AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
Laboratoire de recherche sur les effets des radionucléides sur les écosystèmes (LECO)
École Doctorale Sciences de l'Environnement (ED251)

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Sciences de l'environnement
Spécialité : Environnement et santé

Sophia MURAT EL HOUDIGUI

Étude des effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur le développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes

Soutenue le 4 mai 2020 devant le jury composé de :

Thierry Charlier	Université de Rennes	Président du jury
Christoph Grunau	Université de Perpignan Via Domitia	Rapporteur
Farida Akcha	Ifremer	Examinateur
Nele Horemans	SCK CEN	Examinateur
Adélaïde Lerebours	Université de La Rochelle	Membre invité
André Gilles	Aix-Marseille Université	Membre invité
Olivier Armant	IRSN	Tuteur de thèse
Christelle Adam-Guillermin	IRSN	Directeur de thèse

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes encadrants de thèse Olivier et Christelle. Merci Christelle pour tes conseils durant cette thèse, ta gentillesse et ta disponibilité lors de la correction de la thèse et la préparation de la soutenance. Merci Olivier d'avoir été présent tout au long de cette thèse, de m'avoir soutenue dans mes moments de doute et de m'avoir tout le temps encouragé. J'ai adoré travailler avec toi tu as su trouver un juste milieu entre accompagnement et autonomie. Merci également pour ta gentillesse et ta bonne humeur !

Je voudrais aussi remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail dans ces conditions particulières de confinement. Merci à Thierry Charlier et Christoph Grunau pour leur travail de rapporteur. Merci à Nele Horemans, Farida Akcha, Adélaïde Lerabours et André Gilles d'avoir été présents dans ce jury.

Je remercie François Paquet, chef du SRTE pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son service. Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce projet de thèse. Tout d'abord merci à Sandrine pour ton implication dans ma thèse et ton aide pour l'étude protéomique, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi et tu as su me donner de précieux conseils. Merci à toute l'équipe du CRCM de Marseille d'avoir réalisé l'étude de protéomique. Ce fut un plaisir de vous rencontrer à Marseille et de discuter avec vous des résultats. Un grand merci à Claire pour ton aide précieuse avec les statistiques, merci pour tes explications et ton implication. Tu es une personne géniale, je te souhaite beaucoup de réussite dans ton projet professionnel. Je remercie aussi Amine du SRBE pour son aide avec les statistiques. Je souhaite remercier Giovana qui m'a beaucoup aidé dans les manips et qui m'a donné de très bon conseils. J'ai adoré travailler et rigoler avec toi ! Surtout merci pour ta positivité même quand rien n'allait au labo ! Je remercie Nicolas, sans qui toutes ces manips n'auraient pas été possibles ! Merci pour tes nombreux calculs de doses à MICADO, pour ton aide dans le placement des manips chaque semaine et surtout merci pour ta bonne humeur même le lundi matin à 8h ! Merci à tout le reste de l'équipe des camaristes : Jean-François, Virginie et Sylvie pour leur travail à MICADO. Je souhaite aussi remercier Magali pour les images au MET, merci pour le temps consacré à mon projet et merci de m'avoir suivi pour développer la quantification des dommages. Je remercie aussi toute l'équipe poisson, merci à Olivier S. et Béatrice pour les commandes de poissons et toute la gestion administrative de l'animalerie et merci à Isabelle et Virginie de leur aide pour la gestion technique de l'animalerie. Isabelle et Virginie je voudrais aussi vous remercier de votre gentillesse et merci de toutes ces discussions qu'on a pu avoir au labo ! Je remercie grandement Clara pour son aide avec toutes les démarches administratives auxquelles je ne comprenais jamais rien, merci pour ta patience et surtout merci pour les super soirées passées ensemble. Je remercie aussi Jean-Marc, on a pas eu l'occasion de travailler ensemble mais merci de m'avoir initié à ce monde passionnant de l'aquariophilie, merci pour tout ces retours en voitures à Manosque et merci pour ce repas chez toi où j'ai pu découvrir tes talents de cuisinier ! Merci à Karine pour ses conseils pour les présentations orales et

pour le second article. Merci à Cathy pour sa gentillesse et sa bienveillance. Merci à Fred A. pour les discussions scientifique sur ma thèse. Je voudrais aussi remercier Rodolphe merci pour ta gentillesse et tes précieux conseils lors de la rédaction du premier article.

Je voudrais remercier maintenant l'ensemble du LR2T et du LRTA pour leur accueil à Cadarache. Plus particulièrement merci à Nadine pour les discussions à la salle de sport ! Merci à Hugo pour les discussions de fin de soirée aux journées des thèses j'en garde un très bon souvenir ! Merci Laureline pour tes conseils pour la rédaction. Je voudrais aussi remercier les membres du LRTOX avec qui j'ai réalisé mon stage de master, merci à Stéphane pour tes messages d'encouragement pour la soutenance qui m'ont fait très plaisir, merci Maâmar pour ta bonne humeur et tes conseils, merci à mes encadrants de stage Audrey et Philippe. Audrey merci de m'avoir encouragé à faire une thèse, je te souhaite plein de bonheur avec ton nouveau travail. Merci Philippe de m'avoir mis en contact avec Olivier et d'avoir suivi mon travail tout au long de cette thèse, merci pour ta gentillesse.

Enfin le meilleur pour la fin, je voudrais remercier toute l'équipe des thésards de Cadarache sans qui cette thèse n'aurait pas du tout été la même ! Merci pour toutes ces soirées et ces week-ends passés ensemble. D'abord merci Caroline pour ton aide au labo, j'ai adoré travailler sur le comportement avec toi ! Merci pour les vendredi après-midi de nettoyage à l'élevage quand on était pas motivées ! Merci pour tout tes conseils et ton soutien. Merci d'avoir toujours été là même pour mon déménagement au 4éme étage sans ascenseur ! Merci à mes super co-bureaux Audrey et Rémi ! Merci Audrey pour ta gentillesse à toute épreuve, merci pour toutes ces discussions qu'on a pu avoir sur le sens de nos vies ! Merci Rémi de m'avoir supportée durant plus de 3 ans, de m'avoir encouragée et surtout de m'avoir fait rire. Ces dernières années n'auraient pas du tout été les mêmes sans toi ! Merci à Cécile avec qui j'ai partagé le bureau pendant 1 an, merci pour ta bonne humeur même quand tu étais en rédaction et surtout merci de m'avoir embarquée dans l'aventure de famille d'accueil grâce à toi j'ai vécu pleins de super moments ! Je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille. Merci à Marie pour les soirées jeux de sociétés, tu m'as fait découvrir pleins de nouveaux jeux. Merci à ma petite Marinette pour toutes ces soirées autour d'une bonne bouteille de Jurançon ! Merci d'être venue nous voir en Suisse on a passé un super week-end ski et merci d'être toujours partante pour les soirées ! Merci Alex pour tout tes conseils sur l'écologie j'ai beaucoup apprécié discuter avec toi cela m'a permis de m'améliorer, merci pour le week-end dans le Gers. Surtout merci pour tous ces débats entre Rémi et toi, les pauses du midi n'auraient pas été pareilles sans vous ! Merci à Hamza pour ta gentillesse, merci d'être toujours présent, merci d'avoir gardé Grisou aussi souvent, merci pour tes conseils sportifs et merci d'être venu t'initier à l'équitation ! Merci à Noëmie pour tes gâteaux et ton entrain. Accroches toi pour la fin de ta thèse même si je sais que ce n'est pas facile. Merci Elsa pour tout ces bons moments passés au labo, pour nos discussions à parler de chiens et de chevaux. Je te souhaite à toi aussi plein de courage pour la fin de ta thèse. Merci à Loic et Elisabeth on a moins eu l'occasion de se connaître mais j'ai apprécié les discussions qu'on a pu avoir. Merci à Clément pour ta gentillesse et ton calme légendaire ! Merci Sarah pour les quelques moments qu'on a passé ensemble et pour cette journée via ferrata qui restera dans ma mémoire ! Merci à Amandine et Adrien pour les bons moments passés aux journées des thèses. J'ai hâte de tous vous revoir !

Merci aussi à Elisabetta et Alejandro pour les soirées pasta et pizza ! Un grand merci

à Laurent pour ces moments mémorables, je n'oublierais jamais cette partie de pétanque à Aix !

Je voudrais maintenant remercier mes amis de la région parisienne. Merci à Camille et Silvia d'être la depuis 12 ans maintenant dans les bons comme dans les mauvais moments ! Merci pour les soirées quand je remontais à Paris. Merci pour les visites dans le sud ! Merci d'être toujours aussi proche même si on ne se voit plus autant qu'on le souhaiterais. Merci à Matthieu, Quentin et Philippe de répondre toujours présent pour les soirées ! Merci à mes copines d'Orsay pour ces bonnes années partagées ensemble. Merci à Marion pour nos soirées à Vélizy, merci pour tes encouragements, merci d'être aussi associable que moi, merci d'avoir été mon super binôme pendant la licence ! Merci à Pauline pour sa bonne humeur ! Merci à nos deux jeunes mamans Mélanie et Coralie je vous souhaite plein de bonheur avec vos deux choupettes et j'ai hâte de les rencontrer ! Merci à Léa ma super binôme de master je te souhaite plein de bonheur avec ton chéri.

Enfin je voudrais remercier ma famille. Merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir encouragé à faire des études. J'ai pu faire cette thèse grâce à vous. Merci à ma tante d'être toujours présente. Merci à tout le reste de ma famille Federica, Giulia, Ilva, Carine, Cyril, Christelle, Didier, Pino, Manon, Théo, Alicia, Liam, Lahcen. Grâce à vous je me suis toujours sentie entourée et soutenue. Quelques lignes ne suffiraient à vous remercier, merci pour tout. Merci à ma belle-famille James, Jonathan et François pour les visites dans le sud et les vacances ensemble. Merci pour votre bonne humeur et tous les bons repas partagés ensemble. Merci à mon petit Grisou d'être resté à coté de moi à dormir pendant que je rédigeais ma thèse. Enfin merci à mon Peter, merci de partager ma vie depuis 5 ans, merci de me supporter tous les jours. Merci pour tout ce que tu fais pour moi, merci de me permettre de réaliser mes rêves. Je dédie cette thèse à ma grand mère qui nous a quitté l'année dernière.

Résumé

À la suite des accidents nucléaires de Tchernobyl et Fukushima et de par l'utilisation croissante des radionucléides, la radioprotection de l'environnement constitue une source de préoccupation majeure. Des études démontrent une sensibilité aux rayonnements ionisants (RI) accrue lors du développement. Cependant, il existe peu de données sur les mécanismes moléculaires conduisant à des effets des RI sur l'embryogenèse et de surcroît pour les expositions chroniques. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse, est de mieux comprendre les effets d'une exposition aux RI sur le développement du poisson zèbre (*Danio rerio*), un organisme modèle en écotoxicologie et en biologie du développement. Des œufs fécondés ont été exposés à des rayons gamma émis par une source de césium 137 à des débits de doses faibles à modérés (de 0,005 mGy/h à 50 mGy/h), puis analysés du stade gastrula (6 heures) au stade larvaire (5 jours) par une approche intégrative des effets moléculaires aux effets comportementaux.

Une partie de ce travail a porté sur l'étude des effets des RI à un stade précoce de développement du poisson zèbre. Pour cela, une approche multi-omics avec l'étude du transcriptome et du méthylome a été mise en place. Une étude transcriptomique au stade shield à des débits de doses allant de 0,005 mGy/h à 50 mGy/h a été réalisée et a démontré un effet significatif sur la régulation des gènes impliqués dans la morphogénèse. À 5 et 50 mGy/h, les gènes impliqués dans le développement futur du système nerveux central (SNC) et des muscles sont impactés. L'étude du méthylome a permis de mettre en évidence une hypométhylation des séquences promotrices des gènes impliqués dans le développement du SNC et des muscles associée à une modification de l'expression des gènes. Ces résultats sur des stades embryonnaires précoces, mettent en évidence des effets potentiels sur le développement du SNC et des muscles. L'autre partie de ce travail a porté sur l'évaluation des effets d'une exposition aux RI à des stades plus tardifs du développement par une approche de biologie des systèmes. Pour cela des analyses ont été réalisées de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle. À l'échelle moléculaire, une analyse multi-omics du transcriptome et du protéome a mis en évidence la modulation de gènes impliqués dans la voie de l'acide rétinoïque, le développement du SNC et des muscles chez des embryons et des larves exposés à 0,5 ; 5 et 50 mGy/h. Le marquage par hybridation *in situ* a confirmé la modulation de l'expression des facteurs de transcription *her4.4* dans le SNC et de *myog* dans les muscles des embryons exposés aux RI. Au niveau tissulaire, un détachement des myofibrilles musculaires et une altération des jonctions neuro-musculaires ont été détectés chez les embryons exposés à 5 et 50 mGy/h. Afin d'évaluer un effet individuel, le comportement locomoteur des larves a été évalué en situation de stress. Une diminution significative de la mobilité des larves a été détectée entre 0,5 mGy/h et 50 mGy/h.

Ces travaux ont montré des effets des RI sur le développement du SNC et des muscles dès le développement précoce au niveau moléculaire. Ces effets sont confirmés à des stades de développement plus tardifs. Cette étude suggère donc que les perturbations moléculaires observées au cours du développement précoce sont prédictives des effets observés à des stades de développement plus tardifs. De plus ce travail de thèse, permet de proposer un modèle d'« Adverse Outcome Pathway » où la dérégulation de la voie de l'acide rétinoïque par une exposition aux RI conduirait à des effets sur le développement du SNC et des muscles.

