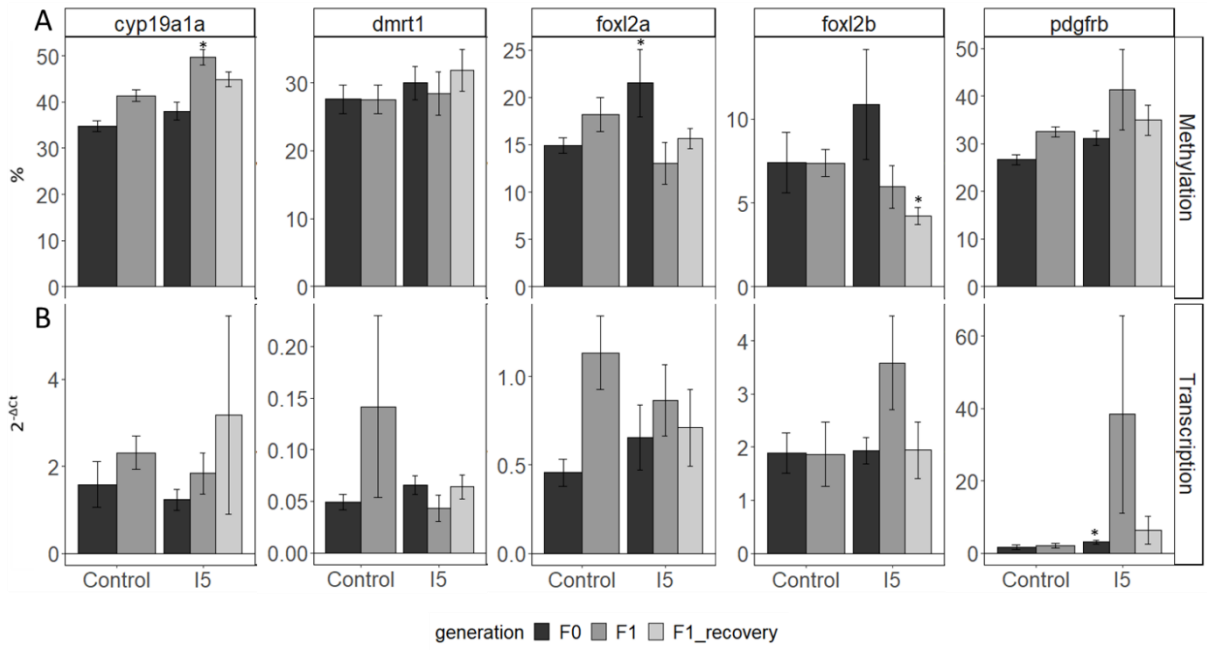


*Figure V- 4 : DNA methylation and RNA transcription levels after irradiation at 5 mGy.h^{-1} and control. (A): Barplot of average DNA methylation (%) of genes for control and irradiated female fish. N = 6, 4, 16, 6 and 8 for F0-ontrol, F0-I5, F1-control, F1-I5 and F1-I5 recovery, respectively. (B) Barplot of RNA transcription level (a.u.) for control and irradiated female fish. N = 8, 7 6, 4 and 9 for F0-control, F0-I5, F1-control, F1-I5 and F1-I5 recovery, respectively. Colours correspond to the generation (F0 in black and F1 in grey). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), compared to control group.*

Figure V- 4A showed the average methylation level of gene involved in sex determination. For *cyp19a1a*, no difference was observed after gamma irradiation at the F0 generation (black bar, control = 34.80% ± 1.14; irradiated = 38.01% ± 1.97). However, hypermethylation was observed for F1 generation after irradiation (grey bar control = 41.38% ± 1.33; irradiated = 49.67% ± 1.73). This effect was not observed for F1 recovery (44.88% ± 1.61). Nevertheless, no difference was observed among F1 irradiated and recovery groups. For *dmrt1* and *pdgfrb* genes, no significant variation was observed whatever the generation. For the two *foxl2* genes, an increase in methylation in F0 generation was observed (black bar, *foxl2a*: control = 14.92% ± 0.82; irradiated = 21.52% ± 3.55; *foxl2b*: control = 7.41% ± 1.80; irradiated = 10.88% ± 3.28). However, this variation was only statistically significant for *foxl2a*. Conversely, a decrease trend in methylation was observed for these two genes in the next generation (F1, grey bar *foxl2a*: control = 18.21% ± 1.81; irradiated =13.02% ± 2.24, recovery = 15.66% ± 1.05; *foxl2b*: control = 7.37% ± 0.82; irradiated = 5.95% ± 1.26; recovery = 4.22% ± 0.52.). However, this hypomethylation was only significant in recovery group for the *foxl2b* gene. Figure V- 4B showed the RNA transcription levels of these latter genes. An effect of irradiation was observed only for *pdgfrb* at the F0 generation, showing an overexpression (control: 1.55 ± 0.65; irradiated: 3.03 ± 0.52).

V.2.4 Discussion

Offspring (F1) effects from exposed genitors raise real questions about wild irradiated population fate. Guirandy et al., 2022b showed male-biased sex ratio in F1 offspring linked to potential transmitted effects since Recovery group without F1 embryo irradiation was also impacted. To our knowledge, it is the first time that such effect was observed after irradiation. Another study (Kamstra et al., 2018), with similar objectives, did not show this effect. Nevertheless, F0 reproduction was done one year after irradiation stop and Guirandy et al., 2019 showed recovery of offspring effects over time after placing irradiated genitors in a non-irradiating zone.

Here, we showed similar results at molecular scale for male-biased sex ratio since no difference was observed between recovery and irradiated group for all analyses. This suggest that male-biased sex ratio is induced by adult genitor irradiation rather than offspring irradiation. These results and those obtained in Pierron et al., 2021 after cadmium exposure showed that biased sex ratio did not only occur when sex determination window (around 21 dpf) was exposed as previously observed (Piferrer, 2013; Piferrer and Anastasiadi, 2021; Santos et al., 2017).

V.2.4.1 5mGy.h^{-1} irradiation did not induce change in cortisol production in F0 female gonad

Cortisol, the main stress hormone (Sadoul and Geffroy, 2019), is transmitted from mother to embryo and is involved in proper offspring development (Faught and Vijayan, 2018; Nesan and Vijayan, 2016, 2012). Cortisol is also suspected to impact sex determination by inducing gonadal steroid production disruption (Geffroy and Bardonnet, 2016; Hayashi et al., 2010). However, F0 female gonad cortisol concentration was not impacted after gamma irradiation at 5 mGy.h^{-1}. First, studies suggest that cortisol level after acute exposure is relevant but is attenuated after chronic exposure as observed here (Cohen et al., 2012; Ribas et al., 2017b; Van Weerd and Komen, 1998). Secondly, 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (*hsd11b2*) is involved in cortisol regulation by converting cortisol into cortisone, its physiologically inert metabolite (Faught et al., 2016; Sadoul and Geffroy, 2019). Since this enzyme was up regulated (log2FoldChange = 1.22, p.adj <0.01) in F0 female gonad (RNA-sequencing data, not shown), it could be an explication of non-effect on cortisol production, stress level being correctly managed by organisms.

V.2.4.2 Evidence of sex-specific DNA methylation levels in zebrafish

As observed in Figure V- 3, *cyp19a1a* and *dmrt1* methylation levels showed different methylation levels between females and males as observed by Navarro-Martín et al., 2011 and Pierron et al., 2021. These differences were also observed on transcription

levels of these genes (Anastasiadi et al., 2018; Pierron et al., 2021). Several studies did not show sex-specific methylation for *foxl2a* (Anastasiadi et al., 2018; Piferrer et al., 2019). However, sex-specific expression of *foxl2* was observed in many teleosts (Yang et al., 2017) and as in our study, Pierron et al., 2021 also reported significant differences in *foxl2a* methylation levels between males and females . Moreover, *dmrt1* and *foxl2a* were highly methylated in female gonads compared to male gonads. Pierron et al., 2021 highlighted that methylation/transcription pattern of *foxl2a* was different from what is expected in literature (i.e, hypomethylation leads to down-regulation). Taking this into account, our results on females confirm the antagonistic role of these two genes in maintaining sexual phenotype of gonads (Huang et al., 2017; Li et al., 2018). Sexual effect of these gene methylations confirmed their involvement in sexual differentiation and their interest in the study of sex determinism.

V.2.4.3 Irradiation dysregulated methylation marks in zebrafish sex determination promoter genes

As early embryonic development is principally dependent on maternal transcripts, only female gonads were analysed (Laing et al., 2018). Moreover, for genes previously mentioned, no effect was showed on methylation marks in males, as observed by (Navarro-Martín et al., 2011; Pierron et al., 2021).

No effect on *dmrt1* and *pdgfrb* methylation was observed for all generations after irradiation. *foxl2a* hyper-methylation was observed after exposure to irradiation in F0 generation, whereas *foxl2b* hypo-methylation was observed in F1 generation for the recovery group. Pierron et al., 2021 showed that *foxl2a* hypo-methylation in F0 female gonads after cadmium (Cd) exposure was correlated with sex ratio at the next generation. More precisely, Cd exposure induced hypo-methylation of *foxl2a* in female gonads. This hypo-methylation was associated to a progressive feminization of the population across generations. As in our study, no effect of Cd was observed in males and despite a significant effect of Cd was observed on the methylation level of *foxl2a* in female gonads at the (exposed) F0 generation, an effect of Cd on the sex ratio was observed only from the (unexposed) F1 generation. In our case, irradiation induced a hyper-methylation of *foxl2a* in F0 female gonads. This hyper-methylation was associated with a masculinization of the population at the next generation. Our results seemed to confirm the relationship between the methylation level of *foxl2a* in female gonads and the sex ratio of their offspring. Same trend was observed for *foxl2b*, without significant difference, probably due to high individual variability. *cyp19a1a* hyper-methylation was observed in F1 female gonad after irradiation. Since this enzyme converts androgen to estrogen, altered steroid synthesis in favour of males, as explain above, could explain masculinization (Piferrer, 2013). However, no effect on reproductive performances was observed although aromatase methylation was impacted by irradiation (Guirandy et al., 2022b). As a matter of fact, several studies suggested that aromatase (*cyp19a1a*) plays a key role in sex determination

(Angelopoulou et al., 2012; Kossack and Draper, 2019; Pierron et al., 2021). In support of that, correlation was observed between F1 *cyp19a1a* methylation and F1 sex ratio (R^2=0.99, non-significant, SD Figure V- 1), as observed by Pierron et al., 2021. Finally, *foxl2a* is required for oogenesis maintenance rather than its initiation (Kossack and Draper, 2019) which suggests that *cyp19a1a* methylation and its transcription is the initiating event.

No effect of irradiation on *foxl2a* and *cyp19a1a* transcription was observed in F0 and F1 generations, respectively, while an effect on methylation was observed for these genes as observed in Pierron et al., 2021. Non-impacted transcription could be explained by stage of dissection (i.e, adult mature fish). Thus, it would be necessary to measure both transcription and methylation levels during the sex determination window in order to strengthen the link between DNA methylation and sex determination (Yang et al., 2017).

Here, sex ratio was assess based on only three genetically different populations (i.e, three spawning genitors) from zebrafish AB strain. However, this strain allows production of genetically closed individuals. Moreover, as molecular effects going in the same direction as Pierron et al., 2021, using more genetic background, we can still deduce an evident irradiation effect on sex determination. Since no sex reversal is observed in mature zebrafish (Santos et al., 2017), it is not aberrant that there was only altered sex ratio on F1 even if molecular effects were observed on F0 (Valdivieso et al., 2020). Thus, these results suggested transmitted epigenetic effects from genitors to offspring. Epigenetic mark inheritance had been already observed after exposure to gamma irradiation (Kamstra et al., 2018). This is supported by the fact that epigenetic marks are not erased in zebrafish and could be inherited via germ cells (Ortega-Recalde et al., 2019; Valdivieso et al., 2020), notably in the case of *foxl2a* (Pierron et al., 2021).

In several species, F0 female gonad contain molecules used for F1 future germ line (Dosch, 2015; Lehmann and Ephrussi, 1994). Since Guirandy et al., 2022a showed an irradiation impact on many maternal factors, altered methylation levels may not be the only cause of male-biased sex ratio. Especially, maternal factors irradiation could alter proper primordial germ cells proliferation and migration or induced their apoptosis (Tzung et al., 2015; Zhou et al., 2018) leading to masculinization, since, in zebrafish, gonads above maturity were "ovary-like" (Kossack and Draper, 2019).

V.2.5 Conclusion

This study aims to identify mechanisms involved in male biased sex ratio after exposure to gamma irradiation on F0 and F1 generations. Similar molecular results,

whether the F1 were irradiated or not (recovery), suggested that the phenotype would be induced by genitor irradiation. Two hypotheses were assessed in order to explain male-biased sex ratio. First, cortisol levels were not impacted in F0 female gonad after irradiation. However, hsd11b2 enzyme was up-regulated to compensate potential excess cortisol. Thus, it would be necessary to measure all cortisol metabolites. Secondly, irradiation effects were observed in promoter methylation of three genes involved in sex determination (*cyp19a1a*, *foxl2a*, *foxl2b*) which presented sex-specific methylation levels. As previously suggested, *cyp19a1a* seemed to be the initiating event in male-biased sex ratio. Since epigenetic marks are inherited in zebrafish, effects could be carried over to subsequent generations via germ line. However, we cannot affirm at this stage that male-biased sex ratio is only due to epigenetic inheritance. These results showed that short-term exposure to irradiation can have long-term effect on populations by modifying the sex ratio through epigenetic modifications but also maternal factors. Finally, simple short-term exposures are insufficient to assess population trajectory since effects in genitor alter their offspring.

V.2.6 References

Anastasiadi, D., Vandeputte, M., Sánchez-Baizán, N., Allal, F., Piferrer, F., 2018. Dynamic epimarks in sex-related genes predict gonad phenotype in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination. Epigenetics 13, 988–1011. https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1529504

Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolakou, P., 2012. Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? Reproductive Biology and Endocrinology 10, 13. https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-13

Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., Mennigen, J.A., 2018. Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 50 Years of Comparative Biochemistry: The Legacy of Peter Hochachka 224, 210–244. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006

Bulmer, M.G., Bull, J.J., 1982. MODELS OF POLYGENIC SEX DETERMINATION AND SEX RATIO CONTROL. Evolution 36, 13–26. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1982.tb05005.x

Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W.J., Miller, G.E., Frank, E., Rabin, B.S., Turner, R.B., 2012. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 5995–5999. https://doi.org/10.1073/pnas.1118355109

Dosch, R., 2015. Next generation mothers: Maternal control of germline development in zebrafish. Crit Rev Biochem Mol Biol 50, 54–68. https://doi.org/10.3109/10409238.2014.985816

Faught, E., Best, C., Vijayan, M.M., 2016. Maternal stress-associated cortisol stimulation may protect embryos from cortisol excess in zebrafish. R Soc Open Sci 3, 160032. https://doi.org/10.1098/rsos.160032

Faught, E., Vijayan, M., 2018. Maternal stress and fish reproduction: The role of cortisol revisited. Fish and Fisheries. https://doi.org/10.1111/FAF.12309

Geffroy, B., Bardonnet, A., 2016. Sex differentiation and sex determination in eels: consequences for management. Fish and Fisheries 17, 375–398. https://doi.org/10.1111/faf.12113

Geffroy, B., Besson, M., Sánchez-Baizán, N., Clota, F., Goikoetxea, A., Sadoul, B., Ruelle, F., Blanc, M.-O., Parrinello, H., Hermet, S., Blondeau-Bidet, E., Pratlong, M., Piferrer, F., Vandeputte, M., Allal, F., 2021. Unraveling the genotype by environment interaction in a thermosensitive fish with a polygenic sex determination system. Proc Natl Acad Sci U S A 118, e2112660118. https://doi.org/10.1073/pnas.2112660118

Guirandy, N., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Pierron, F., Gonzalez, P., Simon, O., 2022. Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish. Aquatic Toxicology 244, 106101. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106101

Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Houdigui, S.M.E., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environmental Toxicology and Chemistry 38, 2556–2567. https://doi.org/10.1002/etc.4562

Hattori, R.S., Castañeda-Cortés, D.C., Arias Padilla, L.F., Strobl-Mazzulla, P.H., Fernandino, J.I., 2020. Activation of stress response axis as a key process in environment-induced sex plasticity in fish. Cell. Mol. Life Sci. 77, 4223–4236. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03532-9

Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T., 2010. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Mol Reprod Dev 77, 679–686. https://doi.org/10.1002/mrd.21203

Huang, S., Ye, L., Chen, H., 2017. Sex determination and maintenance: the role of DMRT1 and FOXL2. Asian J Androl 19, 619–624. https://doi.org/10.4103/1008-682X.194420

Kamstra, J.H., Hurem, S., Martin, L.M., Lindeman, L.C., Legler, J., Oughton, D., Salbu, B., Brede, D.A., Lyche, J.L., Aleström, P., 2018. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. Sci Rep 8, 15373. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33817-w

Kossack, M.E., Draper, B.W., 2019. Chapter Four - Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (Danio rerio), in: Capel, B. (Ed.), Current Topics in Developmental Biology, Sex Determination in Vertebrates. Academic Press, pp. 119–149. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.02.004

Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Mill, J., Santos, E.M., 2018. Sex-specific transcription and DNA methylation profiles of reproductive and epigenetic associated genes in the gonads and livers of breeding zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 222, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.004

Lehmann, R., Ephrussi, A., 1994. Germ plasm formation and germ cell determination in Drosophila. Ciba Found Symp 182, 282–296; discussion 296-300. https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch16

Li, R., Zhang, L., Li, W., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, M., Zhao, L., Hu, X., Wang, S., Bao, Z., 2018. FOXL2 and DMRT1L Are Yin and Yang Genes for Determining Timing of Sex Differentiation in the Bivalve Mollusk Patinopecten yessoensis. Front Physiol 9, 1166. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01166

Lu, J., Li, W., Hu, R., Zhou, Y., Fei, Y., Zhang, Y., Zhai, W., Chen, L., 2022. Molecular and morphological changes in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) gonads during high-temperature-induced masculinization. Aquaculture Research 53, 921–931. https://doi.org/10.1111/are.15633

Mizoguchi, B.A., Valenzuela, N., 2016. Ecotoxicological Perspectives of Sex Determination. SXD 10, 45–57. https://doi.org/10.1159/000444770

Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Croce, L.D., Piferrer, F., 2011. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. PLOS Genetics 7, e1002447. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2016. Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish. Sci Rep 6, 22582. https://doi.org/10.1038/srep22582

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2012. Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. Molecular and Cellular Endocrinology 363, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.07.010

Norrgren, L., 2012. Fish models for ecotoxicology. Acta Vet Scand 54, S14. https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-S1-S14

Ortega-Recalde, O., Day, R.C., Gemmell, N.J., Hore, T.A., 2019. Zebrafish preserve global germline DNA methylation while sex-linked rDNA is amplified and demethylated during feminisation. Nat Commun 10, 3053. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10894-7

Pierron, F., Daffe, G., Lambert, P., Couture, P., Baudrimont, M., 2019. Retrotransposon methylation and activity in wild fish (A. anguilla): A matter of size. Environmental Pollution 245, 494–503. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.014

Pierron, F., Lorioux, S., Héroin, D., Daffe, G., Etcheverria, B., Cachot, J., Morin, B., Dufour, S., Gonzalez, P., 2021. Transgenerational epigenetic sex determination: Environment experienced by female fish affects offspring sex ratio. Environmental Pollution 277, 116864. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116864

Piferrer, F., 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. Developmental Dynamics 242, 360–370. https://doi.org/10.1002/dvdy.23924

Piferrer, F., Anastasiadi, D., 2021. Do the Offspring of Sex Reversals Have Higher Sensitivity to Environmental Perturbations? Sex Dev 15, 134–147. https://doi.org/10.1159/000515192

Piferrer, F., Anastasiadi, D., Valdivieso, A., Sánchez-Baizán, N., Moraleda-Prados, J., Ribas, L., 2019. The Model of the Conserved Epigenetic Regulation of Sex. Front Genet 10, 857. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00857

R Core Team, R.C.T., 2021. R: A language and environment for statistical ## computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW Document]. URL URL https://www.R-project.org/

Ribas, L., Valdivieso, A., Díaz, N., Piferrer, F., 2017. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. Journal of Experimental Biology 220, 1056–1064. https://doi.org/10.1242/jeb.144980

Sadoul, B., Geffroy, B., 2019. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. Journal of Fish Biology 94, 540–555. https://doi.org/10.1111/jfb.13904

Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. Aquatic Toxicology 191, 141–163. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.005

Schmahl, J., Rizzolo, K., Soriano, P., 2008. The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages. Genes Dev 22, 3255–3267. https://doi.org/10.1101/gad.1723908

Shao, C., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Lian, J., Hu, Q., Sun, B., Jin, L., Liu, S., Wang, Z., Zhao, H., Jin, Z., Liang, Z., Li, Y., Zheng, Q., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, G., 2014. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. Genome Res 24, 604–615. https://doi.org/10.1101/gr.162172.113

Tzung, K.-W., Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E.K., Orbán, L., 2015. Early Depletion of Primordial Germ Cells in Zebrafish Promotes Testis Formation. Stem Cell Reports 4, 61–73. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.011

Valdivieso, A., Ribas, L., Monleón-Getino, A., Orbán, L., Piferrer, F., 2020. Exposure of zebrafish to elevated temperature induces sex ratio shifts and alterations in the testicular epigenome of unexposed offspring. Environmental Research 186, 109601. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109601

Van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 120, 107–112. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10017-X

Webster, K.A., Schach, U., Ordaz, A., Steinfeld, J.S., Draper, B.W., Siegfried, K.R., 2017. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish. Developmental Biology 422, 33–46. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.008

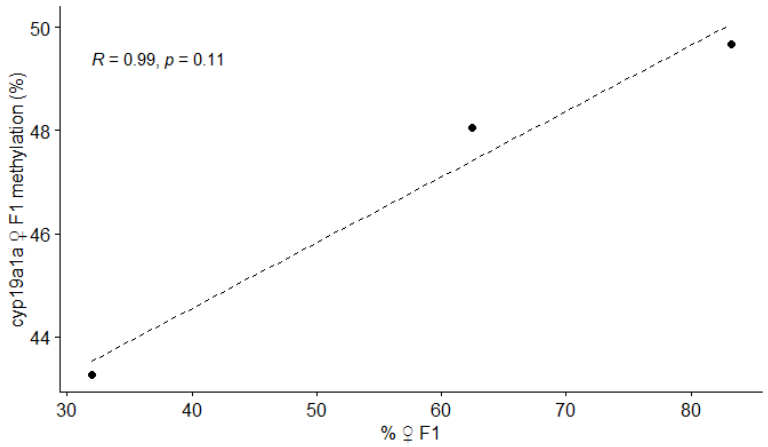
Wedekind, C., 2017. Demographic and genetic consequences of disturbed sex determination. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 372, 20160326. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0326

Wilson, C.A., High, S.K., McCluskey, B.M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T.A., Anderson, J.L., Batzel, P., Carvan, M.J., III, Schartl, M., Postlethwait, J.H., 2014. Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. Genetics 198, 1291–1308. https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284

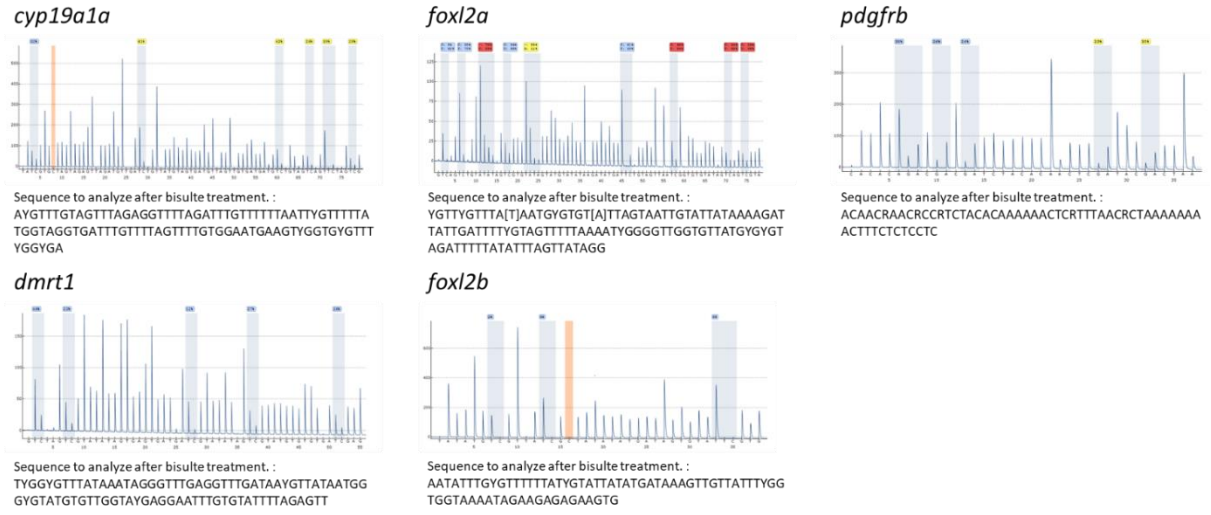
Yang, Y.-J., Wang, Y., Li, Z., Zhou, L., Gui, J.-F., 2017. Sequential, Divergent, and Cooperative Requirements of Foxl2a and Foxl2b in Ovary Development and Maintenance of Zebrafish. Genetics 205, 1551–1572. https://doi.org/10.1534/genetics.116.199133

Zhou, L., Feng, Y., Wang, F., Dong, X., Jiang, L., Liu, C., Zhao, Q., Li, K., 2018. Generation of all-male-like sterile zebrafish by eliminating primordial germ cells at early development. Sci Rep 8, 1834. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20039-3

V.2.7 Appendix A. Supplementary material.



SD Figure V- 1 : correlation between female F1 percent and cyp19a1a methylation percent at the same generation using pearson test.



SD Figure V- 2 : Examples of pyrograms for the five genes from female gonad. For foxl2a, adjusted sequence using two possible nucleotides since polymorphism was observed previously by (Pierron et

al., 2021). For pdgfrb, sequence corresponds to reverse strand. CpG) are represented by an Y (C or T after bisulfite treatment) and by a R for pdgfrb (A or G after bisulfite treatment).

V.3 Synthèse du chapitre

V.3.1 Méthylation de gènes clés dans la détermination du sexe.

Pour rappel, un sexe ratio biaisé en faveur des mâles a été observé chez la descendance F1 pour les deux conditions, irradiée et recovery au débit de dose de 5 $mGy.h^{-1}$, suggérant une origine parentale. Malgré l'absence d'effet phénotypique à la faible dose, la modulation des marques épigénétiques a été étudiée.

V.3.1.1 Effet sur la méthylation à faible débit de dose

Les niveaux de méthylation et de transcription des cinq gènes étudiés (Figure V- 5) ne sont pas impactés par l'irradiation à 0.05 $mGy.h^{-1}$.

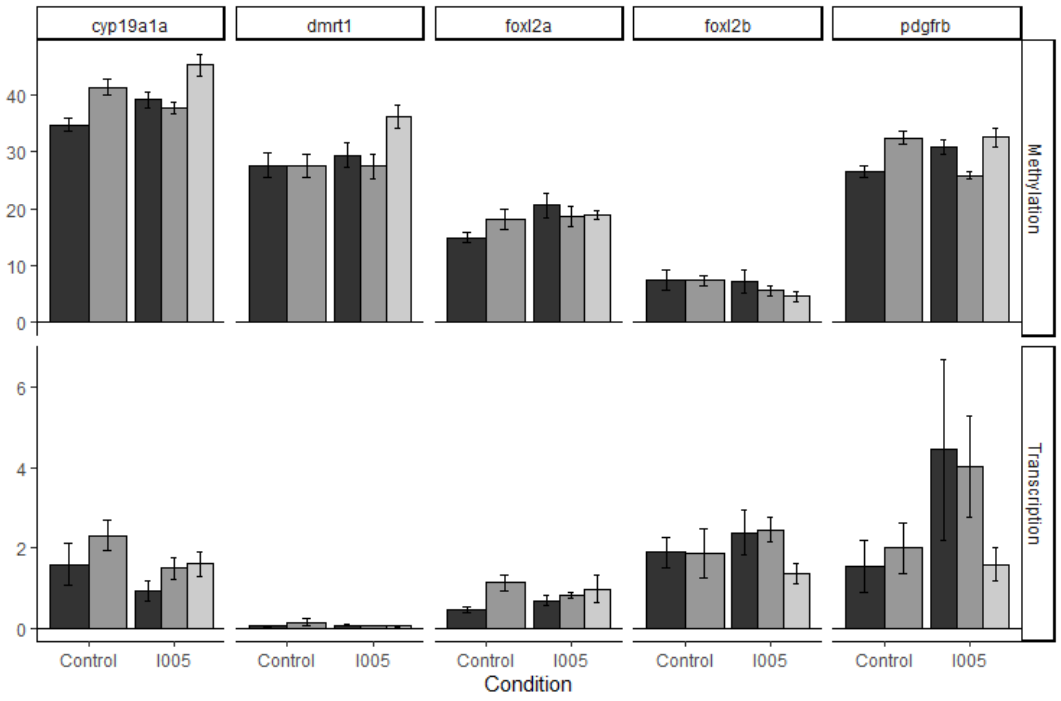


Figure V- 5 : Méthylation de l'ADN(%) et transcription de l'ARN (a.u) dans la condition Control et après irradiation gamma à 0.05 $mGy.h^{-1}$ dans les gonades femelles. Pour la methylation, N = 6, 10, 15, 8 et 8 pour F0-control, F0-I005, F1-control, F1-I005 and F1-I005 recovery, respectivement. Pour la transcription, N = 8, 10, 6, 8 et 8 pour F0-control, F0-I005, F1-control, F1-I005 and F1-I005 recovery, respectivement. Les couleurs correspondent à la génération (F0 en noir et F1 en gris). Aucune différence statistique n'a été mise en évidence.

De notre point de vue, ce constat n'est pas étonnant puisque le sexe ratio n'a pas été altéré pour ce débit de dose. Ainsi, il ne semble pas que l'atteinte moléculaire dans le

cas présent soit plus sensible que l'atteinte à l'échelle individuelle. Dans le cadre des AOPs, ou plus généralement dans le cadre de l'utilisation des biomarqueurs comme outil de diagnostic du risque environnemental, la réponse moléculaire est souvent qualifiée de plus sensible, permettant à cette échelle d'observer des éléments initiateurs d'un phénotype plus tardif. Dans le cas présent, cette approche ne se confirme pas. De plus, l'analyse RNAseq a mis en évidence seulement 33 gènes dérégulés, ce qui semble confirmer que peu d'évènements se passent à l'échelle moléculaire dans nos conditions d'exposition.

V.3.1.2 Effet sur la méthylation dans les gonades mâles

Dans le chapitre précédent, une implication paternelle a été évoquée en plus de l'implication maternelle pour expliquer la mortalité de la descendance. Ici, les niveaux de méthylation des gènes de la détermination sexuelle ne sont pas impactés chez les géniteurs mâles F0 ni chez la descendance, quel que soit le débit de dose (Figure V-6). Ainsi, pour l'altération du sexe ratio, il semblerait que l'origine soit maternelle, comme évoquée par Pierron et al., 2021. Les résultats de la publication 4 montrent clairement un effet maternel à 5 mGy.h^{-1} avec une altération des niveaux de méthylation pour *foxl2a* chez les femelles F0 et *cyp19a1a* chez les femelles F1 (Figure V- 4). Ces résultats représentent la moyenne de plusieurs sites de méthylation au niveau des promoteurs.

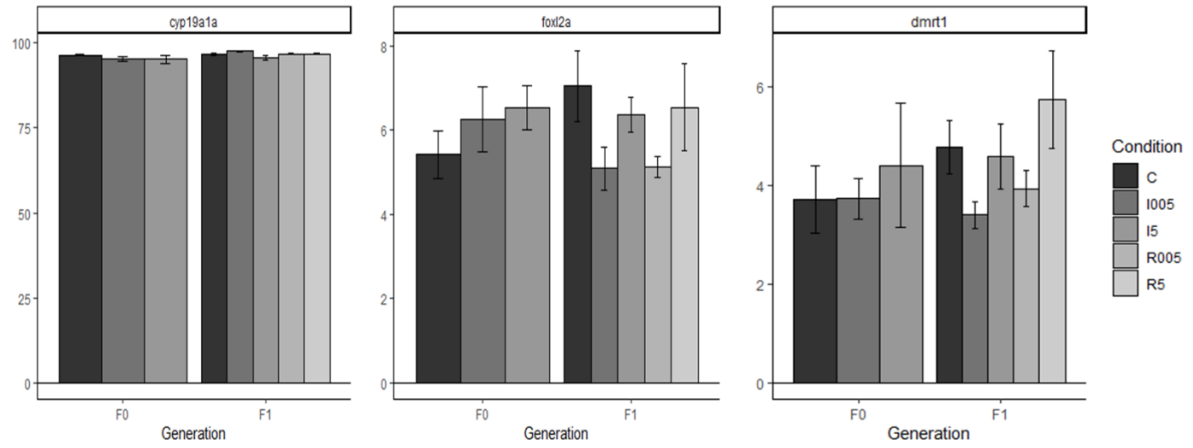


Figure V- 6 : Méthylation de l'ADN dans la condition Control et après irradiation gamma à 0.05 et 5 mGy.h^{-1}dans les gonades mâles. control. N = 6, 10, 4, 8, 16, 10, 7 et 8 pour F0-control, F0-I005, F0-I5, F1-control, F1-I005, F1-I5, F1-I5 recovery and F1-I005 recovery, respectivement. Aucune différence statistique n'a été mise en évidence.

V.3.1.3 Evaluation de la méthode d'analyse

La Figure V- 7 présente les niveaux de méthylation sur les différents sites CpG mesurés pour les deux débits de dose. Après avoir analysé la méthylation sur la moyenne des sites de méthylation sélectionnés, méthode classiquement utilisée, nous avons choisi de vérifier la réponse à l'échelle de chaque site.

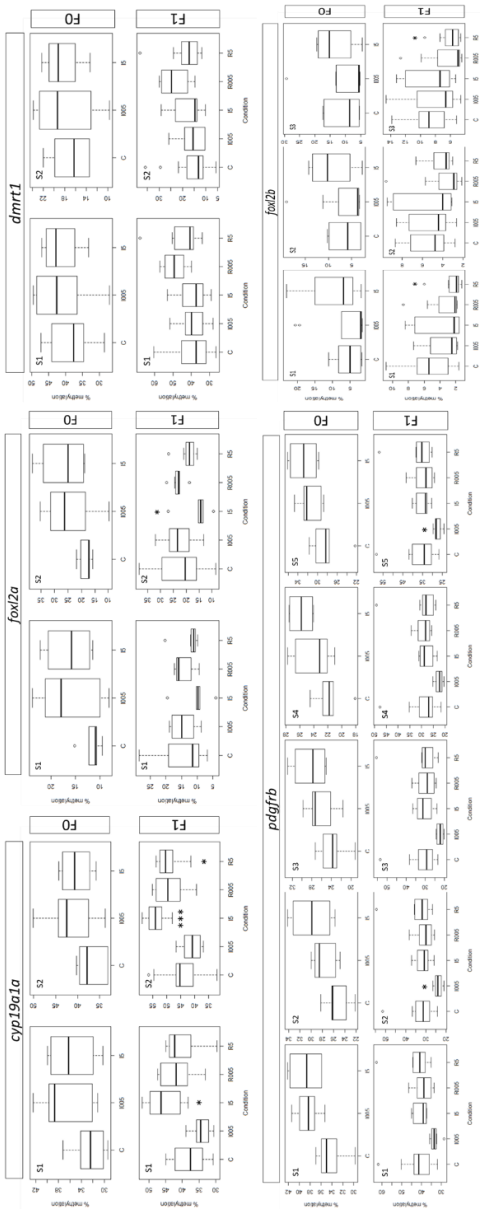


Figure V- 7 : méthylation de l'ADN (%) dans les gonades femelles aux différents sites de méthylation au niveau des promoteurs sur la séquence choisie. S1 = site 1, S2 = site 2, S3 = site 3, S4 = site 4, S5 = site 5.

Pour le gène *pdgfrb*, une hypométhylation a été observée au niveau des sites 2 et 5 pour la génération F1 seulement à 0.05 mGy.h^{-1}. La comparaison des deux débits de dose montre donc que la réponse face au rayonnement n'est pas la même pour un faible débit de dose (0.05 mGy.h^{-1}) par rapport à un débit de dose modéré (5 mGy.h^{-1}). Cependant, les F1 exposés à 0.05 mGy.h^{-1} sont issus d'un même couple reproducteur. Ainsi, cet effet pourrait être alloué au faible background génétique plutôt qu'à l'irradiation. Pourtant, les individus de la condition recovery de ce même débit de dose ne présentent pas la même réponse et tendent vers la réponse des conditions à débit de dose modéré, et contrôle. Ainsi, une exposition prolongée à faible débit de dose semble induire une réponse différente des niveaux de méthylation pour ce gène. La méthode classique d'utiliser des moyennes de plusieurs sites de méthylation (Pierron et al., 2021) pourrait négliger la prise en compte d'effets plus subtiles.

Cependant, les mêmes tendances sont retrouvées entre les différents sites. Les effets retrouvés à l'échelle d'un site pourraient donc être expliqués par des variabilités plus ou moins importantes selon le site. Ce constat est également présent pour *cyp19a1a* pour lequel la condition recovery à 5 mGy.h^{-1} présente une hypométhylation au niveau du site 2 tout comme pour la condition irradiée à ce même débit de dose. Pourtant, la méthylation moyenne de *cyp19a1a* pour la condition recovery à 5 mGy.h^{-1} n'est pas impactée. Pour *foxl2a* chez les F1, cet effet de la variabilité est également montré bien qu'une tendance claire semble se dessiner, avec une hypométhylation uniquement sur le site 2. Cette hypométhylation, masquée par une variabilité de la réponse et soulignée grâce à l'analyse par site unique, présente une information supplémentaire non obtenue par l'analyse moyennée. *foxl2a* chez les F0 présentait au contraire une hyperméthylation avec un lien potentiel avec la masculinisation de la génération suivante. Il semblerait donc que l'effet soit compensé à la génération suivante, laissant penser à une féminisation à la génération F2. Un résultat similaire a déjà été observé après exposition à un phytostérol (Santos et al., 2017). Les cellules souches de la lignée germinale étant très plastiques (Ortega-Recalde et al., 2019) et les marques épigénétiques étant réversibles (Best et al., 2018), il semblerait que la masculinisation ne soit pas fixée au fil des générations. Pour *foxl2b* chez les F1, la même tendance est observée pour tous les sites mais une hypométhylation n'est significative que pour les sites 1 et 3 chez les recovery (5 mGy.h^{-1}). Il est difficile de conclure si seule la condition recovery implique un effet sur la méthylation de ce gène, puisqu'une forte variabilité est observée pour la condition irradiée à 5 mGy.h^{-1}.

De manière générale, nous pouvons remarquer que la variabilité individuelle est élevée et pourrait masquer des effets significatifs à l'échelle de la moyenne. Ainsi, il serait nécessaire d'augmenter les effectifs. Notre approche moyennée a permis de montrer que l'hyperméthylation de *foxl2a* chez les femelles F0 a une incidence sur la génération F1, comme suggéré par Pierron et al., 2021. Ces résultats suggèrent que les marques épigénétiques chez le poisson zèbre ne sont pas effacées comme chez les mammifères (Santos and Dean, 2004). L'hypothèse serait que la lignée germinale ne subisse pas de reprogrammation, permettant de véhiculer les informations épigénétiques à la descendance. Chez les organismes dont la lignée germinale est préformée, la méthylation de l'ADN est gardée en mémoire (Harney et al., 2022; Ortega-Recalde et al., 2019). Particulièrement, les facteurs de transcription sont connus pour véhiculer ce type d'information (Kremsky and Corces, 2020), or *foxl2a* est un facteur de transcription, notamment de *cyp19a1a*. Kremsky and Corces, 2020 suggèrent notamment que les facteurs de transcription peuvent eux-mêmes influencer la méthylation de l'ADN au site de leur liaison. *foxl2a* étant hyperméthylé chez les adultes F0, il se pourrait que ce gène soit également surexprimé pendant le déterminisme sexuel des F1, permettant ainsi un appui pour la méthylation de *cyp19a1a*. Ces hypothèses restent à confirmer, notamment avec une étude de la transcription et de la méthylation de ces gènes au moment de la détermination du sexe (environ 20 jours post-fécondation chez le poisson zèbre (Kossack and Draper, 2019;

Santos et al., 2017)). De plus, la modulation de la méthylation de *foxl2a* en F0 n'est pas retrouvée en F1 suggérant une réversibilité. Finalement, il semblerait que l'origine du phénotype sexe ratio biaisé soit maternelle tout comme évoqué précédemment (Pierron et al., 2021) et que les effets sur la méthylation de l'ADN aient une incidence sur la détermination du sexe de la descendance.

Bien que l'épigénétique semble jouer un rôle clé dans le phénotype observé, montrant ainsi l'implication de ce mécanisme après exposition au rayonnement, la détermination du sexe est sous l'influence de nombreux facteurs et l'épigénétique pourrait ne pas être la seule cause. En effet, la Figure V- 8 montre l'expression des gènes en fonction de la méthylation. Pour un niveau de méthylation similaire, la réponse de l'expression est très variable. Ceci se remarque particulièrement pour les gènes *cyp19a1a* et *pdgfrb* dont la forme du violin-plot se rapproche d'une droite très étendue, suggérant que pour un même niveau de méthylation, plusieurs niveaux d'expression sont rencontrés. Ainsi, le niveau de méthylation du promoteur des gènes ne semble pas expliquer pleinement son expression suggérant d'autres mécanismes sous-jacents. Toutefois, les mesures n'ayant pas été réalisées au moment de l'utilisation de ces gènes, c'est-à-dire au moment de la détermination du sexe, les niveaux d'expression pourraient ne pas refléter totalement son contrôle *via* la méthylation. De plus, une forte variabilité des réponses des niveaux d'expression est observée. Il est nécessaire d'augmenter l'effectif car il est difficile de statuer sur le lien méthylation/expression.

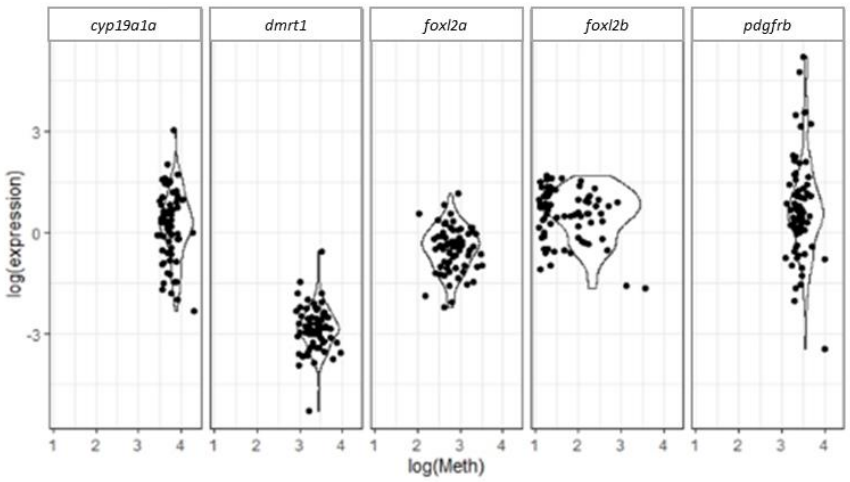


Figure V- 8 : Transcription de l'ARN (a.u) en fonction de la méthylation de l'ADN(%) pour la totalité des individus femelles (toutes générations, toutes conditions).