Abstract

After the nuclear accidents at Chernobyl and Fukushima and due to a growing use of radionuclides, radiation protection of the environment is a major concern. Studies show an increased sensitivity to ionizing radiation (IR) during development. However, there are few data on the molecular mechanisms leading to the effects of IR on embryogenesis and moreover for chronic exposures. In this context, the objective of this thesis is to better understand the effects of exposure to IR on the development of zebrafish (*Danio rerio*), a model organism in ecotoxicology and in developmental biology. Fertilized eggs were exposed to gamma rays emitted by a cesium 137 source at low to moderate dose rates (from 0.005 mGy/h to 50 mGy/h), then analysed from the gastrula stage (6 hours) to the larval stage (5 days) by an integrative approach from molecular effects to behavioural effects.

Part of this work has focused on studying the effects of IR at an early stage of zebrafish development. For this, a multi-omics approach with the study of the transcriptome and the methylome has been implemented. A transcriptomic study at the shield stage with dose rates ranging from 0.005 mGy/h to 50 mGy/h was carried out and demonstrated a significant effect on genes involved in morphogenesis. At 5 and 50 mGy/h, the genes involved in the future development of the central nervous system (CNS) and muscles are affected. The methylome study has revealed hypomethylation of the promoter sequences of genes involved in the development of the CNS and muscles, associated with a modification of gene expression. These results on early embryonic stages, highlight potential effects on the development of the CNS and muscles. The other part of this work focused on assessing the effects of IR exposure at later developmental stages using a system biology approach. For this, analyses were carried out from the molecular scale to the individual scale. At the molecular level, a multi-omics analysis of the transcriptome and the proteome has highlighted the modulation of genes involved in the retinoic acid pathway, the development of the CNS and muscles in embryos and larvae exposed to 0.5, 5 and 50 mGy/h. Labelling by *in situ* hybridization confirmed the misregulation of the transcription factors *her4.4* in the CNS and *myog* in the muscles of embryos exposed to IR. At the tissue level, disruption of muscle myofibrils and alteration of neuromuscular junctions are detected in embryos exposed to 5 and 50 mGy/h. In order to study an individual effect, the locomotor behaviour of the larvae was assessed under stress conditions. A significant decrease in larval mobility was detected between 0.5 mGy/h and 50 mGy/h.

This work has shown effects of IR on the development of the CNS and muscles from early development at the molecular level. These effects are confirmed at later stages of development. This study suggests that the molecular disturbances observed during early development are predictive of the effects observed at later developmental stages. In addition, this thesis work allows to propose a model of "Adverse Outcome Pathway" where the deregulation of the retinoic acid pathway by exposure to IR will lead to effects on the development of the CNS and muscles.

Valorisation scientifique

Publications scientifiques

Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Armant, O. Ionising Radiation Induces Promoter DNA Hypomethylation and Perturbs Transcriptional Activity of Genes Involved in Morphogenesis during Gastrulation in Zebrafish. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 4014. doi : 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. Scientific Reports 9, 20241. doi : https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w

Arcanjo, C., Adam-Guillermin, C., Murat El Houdigui, S., Loro, G., Della-Vedova, C., Cavalié, I., Camilleri, V., Floriani, M., Gagnaire, B., 2019. Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae : a new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species. Aquatic Toxicology, 105384. doi : https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105384

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(11) :2556-2567. doi : https://doi.org/10.1002/etc.4562

Armant, O., Gombeau, K., Murat El Houdigui, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., 2017. Zebrafish exposure to environmentally relevant concentration of depleted uranium impairs progeny development at the molecular and histological levels. Plos one 12(5) :e0177932. doi : https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177932

Communications orales

SETAC Europe annual meeting, 2019, Helsinki, Finlande.

Journées des thèses de l'IRSN, 2019, La Grande Motte, France.

Colloque de la Société d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée, 2018, Montpellier, France.

Congrès de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement, 2018, Marseille France.

Journées des thèses de l'IRSN, 2018, Annecy, France.

Journées du Groupe De Recherche en écotoxicologie, 2017, Lyon, France.

Communications affichées

Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER), 2017, Berlin, Allemagne.

Congrès de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement, 2017, Aix-en-Provence, France.

Journées des thèses de l'IRSN, 2017, Carry-le-Rouet, France.

Table des matières

Remerciements **3**

Résumé **7**

Abstract **9**

Valorisation scientifique **11**

Table des matières **15**

Liste des tableaux **17**

Liste des figures **17**

Introduction générale **19**

I. État de l'art **23**

I.1. Les rayonnements ionisants **25**
I.1.1. La radioactivité 25
I.1.2. Les types d'émissions 25
I.1.3. Les unités de mesure 27
I.1.4. Les voies d'expositions 28
I.1.5. Les sources de rayonnements ionisants 29
I.1.5.1. Les sources naturelles 29
I.1.5.2. Les sources artificielles 29
I.1.5.3. Les accidents nucléaires 30

I.2. Le mécanisme d'action des rayonnements ionisants **33**
I.2.1. Les mécanismes de toxicité des rayonnements ionisants 33
I.2.2. Les mécanismes de réparation de l'ADN 36
I.2.3. Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN 40

I.3. Le modèle d'étude : le poisson zèbre **41**
I.3.1. Caractéristiques du poisson zèbre 41
I.3.1.1. Position phylogénétique 41
I.3.1.2. Mode de vie 41
I.3.1.3. Morphologie 42
I.3.1.4. Reproduction 43
I.3.1.5. Le génome du poisson zèbre 44

I.3.2. Les étapes du développement du poisson zèbre 44
I.3.2.1. Le clivage 45
I.3.2.2. La période blastula 45
I.3.2.3. La gastrulation 47
I.3.2.4. La segmentation 47
I.3.2.5. La phase pharyngula 51
I.3.2.6. L'éclosion 52
I.3.2.7. La période larvaire 52
I.3.3. Les grandes voies de signalisation du développement 52
I.3.3.1. La voie Wnt/β-caténine 53
I.3.3.2. La voie Notch 54
I.3.3.3. La superfamille des TGFβ 55
I.3.3.4. La famille des FGFs 56
I.3.3.5. La voie de l'acide rétinoïque 57
I.3.3.6. Exemples de processus développementaux 58
I.3.4. Effets des rayonnements ionisants sur les organismes 62
I.3.4.1. Effets sur le développement 62
I.3.4.2. Effets sur le système nerveux central 64

I.4. Les modifications épigénétiques 66
I.4.1. Introduction à l'épigénétique 66
I.4.2. Épigénétique et environnement 67
I.4.3. La méthylation de l'ADN 68
I.4.3.1. Les protéines de la méthylation de l'ADN : les DNMTs . . . 68
I.4.3.2. Les sites de méthylation de l'ADN 70
I.4.3.3. Conséquences de la méthylation de l'ADN 71
I.4.3.4. Le processus de déméthylation de l'ADN 72
I.4.4. La méthylation de l'ADN au cours du développement 72
I.4.4.1. La méthylation de l'ADN au cours du développement de la souris 73
I.4.4.2. La méthylation de l'ADN au cours du développement du poisson zèbre 74
I.4.5. Effets des rayonnements ionisants sur la méthylation de l'ADN . . 75

I.5. Le concept de l'Adverse Outcome Pathway 77
I.5.1. Définition de l'AOP 77
I.5.2. Les éléments clés de l'AOP 77
I.5.3. Les AOPs décrits dans le domaine des rayonnements ionisants . . 78

II. Objectifs et stratégie de recherche 81

II.1. Objectifs 83
II.1.1. Question de recherche n° 1 83
II.1.2. Question de recherche n° 2 83

II.2. Stratégie de recherche 85
II.2.1. Le modèle biologique 85

II.2.2. Les stades de développement exposés 85
II.2.3. L'exposition aux rayonnements ionisants 86
II.2.3.1. Dispositif d'irradiation 86
II.2.3.2. Calcul du débit de dose 86
II.2.3.3. Choix des débits de dose 87
II.2.4. Le choix des marqueurs 88

III. Évaluation des effets d'une exposition aux RI au cours du développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes 91

III.1.Objectifs de l'article scientifique 93

III.2.Article scientifique 94

III.3.Principaux résultats et discussion de l'article scientifique 128

IV. Impact des RI sur la méthylation de l'ADN à un stade précoce de développement chez le poisson zèbre 131

IV.1.Objectifs de l'article scientifique 133

IV.2.Article scientifique 134

IV.3.Principaux résultats et discussion de l'article scientifique 185

Conclusion générale et perspectives 187

Références bibliographiques 212

Annexes 213
A. Le développement du poisson zèbre 214

Liste des tableaux

I.3.1. Classification phylogénétique du poisson zèbre 41

I.4.1. Comparaison des isoformes de DNMTs chez la souris et le poisson zèbre 70

II.2.1.Tableau récapitulatif des expériences réalisées. 89

Ccl.1.Tableau récapitulatif des effets observés. 189

Liste des figures

I.1.1. Désintégration d'un noyau instable 26
I.1.2. Pouvoir pénétrant des différents types d'émissions radioactives 27
I.1.3. Les unités de mesure de la radioactivité 28
I.1.4. Exposition moyenne de la population de France métropolitaine aux rayonnements ionisants en 2015 30
I.1.5. Carte des dépôts de césium 137 en Europe après l'accident de Tchernobyl 31
I.1.6. Carte des dépôts de césium 137 après l'accident de Fukushima 32

I.2.1. Principales réactions se produisant lors de la radiolyse de l'eau 34
I.2.2. Lésions de l'ADN induites par les radicaux libres 36
I.2.3. Effets des rayonnements ionisants à différentes échelles biologiques . . . 39

I.3.1. Répartition naturelle du poisson zèbre 42
I.3.2. Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre 43
I.3.3. Cycle de développement du poisson zèbre 45
I.3.4. Carte des territoires présomptifs à 50% d'épibolie 47
I.3.5. Les étapes majeures de la neurulation 49
I.3.6. Développement du cerveau chez le poisson zèbre 51
I.3.7. Voie de signalisation Wnt/β-caténine 53
I.3.8. Voie de signalisation Delta/Notch 55
I.3.9. La mise en place des axes embryonnaires 56
I.3.10. Mécanismes d'action des rétinoïdes 57
I.3.11. Domaine d'expression des gènes *hox* 58
I.3.12. Spécification neuronale dans le tube neural de l'embryon 60
I.3.13. Mécanisme de segmentation des somites 61

I.4.1. Facteurs environnementaux pouvant affecter l'embryon en développement et les cellules germinales 68

I.4.2. Transfert d'un groupement méthyle depuis la molécule SAM vers une cytosine 69
I.4.3. Impact de la méthylation au niveau du promoteur des gènes sur la transcription 71
I.4.4. Changement de la méthylation de l'ADN au cours du développement chez la souris 74
I.4.5. Changement de la méthylation de l'ADN au cours du développement chez le poisson zèbre 75

I.5.1. Diagramme des éléments clés d'un AOP 78
I.5.2. AOP n° 296 79
I.5.3. AOP n° 216 80

II.2.1. Hall d'irradiation MICADO'Lab 86
II.2.2. Exemple de design expérimental. 87

Ccl.1. Proposition d'un AOP pour des débits de doses entre 0,5 mGy/h et 50 mGy/h. 194
A.1. Les principaux stades de développement de l'embryon de poisson zèbre 214

Introduction générale

Les êtres vivants sont exposés continuellement à des éléments radioactifs naturels, présents dans les roches de l'écorce terrestre depuis la formation de la Terre, ou formés à partir du rayonnement cosmique. À cette radioactivité naturelle s'ajoute la radioactivité artificielle générée par les activités humaines, comme le fonctionnement des installations industrielles et médicales, la gestion et le traitement des déchets radioactifs, ainsi que les rejets accidentels survenus suite à des accidents nucléaires dont les plus graves sont Tchernobyl en 1986 et Fukushima-Daiichi en 2011. Dans ce contexte, les différents compartiments de l'écosystème sont en contact permanent avec de faibles concentrations de radionucléides. Il est donc primordial d'étudier les effets d'une exposition chronique à de faibles doses de rayonnements ionisants dans le cadre de la radioprotection de l'environnement.

La radioprotection est née en 1904 avec Antoine Béclère, il préconise l'utilisation de mesures de protections aux radiologues et aux médecins. Ce champ disciplinaire connait un véritable essor en 1920 avec les recherches du Suédois Rolf Sievert. En 1928, le Comité International de protection contre les rayons X et le radium est crée. Il fixe la première limite d'exposition pour les radiologues et les radiothérapeutes. Dans les années 1930, les effets tardifs d'une exposition aux rayonnements ionisants sont découverts avec le cas des ouvrières américaines exposées au radium dans des usines de fabrication de cadrans lumineux. En effet, une augmentation anormale des cancers de la bouche est détectée chez ces ouvrières. En 1942, Robert Stone qui est le directeur de la division santé du projet Manhattan lance un vaste programme de recherche, c'est la naissance de la radiobiologie. Suite à l'essor des essais nucléaires atmosphériques et à l'accident du Lucky Dragon en 1954 lors duquel un navire de pêche est contaminé par les retombées radioactives d'un essai nucléaire américain dans l'océan Pacifique, un Comité Scientifique des Nations-Unies pour l'étude des effets des rayonnements atomiques (UNSCEAR) est crée. De plus, le Comité International de protection contre les rayons X et le radium est rebaptisé Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR). En 1954, la CIPR introduit une limite d'exposition pour le public et abaisse la limite de protection pour les travailleurs. Cinquante ans de recherche ont permis de faire progresser les connaissances sur les effets des rayonnements ionisants, cependant ces recherches n'ont pas permis de lever les incertitudes concernant le risque d'une exposition aux faibles doses. C'est pour cette raison que le principe ALARA a été instauré en radioprotection, il signifie : maintenir les expositions des professionnels et du public sous les limites, aussi bas qu'il est raisonnablement possible. Néanmoins dans cette vision de la radioprotection, l'environnement est uniquement pris en compte comme vecteur de contamination radioactive de la chaîne alimentaire humaine. En effet, à cette époque l'Homme est considéré comme l'une des espèces les plus radiosensibles, donc les normes de protection humaine sont jugées suffisantes pour la protection des écosystèmes [66]. À partir de 1996, des recommandations concernant la radioprotection de l'environnement commencent à être émises [153]. En effet, une valeur seuil de 41,6 µGy/h est recommandée pour la protection des écosystèmes [154]. Des projets de recherche sur les effets des rayonnements ionisants sur différentes espèces animales et végétales sont menés afin de constituer une base de donnée pour l'évaluation du risque. La CIPR développe un ensemble réduit composé d'animaux et de plantes de références afin d'avoir un ensemble plus structuré pour la compréhension des relations entre les expositions, la dose, les effets et les conséquences de ces effets [67]. Les études menées durant plusieurs années ont permis de définir un débit de dose de 10 µGy/h pour lequel il y a moins de 10%

d'effet pour 95% des espèces aquatiques et terrestres [51].

Malgré les différentes études citées ci-dessus, les effets de l'exposition aux rayonnements ionisants ont été majoritairement étudiés au laboratoire et sur les rongeurs. De plus, les scénarios d'expositions utilisés sont peu représentatifs d'une exposition environnementale. En effet, dans l'environnement les populations sont exposées à de faibles débits de doses de façon chronique. Or, dans la majorité des études une irradiation aiguë à de fortes doses a été réalisée, ce qui est représentatif d'une exposition dans le cadre médical. Il a aussi été relevé que les études portant sur les effets des rayonnements ionisants sur des organismes aquatiques se concentrent sur des paramètres tels que la survie et la reproduction qui sont plus simples à observer, peu d'études sont relatives aux paramètres moléculaires [2]. Or, les effets à l'échelle moléculaire sont les effets les plus précoces et les plus sensibles, ils sont à l'origine des effets observés aux échelles supérieures qui peuvent affecter l'individu (survie, croissance, reproduction). C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse qui ont pour objectif d'identifier les modes d'actions toxiques et les effets des rayonnements ionisants sur le développement du poisson zèbre.

Ce travail de doctorat s'articule en quatre parties :

- La première partie correspond à une synthèse bibliographique des différentes thématiques abordées dans la thèse. Le chapitre I présente les connaissances de base sur les radiations ionisantes. Le chapitre II traite du mécanisme d'action des rayonnements ionisants. La chapitre III présente le modèle du poisson zèbre ainsi que son développement. Le chapitre IV aborde les différentes modifications épigénétiques et traite plus en détail de la méthylation de l'ADN. Le chapitre V présente le concept de l'« Adverse Outcome Pathway ».
- La seconde partie, traite des objectifs de ce travail de thèse et de la stratégie expérimentale mise en place au cours de ce projet.
- La troisième partie concerne l'évaluation des effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur le développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes.
- La quatrième partie concerne l'étude des effets des rayonnements ionisants sur la méthylation de l'ADN à un stade précoce de développement chez le poisson zèbre.

Enfin, le document se termine par une conclusion générale et les perspectives qui découlent de ce travail de thèse.

Première partie

État de l'art

Table des matières

I.1. Les rayonnements ionisants **25**

I.2. Le mécanisme d'action des rayonnements ionisants **33**

I.3. Le modèle d'étude : le poisson zèbre **41**

I.4. Les modifications épigénétiques **66**

I.5. Le concept de l'Adverse Outcome Pathway **77**

I.1. Les rayonnements ionisants

I.1.1. La radioactivité

La radioactivité est un phénomène naturel. Elle a été découverte en 1896 par Henri Becquerel. En 1898, Pierre et Marie Curie réussissent à isoler le polonium et le radium. Ces recherches leur ont permis d'obtenir conjointement le prix Nobel de physique en 1903. L'atome est le constituant fondamental de la matière. C'est une entité électriquement neutre composé de deux types d'éléments :

- **Un noyau** lui même constitué de protons (chargés positivement) et de neutrons (non chargés).
- **Des électrons** (chargés négativement) qui gravitent autour du noyau.

Parmi les noyaux, certains sont stables c'est à dire qu'ils restent identiques à eux mêmes indéfiniment, tandis que d'autres, nommés radionucléides sont instables. La stabilité d'un noyau est proportionnelle à son énergie de liaison. Elle correspond à l'énergie à fournir à ce noyau pour séparer entièrement tous les nucléons (protons ou neutrons) qui le constituent. Ainsi, plus l'énergie de liaison est grande, plus le noyau est stable. Afin d'augmenter leur stabilité, les noyaux instables vont spontanément évoluer vers des éléments plus stables. Cette réaction spontanée, appelée désintégration, a lieu car l'énergie de liaison totale des éléments produits par la réaction est plus grande que l'énergie de liaison initiale de l'élément. Par conservation de l'énergie, la différence entre l'énergie de liaison finale et initiale doit être libérée sous forme de rayonnement et/ou d'énergie cinétique. Les produits de la désintégration peuvent eux mêmes être stables ou non. S'ils sont instables, une nouvelle réaction de désintégration aura lieu. L'évolution spontanée des noyaux vers des états plus stables est appelée **radioactivité**.

I.1.2. Les types d'émissions

On distingue trois types d'émissions lors de la transformation des noyaux instables :

- **L'émission particulaire α**. Cette émission est produite par les atomes possédant un trop grand nombre de nucléons. Afin de retrouver la stabilité, le noyau émet un noyau d'hélium, composé de deux protons et de deux neutrons, c'est la particule α (Figure I.1.1).
- **L'émission particulaire β**. Cette émission est produite par des atomes possédant un écart important entre leur nombre de protons et de neutrons. Afin de retrouver la stabilité, le noyau émet un positron (particule $\beta+$) ou un électron (particule β-) (Figure I.1.1).
- **L'émission de rayonnement γ**. L'excès d'énergie libérée par la désintégration peut être émise sous forme d'un rayonnement électromagnétique, le rayonnement γ (Figure I.1.1).

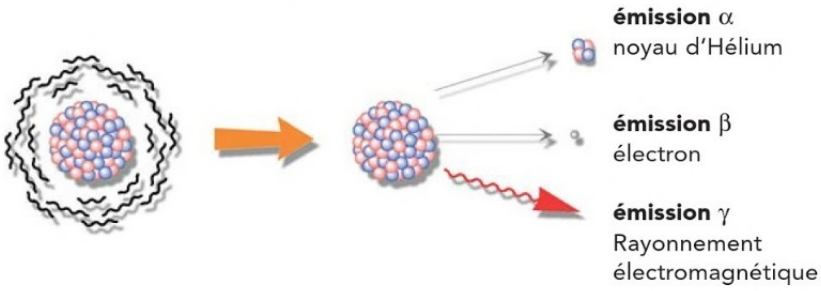


FIGURE I.1.1. – Désintégration d'un noyau instable. Source : [93].

Les émissions radioactives transportent de l'énergie. Cette énergie peut être transférée à d'autres noyaux ou électrons (le plus fréquent). Si l'énergie est transférée à un noyau, elle peut engendrer une nouvelle réaction nucléaire, c'est ce phénomène qui est utilisé dans les bombes atomiques et les réacteurs à fission. Quand l'énergie est transférée à un électron elle va permettre de l'exciter. Si l'énergie transférée est suffisante, l'électron est expulsé de l'atome, cela correspond à une ionisation. Les particules qui ont provoqué cette ionisation sont appelées **des particules ionisantes**. La quantité d'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière est caractérisée par **le transfert d'énergie linéique** (TEL). Cette grandeur est exprimée en KeV/μm. Plus le TEL est grand, plus la quantité d'énergie cédée sur une distance donnée est grande. **Le pouvoir de pénétration de chaque type de rayonnement dépend de sa perte d'énergie dans la matière et donc de son TEL.** En effet, une fois que la particule a cédé toute son énergie elle est stoppée. Ainsi, pour les tissus biologiques, les dégâts sont proportionnels au TEL.

- Les particules α ont un fort TEL, elles sont donc peu pénétrantes mais très ionisantes. Ces particules peuvent être arrêtées par une feuille de papier (Figure I.1.2).
- Les particules β+ ou β- sont beaucoup plus légères qu'une particule α. Ces particules sont donc plus pénétrantes mais moins ionisantes que les particules α. Elles peuvent être stoppées par une feuille d'aluminium (Figure I.1.2).
- Le rayonnement γ est moins ionisant que les rayonnements particulaires mais a un pouvoir de pénétration beaucoup plus important. Ce rayonnement nécessite de fortes épaisseur de plomb ou de béton pour être atténué (Figure I.1.2).

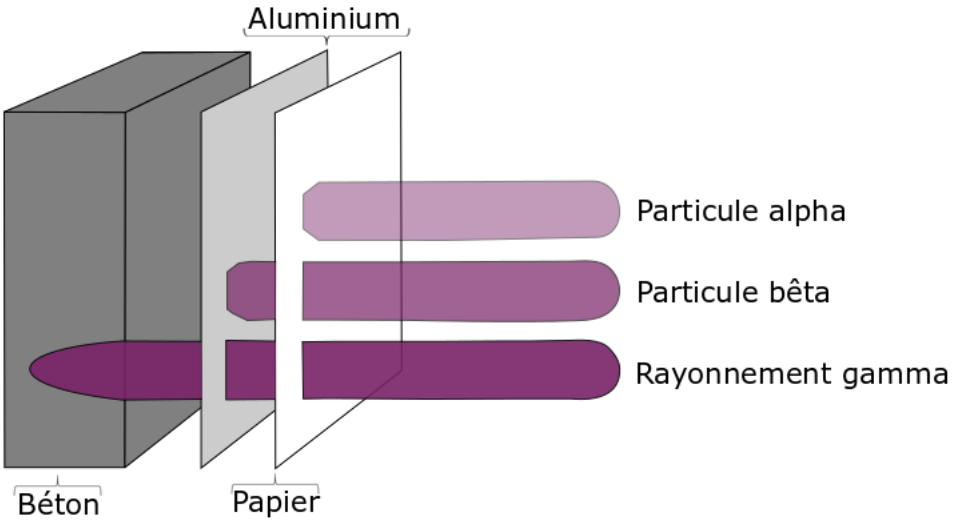


FIGURE I.1.2. – Pouvoir pénétrant des différents types d'émissions radioactives. Source : d'après [70].

I.1.3. Les unités de mesure

Dans le domaine de la radiobiologie, différentes unités permettent de mesurer la radioactivité ou d'en mesurer les effets biologiques :

- **Le Becquerel pour mesurer l'activité radioactive**. Il représente le nombre de désintégrations par seconde à l'intérieur d'une source radioactive. L'activité radioactive se mesure en Becquerel (Bq). Cette unité sert à définir le niveau d'activité d'un échantillon de matière radioactive. L'activité est mesurable à l'aide d'appareils tels que le compteur Geiger. Cependant, cette grandeur ne prend pas en compte les différents effets biologiques induits et ne permet pas l'évaluation du risque encouru.
- **Le Gray pour mesurer la dose absorbée**. Les rayonnements émis par les atomes radioactifs transportent de l'énergie. Lorsque ces atomes rencontrent de la matière, ils cèdent une partie de leur énergie à la matière rencontrée. La dose absorbée correspond à la quantité d'énergie cédée par unité de masse de la matière exposée. Elle se mesure en Gray (Gy). Un Gray correspond à un Joule d'énergie absorbée par kilogramme de matière ($1\ J/kg$). Le débit de dose est la dose absorbée par unité de temps. Celle ci peut être exprimée en Gray par heure (Gy/h), par jour (Gy/j) ou par an (Gy/an). Dans le cadre de ce travail de thèse le Gy/h sera l'unité principalement utilisée.
- **Le Sievert pour évaluer le risque d'effets biologiques chez l'Homme**. Pour une même dose absorbée en Gray, les effets biologiques potentiels sur le tissu exposé dépendent de la nature du rayonnement, de son énergie et du temps d'exposition. Les tissus n'ont pas la même sensibilité face aux rayonnements. Afin de prendre en compte ces différents paramètres une autre unité est utilisée : le Sievert (Sv). Le Sievert correspond au Gray multiplié par un facteur dépendant de différents

paramètres : la nature du rayonnement et la sensibilité du tissu. C'est l'unité de mesure des doses équivalente (pour un organe ou un tissu) et efficace (pour le corps entier), tenant compte des effets biologiques induits par une exposition en fonction des organes touchés. Il est ainsi possible de comparer l'effet d'une même dose délivrée par des rayonnements de nature différente sur un tissu, un organe ou l'organisme entier. Cette unité est utilisée dans le cadre des expositions humaines. Pour l'environnement, il n'y a pas de consensus sur un facteur de pondération en fonction de l'émetteur ou des tissus car la sensibilité des espèces est très différente.

Les trois unités présentées ci-dessus sont schématisées sur la figure I.1.3. Le nombre de pommes qui tombent de l'arbre par unité de temps se mesure en Becquerel. Le nombre de pommes tombant sur le personnage se mesure en Gray. Les effets de l'impact des fruits sur le corps du personnage se mesure en Sievert. L'effet dépend de la grosseur de la pomme (nature du rayonnement) et de la localisation de l'impact.