V.3.2 Mécanismes connexes en lien avec la différenciation sexuelle

V.3.2.1 Rôle Plasma germinatif et des cellules germinales

Pour rappel, l'altération du sexe ratio est retrouvée que la descendance soit irradiée ou non, comme dans le cas de la mortalité, suggérant une origine parentale. De plus, le chapitre précédent ainsi que la modulation des marques épigénétiques suggèrent une forte implication maternelle. Ainsi, comme précédemment démontré, le plasma germinatif (produit à partir du corps Balbiani) peut jouer un rôle prépondérant dans la masculinisation de la descendance. En effet, les cellules germinales primordiales (CGPs) chez le poisson zèbre sont spécifiées par la mère et notamment *via* le plasma germinatif (Aharon and Marlow, 2021; Schwindt, 2015). Après irradiation gamma à 8.7 $mGy.h^{-1}$ de F0 et F1, une perturbation des hormones sexuelles est retrouvée chez les embryons F1 ainsi que des anomalies histologiques des ovocytes, ce qui pourrait affecter la formation des gonades chez les F1 (Hurem et al., 2018b). Dans leur étude, la maturité sexuelle n'a pas pu être atteinte. Il est nécessaire de confronter les résultats des différents stades embryons et adultes, et plus particulièrement après exposition des différents processus biologiques (embryogenèse, détermination sexuelle, différentiation sexuelle, gamétogenèse), précédemment jugés plus sensibles et plus pertinents pour définir les effets de l'irradiation. Ainsi, des analyses transcriptomiques après exposition de ces différents processus chez la descendance devraient être réalisées. Toutefois, ces résultats suggèrent fortement une altération maternelle. Ainsi, dans un premier temps, l'analyse transcriptomique sur les mères F0 pourrait apporter des informations supplémentaires sur les cibles de l'irradiation en lien avec le plasma germinatif et la formation des futures CGPs. Des gènes essentiels pour la survie des CGPs (*vasa*, *nanos*, *dnd*, (Aharon and Marlow, 2021)) ne sont pas dérégulés dans les gonades femelles F0. Cependant, comme expliqué dans le chapitre précédent, les analyses ont été réalisées sur des femelles reproduites ne reflétant donc pas les ovocytes ayant produit la descendance. Il serait nécessaire de réaliser une analyse transcriptomique sur femelles non reproduites afin de comparer les résultats. En revanche, deux gènes moins étudiés, *zp3* (*zp3b* et *zp3c*) et *cxcr4a* (Aharon and Marlow, 2021; Bhat et al., 2021), sont sous exprimés et sont impliqués dans la génération et la migration des CGPs. Ces résultats suggèrent une altération dans l'établissement des cellules germinales et nous encouragent à étudier des stades précoces de l'embryon après irradiation parentale.

V.3.2.2 Voie des stéroïdes

V.3.2.2.1 Cortisol et 11-ketotestosterone

Le cortisol, hormone du stress, est connu pour être impliqué dans des perturbations de la détermination du sexe en altérant la production des stéroïdes (Geffroy and Bardonnet, 2016; Hayashi et al., 2010). Cependant, la Figure V- 2 ne révèle aucun impact sur le niveau de cortisol dans les gonades femelles F0 à 5 $mGy.h^{-1}$. Il semblerait donc que l'irradiation ne puisse pas impacter le niveau de cortisol. Puisque l'exposition et par conséquent le stress, étaient chroniques dans nos deux expérimentations, la question réside dans la gestion du métabolisme du cortisol après ce type d'exposition (Cohen et al., 2012; Ribas et al., 2017b). Ici, la question de la transformation en métabolites secondaires est appuyée par la surexpression du transcrit de l'enzyme 11β-HSD (*hsd11b2*), qui permet la conversion du cortisol en cortisone, le cortisol biologiquement inactif (voir Chapitre I, Faught et al., 2016; Sadoul and Geffroy, 2019). Comme précédemment expliqué (Chapitre IV), une analyse des métabolites secondaires du cortisol permettrait de comprendre les différentes étapes de sa métabolisation après un stress chronique et de conclure sur son implication dans les effets observés. Par ailleurs, il existe un lien étroit entre cortisol et hormones sexuelles. En effet, le cortisol est capable d'inhiber l'aromatase (Bhat et al., 2021; Fernandino et al., 2013; Hattori et al., 2020), ce qui correspond aux résultats trouvés précédemment avec une diminution de la transcription de l'aromatase due à son hyperméthylation. Il semblerait donc qu'il y ait deux mécanismes agissant potentiellement sur l'aromatase, son facteur de transcription *foxl2a* et le cortisol. Par ailleurs, le cortisol induit la synthèse de 11-ketotestosterone via l'enzyme 11β-HSD (Bhat et al., 2021; Fernandino et al., 2013). Ainsi, une augmentation des androgènes, suite audéfaut de l'aromatase pourrait être à l'origine de la masculinisation face à un stress chronique comme dans notre cas, avec une perturbation des gènes des voies féminines (dont l'aromatase) (Fernandino et al., 2013). Une perturbation de la voie des œstrogènes a déjà été mise récemment en évidence après exposition aux rayonnements (Leung et al., 2021). L'hypothèse d'une induction de la synthèse de 11-ketotestosterone est apparue sur la fin de ce projet de thèse. Ainsi, nous avons réalisé un test ELISA (11-keto Testosterone ELISA Kit, Cayman chemical) sur des échantillons restants. L'analyse n'a pas pu être optimisée mais des premiers résultats supposent une tendance à l'augmentation de cette hormone dans les gonades femelles F0 après irradiation à 5 $mGy.h^{-1}$. En effet, la Figure V- 9 présente une légère augmentation par rapport à la condition contrôle bien qu'aucune différence statistique n'ait été révélée. Ici encore, la forte variabilité individuelle pourrait masquer un effet. Point important dans cette première analyse, 83% des individus contrôles présentent une concentration inférieure à la limite de détection du kit contre 50% seulement pour les individus irradiés. Une mise au point est nécessaire afin d'être en adéquation avec la gamme de concentrations recommandée par le kit, mais ce premier résultat semble montrer des concentrations plus élevées en 11-ketotestosterone chez les individus irradiés.

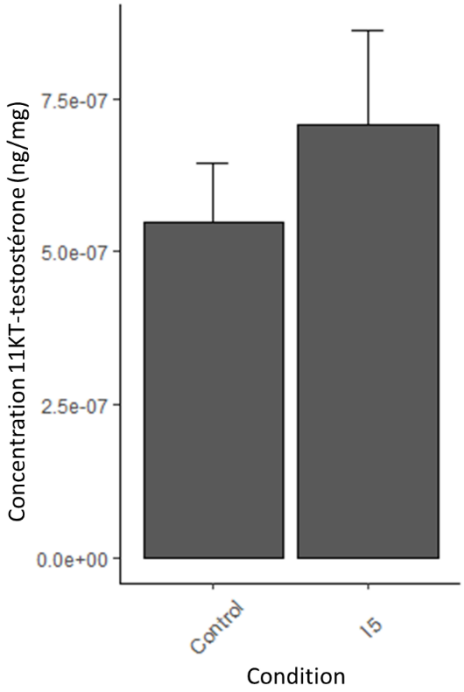


Figure V- 9 : Concentration en 11- ketotestostérone dans les gonades femelles F0 pour les conditions contrôle et exposé à 5 mGy.h^{-1}. n=6.

Sur la base de ces données, nous proposons comme premier schéma explication, que la masculinisation induite par l'irradiation puisse être considérée comme une conséquence de l'inactivation du cortisol en cortisone et de la synthèse concomitante de 11-ketotestosterone (Figure V- 9).

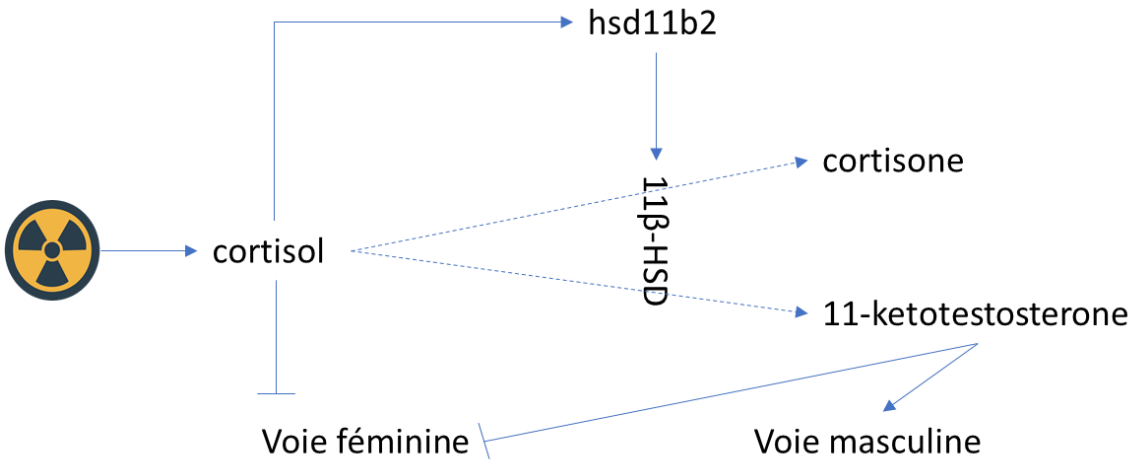


Figure V- 10 : schéma conceptuel de la masculinisation induite par un excès de cortisol dans un contexte de stress chronique. Les flèches pleines représentent les hypothèses testées, les flèches pointillées représentent l'hypothèse du métabolisme du cortisol à tester. Adaptation d'après Fernandino et al., 2013.

V.3.2.2.2 Métabolisme énergétique

Les stéroïdes, dont le cortisol, sont également impliqués dans le métabolisme énergétique.

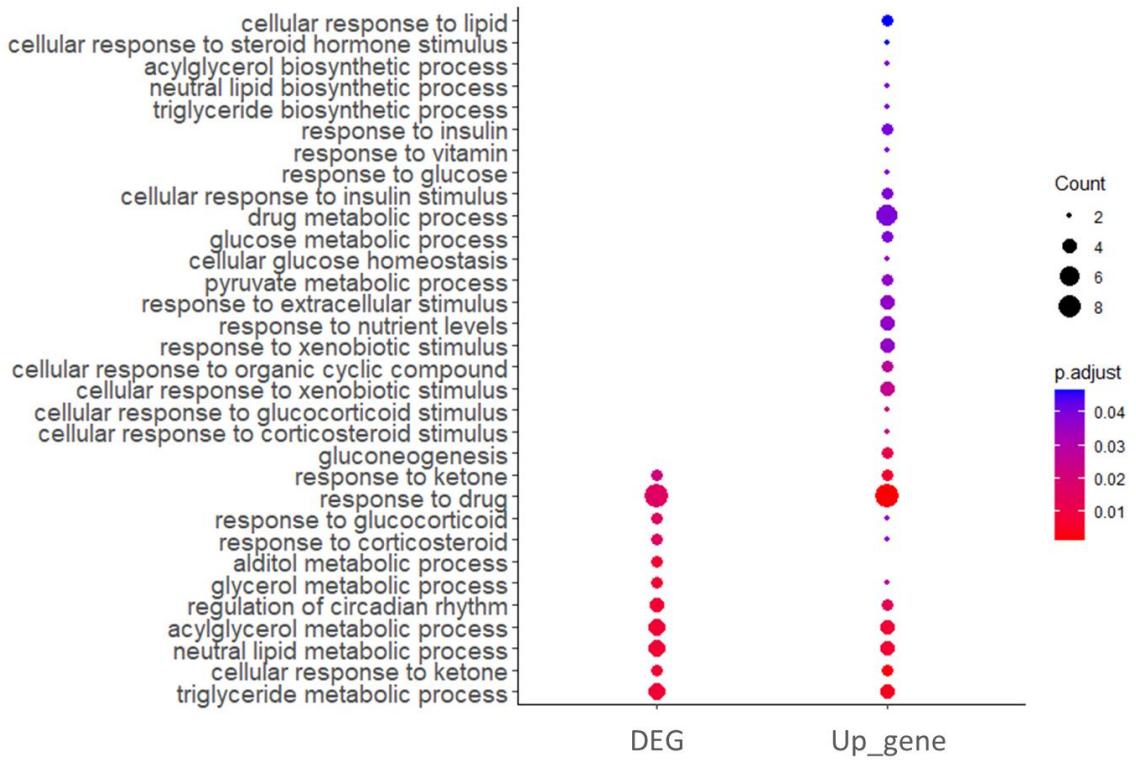


Figure V- 11 : (A) Dot plot de GO (Gene Ontology) term enrichis sélectionnés à partir des gènes différentiellement exprimés (DEG, FDR <0.05) et sur-exprimés (Up_gene, |log2fold change| ≥ 1 and FDR < 0.05) dans les gonades femelles F0 irradiées. La couleur indique les p-values issues du test exact de Fisher, and la taille des points correspond au nombre de gènes consistuant la voie considérée.

Les glucocorticoïdes interviennent dans la régulation des processus métaboliques du glucose et des lipides. Une élévation du cortisol est connue pour augmenter le niveau de glucose dans le plasma (Ribas et al., 2017b). Ici, le cortisol tel que nous l'avons mesuré, n'est pas impacté selon nos premiers résultats et ne semble pas participer directement à l'augmentation du glucose. Pourtant, l'analyse transcriptomique sans *a priori* des gonades femelles F0 montre de nombreux processus biologiques impactés, en lien avec les glucocorticoïdes et le métabolisme énergétique nous empêchant d'écarter un impact de l'irradiation sur ces mécanismes (Figure V- 11). Plus précisément, des gènes impliqués dans la glucogenèse et le transport du glucose sont dérégulés à 5 mGy.h^{-1} (*g6pca*, *pck1*, *pck2*). Parmi les gènes communs entre les 3 débits de dose étudiés, la majorité est impliquée dans le métabolisme énergétique (*ckba*, *slc5a8l*), suggérant un impact de l'irradiation sur ce processus. De plus, après irradiation à 5.4 mGy.h^{-1}, Hurem et al., 2017b ont mis en évidence une altération du métabolisme des lipides. Ici, le gène de la lipoprotéine lipase (*lpl*) est surexprimé à 5 mGy.h^{-1}. Ainsi, ces observations coïncident avec les hypothèses précédentes concernant le taux d'androgènes élevé (inhibition de l'aromatase et production concomitante de 11-ketotestosterone). En effet, les androgènes, en lien avec les

glucocorticoïdes, sont connus pour inhiber le stockage des lipides et augmenter les niveaux de glucose plasmatique (Collette et al., 2016; Geffroy, 2022; O'Connor et al., 2009; Sapolsky et al., 2000). Après irradiation à 5 $mGy.h^{-1}$, des gènes de la glycogenèse et de la lipolyse sont surexprimés. Le stress radio-induit semble donc avoir une incidence sur le métabolisme énergétique à ce débit de dose. Précédemment, une diminution du métabolisme énergétique était suspectée à fort débit de dose, en lien avec une diminution d'éclosion d'origine parentale. Pour un plus faible débit de dose (8.7 $mGy.h^{-1}$), l'irradiation parentale a entraîné au contraire une accélération de l'éclosion (Hurem et al., 2017a). De plus, le métabolisme est connu pour avoir une incidence directe sur la croissance (Lawrence et al., 2008). A 50 $mGy.h^{-1}$, nous avons montré une croissance moins importante des larves par rapport à la condition contrôle (Guirandy et al., 2019). Ainsi, la perturbation du métabolisme énergétique, en lien avec les stéroïdes, après irradiation semble avoir une incidence sur la croissance et l'éclosion. Ces résultats révèlent une nouvelle fois une atteinte différente entre un fort débit de dose et des débits de dose plus faibles.

La croissance étant dimorphe entre mâle et femelle, le métabolisme énergétique, influencé par l'alimentation et la température, a été suggéré comment étant impliqué dans la masculinisation des populations (Geffroy et al., 2021; Mittwoch, 2004; Ribas et al., 2017b). Cette hypothèse est particulièrement proposée dans le cas des espèces TSD (Temperature-Sex-Determination). En effet, ces espèces TSD, dont les poissons, sont ectothermes et la température influence directement leur métabolisme (Geffroy, 2022; Mittwoch, 2004). Or dans notre cas, la température est strictement contrôlée, ne pouvant influencer la détermination du sexe. Le métabolisme énergétique et donc la croissance peuvent également être influencés par l'alimentation. Ainsi, un accès plus ou moins facile à la nourriture donnera un sexe précis (Geffroy, 2022; Lawrence et al., 2008). Ici, tous les poissons sont nourris *ad libitum*, avec la même nourriture. L'accès à la nourriture peut donc être considéré comme similaire entre toutes les conditions d'exposition. L'implication des facteurs confondants (température et alimentation) étant écartée, l'altération du sexe ratio en lien avec le métabolisme énergétique peut donc être allouée à un effet de l'irradiation via la production d'EROs. En effet, les EROs peuvent altérer les molécules (lipides, protéines, hormones, etc. voir chapitre I) ainsi que des gènes essentiels à l'équilibre énergétique. La Figure V- 12 présente le schéma hypothétique de la masculinisation suite aux différentes expériences menées. En résumé, l'irradiation gamma produit des EROs dans l'organisme ce qui crée un stress physiologique, menant à la synthèse de cortisol. Cette hormone pourrait alors perturber la synthèse des hormones sexuelles (11-ketotestostérone) et également induire un déséquilibre énergétique. Cette cascade d'évènements peut finalement mener à la masculinisation des organismes.

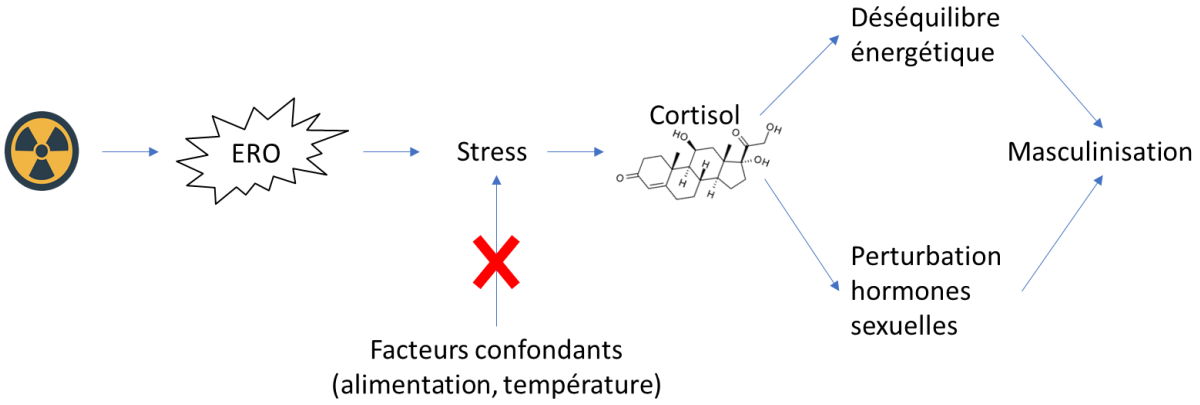


Figure V- 12 : schéma conceptuel présentant la masculinisation induite par l'irradiation via les différents mécanismes hypothétiques présentés.

Compte tenu de la perturbation potentielle des hormones et des marques épigénétiques, il se pourrait que les mécanismes soient étroitement liés. Chez deux espèces de nématodes, le stress alimentaire, en lien avec une perturbation de voies du métabolisme énergétique, induit des modifications de la chromatine (mécanismes épigénétique) dans les CGPs et la lignée germinale maternelle, avec une incidence significative sur la reproduction et le sexe des générations futures (Demoinet et al., 2017; Robles et al., 2021). Sur le poisson zèbre, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au lien entre épigénétique et métabolisme énergétique après perturbation du sexe ratio.

V.3.3 Impact sur le devenir des populations

L'effet sur le sexe ratio a été observé après irradiation multigénérationnelle. Cet effet phénotypique pourrait être induit par les marques épigénétiques hérités à travers les générations par le plasma germinatif et la lignée germinale (Ortega-Recalde et al., 2019; Skinner et al., 2011). Ainsi, ces premiers travaux montrent qu'il semble indispensable d'évaluer ces effets sur plusieurs générations. Dans un contexte d'exposition multigénérationnelle post-accidentelle sur des organismes au cycle de vie rapide, une aggravation des effets pourrait être proposée. En effet, bien qu'aucune différence statistique n'ait été révélée, le sexe ratio est bien plus impacté après irradiation multigénérationnelle (exposition parentale F0 et de la descendance F1), par rapport à une irradiation parentale unique (recovery). Cette aggravation pourrait être due à de l'apoptose des CGPs chez la descendance irradiée. Rappelons que le nombre de CGPs détermine le sexe chez le poisson zèbre (Slanchev et al., 2005; Tzung et al., 2015; Ye et al., 2019). Cette hypothèse reste à confirmer. Des outils analytiques sont actuellement disponibles pour suivre le devenir des CGPs et peuvent être déployés dans la continuité de ce travail. Cependant, dans le cas du rayonnement, cette aggravation ne pourrait être que modérée. En effet, la décroissance radioactive est rapide dans l'environnement. De manière générale, pour des expositions à d'autres stresseurs comme une température élevée, une aggravation multigénérationnelle

pourrait être drastique pour les populations à venir dans un contexte de réchauffement climatique (Valdivieso et al., 2022).