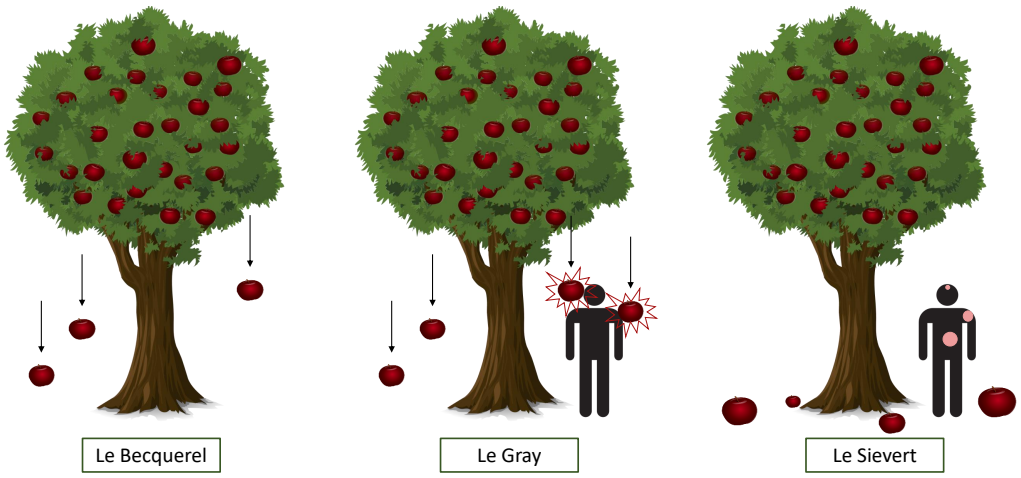


FIGURE I.1.3. – Les unités de mesure de la radioactivité. Source : d'après [4].

I.1.4. Les voies d'expositions

L'exposition aux radionucléides peut être **externe** ou **interne**. Dans le cadre d'une **exposition externe**, les radionucléides demeurent à l'extérieur de l'organisme. Cette exposition ne peut avoir lieu que si les rayonnements émis par les radionucléides sont suffisamment pénétrants. Ce sont les rayonnements β et γ qui sont responsables de l'exposition externe. L'exposition externe cesse dès que l'organisme quitte la trajectoire des rayonnements. Dans le cadre d'une **exposition interne**, les radionucléides peuvent pénétrer dans l'organisme selon plusieurs voies : l'inhalation, l'ingestion, le passage transcutané et le passage par la barrière placentaire. On parle alors de contamination. L'inhalation et le passage transcutané sont les voies de contamination accidentelles les plus fréquentes chez les travailleurs du nucléaire. L'ingestion d'eau de boisson ou d'aliments contaminés est la voie d'exposition principale pour la population générale. C'est par cette voie que les rayonnements α peuvent potentiellement impacter la matière vivante.

I.1.5. Les sources de rayonnements ionisants

I.1.5.1. Les sources naturelles

Les rayonnements d'origine naturelle représentent les deux tiers de l'exposition de la population en France métropolitaine (Figure I.1.4) [69]. Les principales sources d'exposition naturelle sont :

- **La radioactivité cosmique** : le système solaire est bombardé par des particules chargées de haute énergie. Ces particules ont une origine galactique (soleil, étoiles à forte activité) et extragalactique. La Terre est donc exposée à ces rayonnements à différents niveaux en fonction de l'altitude et de la latitude. Pour l'altitude, l'atmosphère agit comme un écran de protection face aux particules de haute énergie, ainsi plus l'altitude est élevée moins le flux de particules est atténué. Ainsi, les personnes voyageant fréquemment en avion sont soumises à une exposition supplémentaire. Enfin, pour la latitude, les particules de basse énergie sont déviées par le champ magnétique terrestre. L'entrée des particules est facilitée au niveau des pôles.
- **La radioactivité tellurique** : la croûte terrestre contient des radionucléides présents depuis la formation de la Terre. Certains de ces radionucléides en se désintégrant donnent naissance à d'autres radionucléides. Par exemple l'uranium 235, l'uranium 238 et le thorium 232. D'autres radionucléides présents dans la croûte terrestre en se désintégrant donnent naissance à des éléments stables. Par exemple le potassium 40 et le rubidium 87. Ces désintégrations sont à l'origine d'une irradiation externe depuis le sol terrestre.
- **La radioactivité atmosphérique** : le radon est un gaz radioactif. Ce gaz est issu de la désintégration de l'uranium et du radium présents dans la croûte terrestre. La concentration en radon dans l'air varie selon la teneur en uranium naturel du sol. Cette concentration est plus importante pour des sols granitiques ou volcaniques. Il se concentre dans les espaces clos.
- **L'incorporation d'éléments radioactifs naturels** : les denrées alimentaires et les eaux de boisson contiennent naturellement des radionucléides. Ils sont telluriques ou atmosphériques. Les radionucléides telluriques entrent dans la chaîne alimentaire en étant principalement absorbés par les racines des végétaux. De plus, le radon se désintègre dans l'air et donne naissance à des radionucléides qui se déposent sur les plantes. On retrouve aussi des radionucléides en milieu marin. Ils proviennent du drainage des sols continentaux, du dégazage du radon dans l'eau et du dépôt atmosphérique à la surface de l'eau des descendants des radionucléides telluriques.

I.1.5.2. Les sources artificielles

La radioactivité artificielle est liée aux activités humaines. L'exposition à des sources artificielles représente un tiers de l'exposition de la population en France métropolitaine (Figure I.1.4) [69]. Les principales sources d'expositions artificielles sont :

- **Les activités médicales** : les rayonnements ionisants (RI) sont utilisés à des fins de diagnostic médical (radiologie ou imagerie) ou de traitement en radiothérapie. Chaque année, 44% des Français effectuent au moins une radiographie, un scanner ou un examen de médecine nucléaire à visée diagnostique [69].

- **Les activités industrielles** : les installations nucléaires rejettent des substances radioactives dans l'environnement, dans le cadre de leur fonctionnement normal. Ce sont des rejets qui sont contrôlés et autorisés par les pouvoirs publics. Les limites de rejets sont fixées en vérifiant que l'installation limite autant que possible les quantités rejetées et que l'impact dosimétrique de ces rejets sur l'environnement et les personnes au voisinage de l'installation reste très faible. L'exposition d'un groupe de référence aux rejets d'une installation nucléaire est de l'ordre de 0,01 mSV/an (Figure I.1.4).
- **Les activités militaires** : entre 1945 et 1980, 543 essais nucléaires atmosphériques ont été réalisés par les États-Unis, la Russie, la Grande-Bretagne, le France et la Chine. Les sites d'essais sont répartis sur l'ensemble du globe, mais la plupart ont eu lieu dans l'hémisphère nord. À chaque explosion aérienne, des particules radioactives ont été libérées dans l'atmosphère. Elles ont pu séjourner dans l'atmosphère de quelques heures à quelques mois avant de retomber au sol. Les particules ont été transportées sur des milliers de kilomètres par les vents dominants. L'hémisphère nord a reçu 75% des retombées radioactives totales. L'iode 131, le césium 137 et le strontium 90 ont constitué l'essentiel de la contamination des composantes de l'environnement (air, eau, sols, denrées). La contamination de la chaîne alimentaire par l'iode 131 a disparu rapidement en raison de sa demi-vie courte (8,02 jours). En revanche, la contamination de la chaîne alimentaire par le césium 137 et le strontium 90 qui ont des demi-vies longues (respectivement 30 ans et 28,79 ans), diminue lentement. La dose efficace annuelle en France liée à ces essais est estimée à 0,01 mSv/an (Figure I.1.4).

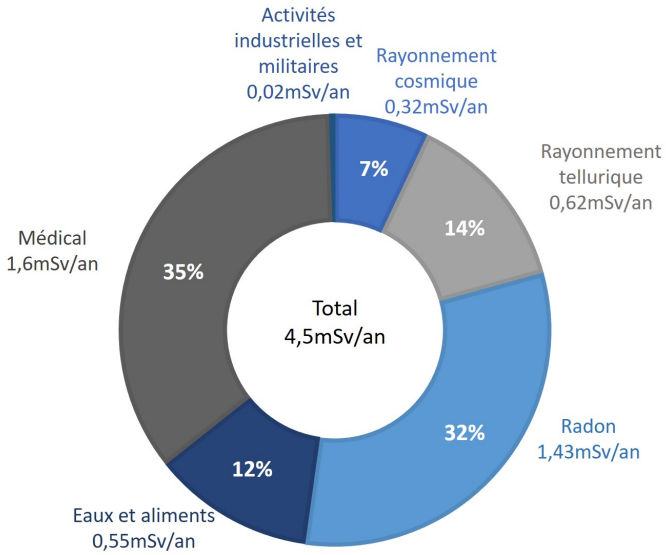


FIGURE I.1.4. – Exposition moyenne de la population de France métropolitaine aux rayonnements ionisants en 2015. Source : d'après [69].

I.1.5.3. Les accidents nucléaires

Dans le cas des accidents nucléaires, les radionucléides sont dispersés par le vent sous forme de masse d'air contaminé que l'on nomme le panache. L'exposition peut avoir lieu de différentes manières :

- Irradiation externe par le panache.
- Irradiation externe par les dépôts.
- Contamination interne par inhalation.
- Contamination interne par ingestion (végétaux, lait...).

I.1.5.3.1. L'accident de Tchernobyl

L'accident nucléaire de Tchernobyl a eu lieu le 26 avril 1986 en Ukraine. Cet accident est classé 7, le plus haut niveau sur l'échelle internationale des événements nucléaires (INES). Cette catastrophe est le résultat d'une erreur humaine lors d'un essai technique ayant provoqué une augmentation incontrôlée de la puissance du réacteur n° 4 conduisant à son explosion. L'explosion a conduit à l'émission dans l'atmosphère de produits radioactifs contenus dans le cœur du réacteur nucléaire, les rejets se sont poursuivis jusqu'au 5 mai 1986. En dix jours, près de 12 milliards de milliards de becquerels ont été rejetés dans l'environnement. La majorité (84% de l'activité totale rejetée) des éléments radioactifs rejetés avaient une demi-vie inférieure à un mois. 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'Ukraine, la Biélorussie et la Russie ont été les pays les plus touchés, ils ont reçu 60% de la radioactivité totale rejetée. Des dépôts de césium 137 dépassant les 600.000 Bq/m^2 ont été mesurés sur près de 13.000 km^2 [71] (Figure I.1.5).

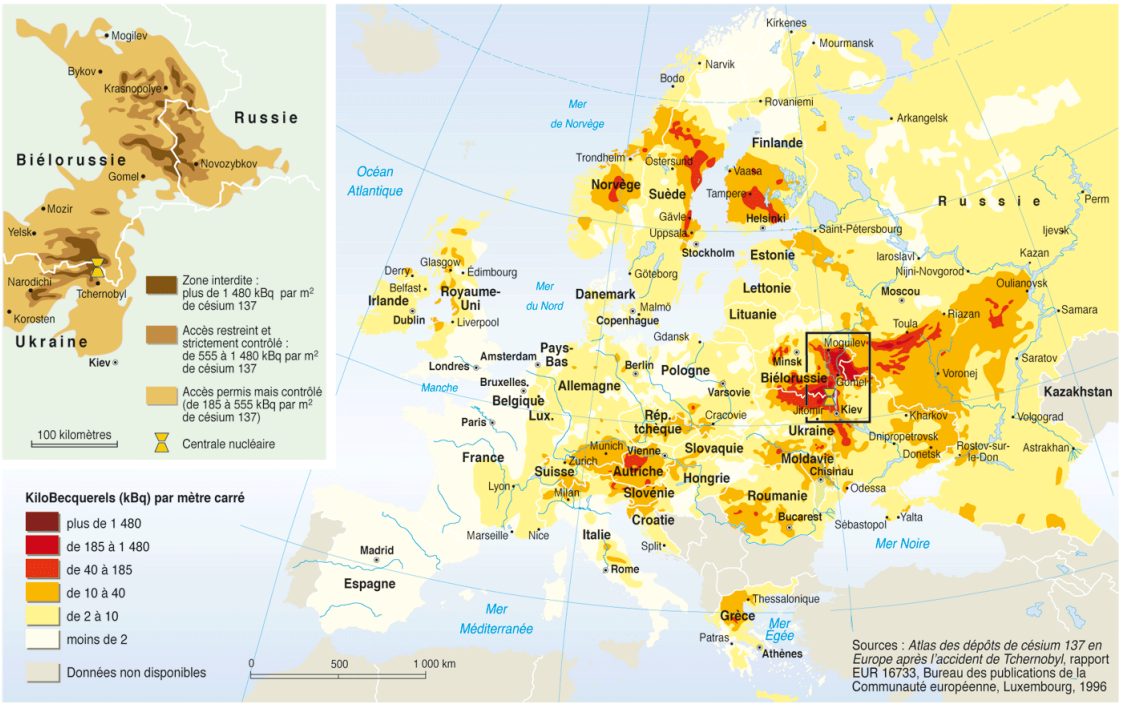


FIGURE I.1.5. – Carte des dépôts de césium 137 en Europe après l'accident de Tchernobyl. Source : [124].

I.1.5.3.2. L'accident de Fukushima-Daiishi

Au Japon, le 11 mars 2011, a eu lieu un séisme de magnitude 9,1 au large des côtes nord-est de l'île de Honshû. Un tsunami s'est déclenché à la suite de ce séisme. La vague

a parcouru jusqu'à 10 km à l'intérieur des terres. Cette catastrophe a fait 20.000 morts et disparus, elle a aussi impactée la centrale nucléaire de Fukushima-Daiishi. La centrale de Fukushima-Daiishi possédait 6 réacteurs dont 3 qui fonctionnaient à pleine puissance au moment du tsunami. Suite au séisme l'électricité a été coupée, et des groupes électrogènes ont pris le relais pour le fonctionnement de la centrale. Moins d'une heure après la mise en marche des groupes électrogènes, le tsunami les met hors d'usage. Cette situation a conduit à la perte du système de refroidissement des cœurs des trois réacteurs en fonctionnement et de plusieurs piscines d'entreposage des combustibles usés. Le défaut de refroidissement des réacteurs a entrainé une fusion des cœurs des réacteurs. De plus, la production d'hydrogène au cours de la dégradation des combustibles a conduit à des explosions. Ces explosions en dégradant les bâtiments des réacteurs 1 à 4 ont été à l'origine des rejets atmosphériques de radionucléides. Cet accident nucléaire classé 7 sur l'échelle INES, a conduit au rejet d'éléments radioactifs dans l'environnement (Iode, Césium, Tellure, Xénon et Crypton). Ces éléments ont été dispersés par le vent sous forme de masse d'air contaminée. Des précipitations au nord-ouest de la centrale ont conduit à de forts dépôts au niveau du sol (Figure I.1.6). Des dépôts de césium 137 dépassant les 600.000 Bq/m^2 ont été mesurés sur près de 600 km^2 [68] (Figure I.1.6). Concernant les rejets marins, la catastrophe de Fukushima-Daiishi représente le plus grand apport de radioactivité artificielle jamais observé dans un intervalle de temps aussi court. Les courants marins ont dispersé les rejets radioactifs mais le proche littoral reste contaminé durablement par les radionucléides fixés dans les sédiments ou apportés à la mer par le lessivage des dépôts terrestres.

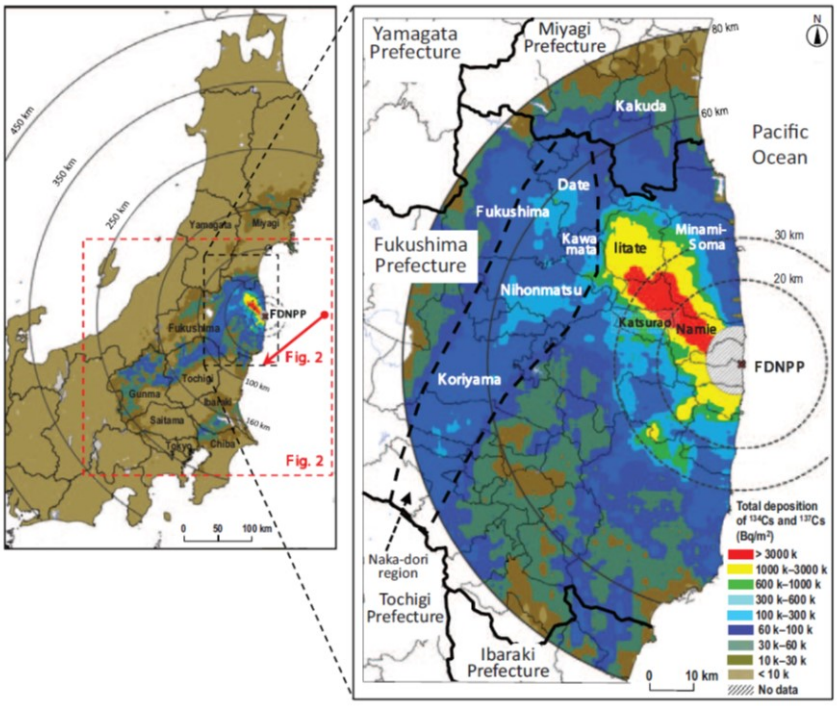


FIGURE I.1.6. – Carte des dépôts de césium 137 après l'accident de Fukushima. Source : [163].

I.2. Le mécanisme d'action des rayonnements ionisants

I.2.1. Les mécanismes de toxicité des rayonnements ionisants

Les RI peuvent impacter les molécules selon deux processus :

- **L'ionisation directe** des molécules par la perte d'électron.
- **L'ionisation indirecte** par la radiolyse de l'eau.

L'ionisation indirecte est le processus prépondérant pour le rayonnement γ. Comme les organismes sont principalement constitués d'eau, la probabilité d'interaction des RI est plus grande avec l'eau qu'avec des macromolécules biologiques [31]. Lors de l'ionisation indirecte il y a production de **radicaux libres** dérivés de l'H_2O qui sont très réactifs. **Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron non apparié.** Ce composé est extrêmement instable, il peut réagir avec des molécules plus stables pour apparier son électron. Le radical libre peut soit arracher un électron (on parle d'oxydation), soit céder un électron (on parle de réduction). Suite à cette première réaction, la formation en chaîne de nouveaux radicaux a lieu. C'est pour cela que la production d'un radical libre dans une cellule peut engendrer d'importantes lésions.

L'ionisation indirecte peut intervenir par deux types de mécanismes (Figure I.2.1, phase physique) :

- **Le phénomène d'excitation**, lors duquel les niveaux énergétiques des électrons sont modifiés.
- **Le phénomène d'ionisation**, lors duquel un électron est arraché.

Suite au phénomène d'excitation, la molécule d'eau est dissociée en radicaux libres $H^\bullet$ et $OH^\bullet$ (Figure I.2.1, phase physico-chimique). Suite à l'ionisation, la molécule d'eau cationique H_2O^+ perd un proton et donne le radical libre $OH^\bullet$ (Figure I.2.1, phase physico-chimique). Le radical hydroxyle $OH^\bullet$ est l'un des plus puissants oxydants chimiques. Ainsi l'excitation et l'ionisation de l'eau conduisent à la formation de radicaux $OH^\bullet$ et $H^\bullet$, qui vont eux-mêmes générer des espèces radicalaires secondaires comme le radical superoxide $O_2^{-\bullet}$, le radical peroxyde $HO_2^\bullet$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 que l'on nomme les **espèces réactives de l'oxygène** (ROS) (Figure I.2.1, phase chimique). Ces ROS vont diffuser dans le milieu et intéragir avec d'autres molécules.

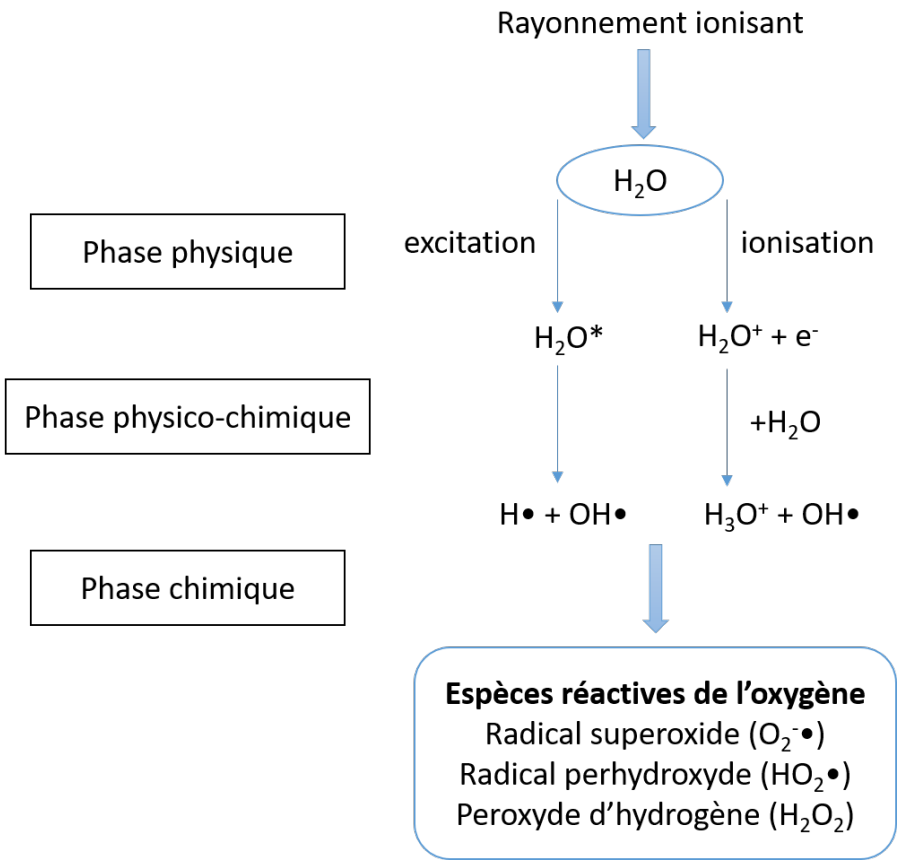


FIGURE I.2.1. – Principales réactions se produisant lors de la radiolyse de l'eau. Source : d'après [92].

Afin de se protéger des ROS, les organismes possèdent des systèmes de défense que l'on appelle **anti-oxydants**. En condition physiologique, la balance anti-oxydants/pro-oxydants est à l'équilibre. Lors de la radiolyse de l'eau, il y a une surproduction de radicaux libres. Une rupture de l'équilibre de la balance anti-oxydants/pro-oxydants peut survenir, il s'agit du **stress oxydant**. Le stress oxydant induit des lésions sur différents type de molécules [132, 41] :

- **L'ADN** est très sensible aux radicaux libres. Il existe différentes classes de dommages oxydatifs qui peuvent être induits par les radicaux libres [132] (Figure I.2.2) :
  - **L'oxydation des bases nucléotidiques** : l'oxydation entraine l'apparition de bases modifiées comme par exemple la 8-oxo-guanine, la 8-oxo-adénine, la 5-hydroxy-cytosine ou des diols de thymine. La guanine est particulièrement sensible à l'oxydation. Ces modifications de bases sont le plus souvent prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN (voir sous-section I.2.2). Si la modification de base n'est pas réparée, il y a apparition d'une mutation.
  - **Les sites abasiques** : les ROS attaquent la liaison entre la base et le désoxyribose. En l'absence de réparation, les sites abasiques ont un effet mutagène. Lors de la réplication, les ADN polymérases choisissent arbitrairement une base à placer face au site vacant.
  - **Les cassures simple ou double brin de l'ADN** : elles peuvent être simple brin ou double brin. Les cassures simple brin proviennent de la rupture de la

chaîne sucre phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. Les cassures double brin proviennent de la cassure des deux chaînes de l'ADN. Elles peuvent aussi se produire lorsque plusieurs dommages sont localisés sur un nombre réduit de paires de bases, on parle de cluster de dommages. Les cassures double brin sont très délétères car elles sont difficiles à réparer.

  - **Les adduits de dérivés d'oxydation lipidique** : un adduit à l'ADN résulte de la fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente. Ils sont issus de la peroxydation lipidique qui génère des aldéhydes mutagènes qui forment des adduits sur les bases de l'ADN. Les adduits provoquent des erreurs de réplication de l'ADN qui sont à l'origine de mutations.
  - **Les pontages ADN-protéines** : l'attaque des ROS sur les protéines interagissant avec l'ADN conduit à former des pontages des protéines sur les bases. Ces pontages provoquent des erreurs de réplication de l'ADN qui sont à l'origine de mutations.

- **Les protéines** sont aussi sensibles aux attaques radicalaires [41]. Les protéines les plus sensibles sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). Les protéines sont oxydées et inactivées. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles à l'action des protéases et du protéasome. Elles deviennent aussi hydrophobes, elles vont donc s'agglutiner et former des amas anormaux qui en association avec les lipides forment des dépôts caractéristiques des tissus âgés. D'autres dommages sont aussi possibles comme la formation de ponts bi-tyrosines, la modification de certains acides aminés ou bien des coupures.
- **Les lipides** sont des cibles de l'attaque par le radical hydroxyle [41]. Cette réaction est appelée la peroxydation lipidique. Les lipides contenus dans les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires peuvent être atteints. L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de lipoprotéines de densité légère (LDL) oxydées. Ces LDL sont captées par les macrophages et vont former le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires. L'attaque des phospholipides membranaires conduit à une modification de la fluidité de la membrane, ce qui impact le fonctionnement de récepteurs et transporteurs membranaires.
- **Les polysaccharides** peuvent être oxydés [41]. Cependant, ce dommage oxydatif est moins étudié que les précédents. Le glucose peut s'oxyder en présence de traces métalliques. La glycosoxydation conduit à la fragilité des parois vasculaires.

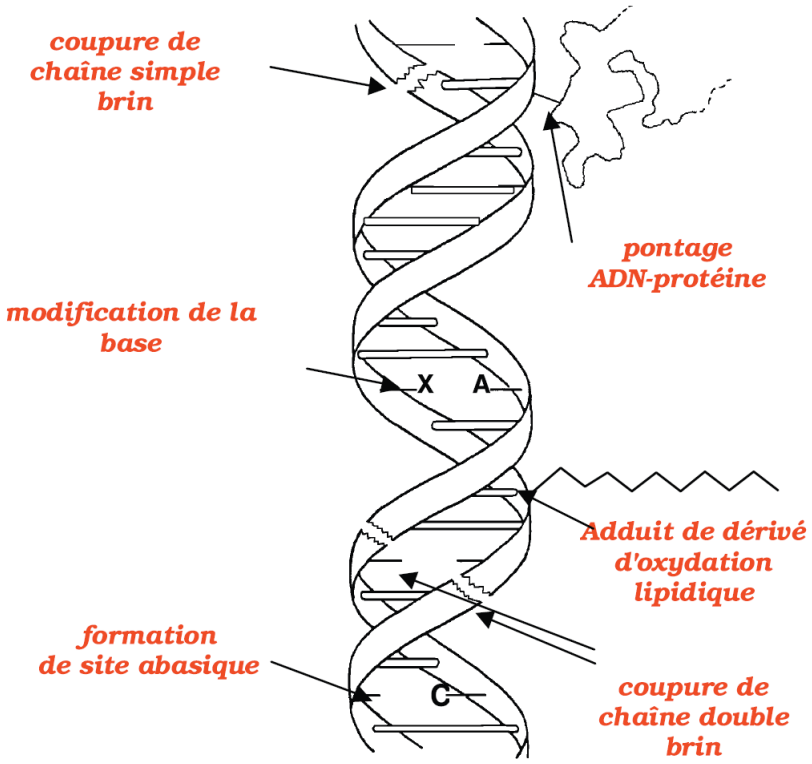


FIGURE I.2.2. – Lésions de l'ADN induites par les radicaux libres. Source : [41].