V.3.4 Conclusion

Ce chapitre a mis en évidence une implication des niveaux de méthylation de gènes clés en lien avec le phénotype sexe ratio biaisé (Figure III- 14). Comme attendu, l'irradiation gamma génère un stress à différents niveaux biologiques, dont les marques épigénétiques. L'altération du sexe ratio semble d'origine maternelle, via une transmission par la lignée germinale. De plus, nos analyses sur la génération adulte F0, semblent expliquer l'altération du sexe ratio uniquement sur la descendance F1 (relation méthylation *foxl2a* en F0 avec la masculinisation en F1). L'irradiation engendre un contexte stressant, qui induit alors une cascade d'effets sur le métabolisme énergétique, les hormones sexuelles et les mécanismes épigénétiques. Comme proposé, ces effets moléculaires pourraient être à l'origine de la masculinisation observée chez la descendance. Pour un débit de dose environnemental (0.05 $mGy.h^{-1}$), les marques épigénétiques ne sont pas impactées par l'irradiation. Cependant, les hypothèses retenues à 5 $mGy.h^{-1}$ ne devraient pas être écartées à faible débit de dose, compte tenu d'une dose cumulée importante dans un contexte environnemental d'exposition chronique. Ces premiers résultats semblent tout de même en adéquation avec la valeur de protection des écosystèmes (0.01 $mGy.h^{-1}$), confirmant l'absence d'effets phénotypiques et moléculaires pour un débit de dose 5 fois supérieur à cette valeur de protection. En revanche, cette valeur est à challenger à l'échelle multigénérationnelle compte tenu du risque d'une potentielle aggravation au fil des générations. Enfin, ce dernier chapitre tout comme les précédents, permet de confirmer la nécessité de prendre en compte l'exposition des processus biologiques complexes dans l'ERE, ici la détermination du sexe, plutôt que les stades vie (adulte *versus* stades précoces). La détermination du sexe pouvant entrainer des répercutions plus tardives sur le devenir des populations, ce chapitre souligne une nouvelle fois l'intérêt de réaliser des expositions multigénérationnelles, englobant la sensibilité des différents stades biologiques et des grandes fonctions physiologiques.

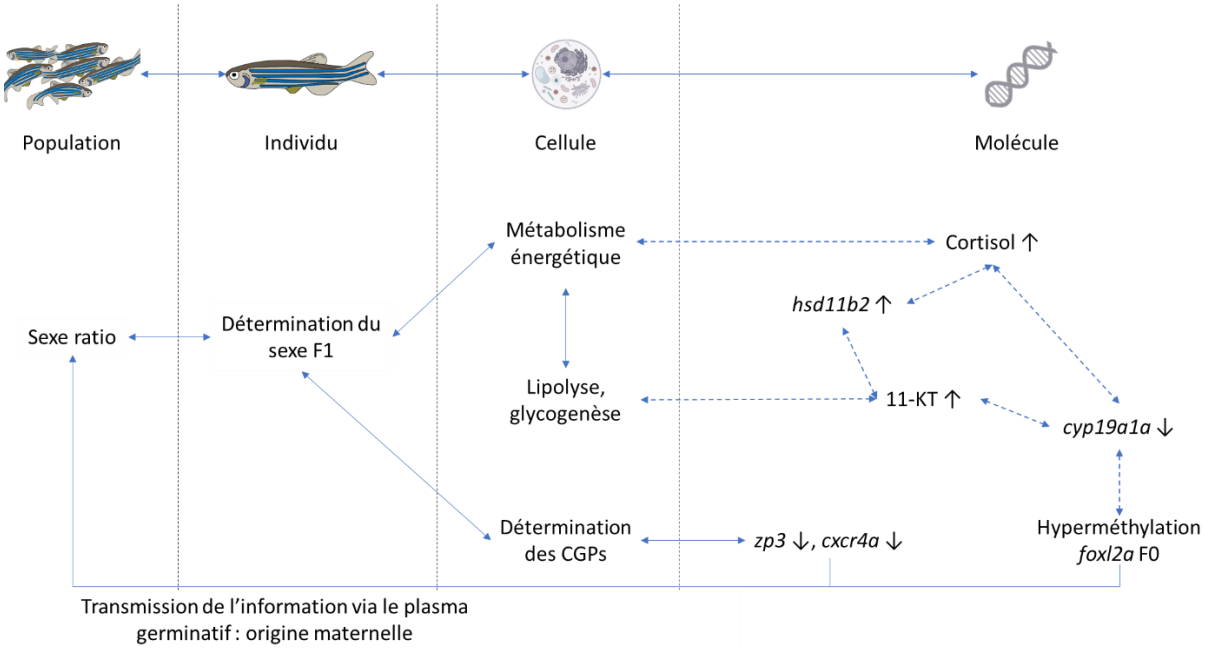


Figure V- 13 : schéma récapitulatif des principales conclusions du chapitre V

Chapitre VI – Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse visait à évaluer les effets reprotoxiques et leur transmission à la descendance chez le poisson modèle *Danio rerio* après irradiation gamma chronique. Pour ce faire, des expositions multigénérationnelles à différents débits de dose ont été réalisées (Figure II- 5). Dans ce contexte, ce travail a été divisé en trois axes de recherche :

Axe I – les effets à l'échelle phénotypique d'une exposition multigénérationnelle

Axe II – les mécanismes moléculaires à l'origine d'effets transmissibles

Axe III – la modulation des marques épigénétiques par l'irradiation

Ces trois axes de recherche ont permis d'évaluer les effets de l'irradiation gamma sur un vertébré aquatique, modèle biologique encore très peu étudié après une telle contamination (Figure VI- 1). Ainsi, à travers les différents résultats, nous avons pu définir le type d'exposition à prendre en compte dans l'ERE. Nous avons également évalué les effets à faible (0.05 & 0.5 $mGy.h^{-1}$), modéré (5 $mGy.h^{-1}$) et fort (50 $mGy.h^{-1}$) débits de dose. Finalement, les résultats obtenus ont permis de proposer des biomarqueurs et de réaliser une première ébauche d'AOP dans le but de favoriser les approches prédictives nécessaires à l'ERE.

Évaluation des effets reprotoxiques et de leur transmission à la descendance chez le poisson modèle Danio rerio après irradiation gamma chronique		
Axe I : Quels sont les effets à l'échelle phénotype d'une exposition multigénérationnelle ?	Axe II : Quels sont les mécanismes moléculaires à l'origine d'effets transmissibles ?	Axe III : L'irradiation module-t-elle les marques épigénétiques?
Chapitre III Publication 1 « Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance » Publication 2 « Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish»	Chapitre IV Publication 3 « Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish »	Chapitre V Publication 4 « Zebrafish Female gamma irradiation exposure impacts methylation marks involved in offspring sex determination »
Effets phénotypiques sur des endpoints clés : • Survie et malformations embryo-larvaires • Éclosion • Sexe ratio • Performances de reproduction	• Analyses transcriptomiques • Mesures de molécules hérités (VTG & cortisol)	• Méthylation de l'ADN • Analyses transcriptomiques • Mesure du cortisol

Figure VI- 1 : récapitulatif des différents axes de recherche avec les publications et les mesures réalisées.

VI.1 Effets d'une exposition multigénérationnelle aux rayonnements gamma

VI.1.1 Effets phénotypiques

L'exposition multigénérationnelle de poisson zèbre au rayonnement gamma a permis de mettre en évidence des effets phénotypiques. D'une part, la comparaison des conditions irradiée et recovery a permis de démontrer une origine parentale de ces effets, et d'autre part, l'exposition directe des stades embryo-larvaires n'induit pas d'effet phénotypique.

VI.1.1.1 Effets phénotypiques à fort débit de dose

Le premier phénotype altéré retrouvé est une **mortalité précoce** chez la descendance uniquement au fort débit de dose testé (50 mGy.h^{-1}). L'exposition directe d'embryons de *Danio rerio* à ce même débit de dose ne produit pas d'effet sur la survie. Une expérimentation en cours sur des embryons d'espèces sauvages (épinoche, truite, omble chevalier, corégone) après exposition chronique directe, conduisant à des doses cumulées très nettement supérieures à celles obtenues chez le *Danio rerio*, n'a pas non plus montré d'effet sur la survie (Article en cours de rédaction). Le même constat est observé pour les **malformations** qui n'apparaissent qu'après irradiation parentale à 50 mGy.h^{-1}. De plus, l'irradiation de la gamétogenèse parentale et l'irradiation de l'embryogenèse à 50 mGy.h^{-1} induisent respectivement **un retard et une accélération de l'éclosion**, suggérant une réponse différente selon le processus biologique irradié. Le transfert des adultes exposés à 50 mGy.h^{-1} en condition contrôle pendant 63 jours a permis d'annuler les effets mortalité sur la descendance, suggérant des capacités de résilience, *via* une réparation des ovocytes endommagées après plusieurs cycles de gamétogenèse. Les effets sont donc bien d'origine parentale et de nouvelles expériences devraient être réalisées pour vérifier la réponse des espèces sauvages.

VI.1.1.2 Effets phénotypiques à débit de dose modéré

Une **masculinisation** a été observée chez les adultes F1 à 5 mGy.h^{-1}. Compte tenu de la mortalité des stades embryo-larvaires, cet effet n'a bien entendu pas pu être observé à la condition 50 mGy.h^{-1}. Bien qu'aucune différence entre les conditions irradiée et recovery n'ait été statistiquement mise en évidence, une tendance à l'aggravation du taux de masculinisation est observée après irradiation continue de la descendance (du stade embryon au stade adulte mature). L'altération du sexe ratio

chez la descendance semble donc liée d'une part à l'irradiation des parents et d'autre part à l'impact direct de l'irradiation sur le déterminisme sexuel de la descendance. Cet impact pourrait notamment être dû à l'apoptose des CGPs. Une mesure de l'apoptose et des CGPs dans les embryons pourrait être envisagée (Tableau VI- 1).

Aucun effet phénotype majeur n'a été observé aux plus faibles débits de dose (0.05 et 0.5 $mGy.h^{-1}$).

A stade, le résultat majeur est une **atteinte de la gamétogenèse tardive** entrainant des effets sur la descendance (mortalité et sexe ratio altérés). En revanche, il n'est pas possible de conclure sur une origine maternelle ou paternelle. Ainsi afin d'évaluer leur implication respective, il serait nécessaire de réaliser des expériences en irradiant un seul des géniteurs.

VI.1.2 Mécanismes moléculaires des effets transmis

L'altération du sexe ratio à débit de dose modéré a été observé pour la première fois à notre connaissance. En revanche, d'autres études ont déjà montré une mortalité précoce de la descendance après irradiation parentale à un fort débit de dose. Cependant, les mécanismes d'action à l'échelle moléculaire, responsables des effets phénotypiques, sont encore méconnus. Ainsi, il était indispensable d'essayer d'identifier ces mécanismes.

VI.1.2.1 Mortalité précoce

La mortalité étant due à une irradiation de la gamétogenèse parentale, les **dommages à l'ADN** (test des comètes, mRNAseq femelles F0) observés chez les mâles et les femelles géniteurs pourraient induire une descendance non viable et ont été par conséquent étudiés. Cependant, pour rappel, les analyses moléculaires ayant été réalisées sur des individus reproduits, il est nécessaire de répéter les mêmes analyses sur des individus non reproduits reflétant directement les effets possiblement transmis à la descendance. Une autre possibilité, pour les femelles génitrices serait de disséquer les ovocytes matures pour évaluer les dommages de l'ADN réellement transmis à la descendance. Ce questionnement est en relation directe avec les modalités de la gamétogénèse asynchrone et continue du *Danio rerio*.

Des apports non génétiques (cortisol, VTG, mARN) sont également nécessaires à la production d'une descendance viable et sont regroupés dans le plasma germinatif maternel. L'analyse du transcriptome maternel a révélé **2 gènes majeurs impactés**

(*buc*, *macf1a*), impliqués dans la formation du corps Balbiani (futur plasma germinatif), ainsi que plusieurs **gènes impliqués dans l'établissement des axes embryonnaires**. Les molécules maternellement transmises telles que le cortisol et la vitellogénine, ne sont pas impactées par l'irradiation dans nos analyses. En revanche, les voies de métabolisation de ces molécules (***nr3c1***, ***hsd11b2***, ***ctsd***) sont impactées par l'irradiation et nous encouragent à continuer les investigations sur ces deux molécules (Tableau VI- 1). Enfin des évidences d'une **altération des miARNs,** essentiels au développement embryonnaire, ont été observées avec un impact de l'irradiation des gènes impliqués dans leur formation et maturation (***drosha***, ***dicer1***, ***ago2***, ***ago3b***, ***ago4***) chez les femelles génitrices. Il serait donc nécessaire d'étudier les effets de l'irradiation gamma sur ces derniers.

VI.1.2.2 Sexe ratio biaisé en faveur des mâles

L'altération du sexe ratio de la descendance est également liée principalement à l'irradiation parentale, bien qu'une aggravation semble se dessiner chez la descendance exposée en continue. Le poisson zèbre étant une espèce à détermination du sexe génétique, il était nécessaire d'analyser les gènes en lien avec ce processus. Etant donné qu'une transmission parentale est avérée, nous avons choisi d'analyser les marques épigénétiques transmettant des informations entre les générations. En théorie, les mesures de **méthylation de l'ADN** au niveau des promoteurs de gènes cibles permettent de faire un lien avec la modulation de l'expression des gènes via l'épigénétique.

Les résultats des niveaux de méthylation montrent clairement une **origine maternelle**, avec des effets sur la méthylation uniquement sur les gonades femelles F0 et F1. Nous avons proposé que l'**hyperméthylation de *foxl2a*** en F0 est associée à une masculinisation en F1. Une **hypométhylation de *foxl2b*** est en revanche retrouvée en F1 questionnant sur l'effet à la génération suivante (F2). Finalement, une **hyperméthylation de *cyp19a1a*** (aromatase) en F1 est observée. Le lien théorique entre méthylation et expression n'a pas pu être observé. Nous proposons de réitérer les mesures d'expression des gènes au moment de leur utilisation, pendant la fenêtre de détermination du sexe.

L'altération du transcrit de l'aromatase suggère une diminution des œstrogènes chez les femelles. En lien avec ce résultat, des effets sur la synthèse des stéroïdes sont observés avec une **sur-expression de *hsd11b2*** permettant d'une part la conversion de cortisol en cortisone et d'autre part la **production l'hormone male, la 11-ketotestostérone**. Les premiers résultats de mesure de cette hormone montrent une tendance à une concentration plus élevée dans les gonades femelles F0. De plus, les stéroïdes, interviennent dans la régulation des processus métaboliques énergétiques (glucide et lipide). L'analyse transcriptomique révélant l'altération des processus biologiques en lien avec le métabolisme énergétique ainsi que la perturbation de la

synthèse des stéroïdes, suggèrent une **altération du métabolisme énergétique** ayant une incidence potentielle sur la détermination du sexe. L'altération de ce métabolisme pourrait également expliquer les malformations et les effets sur l'éclosion.

VI.1.3 Perspectives générales liées aux expositions multigénérationnelles

Les analyses transcriptomiques *sans a priori* ont permis d'élargir l'investigation des voies biologiques impactées par l'irradiation gamma. De manière générale, de telles analyses peuvent être indispensables pour le suivi des mécanismes.

- Une analyse transcriptomique des femelles F0-50 mGy.h^{-1} placées en condition contrôle permettrait de suivre la dynamique de récupération des effets moléculaires et ainsi comprendre l'origine des effets phénotypiques maternels. De plus, une irradiation sur un seul des géniteurs avec suivi de la descendance permettrait de conclure sur l'origine parentale.

- L'analyse du transcriptome de la descendance F1 permettrait la mise en évidence d'effets transmissibles et les aggravations suggérées en irradiation continue. En effet, des études précédentes menées au laboratoire ont déjà permis l'acquisition de données omiques après irradiation directe d'embryons (Thèse Sophia Murat El Houdigui). Il serait intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus après irradiation parentale. Actuellement, nous attendons des résultats d'analyse transcriptomique (RNA seq) sur les adultes de la génération F1. Compte tenu des délais propres à l'IRSN, ces résultats ne pourront pas être ajoutés à ce manuscrit.

- De manière générale, les analyses sur les gonades F0 devraient être réitérées sur des femelles non reproduites de manière à analyser les ovocytes matures, en lien direct avec la descendance.

- À l'échelle populationnelle et donc écologique, notre travail montre que l'investigation d'effets transmissibles semble indispensable pour mieux définir les effets d'une exposition sur le long terme telle que rencontrée dans les situations post-accidentelles. Ceci nous encourage à réaliser dans un premier temps, des expositions jusqu'à la génération F2 pour tester nos hypothèses

- Finalement, il est nécessaire de réaliser les expérimentations sur des espèces sauvages rencontrées dans nos cours d'eau. Parmi les espèces sauvages

candidates aux études d'irradiation multigénérationnelles, l'épinoche a été retenue. Par conséquent, les épinoches adultes matures pourraient être irradiées pendant la période de gamétogénèse tardive. Une fécondation *in vitro*, technique régulièrement utilisée par notre partenaire, l'INERIS, permettrait d'obtenir des embryons, qui seraient ensuite soit irradiés soit placés en condition Recovery.

Tableau VI- 1 : Tableau récapitulatif des principaux phénotypes altérés observés, les mécanismes moléculaires associés ainsi que les investigations à poursuivre pour valider les hypothèses.

Phénotype	Molécule	Perspectives	Techniques
Mortalité précoce F1 (50 $mGy.h^{-1}$)	Dommages ADN parentaux	Réitérer sur analyses sur gonades femelles non reproduites contenant les ovocytes matures avant expulsion	Comètes, h2ax, biomarqueurs des ROS et dommages ADN
	Altération ARNm maternels nécessaires au développement précoce	Réitérer analyse transcriptomique sur gonades femelles non reproduites contenant les ovocytes matures avant expulsion Analyse transcriptomique sur F1 avant activation génome zygote pour vérifier la cinétique de dégradation des ARN maternels	mRNA-sequencing
	Altération miARN maternels nécessaires au développement précoce	Analyse des miARN sur les gonades femelles F0	Total RNA-sequencing ou mesure ciblée par TaqMan Low Density Array (TLDA)
Éclosion retardée (après irradiation parentale) ou accélérée (après irradiation embryonnaire)	Métabolisme énergétique impacté	Mesures d'éclosion à différents débits de dose après irradiation parentale et après irradiation embryonnaire directe Mesure de marqueurs du métabolisme énergétique dans les embryons F1 (peroxydation des lipides)	Suivi individuel de l'éclosion Mesure des concentrations en MDA (malondialdéhyde) et HNE (4-hydroxynonénal)
Malformations F1 (50 $mGy.h^{-1}$)	Augmentation synthèse cortisol	Mesure du cortisol dans gonades femelles non reproduites contenant les ovocytes matures avant expulsion et dans les embryons F1 Mesure des métabolites du cortisol dans les gonades femelles F0 pour estimer sa métabolisation	Test ELISA HPLC-MS
Masculinisation des F1 (5 $mGy.h^{-1}$)	Hyperméthylation foxl2a F0 femelles Hyperméthylation cyp19a1a F1 femelles Hypométhylation foxl2b F1 femelles	Réitérer les analyses sur génération F2 pour évaluer l'héritabilité des effets	Pyro-séquençage
	Transcrits nécessaires au développement des CGPs impactés ou apoptose CGPs	Mesure apoptose Visualisation des CGPs dans les F1	Coloration à l'acridine orange Hybridation in situ de nanos3, spécifique aux CGPs

	Stéroïdes (cortisol et 11KT-testostérone)	Finir la mise au point de la mesure de 11KT-testostérone	Test ELISA
	Modulation de l'expression des gènes de la détermination du sexe en F1	Mesure des gènes cibles pendant la fenêtre de détermination du sexe Analyse transcriptomique F1 femelles	RT-qPCR mRNA-sequencing
	Métabolisme énergétique impacté	Mesure de marqueurs du métabolisme énergétique dans les embryons F1 (peroxidation des lipides)	Mesure des concentrations en MDA (malondialdéhyde) et HNE (4-hydroxynonénal)

VI.2 Evaluation du risque écologique

Les résultats de ces différentes expérimentations ont pu être comparés aux valeurs de protection établies dans l'évaluation radioécologique. Ce type d'expérience à l'échelle multigénérationnelle a permis d'appréhender de manière assez simple de nouvelles réponses essentielles dans le lien étroit entre embryons et adultes, stades régulièrement utilisés pour l'ERE.

VI.2.1 La méthode d'évaluation

VI.2.1.1 Les bioessais standardisés

La méthodologie de l'évaluation du risque est fondée sur des bio-essais standardisés, qui ne prennent pas en compte des expositions multigénérationnelles en général. Les données sont issues de tests d'écotoxicité réalisés en laboratoire, et principalement obtenues à l'échelle biologique des individus en termes de morbidité, reproduction et mortalité. Dans l'évaluation du risque plus général, des tests sur des expositions multigénérationnelles commencent à être déployés pour les chimiques (OECD, 2012). Dans le cadre du rayonnement gamma, nos résultats soulignent des effets drastiques susceptibles d'impacter le devenir des populations (Figure III- 15), après **exposition multigénérationnelle**. Ces différents effets sont retrouvés à forts débits de dose comme à un débit de dose plus modéré, suggérant ainsi de réaliser des expositions multigénérationnelles dans le cadre de la protection des écosystèmes. Ce constat est également de plus en plus observé pour l'exposition aux substances chimiques (Nacci et al., 2010; Sun et al., 2021). Ainsi, il conviendrait de généraliser à tous les contaminants, l'évaluation des effets sur plusieurs générations. De plus, les expositions standardisées sont réalisées sur des stades de vie (adultes matures, embryons, larves) sans considérer les processus biologiques en cours (gamétogenèse, embryogenèse, détermination du sexe) qui pourraient être plus ou moins sensibles à une contamination. Les préconisations des tests sont réalisées sur une durée d'exposition et sur un stade biologique précis. Cependant, ce travail de thèse a démontré que **l'irradiation de processus biologiques complexes** comme par exemple la détermination du sexe, pouvait entrainer des effets délétères. Toutefois, certains tests normalisés prennent en compte le sexe ratio. Cependant, ces tests sont seulement recommandés pour des polluants à caractère perturbateur endocrinien supposé. Ils durent seulement 60 jours à partir du stade œufs et sur 21 jours à partir du stade adulte (OECD, 2011, 2009). Il existe également un bioessai sur juvénile (moment de la détermination du sexe), mais il ne s'intéresse qu'à la croissance du poisson (OECD, 2000). Compte tenu de l'héritabilité des effets et de la sensibilité de la détermination du sexe, un test multigénérationnel englobant le processus de détermination du sexe devrait être développé pour tous les contaminants. Les modalités d'exposition ne devraient pas se limiter pas à un stade de vie de l'organisme

mais à un moment clé de son développement. Finalement, il serait plus approprié de viser un **processus biologique** à analyser, plutôt qu'un simple endpoint à un temps donné, et de tester l'héritabilité des effets via des **expositions multigénérationnelles**.