I.2.2. Les mécanismes de réparation de l'ADN

Comme décrit ci-dessus, les RI interagissent avec tous les composants de la cellule. Cependant, l'ADN est considéré comme la cible moléculaire la plus susceptible de compromettre l'intégrité cellulaire, car seulement deux copies de ces molécules sont présentes dans les cellules. Ces lésions interfèrent avec la transcription ou la réplication et mettent en cause la survie cellulaire. Les cellules possèdent différents mécanismes pour réparer l'ADN :

- **La voie de réparation par excision de base (BER)** : cette réparation, utilise une ADN glycosylase qui reconnaît et élimine la base lésée en hydrolysant la liaison glycosidique unissant le désoxyribose à la base. Le désoxyribose est ensuite éliminé par une endonucléase. Le remplacement du nucléotide est effectué par une ADN polymérase et une ADN ligase par complémentarité avec le brin opposé puis l'ADN est restauré dans son état initial.
- **La voie de réparation par excision de nucléotides (NER)** : la lésion est reconnue par la distorsion de la double hélice due au nucléotide incorrect. Des protéines de la famille xeroderma pigmentosum sont impliquées dans cette voie de réparation. Cette réparation se déroule en quatre étapes :
  - La recherche et la reconnaissance de la lésion par des protéines à doigt de zinc.
  - L'ouverture de la double hélice au niveau de la lésion par les hélicases.
  - L'incision de part et d'autre de la lésion puis excision pour le fragment d'ADN contenant la lésion par des endonucléases (un fragment de 24 à 32 nucléotides est excisé).

- La re-synthése par les polymérases puis ligation.

Les cassures double brin provoquent la phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139, c'est ce complexe que l'on appelle γ-H2AX. Cette phosphorylation est effectuée majoritairement par la kinase ATM mais peut aussi être effectuée par ATR et les DNA-PKs [18]. γ-H2AX assure un rôle de plateforme de recrutement des protéines de réparation des cassures double brin. Il existe deux voies de réparation des cassures double brin : la recombinaison homologue et la jonction des extrémités non-homologues.

- **La recombinaison homologue (RH)** utilise la séquence homologue afin de reproduire la région perdue lors de la cassure. Ce processus a lieu entre les phases S et G2 du cycle cellulaire car la chromatide sœur est présente et sert comme matrice d'ADN. Le processus de réparation se déroule en trois phases :
  - La première phase est la phase présynaptique, l'ADN orienté dans le sens 5'-3' de part et d'autre de la cassure est dégradé, on parle de résection. Une extrémité 3' d'ADN simple brin est généré. Cette extrémité simple brin est prise en charge par la protéine RPA, c'est un complexe composé de trois protéines qui permet de stabiliser l'ADN simple brin. Ce complexe ADN simple brin et protéines est appelé filament présynaptique.
  - La seconde phase est la phase synaptique. La recherche d'homologie nécessite le remplacement des protéines RPA par la recombinase Rad51. D'autres protéines comme Rad52 ou Brca2 sont nécessaires pour le déplacement des complexes RPA et le chargement de Rad51. Lors de cette phase, le filament envahit la séquence homologue, ce que l'on nome la D-loop où l'extrémité 3' est un point de départ pour la synthèse d'ADN avec comme modèle la séquence homologue.
  - La dernière phase est la phase post-synaptique. Lors de cette phase, l'ADN est synthétisé au sein de la D-loop. La synthèse est suivie par une étape de ligation qui permet d'obtenir la jonction de Holliday. La résolution de la jonction de Holliday peut avoir lieu selon deux mécanismes : un mécanisme qui conduira à un crossing-over (échange important de matériel génétique) ou un mécanisme sans crossing-over (échange de matériel génétique limité).
- **La jonction des extrémités non-homologues (JENH)** permet de relier directement les deux extrémités endommagées. Ce processus est indépendant du cycle cellulaire. Il s'agit de la voie majeure de réparation dans les cellules de mammifères. Le processus de réparation se déroule en trois phases :
  - La première phase consiste en la détection des extrémités. L'hétérodimère Ku70/80 qui a une forme d'anneau se lie aux extrémités libres de l'ADN. Puis un complexe DNA-PK avec Ku70/80 se forme. Ce complexe conduit à la phosphorylation de nombreuses cibles.
  - La seconde phase est la maturation des extrémités. Les enzymes rendent les extrémités compatibles pour la ligation. Il peut arriver que les extrémités de la cassure ne soient pas compatibles. Dans ce cas de nombreuses enzymes sont impliquées afin d'obtenir des extrémités nettes. Ce cas est exceptionnel car il est très délétère pour l'information génétique.
  - La dernière phase est la ligation. Un complexe multi-protéique contenant notamment Xrcc4 effectue la ligation des extrémités.

Si les dommages à l'ADN sont trop importants, ils peuvent ne pas être pris en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN. Les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et conduire à deux possibilités [41] :

- Des erreurs de lecture et de synthèse par les ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome.
- Une impossibilité de copie de l'ADN ce qui va conduire à la mort de la cellule par apoptose.

Il s'agit d'un effet à court terme à la suite d'une exposition aux RI (Figure I.2.3). Lorsque les dommages à l'ADN sont pris en charge par le système de réparation de l'ADN, il peut tout de même y avoir des erreurs, des mutations peuvent être introduites. En fonction des cellules impactées, il va y avoir des conséquentes différentes :

- Si les mutations impactent des cellules somatiques elles peuvent conduire à la cancérogenèse.
- Si ces mutations surviennent dans les cellules germinales elles pourront impacter la fécondité et la fertilité mais aussi être transmises à la descendance.
- Si les mutations impactent des cellules fœtales elles peuvent conduire à l'apparition d'effets tératogènes.

Dans ce cadre, il est aisé de comprendre que les RI peuvent impacter à long terme la santé des populations ainsi que la qualité de l'écosystème (Figure I.2.3).

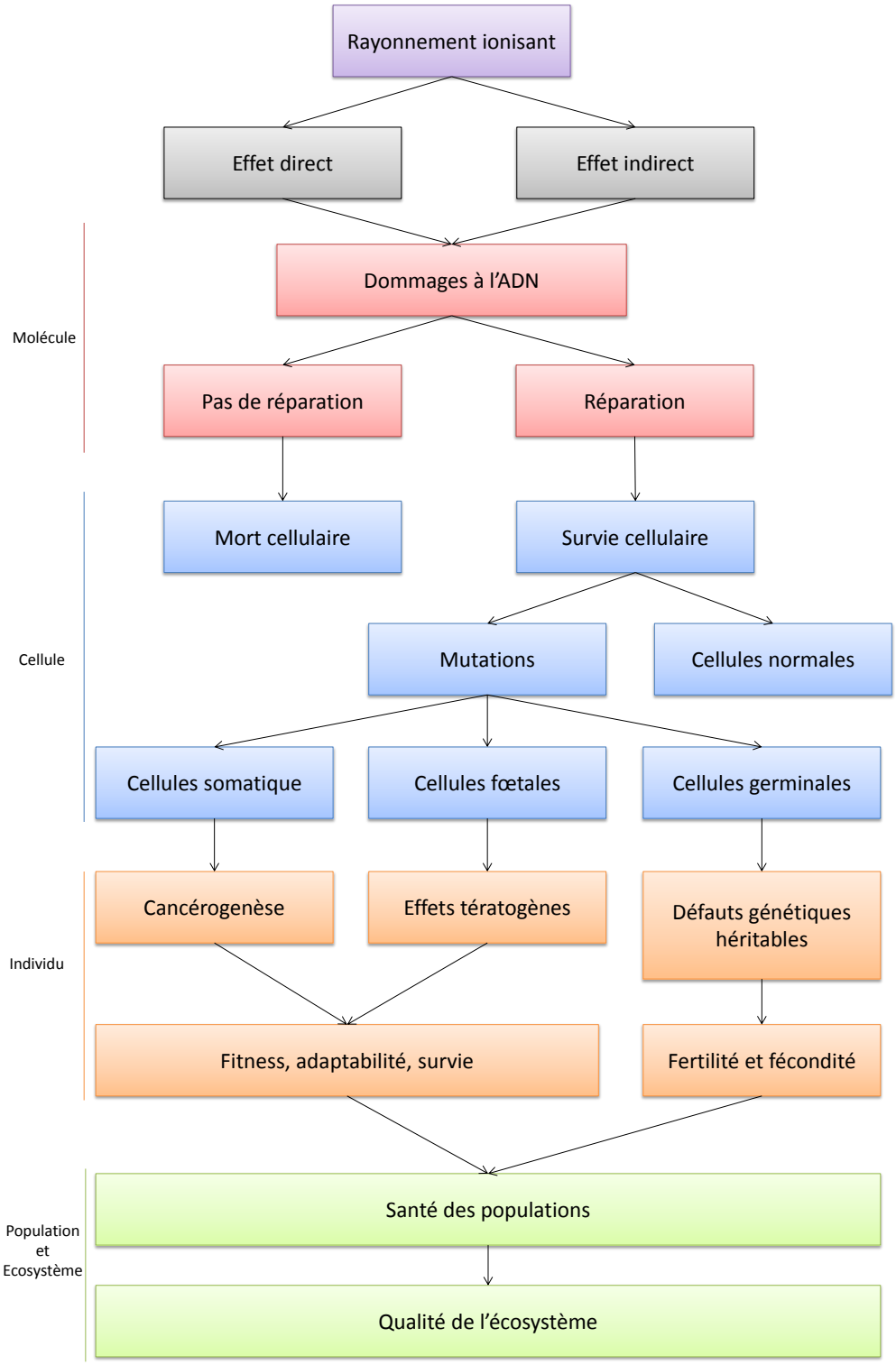


FIGURE I.2.3. – Schéma récapitulatif des effets des rayonnements ionisants à différentes échelles biologiques. Source : d'aprés [73, 88, 118].

I.2.3. Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN

Comme décrit précédemment, l'une des cible critique des RI est l'ADN. Afin de détecter les dommages à l'ADN différents tests peuvent être mis en œuvre. Le test des comètes en conditions alcalines en fait partie, il permet de détecter les cassures simple brin de l'ADN ainsi que les sites alcali-labiles [165]. Le marquage immuno-histochimique des focis γ-H2AX permet de détecter les sites de réparation des cassures doubles brin de l'ADN. Une étude a mis en évidence l'induction de dommages à l'ADN avec le test des comètes chez des embryons de poisson zèbre irradiés durant 1 h ou 24 h à des doses de 1,2 et 7,2 mGy/h [72]. Des résultats similaires ont été trouvés par une autre équipe, après une irradiation aiguë sur des embryons de poisson zèbre de 3 heures post-fécondation (hpf) à des doses allant de 1 à 10 Gy, des dommages à l'ADN sont détectés pour toutes les doses avec le test des comètes [130]. Après une irradiation de 24 h à 23,75 mGy/h sur des embryons de poisson zèbre une augmentation des dommages à l'ADN a été détectée toujours avec le test des comètes [50]. Ces trois études d'irradiation sur des embryons de poisson zèbre montrent que les RI induisent des dommages à l'ADN de type simple brin ou des sites alcali-labiles qui sont détectés par le test des comètes ceci malgré des débits de doses faibles pour la première étude [72]. Une autre étude a utilisé le marquage des focis γ-H2AX afin d'étudier les effets des RI [123]. Le marquage a été réalisé sur des cellules ZF4 (lignée cellulaire provenant du poisson zèbre), après une irradiation de 24 h aux doses de 4,17 mGy/h et 31,25 mGy/h. Une augmentation significative du nombre de focis γ-H2AX est détectée par rapport à la condition contrôle. Ce résultat indique que les RI induisent aussi des cassures double brin de l'ADN en complément des cassures simple brin.

I.3. Le modèle d'étude : le poisson zèbre

I.3.1. Caractéristiques du poisson zèbre

Au cours de ce projet de thèse, le poisson zèbre (*Danio rerio*) a été choisi comme organisme modèle. C'est un organisme vertébré qui présente de nombreux avantages notamment du à sa facilité d'élevage. Il est fréquemment étudié en toxicologie et en biologie du développement, ainsi de nombreuses connaissances sur son développement et sa physiologie ont été acquises.

I.3.1.1. Position phylogénétique

Le poisson zèbre, a été décrit pour la première fois par Francis Hamilton en 1822. C'est un vertébré qui appartient à la plus grande famille des poissons d'eau douce : les cyprinidés [144] (Tableau I.3.1).

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Cypriniformes
Family	Cyprinidae
Genus	Danio
Species	Danio Rerio

Tableau I.3.1. – Classification phylogénétique du poisson zèbre.

I.3.1.2. Mode de vie

Le poisson zèbre est originaire d'Asie. C'est un poisson d'eau douce qui se trouve en Inde, au Bangladesh et au Népal (Figure I.3.1). Il vit dans les plans d'eaux stagnantes, les rivières à faible courant et les rizières.

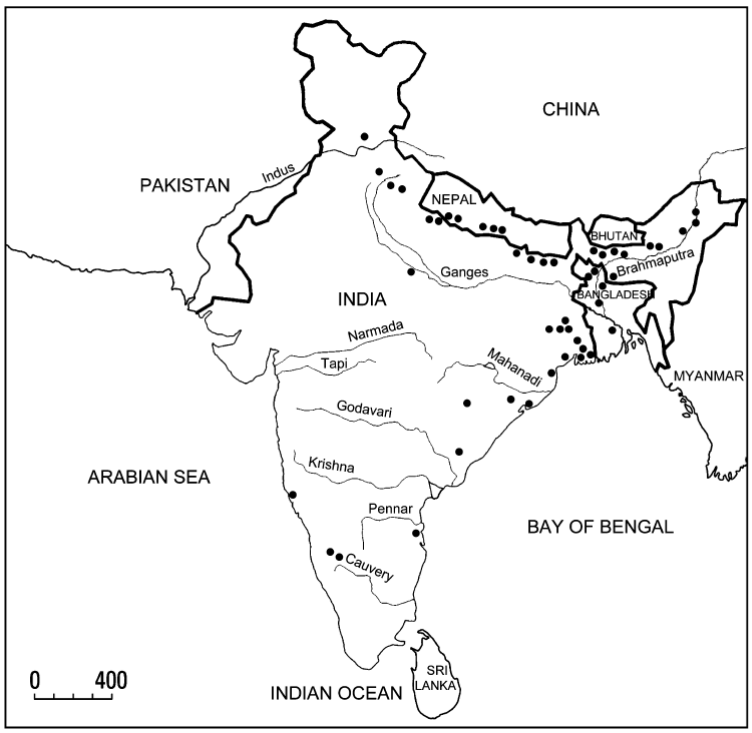


FIGURE I.3.1. – Répartition naturelle du poisson zèbre. Les points noirs indiquent les lieux où le poisson a été repéré. Source : [144].

Son espérance de vie est de 1 ans en milieu naturel et environ 3 ans et demi en captivité. Il est très apprécié par les aquariophiles en raison de sa facilité de maintenance et de reproduction. En effet, il supporte un pH compris entre 5,9 et 8,1 et une température comprise entre 18 et 38 °C. La température optimale est comprise entre 24 et 29 °C. Il s'agit d'une espèce grégaire qui vit en banc d'une dizaine de poissons. Le poisson zèbre est omnivore, son régime naturel est principalement composé de zooplancton et d'insectes. Il pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la population des moustiques car à l'état sauvage il se nourrit de larves de moustiques [36].

I.3.1.3. Morphologie

Le poisson zèbre mesure en moyenne 4 cm, de par sa petite taille, son élevage est facile et peu coûteux. Cinq à sept bandes bleues foncées sont présentes sur toute la longueur du corps. Il est de teinte métallique et brillante. La couleur est composée de trois types de cellules pigmentées [121] :

- **Les mélanophores** bleus foncés.
- **Les xanthophores** dorés.
- **Les iridophores** irisés.

C'est un poisson de proche surface. La bouche est dirigée vers le haut, ce qui lui permet de capturer les insectes à la surface de l'eau. Le dimorphisme sexuel est assez marqué, les mâles sont élancés tandis que les femelles sont plus rondes. Les rayures horizontales du mâle tirent sur le jaune alors que celles de la femelle sont plutôt blanchâtres. De

plus, la présence d'une papille génitale devant la nageoire anale permet de distinguer les femelles.

FIGURE I.3.2. – Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre. Source : [43].

I.3.1.4. Reproduction

Le poisson zèbre est une espèce ovipare. Il est mature sexuellement vers 3-4 mois. Afin de favoriser la reproduction, les poissons reproducteurs sont maintenus avec un cycle jour/nuit 14 h de jour pour 10 h de nuit ce qui correspond au cycle de la photo-période lors de la saison des moussons et avec une température comprise entre 26,5 et 28,5 °C. L'ovulation des femelles dépend de l'exposition aux phéromones mâles [144]. La veille de la reproduction les poissons sont placés par couple dans un petit bac avec une séparation ce qui permet les échanges de phéromones mais évite les contacts directs entre mâles et femelles. Lorsque la séparation est retirée, le mâle se met à poursuivre rapidement la femelle et il pousse le flanc de celle-ci avec sa tête afin de l'entrainer vers un site de ponte. Une fois la femelle arrivée au site de ponte, le mâle nage prés d'elle en étendant ses nageoires dorsales et caudales autour d'elle. Ce comportement déclenche la ponte chez la femelle et le sperme est libéré simultanément. Ce comportement de reproduction dure environ 1 heure chez le mâle et il est le plus actif durant les trente premières minutes. Ce comportement de la part des mâles est dû aux phéromones libérées par les femelles [144]. La ponte est induite par la température et la disponibilité alimentaire. Les pontes du poisson zèbre sont abondantes et la période de reproduction en laboratoire est constante toute l'année. Les femelles peuvent pondre une fois par semaine et chaque ponte peut contenir plusieurs centaines d'œufs. La ponte est libre dans le milieu, ainsi, pour éviter la prédation des œufs par les adultes un bac grillagé est utilisé : la femelle pond les œufs qui sont fécondés par le mâle et ensuite ils décantent au fond du bac rendu inaccessible.

I.3.1.5. Le génome du poisson zèbre

Le génome peut être subdivisé en deux parties : une partie avec **les régions codantes** c'est à dire les régions qui sont transcrites en ARN et traduites en protéines et **les régions non codantes** qui sont soit des régions non transcrites, soit des régions transcrites en ARN mais non traduites en protéines. Le projet de séquençage du génome du poisson zèbre à été initié en 2001 au Welcome Trust Sanger Institute. Le poisson zèbre possède 50 chromosomes répartis en 25 paires. Il fait partie de l'infraclasse des téléostéens, un groupe qui a émérgé il y a 340 millions d'années. L'ancêtre commun des téléostéens a subi une duplication totale du génome supplémentaire par rapport aux vertébrés appelé « the teleost-specific genome dupliction » [107]. La dernière version en date du génome de référence : « Genome Reference Consortium Zebrafish Build 11 » (GRCz11) dénombre 25.592 gènes codant pour des protéines et 6599 gènes non codants [37]. Pour comparaison chez l'humain (GRCh38.p12) on compte 20.454 gènes codants et 23.940 gènes non codants [37] et chez la souris (GRCm38.p6) il y a 22.480 gènes codants et 16.324 gènes non codants [37]. Le plus grand nombre de gènes codants chez le poisson zèbre provient de la duplication du génome supplémentaire [63]. Environ 70% des gènes de poisson zèbre ont un orthologue humain.

I.3.2. Les étapes du développement du poisson zèbre

Les embryons sont transparents durant les premiers stades de vie ce qui permet une observation sous la loupe binoculaire. Le développement des embryons est synchrone et rapide (Figure I.3.3). En effet, les précurseurs de tous les organes majeurs sont mis en place en 36 heures. L'éclosion a lieu entre 48 et 72 heures post fécondation (hpf) à 28,5 °C (Figure I.3.3) [82]. Les œufs sont télolécithes, ce qui signifie que le vitellus est très abondant. Les œufs non fécondés développent un espace périvitellin mais ne se développent pas au delà des premiers clivages.

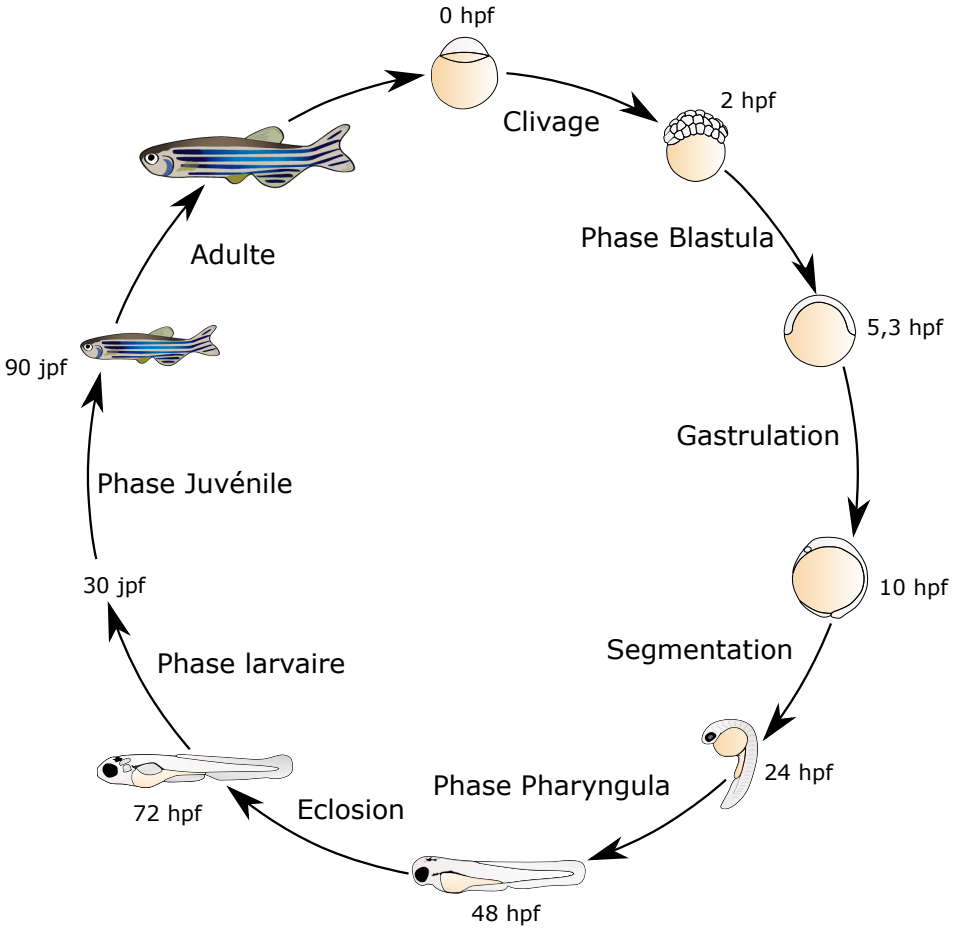


FIGURE I.3.3. – Cycle de développement du poisson zèbre. Source : d'après [138].

I.3.2.1. Le clivage

Au moment de la fécondation le zygote mesure 0,7 mm de diamètre. Le premier clivage a lieu 40 minutes après la fécondation. Les blastomères sont les cellules dérivées de la segmentation de l'oeuf. Après ce premier clivage les blastomères se divisent à 15 minutes d'intervalle [82]. Les divisions sont rapides car l'embryon utilise les ARNs et les protéines maternels déposé dans l'œuf. Les divisions sont méroblastiques c'est à dire qu'elles sont partielles et ne coupent pas tout le vitellus. Six clivages composent cette période. À la fin de la période l'embryon a atteint le stade 64 cellules.

I.3.2.2. La période blastula

Cette phase apparait lorsque le stade 64 cellules est atteint. Durant cette période, trois processus importants se mettent en place :

- **La transition mi-blastuléenne (MBT)**.
- **La mise en place de la couche vitelline syncytiale (YSL)**.
- **Le début de l'épibolie**.

I.3.2.2.1. La transition mi-blastuléenne

Durant les premières divisions de l'embryon l'expression du génome du zygote est inhibée, ce sont les ARNs et protéines maternels qui permettent le développement embryonnaire précoce. À partir du stade 512 cellules débute la transition mi-blastuléenne. Elle est caractérisée par un allongement du cycle cellulaire, une perte de la synchronisation des cellules, l'apparition de la mobilité cellulaire et l'activation de la transcription [82]. La majorité des ARNs maternels sont dégradés par des miRNAs et des protéines produites par l'embryon. Immédiatement après cette phase une cascade d'événements moléculaires va se mettre en place, ce qui va conduire les cellules de l'embryon à adopter un destin cellulaire tel qu'il est défini sur la carte des territoires présomptifs (Figure I.3.4).

I.3.2.2.2. Formation de la couche vitelline syncytiale

Les blastomères situés près de la réserve vitelline sont connectés par des ponts cytoplasmiques à cette réserve tout au long des divisions. Entre les stades 512 et 1024 cellules, ces blastomères fusionnent avec la réserve vitelline et lui transfèrent leur cytoplasme et leur noyau formant ainsi la couche vitelline syncytiale (« yolk syncytial layer », YSL) [22]. La YSL est une annexe embryonnaire unique aux téléostéens. Cette structure est essentielle pour la détermination des axes embryonnaires et elle a des fonctions métaboliques importantes jusqu'aux stades larvaires [22]. La formation de la YSL est concomitante avec la transition mi-blastuléenne mais la mise en place de ces deux événements semble être distincte [82].

I.3.2.2.3. Le début de l'épibolie

À ce stade, on distingue 3 types cellulaires :

- **Les cellules profondes.**
- **Les cellules externes** appelées « enveloping layer » (EVL).
- **Les cellules de la couche vitelline syncitiale**.

L'épibolie débute à la fin de la période blastula. Cette phase correspond au mouvement de recouvrement d'un tissu sur un autre. Au cours de cette période, les cellules externes vont recouvrir la réserve vitelline par un mouvement d'épibolie. L'embryon se creuse en son centre. À la fin de la période blastula seul l'axe animal/végétal est reconnaissable visuellement. L'axe dorso-ventral, les trois feuillets embryonnaires et les précurseurs des différents tissus sont déterminés au niveau moléculaire (Figure I.3.4). Chaque feuillet embryonnaire (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) va donner les différents organes de l'embryon. C'est l'ectoderme qui est à l'origine du système nerveux central (SNC).