VI.2.1.2 Relation dose-réponse et définition de valeurs de protection

Le but de ces bioessais est de permettre de définir des courbes dose réponse pour modéliser les effets et définir des valeurs de protection des écosystèmes dans des conditions standardisées. Souvent pour les chimiques, la relation suit un modèle log-logistique et les effets sont proportionnels à la concentration. La modélisation nécessite d'obtenir des doses conduisant à 100% de l'effet recherché et impose de tester dans un premier temps, des concentrations ou ici, des débits de dose élevés. Ce type d'approche part du principe que la réponse à l'exposition est plus ou moins intensifiée selon la dose. Or ici, les phénotypes étaient très marqués à fort débit de dose tout comme l'impact de l'irradiation sur l'expression des gènes, suggérant une régression exponentielle (Figure III- 20et Figure IV- 8). Ceci souligne que **la relation dose-réponse ne suit pas le modèle log-logistique, communément utilisé dans ERE**. Le nombre de débits de dose testé étant insuffisant, il est nécessaire de réaliser des expériences supplémentaires à des débits de dose entre 5 et 50 $mGy.h^{-1}$, pour mieux décrire la relation dose réponse et confirmer nos résultats aux faibles doses. De plus, il semblerait que **la réponse moléculaire elle-même face à l'irradiation ne soit pas forcément la même pour les différents débits de dose**. En effet, bien que des marqueurs de l'irradiation soient présents à plusieurs débits de dose (dommages ADN, ROS), peu de gènes sont retrouvés en commun. De plus, quand un processus est commun à tous les débits de dose, comme le métabolisme énergétique, la réponse n'est pas la même entre les débits de dose. En effet, les gènes communs du métabolisme sont surexprimés à 0.05 et 5 $mGy.h^{-1}$ et sous exprimés à 50 $mGy.h^{-1}$. La manipulation des données omiques restant compliquée, l'utilisation de l'outil DRomics (Larras et al., 2020, 2018), dans le cadre de l'ERE, pourrait permettre de caractériser la relation des réponses moléculaires en fonction des doses tout en permettant la définition de valeur seuil (Benchmark dose BMD) sur des données moléculaires. Pour les rayonnements dont les mécanismes d'action moléculaire sont peu connus, cet outil permettrait après annotation fonctionnelle d'obtenir des BMDs résumées pour définir la sensibilité d'un processus biologique par exemple. Cependant, un grand nombre de doses est nécessaire, ce dont nous ne disposons pas actuellement. Il est envisagé de réaliser d'autres analyses transcriptomiques pour d'autres débits de dose (à 0.5 et 10 $mGy.h^{-1}$). Ici, les effets sont donc différents rendant ainsi **difficile l'extrapolation des effets obtenus à forts débits de dose sur des débits de dose environnementaux**. Pourtant, les études actuelles sont pour la plupart fondées sur des forts débits de dose ou sur de fortes concentrations de contamination. Pour la radioécologie, il semblerait que les études mécanistiques à fort débit de dose ne soient pas extrapolables pour les effets rencontrés sur le terrain. Ainsi, l'évaluation du risque radioécologique pourrait se concentrer principalement sur les expositions environnementalement réalistes, c'est-à-dire à des débits de dose rencontrés *in situ*.

VI.2.1.3 Les valeurs de protection actuelles

Bien que les résultats rencontrés dans ce travail de thèse soient hors cadre des expositions couramment testées dans l'évaluation du risque (expositions multigénérationnelles), il était important de les confronter aux valeurs de protection des écosystèmes actuellement utilisées. Très peu d'effet moléculaires et aucun effet phénotypique sont retrouvés à 0.05 $mGy.h^{-1}$, ainsi la valeur de protection des écosystèmes aquatiques de 10 $\mu Gy.h^{-1}$ (Predicted No-Effect Dose Rate) est respectée. Selon les DCRLs (Derived Consideration Reference Levels, CIPR) chez l'animal de référence, la truite, la mortalité embryonnaire apparait pour des débits de dose supérieurs à 42 $mGy.h^{-1}$. Ici, l'exposition directe des stades embryonnaires à 50 $mGy.h^{-1}$ n'induit pas de mortalité chez *Danio rerio*. Nos résultats montrent que les valeurs de protection sont correctement définies et peuvent être même surestimées à l'échelle d'une seule génération. Toutefois, les expositions réalisées ici ne concernent que l'irradiation externe sans prendre en compte la contamination interne, rencontrée en situation post accidentelle. Ainsi, les effets sur le terrain pourraient être supérieurs compte tenu de la radiotoxicité interne. Garnier-Laplace et al., 2013 montrent que les espèces sur le terrain présentent une sensibilité supérieure par rapport aux espèces irradiées de manière externe en conditions contrôlées de laboratoire, pour des débits de dose similaires. L'exposition interne ajoutée *in situ* pourrait expliquer cette différence de sensibilité.

Les valeurs de protection de l'environnement sont exprimées en débits de dose. Pourtant, cette unité ne désigne pas le temps d'exposition qui conditionne principalement l'effet. Sur le terrain, un faible débit de dose pourrait être retrouvé écartant ainsi le risque. Cependant si l'exposition perdure dans le temps, la dose cumulée sera élevée et l'effet pourrait être décuplé. Ainsi, il serait plus judicieux de définir ces valeurs en dose cumulée (Gy) afin d'obtenir une vision générale et de ne pas sous-estimer le risque potentiel. Dans le cas d'exposition multigénérationnelle, la descendance de poissons est irradiée dans les géniteurs via les gamètes, puis au cours de sa vie après fécondation. Ainsi, la dose cumulée entre deux générations est amplifiée. En adéquation avec nos travaux, l'addition de doses cumulées reçues par les parents et la descendance menant à une dose totale élevée même à faibles débits de dose suggère des effets drastiques chez la descendance. **Il est nécessaire d'uniformiser les expositions dans le cadre de l'ERE afin d'obtenir des doses cumulées comparables**. Nous proposons de réitérer l'évaluation des effets phénotypiques à 50 $mGy.h^{-1}$ pendant 3 jours afin d'obtenir la même dose cumulée que pour l'expérimentation à 5 $mGy.h^{-1}$ pendant 30 jours. Cette nouvelle expérimentation permettrait de comparer strictement les effets pour une même dose cumulée.

Finalement, pour des études sur une génération unique à des débits de dose environnementaux (0.05 $mGy.h^{-1}$), peu d'effets sont observés. Cependant, sur des temps d'irradiation plus longs menant à une dose cumulée importante (comparable

aux expérimentations menées ici à débit de dose modéré), des effets pourraient être observés. Ce type d'exposition est en lien étroit avec les conditions rencontrées *in situ*, pour lesquelles les organismes sont exposés sur leur cycle de vie entier et sur plusieurs générations.

VI.2.2 Outils pour l'ERE

VI.2.2.1 Biomarqueurs

L'identification des mécanismes moléculaires peut permettre de définir des biomarqueurs de l'irradiation utiles pour l'évaluation du risque. Le cortisol et la VTG étaient des cibles potentielles. Cependant, le cortisol ne semble pas impacté par l'irradiation. Nous pouvons proposer que cette absence d'impact soit probablement due à sa métabolisation rapide. Pour la vitellogénine, notre approche ne visait pas à évaluer la quantité de **VTG** présente mais à identifier les métabolites présents. Ainsi, un test ELISA comme préconisé dans les tests OCDE (OCDE, 2015) pourrait être employé. Ce test ELISA nous permettrait seulement de mesurer la VTG dans les gonades. Pour valider l'hypothèse proposée ici d'une altération de la dégradation et ensuite utiliser la VTG comme biomarqueur, la mesure de la VTG peut être complétée par des analyses protéomiques de ses métabolites obtenus après irradiation. Nos travaux ont identifié deux gènes majeurs du développement embryonnaire qui sont impactés par l'irradiation et pourraient ainsi être utilisés comme biomarqueurs (***buc***, ***macf1a***). Finalement, il est indispensable de définir la réponse face aux différents débits de dose. En effet, les réponses différentes obtenues ici questionnent quant à la pertinence de définir des biomarqueurs qui ne serait pas pertinents pour tous les débits de dose. Les gènes communs aux trois débits de dose en lien avec le métabolisme énergétique semblent donc plus appropriés pour l'évaluation générique de l'irradiation gamma.

VI.2.2.2 Adverse outcome pathways (AOPs)

Les résultats aux différentes échelles d'intégration biologique fournissent de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'action toxique induits par une exposition chronique à l'irradiation gamma, dans un contexte multigénérationnel. La compréhension des mécanismes de toxicité doit contribuer à évaluer le risque pour les populations exposées. Dans ce contexte, le concept des AOPs permet de lier l'exposition à un contaminant à une réponse délétère sur l'organisme. Les premiers résultats de ce travail de thèse ont pu être intégrés dans une AOP (Tollefsen et al., 2022). Ici, nous proposons une nouvelle ébauche incluant tous les résultats obtenus au cours de ce projet de thèse (Figure VI- 2). Ce modèle d'AOP inclut les effets sur les générations F0 et F1 et sur les mécanismes épigénétiques (KE 9). Les liens entre les

différents « Key event » (KE) pourront être validés par les futures expérimentations proposées dans ce chapitre.

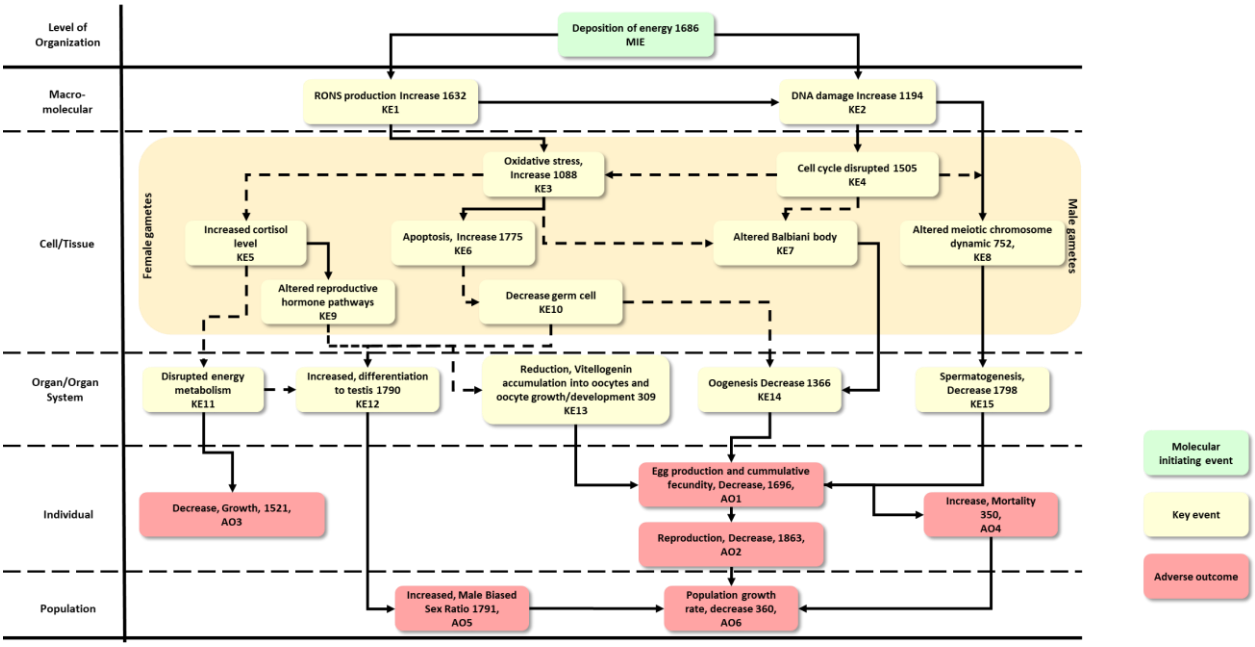


Figure VI- 2 : proposition d'AOP sur la reprotoxicité après irradiation du poisson zèbre. Les éléments nouveaux de ce projet de thèse ont été ajoutés à l'AOP reprotoxicité récemment publiée (Tollefsen et al., 2022).

De manière générale, ce travail de thèse apporte de nombreux éléments à l'évaluation du risque. En revanche, de nombreuses pistes restent à explorer sur le plan mécanistique et la compréhension des effets.

Références bibliographiques

Abrams, E.W., Mullins, M.C., 2009. Early zebrafish development: It's in the maternal genes. Curr Opin Genet Dev 19, 396–403. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.002

Adam-Guillermin, C., Hertal-Aas, T., Oughton, D., Blanchard, L., Alonzo, F., Armant, O., Horemans, N., 2018. Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. Ann ICRP 47, 327–341. https://doi.org/10.1177/0146645318756844

Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, New York, NY, pp. 67–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3414-6_3

Agence Internationale de l'Energie Atomique, 1996. Tchernobyl et l'environnement marin : l'impact radiologique dans son contexte.

Aharon, D., Marlow, F.L., 2021. Sexual determination in zebrafish. Cell. Mol. Life Sci. 79, 8. https://doi.org/10.1007/s00018-021-04066-4

Anastasiadi, D., Vandeputte, M., Sánchez-Baizán, N., Allal, F., Piferrer, F., 2018. Dynamic epimarks in sex-related genes predict gonad phenotype in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination. Epigenetics 13, 988–1011. https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1529504

Anbumani, S., Mohankumar, M.N., 2012. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish Catla catla. Aquat Toxicol 122–123, 125–132. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.001

Andersen, I.S., Lindeman, L.C., Reiner, A.H., Østrup, O., Aanes, H., Aleström, P., Collas, P., 2013. Epigenetic marking of the zebrafish developmental program. Curr Top Dev Biol 104, 85–112. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416027-9.00003-6

Andersen, I.S., Reiner, A.H., Aanes, H., Aleström, P., Collas, P., 2012. Developmental features of DNA methylation during activation of the embryonic zebrafish genome. Genome Biology 13, R65. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-r65

Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolakou, P., 2012. Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? Reproductive Biology and Endocrinology 10, 13. https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-13

Averbeck, D., 2000. Mécanismes de réparation et mutagenèse radio-induite chez les eucaryotes supérieurs. Cancer/Radiothérapie 4, 335–354. https://doi.org/10.1016/S1278-3218(00)00008-1

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014, 360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438

Aypar, U., Morgan, W.F., Baulch, J.E., 2011. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? Int J Radiat Biol 87, 179–191. https://doi.org/10.3109/09553002.2010.522686

Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett 327, 48–60. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012

Baker, T.R., Peterson, R.E., Heideman, W., 2014. Using Zebrafish as a Model System for Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. Toxicological Sciences 138, 403–411. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu006

Basciani, S., Mariani, S., Spera, G., Gnessi, L., 2010. Role of Platelet-Derived Growth Factors in the Testis. Endocrine Reviews 31, 916–939. https://doi.org/10.1210/er.2010-0004

Beaugelin-Seiller, K., Della-Vedova, C., Garnier-Laplace, J., 2020. Transforming Acute Ecotoxicity Data into Chronic Data: A Statistical Method to Better Inform the Radiological Risk for Nonhuman Species. Environ Sci Technol 54, 12376–12382. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03932

Belli, M., Tabocchini, M.A., 2020. Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection. International Journal of Molecular Sciences 21, 5993. https://doi.org/10.3390/ijms21175993

Beresford, N.A., Barnett, C.L., Gashchak, S., Maksimenko, A., Guliaichenko, E., Wood, M.D., Izquierdo, M., 2020a. Radionuclide transfer to wildlife at a 'Reference site' in the Chernobyl Exclusion Zone and resultant radiation exposures. Journal of Environmental Radioactivity 211, 105661. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.02.007

Beresford, N.A., Horemans, N., Copplestone, D., Raines, K.E., Orizaola, G., Wood, M.D., Laanen, P., Whitehead, H.C., Burrows, J.E., Tinsley, M.C., Smith, J.T., Bonzom, J.-M., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Gashchak, S., Jha, A.N., de Menezes, A., Willey, N., Spurgeon, D., 2020b. Towards solving a scientific controversy – The effects of ionising radiation on the environment. Journal of Environmental Radioactivity 211, 106033. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106033

Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., Mennigen, J.A., 2018. Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 50 Years of Comparative Biochemistry: The Legacy of Peter Hochachka 224, 210–244. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006

Best, C., Vijayan, M.M., 2018. Cortisol elevation post-hatch affects behavioural performance in zebrafish larvae. Gen Comp Endocrinol 257, 220–226. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.009

Bhat, I.A., Dar, J.Y., Ahmad, I., Mir, I.N., Bhat, H., Bhat, R.A.H., Ganie, P.A., Sharma, R., 2021. Testicular development and spermatogenesis in fish: insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors. Reviews in Aquaculture 13, 2142–2168. https://doi.org/10.1111/raq.12563

Bisgrove, B., Su, Y.-C., Yost, H., 2017. Maternal Gdf3 is an obligatory cofactor in Nodal signaling for embryonic axis formation in zebrafish. eLife. https://doi.org/10.7554/eLife.28534

Bobe, J., Fostier, A., Guiguen, Y., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., 2014. La reproduction des poissons, in: La Reproduction Animale et Humaine, Collection Synthèses. Editions Quae, p. 751 p.

Bonzom, J.-M., Hättenschwiler, S., Lecomte-Pradines, C., Chauvet, E., Gaschak, S., Beaugelin-Seiller, K., Della-Vedova, C., Dubourg, N., Maksimenko, A., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2016. Effects of radionuclide contamination on leaf litter decomposition in the Chernobyl exclusion zone. Science of The Total Environment 562, 596–603. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.006

Bourrachot, S., Brion, F., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalié, I., Palluel, O., Adam-Guillermin, C., 2014. Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol 154, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.018

Bréchignac, F., Oughton, D., Mays, C., Barnthouse, L., Beasley, J.C., Bonisoli-Alquati, A., Bradshaw, C., Brown, J., Dray, S., Geras'kin, S., Glenn, T., Higley, K., Ishida, K., Kapustka, L., Kautsky, U., Kuhne, W., Lynch, M., Mappes, T., Mihok, S., Møller, A.P., Mothersill, C., Mousseau, T.A., Otaki, J.M., Pryakhin, E., Rhodes, O.E., Salbu, B., Strand, P., Tsukada, H., 2016. Addressing ecological effects of radiation on populations and ecosystems to improve protection of the environment against radiation: Agreed statements from a Consensus Symposium. J Environ Radioact 158–159, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.03.021

Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol 68, 193–217. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.022

Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Reviews in Fish Biology and Fisheries 7, 387–416. https://doi.org/10.1023/A:1018400130692

Brown, J.E., Alfonso, B., Avila, R., Beresford, N.A., Copplestone, D., Pröhl, G., Ulanovsky, A., 2008. The ERICA Tool. Journal of Environmental Radioactivity, The ERICA Project 99, 1371–1383. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.01.008

Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using Caenorhabditis elegans. J Environ Radioact 137, 190–197. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.07.014

Bulmer, M.G., Bull, J.J., 1982. MODELS OF POLYGENIC SEX DETERMINATION AND SEX RATIO CONTROL. Evolution 36, 13–26. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1982.tb05005.x

Burggren, W.W., 2014. Epigenetics as a source of variation in comparative animal physiology – or – Lamarck is lookin' pretty good these days. Journal of Experimental Biology 217, 682–689. https://doi.org/10.1242/jeb.086132

Cabrita, E., Soares, F., Beirão, J., García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., Dinis, M.T., 2011. Endocrine and milt response of Senegalese sole, Solea senegalensis, males maintained in captivity. Theriogenology 75, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.003

Canedo, A., Rocha, T.L., 2021. Zebrafish (Danio rerio) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. Science of The Total Environment 762, 144084. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084

Car, C., Gilles, A., Armant, O., Burraco, P., Beaugelin-Seiller, K., Gashchak, S., Camilleri, V., Cavalié, I., Laloi, P., Adam-Guillermin, C., Orizaola, G., Bonzom, J.-M., 2022. Unusual evolution of tree frog populations in the Chernobyl exclusion zone. Evolutionary Applications 15, 203–219. https://doi.org/10.1111/eva.13282

Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Lubzens, E., Maradonna, F., 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. General and Comparative Endocrinology 146, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.007

Carnevali, O., Mosconi, G., Cambi, A., Ridolfi, S., Zanuy, S., Polzonetti-Magni, A.M., 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (Dicentrarchus labrax) eggs and developing embryos. Aquaculture, Bass SPP culture:basic and applied aspects 202, 249–256. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00775-X

Chakraborty, A., Uechi, T., Higa, S., Torihara, H., Kenmochi, N., 2009. Loss of Ribosomal Protein L11 Affects Zebrafish Embryonic Development through a p53-Dependent Apoptotic Response. PLOS ONE 4, e4152. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004152

Chang, H., Yeo, J., Kim, J.-G., Kim, H., Lim, J., Lee, M., Kim, H.H., Ohk, J., Jeon, H.-Y., Lee, H., Jung, H., Kim, K.-W., Kim, V.N., 2018. Terminal Uridylyltransferases Execute Programmed Clearance of Maternal Transcriptome in Vertebrate Embryos. Mol Cell 70, 72-82.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.004

Chen, L., Hu, C., Guo, Y., Shi, Q., Zhou, B., 2019. TiO2 nanoparticles and BPA are combined to impair the development of offspring zebrafish after parental coexposure. Chemosphere 217, 732–741. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.052

Chen, M.-F., Huang, C.-Z., Pu, D.-Y., Zheng, C.-Y., Yuan, K.-M., Jin, X.-X., Zhang, Y.-G., Jin, L., 2015. Toxic effects of CdSe/ZnS QDs to zebrafish embryos. Huanjing Kexue/Environmental Science 36, 719–726. https://doi.org/10.13227/j.hjkx.2015.02.046

Cheng, R., Zhang, J., He, Y., Liao, C., Wang, L., Zhang, X., 2022. Parental exposure to waterborne selenite induces transgenerational development toxicity in zebrafish offspring. Chemosphere 303, 134838. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134838

Chino, M., NAKAYAMA, H., NAGAI, H., TERADA, H., KATATA, G., YAMAZAWA, H., 2011. Preliminary Estimation of Release Amounts of 131I and 137Cs Accidentally Discharged from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant into the Atmosphere. Journal of Nuclear Science and Technology 48, 1129–1134. https://doi.org/10.1080/18811248.2011.9711799

Choi, V.W.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2010. Radioadaptive Response Induced by Alpha-Particle-Induced Stress Communicated in Vivo between Zebrafish Embryos. Environ. Sci. Technol. 44, 8829–8834. https://doi.org/10.1021/es101535f

Choi, V.W.Y., Yu, K.N., 2015. Embryos of the zebrafish Danio rerio in studies of non-targeted effects of ionizing radiation. Cancer Letters, Bystander effects 356, 91–104. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.020

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology 193, 3–34. https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00287-7

Clelland, E., Peng, C., 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. Mol Cell Endocrinol 312, 42–52. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.009

CNRS, 2019. Utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements français – Enquête statistique 2019 –.

Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W.J., Miller, G.E., Frank, E., Rabin, B.S., Turner, R.B., 2012. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 5995–5999. https://doi.org/10.1073/pnas.1118355109

Collette, T.W., Skelton, D.M., Davis, J.M., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Martinović-Weigelt, D., Ekman, D.R., 2016. Metabolite profiles of repeatedly sampled urine from male fathead minnows (Pimephales promelas) contain unique lipid signatures following exposure to anti-androgens. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 19, 190–198. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.01.001

Colson, V., Valotaire, C., Geffroy, B., Kiilerich, P., 2015. Egg Cortisol Exposure Enhances Fearfulness in Larvae and Juvenile Rainbow Trout. Ethology 121, 1191–1201. https://doi.org/10.1111/eth.12437

Copplestone, D., Hingston, J., Real, A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. J Environ Radioact 99, 1456–1463. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.01.006

Corrales, J., Thornton, C., White, M., Willett, K.L., 2014. Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. Aquatic Toxicology 148, 16–26. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.028

Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12, 33–58. https://doi.org/10.1023/A:1022613404123

Cunningham, K., Hinton, T.G., Luxton, J.J., Bordman, A., Okuda, K., Taylor, L.E., Hayes, J., Gerke, H.C., Chinn, S.M., Anderson, D., Laudenslager, M.L., Takase, T., Nemoto, Y., Ishiniwa, H., Beasley, J.C., Bailey, S.M., 2021. Evaluation of DNA damage and stress in wildlife chronically exposed to low-dose, low-dose rate radiation from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. Environment International 155, 106675. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106675

Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S., 2008. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. Blood 112, 5228–5237. https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132290

Demoinet, E., Li, S., Roy, R., 2017. AMPK blocks starvation-inducible transgenerational defects in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E2689–E2698. https://doi.org/10.1073/pnas.1616171114

Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M.P., Grant, S., Schmidt-Ullrich, R., 2003. Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellular Signaling Pathways1. Radiation Research 159, 283–300. https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0283:SARIAO]2.0.CO;2

Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. Ecotoxicology 3, 161–172. https://doi.org/10.1007/BF00117081

Desouky, O., Ding, N., Zhou, G., 2015. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 8, 247–254. https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003

Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S., 2011. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (Salmo trutta) and Arctic charr (Salvelinus alpinus). Aquatic Toxicology 101, 405–411. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.017

Dosch, R., 2015. Next generation mothers: Maternal control of germline development in zebrafish. Crit Rev Biochem Mol Biol 50, 54–68. https://doi.org/10.3109/10409238.2014.985816

Dosch, R., Wagner, D.S., Mintzer, K.A., Runke, G., Wiemelt, A.P., Mullins, M.C., 2004. Maternal Control of Vertebrate Development before the Midblastula Transition: Mutants from the Zebrafish I. Developmental Cell 6, 771–780. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.002

Dubois, C., Lecomte, C., Ruys, S.P. dit, Kuzmic, M., Della-Vedova, C., Dubourg, N., Galas, S., Frelon, S., 2018. Precoce and opposite response of proteasome activity after acute or chronic exposure of C. elegans to γ-radiation. Sci Rep 8, 11349. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29033-1

Dubois, C., Pophillat, M., Audebert, S., Fourquet, P., Lecomte, C., Dubourg, N., Galas, S., Camoin, L., Frelon, S., 2019. Differential modification of the C. elegans proteome in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. Science of The Total Environment 676, 767–781. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.039

Eaton, S.L., Roche, S.L., Hurtado, M.L., Oldknow, K.J., Farquharson, C., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., 2013. Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. PLOS ONE 8, e72457. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072457

Epperly, M.W., Bahary, N., Quader, M., Dewald, V., Greenberger, J.S., 2012. The zebrafish--Danio rerio--is a useful model for measuring the effects of small-molecule mitigators of late effects of ionizing irradiation. In Vivo 26, 889–897.

Facchinello, N., Skobo, T., Meneghetti, G., Colletti, E., Dinarello, A., Tiso, N., Costa, R., Gioacchini, G., Carnevali, O., Argenton, F., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2017. Nr3c1 null mutant zebrafish are viable and reveal DNA-binding-independent activities of the glucocorticoid receptor. Scientific Reports 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04535-6

Faßbender, C., Braunbeck, T., 2013. Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. Ecotoxicology 22, 825–837. https://doi.org/10.1007/s10646-013-1057-x

Faught, E., Best, C., Vijayan, M.M., 2016. Maternal stress-associated cortisol stimulation may protect embryos from cortisol excess in zebrafish. R Soc Open Sci 3, 160032. https://doi.org/10.1098/rsos.160032

Faught, E., Vijayan, M., 2018. Maternal stress and fish reproduction: The role of cortisol revisited. Fish and Fisheries. https://doi.org/10.1111/FAF.12309

Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Lombó, M., Herráez, M.P., 2018. Tolerance to paternal genotoxic damage promotes survival during embryo development in zebrafish (Danio rerio). Biology Open 7, bio030130. https://doi.org/10.1242/bio.030130

Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kishii, A., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2012. The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11β-hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. Endocrinology 153, 6003–6011. https://doi.org/10.1210/en.2012-1517

Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Moreno Acosta, O.D., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2013. Environmental stress-induced testis differentiation: Androgen as a by-product of cortisol inactivation. General and Comparative Endocrinology, 7th International Symposium on Fish Endocrinology 192, 36–44. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.024

Finn, R.N., 2007. Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins1. Biology of Reproduction 76, 926–935. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059766

Flores, M.V.C., Lam, E.Y.N., Crosier, K.E., Crosier, P.S., 2008. Osteogenic transcription factor Runx2 is a maternal determinant of dorsoventral patterning in zebrafish. Nat Cell Biol 10, 346–352. https://doi.org/10.1038/ncb1697

Follo, C., Ozzano, M., Mugoni, V., Castino, R., Santoro, M., Isidoro, C., 2011. Knock-Down of Cathepsin D Affects the Retinal Pigment Epithelium, Impairs Swim-Bladder Ontogenesis and Causes Premature Death in Zebrafish. PLOS ONE 6, e21908. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021908

Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 272–280. https://doi.org/10.1897/05-257R.1

Freeman, J.L., Weber, G.J., Peterson, S.M., Nie, L.H., 2014. Embryonic ionizing radiation exposure results in expression alterations of genes associated with cardiovascular and neurological development, function, and disease and modified cardiovascular function in zebrafish. Front Genet 5, 268. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00268

Fuller, N., Ford, A.T., Nagorskaya, L.L., Gudkov, D.I., Smith, J.T., 2018. Reproduction in the freshwater crustacean Asellus aquaticus along a gradient of radionuclide contamination at Chernobyl. Science of The Total Environment 628–629, 11–17. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.309

Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Camilleri, V., Simon, O., Dubourg, N., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., 2021. Effects of gamma ionizing radiation exposure on Danio rerio embryo-larval stages - comparison with tritium exposure. Journal of Hazardous Materials 408, 124866. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124866

Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 169, 69–78. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.005

Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailes, C., Beresford, N.A., Howard, B.J., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. J. Radiol. Prot. 30, 215–233. https://doi.org/10.1088/0952-4746/30/2/S02

Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Gilbin, R., Copplestone, D., Hingston, J., Ciffroy, P., 2006. First Derivation of Predicted-No-Effect Values for Freshwater and Terrestrial Ecosystems Exposed to Radioactive Substances. Environ. Sci. Technol. 40, 6498–6505. https://doi.org/10.1021/es0606531

Garnier-Laplace, J., Geras'kin, S., Della-Vedova, C., Beaugelin-Seiller, K., Hinton, T.G., Real, A., Oudalova, A., 2013. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. Journal of Environmental Radioactivity, Special Issue: 2011 ICRER meeting 121, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.01.013

Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. Sciences Eaux Territoires 1, 12–17.

Geffroy, B., 2022. Energy as the cornerstone of environmentally driven sex allocation. Trends in Endocrinology & Metabolism. https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.07.002

Geffroy, B., Bardonnet, A., 2016. Sex differentiation and sex determination in eels: consequences for management. Fish and Fisheries 17, 375–398. https://doi.org/10.1111/faf.12113

Geffroy, B., Besson, M., Sánchez-Baizán, N., Clota, F., Goikoetxea, A., Sadoul, B., Ruelle, F., Blanc, M.-O., Parrinello, H., Hermet, S., Blondeau-Bidet, E., Pratlong, M., Piferrer, F., Vandeputte, M., Allal, F., 2021. Unraveling the genotype by environment interaction in a thermosensitive fish with a polygenic sex determination system. Proc Natl Acad Sci U S A 118, e2112660118. https://doi.org/10.1073/pnas.2112660118

Geffroy, B., Simon, O., 2013. Effects of a Spirulina platensis-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. Cybium 31–38.

Geras'kin, S.A., Fesenko, S.V., Volkova, P.Yu., Isamov, N.N., 2021. What Have We Learned about the Biological Effects of Radiation from the 35 Years of Analysis of the Consequences of the Chernobyl NPP Accident? Biol Bull Russ Acad Sci 48, 2105–2126. https://doi.org/10.1134/S1062359021120050

Gilbin, R., Alonzo, F., Garnier-Laplace, J., 2008. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of Daphnia magna. J Environ Radioact 99, 134–145. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2007.07.004

Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., Schier, A.F., 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. Science 312, 75–79. https://doi.org/10.1126/science.1122689

Grygoryev, D., Moskalenko, O., Hinton, T.G., Zimbrick, J.D., 2013. DNA damage caused by chronic transgenerational exposure to low dose gamma radiation in Medaka fish (Oryzias latipes). Radiat Res 180, 235–246. https://doi.org/10.1667/RR3190.1

Guédon, R., Maremonti, E., Armant, O., Galas, S., Brede, D.A., Lecomte-Pradines, C., 2021. A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in C. elegans. Ecotoxicology and Environmental Safety 225, 112793. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112793

Guirandy, N., Armant, O., Frelon, S., Pierron, F., Geffroy, B., Daffe, G., Houdelet, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2022a. Maternal exposure to gamma irradiation impacts offspring fitness through altered ovarian transcriptome in zebrafish (Submitted).

Guirandy, N., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Pierron, F., Gonzalez, P., Simon, O., 2022b. Multigenerational exposure to gamma radiation affects offspring differently over generations in zebrafish. Aquatic Toxicology 244, 106101. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106101

Guirandy, N., Gagnaire, B., Frelon, S., Munch, T., Dubourg, N., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Arcanjo, C., Houdigui, S.M.E., Armant, O., Adam-Guillermin, C., Gonzalez, P., Simon, O., 2019. Adverse effects induced by chronic gamma irradiation in progeny of adult fish not affecting parental reproductive performance. Environmental Toxicology and Chemistry 38, 2556–2567. https://doi.org/10.1002/etc.4562

Hara, A., Hiramatsu, N., Fujita, T., 2016. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. Fish Sci 82, 187–202. https://doi.org/10.1007/s12562-015-0957-5

Harney, E., Paterson, S., Collin, H., Chan, B.H.K., Bennett, D., Plaistow, S.J., 2022. Pollution induces epigenetic effects that are stably transmitted across multiple generations. Evolution Letters 6, 118–135. https://doi.org/10.1002/evl3.273

Hattori, R.S., Castañeda-Cortés, D.C., Arias Padilla, L.F., Strobl-Mazzulla, P.H., Fernandino, J.I., 2020. Activation of stress response axis as a key process in environment-induced sex plasticity in fish. Cell. Mol. Life Sci. 77, 4223–4236. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03532-9

Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T., 2010. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Mol Reprod Dev 77, 679–686. https://doi.org/10.1002/mrd.21203

Hernandez, R.E., Galitan, L., Cameron, J., Goodwin, N., Ramakrishnan, L., 2018. Delay of Initial Feeding of Zebrafish Larvae Until 8 Days Postfertilization Has No Impact on Survival or Growth Through the Juvenile Stage. Zebrafish 15, 515–518. https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1579

Herráez, M.P., Ausió, J., Devaux, A., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Bony, S., Saperas, N., Robles, V., 2017. Paternal contribution to development: Sperm genetic damage and repair in fish. Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research 472, 45–59. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.007

Hinfray, N., Sohm, F., Caulier, M., Chadili, E., Piccini, B., Torchy, C., Porcher, J.-M., Guiguen, Y., Brion, F., 2018. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a -eGFP zebrafish line. General and Comparative Endocrinology 261, 179–189. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.014

Ho, N.Y., Yang, L., Legradi, J., Armant, O., Takamiya, M., Rastegar, S., Strähle, U., 2013. Gene Responses in the Central Nervous System of Zebrafish Embryos Exposed to the Neurotoxicant Methyl Mercury. Environ. Sci. Technol. 47, 3316–3325. https://doi.org/10.1021/es3050967

Hoerter, J.D., Arnold, A.A., Kuczynska, D.A., Shibuya, A., Ward, C.S., Sauer, M.G., Gizachew, A., Hotchkiss, T.M., Fleming, T.J., Johnson, S., 2005. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in Escherichia coli. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 81, 171–180. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.07.005

Howard, B.J., Larsson, C.-M., 2008. The ERICA Integrated Approach and its contribution to protection of the environment from ionising radiation. J Environ Radioact 99, 1361–1363. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.04.013

Hu, M., Hu, N., Ding, D., Zhao, W., Feng, Y., Zhang, H., Li, G., Wang, Y., 2016. Developmental toxicity and oxidative stress induced by gamma irradiation in zebrafish embryos. Radiat Environ Biophys 55, 441–450. https://doi.org/10.1007/s00411-016-0663-4

Huang, G., Zhang, F., Ye, Q., Wang, H., 2016. The circadian clock regulates autophagy directly through the nuclear hormone receptor Nr1d1/Rev-erbα and indirectly via Cebpb/(C/ebpβ) in zebrafish. Autophagy 12, 1292–1309. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1183843

Huang, S., Ye, L., Chen, H., 2017. Sex determination and maintenance: the role of DMRT1 and FOXL2. Asian J Androl 19, 619–624. https://doi.org/10.4103/1008-682X.194420

Huang, W., Zheng, S., Wang, X., Cai, Z., Xiao, J., Liu, C., Wu, K., 2020. A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 205. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111165

Hulak, M., Gazo, I., Shaliutina, A., Linhartova, P., 2013. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (Acipenser ruthenus) spermatozoa. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 158, 64–71. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.002

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.-K., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017a. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environmental Research 159, 564–578. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.053

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Mayer, I., Lobert, V.H., Mutoloki, S., Gutzkow, K.B., Teien, H.-C., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2018a. Gamma irradiation during gametogenesis in young adult zebrafish causes persistent genotoxicity and adverse reproductive effects. Ecotoxicol Environ Saf 154, 19–26. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.031

Hurem, S., Martín, L.M., Brede, D.A., Skjerve, E., Nourizadeh-Lillabadi, R., Lind, O.C., Christensen, T., Berg, V., Teien, H.-C., Salbu, B., Oughton, D.H., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017b. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. PLOS ONE 12, e0179259. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179259

Hurem, S., Martín, L.M., Lindeman, L., Brede, D.A., Salbu, B., Lyche, J.L., Aleström, P., Kamstra, J.H., 2018b. Parental exposure to gamma radiation causes progressively altered transcriptomes linked to adverse effects in zebrafish offspring. Environmental Pollution 234, 855–863. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.023

ICRP, 2008. Environmental Protection - the Concept and Use of Reference Animals and Plants. Ann. ICRP 38, 4–6.

ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103.

ICRP, 1977. Recommendations of the ICRP. ICRP Publication 26.

Ilnytskyy, Y., Kovalchuk, O., 2011. Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. Mutat Res 714, 113–125. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.06.014

Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, 2018. Tchernobyl en 2016 [WWW Document]. URL https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-tchernobyl-1986/2016-Tchernobyl-30ans-apres/Pages/0-Tchernobyl-2016-30ans-apres-Sommaire.aspx#.YvoC7y7P02w (accessed 8.15.22).

Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, 2014. Fukushima en 2014 [WWW Document]. URL https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/fukushima-2014-2015/Pages/1-Fukushima-en-2014.aspx#.YvoB6C7P02w (accessed 8.15.22).

Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, 2005. Fiche radionucléide - Césium 137 et environnement.

International Commission on Radiological Protection, 2012. Protection of the Environmentent under Different Exposure Situations.

Ivy, C.M., Robertson, C.E., Bernier, N.J., 2017. Acute embryonic anoxia exposure favours the development of a dominant and aggressive phenotype in adult zebrafish. Proc Biol Sci 284, 20161868. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1868

Jaafar, L., Podolsky, R.H., Dynan, W.S., 2013. Long-Term Effects of Ionizing Radiation on Gene Expression in a Zebrafish Model. PLOS ONE 8, e69445. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069445

Jamieson-Lucy, A., Mullins, M.C., 2019. Chapter One - The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity, in: Lehmann, R. (Ed.), Current Topics in Developmental Biology, The Immortal Germline. Academic Press, pp. 1–34. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.003

Jarvis, R.B., Knowles, J.F., 2003. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate γ-radiation: detection by the alkaline comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 541, 63–69. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00182-7

Kamstra, J.H., Hurem, S., Martin, L.M., Lindeman, L.C., Legler, J., Oughton, D., Salbu, B., Brede, D.A., Lyche, J.L., Aleström, P., 2018. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. Sci Rep 8, 15373. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33817-w

Kane, D.A., Kimmel, C.B., 1993. The zebrafish midblastula transition. Development 119, 447–456. https://doi.org/10.1242/dev.119.2.447

Karga, J., Mandal, S. c., 2017. Effect of different feeds on the growth, survival and reproductive performance of zebrafish, Danio rerio (Hamilton, 1822). Aquaculture Nutrition 23, 406–413. https://doi.org/10.1111/anu.12407

Kelly, G.M., Erezyilmaz, D.F., Moon, R.T., 1995. Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of β-catenin. Mechanisms of Development 53, 261–273. https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00442-4

Kergonou, J.-F., Bernard, P., Braquet, M., Rocquet, G., 1981. Effect of whole-body gamma irradiation on lipid peroxidation in rat tissues. Biochimie 63, 555–559. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(81)80088-0

Kergonou, J.F., Thiriot, C., Braquet, M., Ducousso, R., Rocquet, G., 1986. Influence of whole-body γ-irradiation upon rat erythrocyte: lipid peroxidation and osmotic fragility. Biochimie 68, 311–318. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80028-1

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics 203, 253–310. https://doi.org/10.1002/aja.1002030302

Knowles, J.F., 2002. An investigation into the effects of chronic radiation on fish.

Kong, E.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2016. Zebrafish as an In Vivo Model to Assess Epigenetic Effects of Ionizing Radiation. International Journal of Molecular Sciences 17, 2108. https://doi.org/10.3390/ijms17122108

Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (Danio rerio) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 650, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.009

Kossack, M.E., Draper, B.W., 2019. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (Danio rerio). Curr Top Dev Biol 134, 119–149. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.02.004

Kremsky, I., Corces, V.G., 2020. Protection from DNA re-methylation by transcription factors in primordial germ cells and pre-implantation embryos can explain trans-generational epigenetic inheritance. Genome Biology 21, 118. https://doi.org/10.1186/s13059-020-02036-w

Kryshev, A., 1998. Modelling the accidental radioactive contamination and assessment of doses to biota in the Chernobyl NPP's cooling pond. Presented at the Proceedings of the topical meeting of International Union of Radioecologists, Mol, 1, pp. 32–38.

Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Mill, J., Santos, E.M., 2018. Sex-specific transcription and DNA methylation profiles of reproductive and epigenetic associated genes in the gonads and livers of breeding zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 222, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.004

Langdon, Y.G., Mullins, M.C., 2011. Maternal and zygotic control of zebrafish dorsoventral axial patterning. Annu Rev Genet 45, 357–377. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132517

Larras, F., Billoir, E., Baillard, V., Siberchicot, A., Scholz, S., Wubet, T., Tarkka, M., Schmitt-Jansen, M., Delignette-Muller, M.-L., 2018. DRomics: A Turnkey Tool to Support the Use of the Dose–Response Framework for Omics Data in Ecological Risk Assessment. Environ. Sci. Technol. 52, 14461–14468. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04752

Larras, F., Billoir, E., Scholz, S., Tarkka, M., Wubet, T., Delignette-Muller, M.-L., Schmitt-Jansen, M., 2020. A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte Scenedesmus vacuolatus. Journal of Hazardous Materials 397, 122727. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122727

Larsson, C.-M., 2004. The FASSET framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems--an overview. J Radiol Prot 24, A1-12. https://doi.org/10.1088/0952-4746/24/4a/001

Laue, K., Rajshekar, S., Courtney, A.J., Lewis, Z.A., Goll, M.G., 2019. The maternal to zygotic transition regulates genome-wide heterochromatin establishment in the zebrafish embryo. Nat Commun 10, 1551. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09582-3

Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

Lawrence, C., Best, J., James, A., Maloney, K., 2012. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (Danio rerio). Aquaculture 368–369, 103–108. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.022

Lawrence, C., Ebersole, J.P., Kesseli, R.V., 2008. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (Danio rerio). Environ Biol Fish 81, 239–246. https://doi.org/10.1007/s10641-007-9195-8

Lecomte-Pradines, C., Adam-Guillermin, C., Gashchak, S., Bradshaw, C., Copplestone, D., Beresford, N.A., 2020. More than thirty years after the Chernobyl accident: What do we know about the effects of radiation on the environment? Journal of Environmental Radioactivity 211, 106108. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106108

Lecomte-Pradines, C., Bonzom, J.-M., Della-Vedova, C., Beaugelin-Seiller, K., Villenave, C., Gaschak, S., Coppin, F., Dubourg, N., Maksimenko, A., Adam-Guillermin, C., Garnier-Laplace, J., 2014. Soil nematode assemblages as bioindicators of radiation impact in the Chernobyl Exclusion Zone. Science of The Total Environment 490, 161–170. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.115

Lehmann, R., Ephrussi, A., 1994. Germ plasm formation and germ cell determination in Drosophila. Ciba Found Symp 182, 282–296; discussion 296-300. https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch16

Lemos, J., Neuparth, T., Trigo, M., Costa, P., Vieira, D., Cunha, L., Ponte, F., Costa, P.S., Metello, L.F., Carvalho, A.P., 2017. Single Low-Dose Ionizing Radiation Induces Genotoxicity in Adult Zebrafish and its Non-Irradiated Progeny. Bull Environ Contam Toxicol 98, 190–195. https://doi.org/10.1007/s00128-016-2006-1

Lerebours, A., Gudkov, D., Nagorskaya, L., Kaglyan, A., Rizewski, V., Leshchenko, A., Bailey, E.H., Bakir, A., Ovsyanikova, S., Laptev, G., Smith, J.T., 2018. Impact of Environmental Radiation on the Health and Reproductive Status of Fish from Chernobyl. Environ. Sci. Technol. 52, 9442–9450. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02378

Lerebours, A., Nagorskaya, L., Gudkov, D., Smith, J., 2016. Effect of radiation on the health of fish from Chernobyl,.

Lerebours, A., Robson, S., Sharpe, C., Nagorskaya, L., Gudkov, D., Haynes-Lovatt, C., Smith, J.T., 2020. Transcriptional Changes in the Ovaries of Perch from Chernobyl. Environ. Sci. Technol. 54, 10078–10087. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02575

Leung, C.T., Yang, Y., Yu, K.N., Tam, N., Chan, T.F., Lin, X., Kong, R.Y.C., Chiu, J.M.Y., Wong, A.S.T., Lui, W.Y., Yuen, K.W.Y., Lai, K.P., Wu, R.S.S., 2021. Low-Dose Radiation Can Cause Epigenetic Alterations Associated With Impairments in Both Male and Female Reproductive Cells. Frontiers in Genetics 12.

Li, J., Ge, W., 2020. Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies. Molecular and Cellular Endocrinology 507, 110778. https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110778

Li, R., Zhang, L., Li, W., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, M., Zhao, L., Hu, X., Wang, S., Bao, Z., 2018. FOXL2 and DMRT1L Are Yin and Yang Genes for Determining Timing of Sex Differentiation in the Bivalve Mollusk Patinopecten yessoensis. Front Physiol 9, 1166. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01166

Li, S., Wu, Q., Sun, Q., Coffin, S., Gui, W., Zhu, G., 2019. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. Aquat Toxicol 211, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.002

Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., 2012. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. PLOS ONE 7, e34397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397

Lin, W., Guo, H., Wang, L., Zhang, D., Wu, X., Li, L., Qiu, Y., Yang, L., Li, D., Tang, R., 2020. Parental Transfer of Microcystin-LR-Induced Innate Immune Dysfunction of Zebrafish: A Cross-Generational Study. Environ. Sci. Technol. 54, 1014–1023. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04953

Liu, Y., Zhu, Z., Ho, I.H.T., Shi, Y., Li, J., Wang, X., Chan, M.T.V., Cheng, C.H.K., 2020. Genetic Deletion of miR-430 Disrupts Maternal-Zygotic Transition and Embryonic Body Plan. Frontiers in Genetics 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00853

López-Barradas, A., González-Cid, T., Vázquez, N., Gavi-Maza, M., Reyes-Camacho, A., Velázquez-Villegas, L.A., Ramírez, V., Zandi-Nejad, K., Mount, D.B., Torres, N., Tovar, A.R., Romero, M.F., Gamba, G., Plata, C., 2016. Insulin and SGK1 reduce the function of Na+/monocarboxylate transporter 1 (SMCT1/SLC5A8). American Journal of Physiology-Cell Physiology 311, C720–C734. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2015

Lousada, C.M., Soroka, I.L., Yagodzinskyy, Y., Tarakina, N.V., Todoshchenko, O., Hänninen, H., Korzhavyi, P.A., Jonsson, M., 2016. Gamma radiation induces hydrogen absorption by copper in water. Sci Rep 6, 24234. https://doi.org/10.1038/srep24234

Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 74, 957–967. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90719-7

Lu, J., Li, W., Hu, R., Zhou, Y., Fei, Y., Zhang, Y., Zhai, W., Chen, L., 2022. Molecular and morphological changes in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) gonads during high-temperature-induced masculinization. Aquaculture Research 53, 921–931. https://doi.org/10.1111/are.15633

Lubzens, E., Bobe, J., Young, G., Sullivan, C.V., 2017. Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research 472, 107–143. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.029

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. General and Comparative Endocrinology, Fish Reproduction 165, 367–389. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022

Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., Jasper, H., 2007. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. EMBO J 26, 380–390. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601484

Ma, Y.-B., Lu, C.-J., Junaid, M., Jia, P.-P., Yang, L., Zhang, J.-H., Pei, D.-S., 2018. Potential adverse outcome pathway (AOP) of silver nanoparticles mediated reproductive toxicity in zebrafish. Chemosphere 207, 320–328. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.019

Ma, Z., Peng, H., Jin, Y., Zhang, X., Xie, X., Jian, K., Liu, H., Su, G., Tang, S., Yu, H., 2018. Multigenerational Effects and Demographic Responses of Zebrafish (Danio rerio) Exposed to Organo-Bromine Compounds. Environ. Sci. Technol. 52, 8764–8773. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00569

Maremonti, E., Eide, D.M., Oughton, D.H., Salbu, B., Grammes, F., Kassaye, Y.A., Guédon, R., Lecomte-Pradines, C., Brede, D.A., 2019. Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in Caenorhabditis elegans via impairment of spermatogenesis. Science of The Total Environment 695, 133835. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133835

Maremonti, E., Eide, D.M., Rossbach, L.M., Lind, O.C., Salbu, B., Brede, D.A., 2020. In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in Caenorhabditis elegans. Free Radical Biology and Medicine 152, 583–596. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.037

Marlow, F.L., 2010. Oocyte Polarity and the Embryonic Axes: The Balbiani Body, an Ancient Oocyte Asymmetry, Maternal Control of Development in Vertebrates: My Mother Made Me Do It! Morgan & Claypool Life Sciences.

Martín, L., Kamstra, J.H., Hurem, S., Lindeman, L.C., Brede, D.A., Aanes, H., Babiak, I., Arenal, A., Oughton, D., Salbu, B., Lyche, J.L., Aleström, P., 2021. Altered non-coding RNA expression profile in F1 progeny 1 year after parental irradiation is linked to adverse effects in zebrafish. Sci Rep 11, 4142. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83345-3

Martinez, R., Vera-Chang, M.N., Haddad, M., Zon, J., Navarro-Martin, L., Trudeau, V.L., Mennigen, J.A., 2019. Developmental fluoxetine exposure in zebrafish reduces offspring basal cortisol concentration via life stage-dependent maternal transmission. PLOS ONE 14, e0212577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212577

Maternal Effect Genes in Development, Volume 140 - 1st Edition [WWW Document], n.d. URL https://www.elsevier.com/books/maternal-effect-genes-in-development/marlow/978-0-12-815220-1 (accessed 2.9.22).

McAleer, M.F., Davidson, C., Davidson, W.R., Yentzer, B., Farber, S.A., Rodeck, U., Dicker, A.P., 2005. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics 61, 10–13. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.09.046

McBride, W.H., Iwamoto, K.S., Syljuasen, R., Pervan, M., Pajonk, F., 2003. The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. Oncogene 22, 5755–5773. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206676

McCormick, M.I., 1999. Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. Oecologia 118, 412–422. https://doi.org/10.1007/s004420050743

Mercer, M., Jang, S., Ni, C., Buszczak, M., 2021. The Dynamic Regulation of mRNA Translation and Ribosome Biogenesis During Germ Cell Development and Reproductive Aging. Frontiers in Cell and Developmental Biology 9. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710186

Miccoli, A., Dalla Valle, L., Carnevali, O., 2017. The maternal control in the embryonic development of zebrafish. Gen Comp Endocrinol 245, 55–68. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.028

Mittwoch, U., 2004. The elusive action of sex-determining genes: mitochondria to the rescue? Journal of Theoretical Biology 228, 359–365. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.02.001

Mizoguchi, B.A., Valenzuela, N., 2016. Ecotoxicological Perspectives of Sex Determination. SXD 10, 45–57. https://doi.org/10.1159/000444770

Morais, R.D.V.S., Thomé, R.G., Lemos, F.S., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2012. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. Cell Tissue Res 347, 467–478. https://doi.org/10.1007/s00441-012-1327-6

Moritz, C.P., 2017. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. PROTEOMICS 17, 1600189. https://doi.org/10.1002/pmic.201600189

MotherSill, C., Seymour, C., 2012. Changing paradigms in radiobiology. Mutat Res 750, 85–95. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.007

Münch, J., Grivas, D., González-Rajal, Á., Torregrosa-Carrión, R., de la Pompa, J.L., 2017. Notch signalling restricts inflammation and serpine1 expression in the dynamic endocardium of the regenerating zebrafish heart. Development 144, 1425–1440. https://doi.org/10.1242/dev.143362

Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Armant, O., 2020. Ionising Radiation Induces Promoter DNA Hypomethylation and Perturbs Transcriptional Activity of Genes Involved in Morphogenesis during Gastrulation in Zebrafish. Int J Mol Sci 21, E4014. https://doi.org/10.3390/ijms21114014

Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Loro, G., Arcanjo, C., Frelon, S., Floriani, M., Dubourg, N., Baudelet, E., Audebert, S., Camoin, L., Armant, O., 2019. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. Sci Rep 9, 20241. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w

Nacci, D.E., Gleason, T.R., Munns, W.R., 2010. Evolutionary and Ecological Effects of Multi-Generational Exposures to Anthropogenic Stressors. Human and Ecological Risk Assessment. https://doi.org/10.1080/20028091056746

Nakashima, J., Duong, H., 2022. Radiation Physics, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Croce, L.D., Piferrer, F., 2011. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. PLOS Genetics 7, e1002447. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2016. Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish. Sci Rep 6, 22582. https://doi.org/10.1038/srep22582

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2013. Role of glucocorticoid in developmental programming: Evidence from zebrafish. General and Comparative Endocrinology, Combined Special Issues: CESP 2012 and 7th AOSCE Congress 181, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.10.006

Nesan, D., Vijayan, M.M., 2012. Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. Molecular and Cellular Endocrinology 363, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.07.010

Newman, T.A.C., Carleton, C.R., Leeke, B., Hampton, M.B., Horsfield, J.A., 2015. Embryonic oxidative stress results in reproductive impairment for adult zebrafish. Redox Biology 6, 648–655. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.10.010

Ng, C.Y.P., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2017. Photon hormesis deactivates alpha-particle induced bystander effects between zebrafish embryos. Radiation Physics and Chemistry 133, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.12.025

Nilsson, E.E., Ben Maamar, M., Skinner, M.K., 2022. Role of epigenetic transgenerational inheritance in generational toxicology. Environ Epigenet 8, dvac001. https://doi.org/10.1093/eep/dvac001

Nojima, H., Shimizu, T., Kim, C.-H., Yabe, T., Bae, Y.-K., Muraoka, O., Hirata, T., Chitnis, A., Hirano, T., Hibi, M., 2004. Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish. Mech Dev 121, 371–386. https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.02.003

Norrgren, L., 2012. Fish models for ecotoxicology. Acta Vet Scand 54, S14. https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-S1-S14

OCDE, 2015. Test No. 240: Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT).

O'Connor, C.M., Gilmour, K.M., Arlinghaus, R., Van Der Kraak, G., Cooke, S.J., 2009. Stress and Parental Care in a Wild Teleost Fish: Insights from Exogenous Supraphysiological Cortisol Implants. Physiological and Biochemical Zoology 82, 709–719. https://doi.org/10.1086/605914

OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.

OECD, 2018. Essai n° 443 : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération.

OECD, 2012. Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264185265-en

OECD, 2011. Test No. 234: Fish Sexual Development Test.

OECD, 2009. Test No. 230: 21-day Fish Assay.

OECD, 2000. Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test.

Ortega-Recalde, O., Day, R.C., Gemmell, N.J., Hore, T.A., 2019. Zebrafish preserve global germline DNA methylation while sex-linked rDNA is amplified and demethylated during feminisation. Nat Commun 10, 3053. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10894-7

Palasin, K., Uechi, T., Yoshihama, M., Srisowanna, N., Choijookhuu, N., Hishikawa, Y., Kenmochi, N., Chotigeat, W., 2019. Abnormal development of zebrafish after knockout and knockdown of ribosomal protein L10a. Sci Rep 9, 18130. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54544-w

Pan, Y.-X., Luo, Z., Zhuo, M.-Q., Wei, C.-C., Chen, G.-H., Song, Y.-F., 2018. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish Danio rerio. Aquat Toxicol 199, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.017

Parisot, F., Bourdineaud, J.-P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in Daphnia magna during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. Aquatic Toxicology 163, 27–36. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002

Patiño, R., Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry 26, 57–70. https://doi.org/10.1023/A:1023311613987

Pelegri, F., 2003. Maternal factors in zebrafish development. Dev Dyn 228, 535–554. https://doi.org/10.1002/dvdy.10390

Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2831–2837. https://doi.org/10.1002/etc.695

Pereira, S., Malard, V., Ravanat, J.-L., Davin, A.-H., Armengaud, J., Foray, N., Adam-Guillermin, C., 2014. Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. PLoS One 9, e92974. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092974

Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M.P., 2010. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. Reproduction 139, 989–997. https://doi.org/10.1530/REP-10-0037

Pierron, F., Daffe, G., Lambert, P., Couture, P., Baudrimont, M., 2019. Retrotransposon methylation and activity in wild fish (A. anguilla): A matter of size. Environmental Pollution 245, 494–503. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.014

Pierron, F., Lorioux, S., Héroin, D., Daffe, G., Etcheverria, B., Cachot, J., Morin, B., Dufour, S., Gonzalez, P., 2021. Transgenerational epigenetic sex determination: Environment experienced by female fish affects offspring sex ratio. Environmental Pollution 277, 116864. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116864

Piferrer, F., 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. Developmental Dynamics 242, 360–370. https://doi.org/10.1002/dvdy.23924

Piferrer, F., Anastasiadi, D., 2021. Do the Offspring of Sex Reversals Have Higher Sensitivity to Environmental Perturbations? Sex Dev 15, 134–147. https://doi.org/10.1159/000515192

Piferrer, F., Anastasiadi, D., Valdivieso, A., Sánchez-Baizán, N., Moraleda-Prados, J., Ribas, L., 2019. The Model of the Conserved Epigenetic Regulation of Sex. Front Genet 10, 857. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00857

Pikulkaew, S., Benato, F., Celeghin, A., Zucal, C., Skobo, T., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2011. The knockdown of maternal glucocorticoid receptor mRNA alters embryo development in zebrafish. Developmental Dynamics 240, 874–889. https://doi.org/10.1002/dvdy.22586

Potok, M.E., Nix, D.A., Parnell, T.J., Cairns, B.R., 2013. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. Cell 153, 759–772. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.030

Praveen Kumar, M.K., Shyama, S.K., Kashif, S., Dubey, S.K., Avelyno, D., Sonaye, B.H., Kadam Samit, B., Chaubey, R.C., 2017. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicol Environ Saf 142, 95–101. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.054

Praveen Kumar, M.K., Shyama, S.K., Sonaye, B.S., Naik, U.R., Kadam, S.B., Bipin, P.D., D'costa, A., Chaubey, R.C., 2014. Evaluation of γ-radiation-induced DNA damage in two species of bivalves and their relative sensitivity using comet assay. Aquat Toxicol 150, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.007

R Core Team, R.C.T., 2021. R: A language and environment for statistical ## computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW Document]. URL URL https://www.R-project.org/

Rackham, B.D., Woodhead, D.S., 1984. Effects of Chronic γ-irradiation on the Gonads of Adult Ameca Splendens (Osteichthyes: Teleostei). International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine 45, 645–656. https://doi.org/10.1080/09553008414550911

Rai, K., Nadauld, L.D., Chidester, S., Manos, E.J., James, S.R., Karpf, A.R., Cairns, B.R., Jones, D.A., 2006. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. Mol Cell Biol 26, 7077–7085. https://doi.org/10.1128/MCB.00312-06

Rajendiran, P., Jaafar, F., Kar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., Parhar, I.S., 2021. Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. Biology (Basel) 10, 973. https://doi.org/10.3390/biology10100973

Reading, B.J., Sullivan, C.V., 2011. THE REPRODUCTIVE ORGANS AND PROCESSES | Vitellogenesis in Fishes, in: Farrell, A.P. (Ed.), Encyclopedia of Fish Physiology. Academic Press, San Diego, pp. 635–646. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00257-4

Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. Mar Environ Res 54, 419–423. https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00146-0

Reinardy, H.C., Dharamshi, J., Jha, A.N., Henry, T.B., 2013a. Changes in expression profiles of genes associated with DNA repair following induction of DNA damage in larval zebrafish Danio rerio. Mutagenesis 28, 601–608. https://doi.org/10.1093/mutage/get038

Reinardy, H.C., Syrett, J.R., Jeffree, R.A., Henry, T.B., Jha, A.N., 2013b. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (Danio rerio), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. Aquatic Toxicology 126, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.007

Reisz, J.A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., Furdui, C.M., 2014. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. Antioxid Redox Signal 21, 260–292. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489

Ren, F., Lin, Q., Gong, G., Du, X., Dan, H., Qin, W., Miao, R., Xiong, Y., Xiao, R., Li, X., Gui, J.-F., Mei, J., 2020. Igf2bp3 maintains maternal RNA stability and ensures early embryo development in zebrafish. Commun Biol 3, 94. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0827-2

Rhee, J.-S., Kim, B.-M., Kang, C.-M., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2012. Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, Kryptolebias marmoratus embryo. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 1745–1753. https://doi.org/10.1002/etc.1873

Ribas, L., Liew, W.C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., Piferrer, F., 2017a. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E941–E950. https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114

Ribas, L., Piferrer, F., 2014. The zebrafish (Danio rerio) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. Reviews in Aquaculture 6, 209–240. https://doi.org/10.1111/raq.12041

Ribas, L., Valdivieso, A., Díaz, N., Piferrer, F., 2017b. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. Journal of Experimental Biology 220, 1056–1064. https://doi.org/10.1242/jeb.144980

Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., Marks, P.A., 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 10014–10019. https://doi.org/10.1073/pnas.180316197

Robles, P., Turner, A., Zuco, G., Adams, S., Paganopolou, P., Winton, M., Hill, B., Kache, V., Bateson, C., Pires-daSilva, A., 2021. Parental energy-sensing pathways control intergenerational offspring sex determination in the nematode Auanema freiburgensis. BMC Biology 19, 102. https://doi.org/10.1186/s12915-021-01032-1

Rodríguez-Marí, A., Cañestro, C., BreMiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., Postlethwait, J.H., 2010. Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis. PLOS Genetics 6, e1001034. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001034

Russo, G., Landi, R., Pezone, A., Morano, A., Zuchegna, C., Romano, A., Muller, M.T., Gottesman, M.E., Porcellini, A., Avvedimento, E.V., 2016. DNA damage and Repair Modify DNA methylation and Chromatin Domain of the Targeted Locus: Mechanism of allele methylation polymorphism. Sci Rep 6, 33222. https://doi.org/10.1038/srep33222

Sadoul, B., Geffroy, B., 2019. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. Journal of Fish Biology 94, 540–555. https://doi.org/10.1111/jfb.13904

Saito, K., Tanihata, I., Fujiwara, M., Saito, T., Shimoura, S., Otsuka, T., Onda, Y., Hoshi, M., Ikeuchi, Y., Takahashi, F., Kinouchi, N., Saegusa, J., Seki, A., Takemiya, H., Shibata, T., 2015. Detailed deposition density maps constructed by large-scale soil sampling for gamma-ray emitting radioactive nuclides from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. Journal of Environmental Radioactivity 139, 308–319. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.02.014

Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F., 2009. Time-course Expression of DNA Repair-related Genes in Hepatocytes of Zebrafish (Danio rerio) After UV-B Exposure. Photochemistry and Photobiology 85, 220–226. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00422.x

Sant, K.E., Timme-Laragy, A.R., 2018. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. Curr Environ Health Rep 5, 125–133. https://doi.org/10.1007/s40572-018-0183-2

Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. Aquatic Toxicology 191, 141–163. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.005

Santos, F., Dean, W., 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. Reproduction 127, 643–651. https://doi.org/10.1530/rep.1.00221

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W., Devaux, A., 2013a. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. Reproductive Toxicology 36, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.11.004

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Reggio, J., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W., Devaux, A., 2013b. Parental exposure to methyl methane sulfonate of three-spined stickleback: contribution of DNA damage in male and female germ cells to further development impairment in progeny. Ecotoxicology 22, 815–824. https://doi.org/10.1007/s10646-013-1088-3

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. Endocrine Reviews 21, 55–89. https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389

Sarapultseva, E.I., Gorski, A.I., 2013. Low-Dose γ-Irradiation Affects the Survival of Exposed Daphnia and their Offspring. Dose-Response 11, dose-response.12-033.Sarapultseva. https://doi.org/10.2203/dose-response.12-033.Sarapultseva

Sathiyaa, R., Vijayan, M.M., 2003. Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. American Journal of Physiology-Cell Physiology 284, C1508–C1515. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00448.2002

Schmahl, J., Rizzolo, K., Soriano, P., 2008. The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages. Genes Dev 22, 3255–3267. https://doi.org/10.1101/gad.1723908

Schwindt, A.R., 2015. Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there evidence of transgenerational inheritance? General and Comparative Endocrinology, Disruption of the thyroid and sex steroid hormone systems and their crosstalk in aquatic wildlife 219, 152–164. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.020

Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, Brachydanio rerio. Journal of Morphology 218, 203–224. https://doi.org/10.1002/jmor.1052180209

Shao, C., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Lian, J., Hu, Q., Sun, B., Jin, L., Liu, S., Wang, Z., Zhao, H., Jin, Z., Liang, Z., Li, Y., Zheng, Q., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, G., 2014. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. Genome Res 24, 604–615. https://doi.org/10.1101/gr.162172.113

Shimada, A., Shima, A., 2001. High incidence of mosaic mutations induced by irradiating paternal germ cells of the medaka fish, Oryzias latipes. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 495, 33–42. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00193-0

Siegenthaler, P.F., Zhao, Y., Zhang, K., Fent, K., 2017. Reproductive and transcriptional effects of the antiandrogenic progestin chlormadinone acetate in zebrafish (Danio rerio). Environ Pollut 223, 346–356. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.031

Siegfried, K.R., Nüsslein-Volhard, C., 2008. Germ line control of female sex determination in zebrafish. Developmental Biology 324, 277–287. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.025

Simon, O., Floc'h, E., Geffroy, B., Frelon, S., 2014. Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1817–1824. https://doi.org/10.1002/etc.2586

Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011a. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve Corbicula fluminea. Journal of Environmental Radioactivity 102, 766–773. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.04.004

Simon, O., Gagnaire, B., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., 2018. Toxicokinetic and toxicodynamic of depleted uranium in the zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 197, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.013

Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T.G., Gilbin, R., 2011b. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of γ irradiation on zebrafish eggs. Journal of Environmental Radioactivity 102, 1039–1044. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.06.004

Simon, Olivier, Mottin, E., Geffroy, B., Hinton, T., 2011. Effects of dietary uranium on reproductive endpoints—fecundity, survival, reproductive success—of the fish Danio rerio. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 220–225. https://doi.org/10.1002/etc.381

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175, 184–191. https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0

Sinha, P., Arunachalam, K.D., Annamalai, S.K., 2018. Radio-protective dosimetry of Pangasius sutchi as a biomarker, against gamma radiation dosages perceived by genotoxic assays. Ecotoxicology and Environmental Safety 164, 629–640. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.071

Skinner, M.K., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., 2011. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. Reproductive Toxicology, Prenatal Programming and Toxicity II (PPTOX II): Role

of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease 31, 337–343. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.012

Skvortsova, K., Tarbashevich, K., Stehling, M., Lister, R., Irimia, M., Raz, E., Bogdanovic, O., 2019. Retention of paternal DNA methylome in the developing zebrafish germline. Nat Commun 10, 1–13. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10895-6

Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G., Raz, E., 2005. Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 4074–4079. https://doi.org/10.1073/pnas.0407475102

Smallwood, S.A., Kelsey, G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends in Genetics 28, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004

Smith, G.C., Jackson, S.P., 1999. The DNA-dependent protein kinase. Genes Dev 13, 916–934. https://doi.org/10.1101/gad.13.8.916

Soares, J., Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., Monteiro, N.M., Vieira, M.N., Oliveira, J.M.A., Guedes-Dias, P., Fontaínhas-Fernandes, A., Parra, S.S., Carvalho, A.P., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2009. Disruption of zebrafish (Danio rerio) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. Aquatic Toxicology 95, 330–338. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.021

Spitz, D.R., Azzam, E.I., Li, J.J., Gius, D., 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. Cancer Metastasis Rev 23, 311–322. https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc

Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., Kille, P., 2020. Species Sensitivity to Toxic Substances: Evolution, Ecology and Applications. Frontiers in Environmental Science 8.

Sreenivasan, R., Jiang, J., Wang, X., Bártfai, R., Kwan, H.Y., Christoffels, A., Orbán, L., 2014. Gonad Differentiation in Zebrafish Is Regulated by the Canonical Wnt Signaling Pathway1. Biology of Reproduction 90, 45, 1–10. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110874

Štajner, D., Milošević, M., Popović, B.M., 2007. Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds. International Journal of Molecular Sciences 8, 618–627. https://doi.org/10.3390/i8070618

Sumoy, L., Kiefer, J., Kimelman, D., 1999. Conservation of intracellular Wnt signaling components in dorsal-ventral axis formation in zebrafish. Dev Genes Evol 209, 48–58. https://doi.org/10.1007/s004270050226

Sun, X., Zhang, L., Liu, H., Wang, Z., Giesy, J.P., 2021. Ecotoxicological risk assessment of metal cocktails based on maximum cumulative ratio during multi-generational exposures. Water Research 200, 117274. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117274

Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S.C., Sun, Y.A., Lee, C., Tarakhovsky, A., Lao, K., Surani, M.A., 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. Genes Dev 21, 644–648. https://doi.org/10.1101/gad.418707

Terrazas-Salgado, L., García-Gasca, A., Betancourt-Lozano, M., Llera-Herrera, R., Alvarado-Cruz, I., Yáñez-Rivera, B., 2022. Epigenetic Transgenerational Modifications Induced by Xenobiotic Exposure in Zebrafish. Frontiers in Cell and Developmental Biology 10.

Thatcher, E.J., Flynt, A.S., Li, N., Patton, J.R., Patton, J.G., 2007. MiRNA expression analysis during normal zebrafish development and following inhibition of the Hedgehog and Notch signaling pathways. Developmental Dynamics 236, 2172–2180. https://doi.org/10.1002/dvdy.21211

Thompson, W.A., Vijayan, M.M., 2021. Zygotic exposure to venlafaxine disrupts cortisol stress axis activity in multiple generations of zebrafish. Environmental Pollution 274, 116535. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116535

Tollefsen, K.E., Alonzo, F., Beresford, N.A., Brede, D.A., Dufourcq-Sekatcheff, E., Gilbin, R., Horemans, N., Hurem, S., Laloi, P., Maremonti, E., Oughton, D., Simon, O., Song, Y., Wood, M.D., Xie, L., Frelon, S., 2022. Adverse outcome pathways (AOPs) for radiation-induced reproductive effects in

environmental species: state of science and identification of a consensus AOP network. International Journal of Radiation Biology 0, 1–16. https://doi.org/10.1080/09553002.2022.2110317

Tovo-Neto, A., Martinez, E.R.M., Melo, A.G., Doretto, L.B., Butzge, A.J., Rodrigues, M.S., Nakajima, R.T., Habibi, H.R., Nóbrega, R.H., 2020. Cortisol Directly Stimulates Spermatogonial Differentiation, Meiosis, and Spermiogenesis in Zebrafish (Danio rerio) Testicular Explants. Biomolecules 10, E429. https://doi.org/10.3390/biom10030429

Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K.A.C., Alonzo, F., 2018. Transgenerational DNA Methylation Changes in Daphnia magna Exposed to Chronic γ Irradiation. Environ. Sci. Technol. 52, 4331–4339. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05695

Tsyusko, O., Glenn, T., Yi, Y., Joice, G., Jones, K., Aizawa, K., Coughlin, D., Zimbrick, J., Hinton, T., 2011. Differential genetic responses to ionizing irradiation in individual families of Japanese medaka, Oryzias latipes. Mutat Res 718, 18–23. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.11.001

Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., Masse, R., 2006. The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses. J Radiol Prot 26, 317–324. https://doi.org/10.1088/0952-4746/26/3/N01

Tzung, K.-W., Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E.K., Orbán, L., 2015. Early Depletion of Primordial Germ Cells in Zebrafish Promotes Testis Formation. Stem Cell Reports 4, 61–73. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.011

UNSCEAR, 2008. Effects of Ionizing Radiation . UNSCEAR 2006 Report. Volume I. Scientific Annex A. Epidemiological Studies of Radiation and Cancer (New York: United Nations).

UNSCEAR, 2000. Sources and effects of ionizing radiation / 89 p. :

Valdivieso, A., Ribas, L., Monleón-Getino, A., Orbán, L., Piferrer, F., 2020. Exposure of zebrafish to elevated temperature induces sex ratio shifts and alterations in the testicular epigenome of unexposed offspring. Environmental Research 186, 109601. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109601

Valdivieso, A., Wilson, C.A., Amores, A., da Silva Rodrigues, M., Nóbrega, R.H., Ribas, L., Postlethwait, J.H., Piferrer, F., 2022. Environmentally-induced sex reversal in fish with chromosomal vs. polygenic sex determination. Environmental Research 213, 113549. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113549

Van der Ven, L.T.M., Holbech, H., Fenske, M., Van den Brandhof, E.-J., Gielis-Proper, F.K., Wester, P.W., 2003. Vitellogenin expression in zebrafish Danio rerio: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. Aquatic Toxicology 65, 1–11. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00103-6

Van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 120, 107–112. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10017-X

Vastenhouw, N.L., Cao, W.X., Lipshitz, H.D., 2019. The maternal-to-zygotic transition revisited. Development 146, dev161471. https://doi.org/10.1242/dev.161471

Velki, M., Meyer-Alert, H., Seiler, T.-B., Hollert, H., 2017. Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. Aquatic Toxicology 193, 187–200. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.019

Vera-Chang, M.N., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2019. Ancestral Fluoxetine Exposure Sensitizes Zebrafish to Venlafaxine-Induced Reductions in Cortisol and Spawning. Endocrinology 160, 2137–2142. https://doi.org/10.1210/en.2019-00281

Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquatic Toxicology 105, 235–245. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.011

Vuori, K.A., Kanerva, M., Ikonen, E., Nikinmaa, M., 2008. Oxidative stress during baltic salmon feeding migration may be associated with yolk-sac fry mortality. Environmental Science and Technology 42, 2668–2673. https://doi.org/10.1021/es702632c

Wada, T., Tomiya, A., Enomoto, M., Sato, T., Morishita, D., Izumi, S., Niizeki, K., Suzuki, S., Morita, T., Kawata, G., 2016. Radiological impact of the nuclear power plant accident on freshwater fish in Fukushima: An overview of monitoring results. Journal of Environmental Radioactivity 151, 144–155. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.09.017

Waddington, C.H., 1940. Organisers and genes. Organisers and genes.

Wafer, L.N., Jensen, V.B., Whitney, J.C., Gomez, T.H., Flores, R., Goodwin, B.S., 2016. Effects of Environmental Enrichment on the Fertility and Fecundity of Zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 55, 291–294.

Walker, C., Streisinger, G., 1983. Induction of Mutations by γ-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. Genetics 103, 125–136.

Walser, C.B., Lipshitz, H.D., 2011. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. Current Opinion in Genetics & Development, Differentiation and gene regulation 21, 431–443. https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.03.003

Wang, J., Zhu, X., Zhang, X., Zhao, Z., Liu, H., George, R., Wilson-Rawls, J., Chang, Y., Chen, Y., 2011. Disruption of zebrafish (Danio rerio) reproduction upon chronic exposure to TiO2 nanoparticles. Chemosphere 83, 461–467. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.069

Wang, M., Chen, J., Lin, K., Chen, Y., Hu, W., Tanguay, R.L., Huang, C., Dong, Q., 2011. Chronic zebrafish PFOS exposure alters sex ratio and maternal related effects in F1 offspring. Environ Toxicol Chem 30, 2073–2080. https://doi.org/10.1002/etc.594

Wang, X., Ma, X., Wei, G., Ma, W., Zhang, Z., Chen, X., Gao, L., Liu, Z., Yuan, Y., Yi, L., Wang, J., Tokumoto, T., Huang, J., Chen, D., Zhang, J., Liu, J., 2021. The Role of DNA Methylation Reprogramming during Sex Determination and Transition in Zebrafish. Genomics Proteomics Bioinformatics 19, 48–63. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.10.004

Wdowiak, A., Skrzypek, M., Stec, M., Panasiuk, L., 2019. Effect of ionizing radiation on the male reproductive system. Ann Agric Environ Med 26, 210–216. https://doi.org/10.26444/aaem/106085

Webster, K.A., Schach, U., Ordaz, A., Steinfeld, J.S., Draper, B.W., Siegfried, K.R., 2017. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish. Developmental Biology 422, 33–46. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.008

Wedekind, C., 2017. Demographic and genetic consequences of disturbed sex determination. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 372, 20160326. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0326

Wei, C., Salichos, L., Wittgrove, C.M., Rokas, A., Patton, J.G., 2012. Transcriptome-wide analysis of small RNA expression in early zebrafish development. RNA 18, 915–929. https://doi.org/10.1261/rna.029090.111

Welch, E.L., Eno, C.C., Nair, S., Lindeman, R.E., Pelegri, F., 2017. Functional Manipulation of Maternal Gene Products Using In Vitro Oocyte Maturation in Zebrafish. JoVE (Journal of Visualized Experiments) e55213. https://doi.org/10.3791/55213

Whitehouse, P., Brown, B., Wilkinson, H., Payá Pérez, A., Zaldivar-Comenges, J., Daginnus, K., Deviller, G., Clausen, H., Lofstedt, M., Babut, M., van Vlaardingen, P., Moermond, C., Janssen, M., Ten Hulscher, D., Delbeke, K., Assche, F., Schwaiger, K., Rodinger, W., Geyt, A., Castro-Jiménez, J., 2011. Guidance Document No. 27. Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards. https://doi.org/10.2779/43816

Wilson, C.A., High, S.K., McCluskey, B.M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T.A., Anderson, J.L., Batzel, P., Carvan, M.J., III, Schartl, M., Postlethwait, J.H., 2014. Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. Genetics 198, 1291–1308. https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284

Woodhead, D.S., 1977. The Effects of Chronic Irradiation on the Breeding Performance of the Guppy, Poecilia Reticulata (Osteichthyes : Teleostei). International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine 32, 1–22. https://doi.org/10.1080/09553007714550721

Wu, S.-F., Zhang, H., Cairns, B.R., 2011. Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. Genome Res. 21, 578–589. https://doi.org/10.1101/gr.113167.110

Xie, X., Jin, Y., Ma, Z., Tang, S., Peng, H., Giesy, J.P., Liu, H., 2019. Underlying mechanisms of reproductive toxicity caused by multigenerational exposure of 2, bromo-4, 6-dinitroaniline (BDNA) to Zebrafish (Danio rerio) at environmental relevant levels. Aquatic Toxicology 216, 105285. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105285

Yang, F.-X., Xu, Y., Hui, Y., 2006. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 142, 77–84. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.012

Yang, Y.-J., Wang, Y., Li, Z., Zhou, L., Gui, J.-F., 2017. Sequential, Divergent, and Cooperative Requirements of Foxl2a and Foxl2b in Ovary Development and Maintenance of Zebrafish. Genetics 205, 1551–1572. https://doi.org/10.1534/genetics.116.199133

Yao, Y., Ma, L., Jia, Q., Deng, W., Liu, Z., Zhang, Y., Ren, J., Xue, Y., Jia, H., Yang, Q., 2014. Systematic characterization of small RNAome during zebrafish early developmental stages. BMC Genomics 15, 117. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-117

Ye, D., Zhu, L., Zhang, Q., Xiong, F., Wang, H., Wang, X., He, M., Zhu, Z., Sun, Y., 2019. Abundance of Early Embryonic Primordial Germ Cells Promotes Zebrafish Female Differentiation as Revealed by Lifetime Labeling of Germline. Mar Biotechnol 21, 217–228. https://doi.org/10.1007/s10126-019-09874-1

Ye, L.F., Chaudhary, K.R., Zandkarimi, F., Harken, A.D., Kinslow, C.J., Upadhyayula, P.S., Dovas, A., Higgins, D.M., Tan, H., Zhang, Y., Buonanno, M., Wang, T.J.C., Hei, T.K., Bruce, J.N., Canoll, P.D., Cheng, S.K., Stockwell, B.R., 2020. Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers. ACS Chem. Biol. 15, 469–484. https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00939

Ye, M., Chen, Y., 2020. Zebrafish as an emerging model to study gonad development. Computational and Structural Biotechnology Journal 18, 2373–2380. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.025

Yilmaz, O., Patinote, A., Com, E., Pineau, C., Bobe, J., 2021. Knock out of specific maternal vitellogenins in zebrafish (Danio rerio) evokes vital changes in egg proteomic profiles that resemble the phenotype of poor quality eggs. BMC Genomics 22, 308. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07606-1

Yilmaz, O., Patinote, A., Nguyen, T., Bobe, J., 2018. Multiple vitellogenins in zebrafish (Danio rerio): quantitative inventory of genes, transcripts and proteins, and relation to egg quality. Fish Physiol Biochem 44, 1509–1525. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0524-y

Yoshizaki, N., Yonezawa, S., 1994. Cathepsin D Activity in the Vitellogenesis of Xenopus laevis. Development, Growth & Differentiation 36, 299–306. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1994.00299.x

Yum, E.H.W., Li, V.W.T., Choi, V.W.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2010. Effects of alpha particles on zebrafish embryos. Applied Radiation and Isotopes, The 7th International Topical Meeting on Industrial Radiation and Radio isotope Measurement Application(IRRMA-7) 68, 714–717. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.09.035

Zhang, M., Zhang, J., Lin, S.-C., Meng, A., 2012. β-Catenin 1 and β-catenin 2 play similar and distinct roles in left-right asymmetric development of zebrafish embryos. Development 139, 2009–2019. https://doi.org/10.1242/dev.074435

Zhang, Q.-F., Li, Y.-W., Liu, Z.-H., Chen, Q.-L., 2016a. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. Aquat Toxicol 181, 76–85. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.029

Zhang, Q.-F., Li, Y.-W., Liu, Z.-H., Chen, Q.-L., 2016b. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Aquatic Toxicology 177, 417–424. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.018

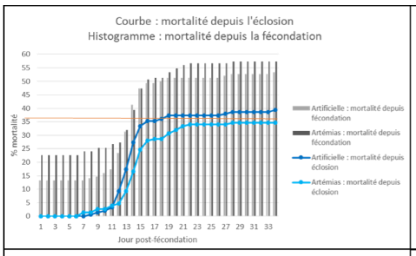
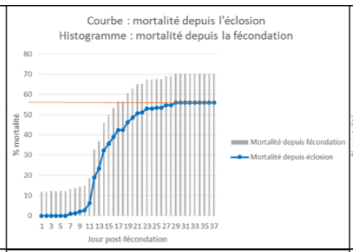
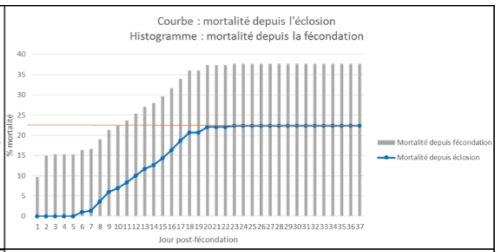
Zhang, Y., Li, T., Pan, C., Khan, I.A., Chen, Z., Yue, Y., Yang, M., 2022. Intergenerational toxic effects of parental exposure to bisphenol AF on offspring and epigenetic modulations in zebrafish. Science of The Total Environment 823, 153714. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153714

Zheng, J.-L., Zhu, Q.-L., Hu, X.-C., Parsons, D., Lawson, R., Hogstrand, C., 2022. Transgenerational effects of zinc in zebrafish following early life stage exposure. Science of The Total Environment 828, 154443. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154443

Zhou, L., Feng, Y., Wang, F., Dong, X., Jiang, L., Liu, C., Zhao, Q., Li, K., 2018. Generation of all-male-like sterile zebrafish by eliminating primordial germ cells at early development. Sci Rep 8, 1834. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20039-3

Annexes

Annexe I - Mise au point d'une technique d'élevage compatible avec l'irradiation dans Micado'LAB

		
Test 1 : artémias matin et soir, nourriture sèche du stock le midi	Test 2 : changement de nourriture sèche : SDS	Test 3 : changement de nourriture sèche : GEMMA + artémias matin et soir

Annexe II - Protocole d'élevage choisi

- Nombre d'individus par unité expérimentale : 50 œufs
- Siphonage quotidien des unités expérimentales + remise à niveau de l'eau
- Unités expérimentales :

- Cristallisoir, 1 cm eau provenant des armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », de 1 à 8 jpf
- Cristallisoir, 2 cm eau provenant des armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », de 9 à 14 jpf
- Cristallisoir, 3 cm eau provenant des armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », de 15 à 17 jpf
- Cristallisoir, 4 cm eau provenant des armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », de 18 à 20 jpf
- Aquarium dans armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », flux d'eau très faible, de 20 à 30 jpf
- Aquarium dans armoires à poissons « Zebtec Tecniplast Stand Alone », flux d'eau normal à partir de 30 jpf

- Type d'alimentation

- Nauplii d’artémias de 5 à 60 jpf
- Skretting Gemma Micro 75
- Skretting Gemma Micro 75 + 300
- Skretting Gemma Micro 300
- Skretting Gemma Wean

- Fréquence d’alimentation

- De 5 à 60 jpf : nauplii artémias matin et soir + Skretting Gemma midi
- A partir 60 jpf : Skretting Gemma Wean matin, midi et soir
- Le week-end : prise unique par jour de nauplii artémias + Skretting Gemma

Annexe III – Protocole histologie

Les gonades mâles et femelles ont été fixées dans un tampon (2,5% glutaraldehyde dans un tampon de cocadylate de sodium à 0,1M) pendant deux jours. Les échantillons sont lavés 3 fois pendant 5 min avec ce tampon et incubés dans un tampon (1% tetroxyde d’osmium dans un tampon de cocadylate de sodium à 0,1M). Une étape de déshydratation s’en suit dans des bains successifs d’éthanol et une inclusion dans une résine (Epon 812). Tous les produits chimiques utilisés ont été obtenus par Electron Microscopy Sciences. Des coupes de 200 nm ont été réalisées via un ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne). Ces dernières ont été colorées au bleu de Toluidine et analysées sous microscope optique (Leica, DM750), équipé d’une caméra ICC50 et du logiciel LAS EZ.