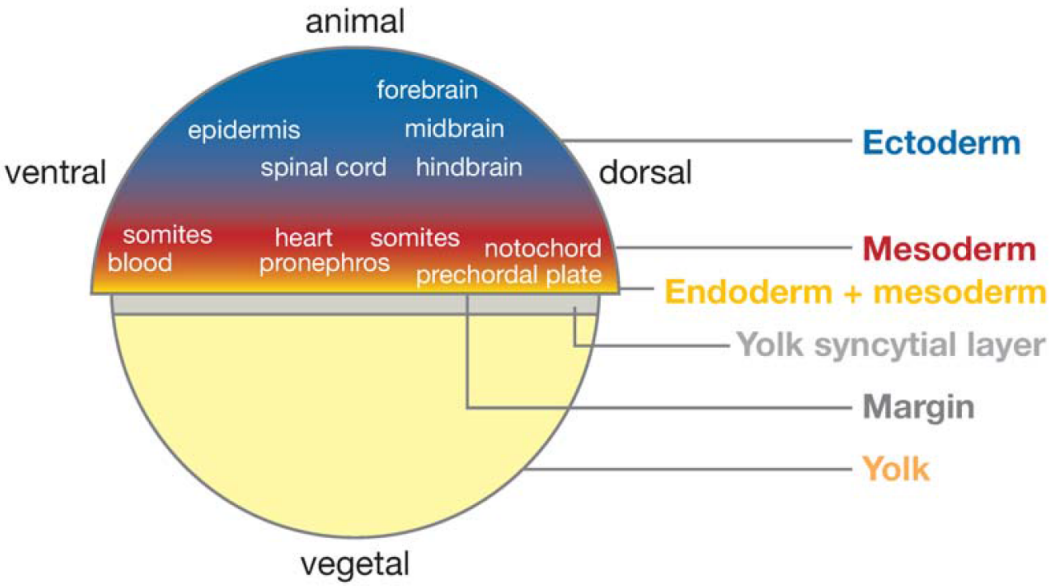


FIGURE I.3.4. – Carte des territoires présomptifs à 50 % d'épibolie (la fin de la période blastula). Les trois feuillets embryonnaires sont représentés : l'ectoderme en bleu, le mesoderme en rouge, l'endoderme et une partie du mésoderme en jaune. Source : [140].

I.3.2.3. La gastrulation

La gastrulation commence lorsque 50 % de la réserve vitelline est recouverte par les cellules externes. Trois mouvements ont lieu dans l'embryon au cours de la gastrulation :

- **La fin du mouvement d'épibolie** qui se poursuit jusqu'à ce que toute la réserve vitelline soit recouverte par les cellules embryonnaires.
- **Le mouvement d'invagination des cellules de la marge** qui va permettre la formation des deux feuillets embryonnaires profonds : l'endoderme et le mésoderme. Un épaississement de la zone marginale permet de visualiser les mouvements d'invagination, cet épaississement est appelé anneau germinatif. Dorsalement, il constitue l'écusson, qui correspond au stade shield. Cet écusson est l'équivalent du centre organisateur de Spemann-Mangold [139].
- **Le mouvement de convergence** qui conduit les cellules ventrales vers la face dorsale de l'embryon où s'allonge l'axe embryonnaire.

La gastrulation prend fin lorsque la réserve vitelline est entièrement recouverte de cellules et que le bourgeon caudal est formé. À cette période, les principales régions de l'embryon (tête, queue, axe) ont été mises en place et sont reconnaissables morphologiquement.

I.3.2.4. La segmentation

Le segmentation a lieu entre 10 et 24 hpf. Durant cette période, les somites et les ébauches d'organes se mettent en place. Les somites apparaissent de façon séquentielle, ils permettent de déterminer précisément le stade de développement de l'embryon. À

partir du stade bud (10 hpf) il est possible d'identifier les principales structures du cerveau. En effet, la spécification du SNC commence à la fin de la gastrulation (9 hpf). Ce processus est appelé **la neurulation**. Le SNC se développe à partir du tube neural. La neurulation peut avoir lieu selon différents processus en fonction des espèces. Chez les amniotes, la neurulation a lieu *via* un processus d'invagination, tandis que chez le poisson zèbre la neurulation a lieu *via* un processus de cavitation. C'est ce processus de cavitation qui est décrit dans ce paragraphe. Au cours de la neurulation, la plaque neurale (Figure I.3.5 A) se courbe et s'invagine et forme une structure appelée le « neural keel » (Figure I.3.5 B). Puis, la plaque neurale se referme et forme une tige le « neural rod » (Figure I.3.5 C) puis le tube neural (Figure I.3.5 D). La partie antérieure du tube neural deviendra le cerveau et la partie postérieure du tube neural deviendra la moelle épinière. C'est durant l'étape de neurulation que les cellules souches embryonnaires sont spécifiées pour devenir des progéniteurs neuronaux. Plus tard au cours du développement, ces progéniteurs se différencient en différents types de cellules :

- **Les neurones** qui sont des cellules excitables qui assurent la transmission de l'influx nerveux.
- **Les oligodendrocytes** dont la principale fonction est la formation de la gaine de myéline entourant les axones du SNC.
- **Les astrocytes** qui sont des cellules de forme étoilée qui assurent la protection des neurones. Principalement, elles régulent le flux sanguin, elles participent au métabolisme énergétique du SNC et elles participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique.

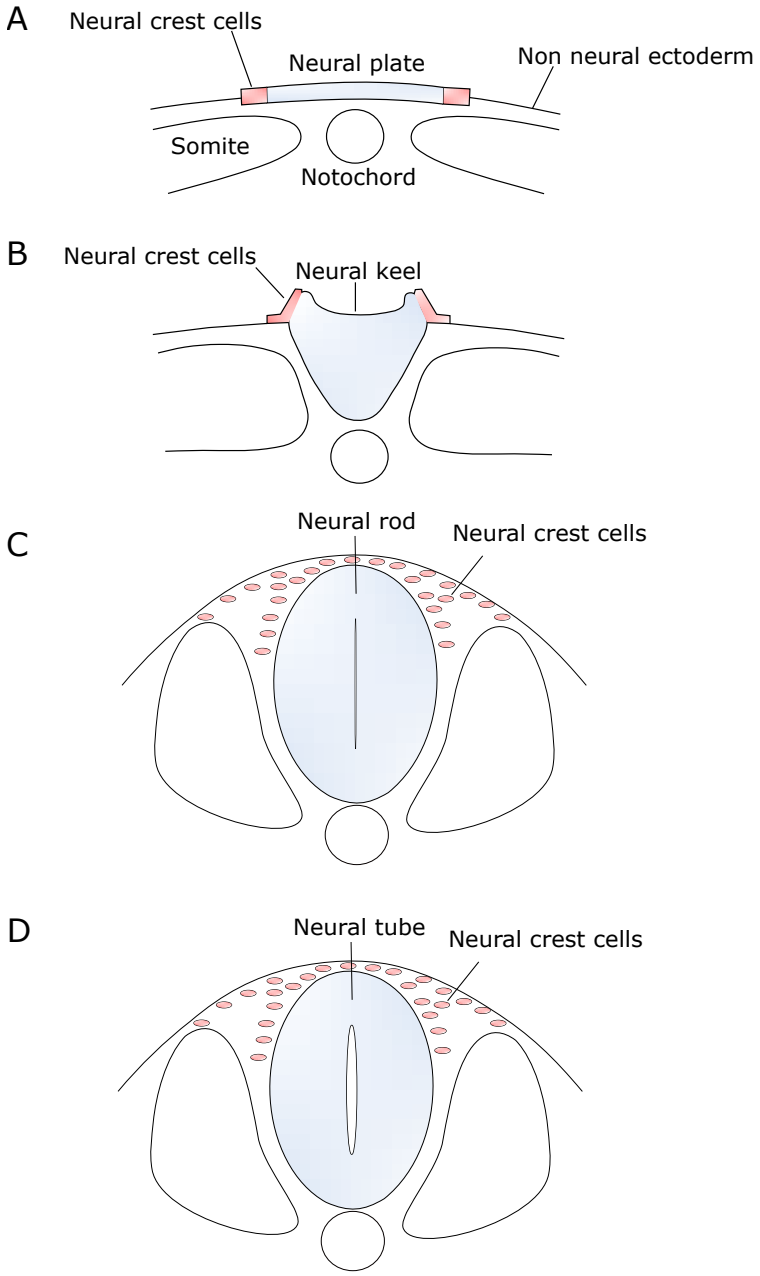


FIGURE I.3.5. – Les étapes majeures de la neurulation. Source : Adapté de [55].

Les premiers mouvements de l'embryon sont visibles à partir de 17 hpf. Ce sont des contractions involontaires de la queue qui sont contrôlées par les motoneurones primaires (pour le développement des neurones primaires voir la sous-partie I.3.3.6.2) [17]. À partir du stade prim 5 (24 hpf) les parties du cerveau sont bien définies. Le SNC est régionalisé en quatre domaines majeurs selon l'axe antéro-postérieur (Figure I.3.6 A) :

- **Le prosencéphale (forebrain)** : chez le poisson zèbre adulte, le prosencéphale se développe en télencéphale et diencéphale. Le télencéphale est composé principalement du pallium, du subpallium et du bulbe olfactif. Le diencéphale est composé du thalamus, de l'hypothalamus et de la glande pinéale (Figure I.3.6 B). Cette partie du cerveau est le centre de contrôle principal du traitement de l'information sensorielle, des fonctions viscérales et des fonctions motrices volontaires.

- **Le mésencéphale (midbrain)** : les structures majeures dérivées du mésencéphale sont le tectum et le tegmentum (Figure I.3.6 B). Cette partie du cerveau assure le contrôle de la vision et de l'audition.
- **Le rhombencéphale (hindbrain)** : le rhombencéphale est séparé physiquement du mésencéphale durant le développement embryonnaire par la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale (Figure I.3.6 A). Cette frontière est transitoire, elle est absente chez le poisson zèbre adulte, elle a un rôle dans la détermination du mésencéphale et du rhombencéphale [15]. Le rhombencéphale va donner deux structures principales du cerveau adulte : le cerebellum et la medulla oblongata. Ces régions contrôlent des comportements vitaux comme la respiration ou le battement cardiaque. Au cours du développement embryonnaire, le rhombencéphale est spécifié en sept ou huit compartiments le long du tube neural, ces compartiments sont appelés les rhombomères (Figure I.3.6 A).
- **La moelle épinière** : elle permet la transmission des informations entre le cerveau et le corps.

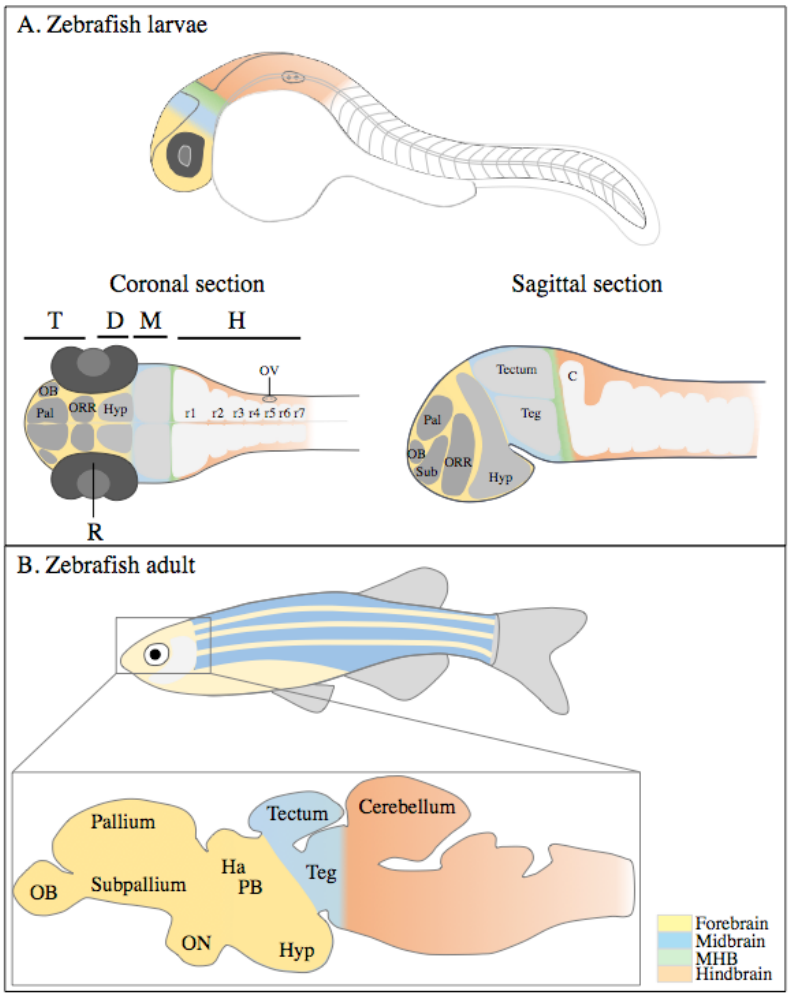


FIGURE I.3.6. – Développement du cerveau chez le poisson zèbre. (A) Représentation schématique du cerveau chez l'embryon (30 hpf) avec le forebrain (en jaune), le midbrain (en bleu), la frontière entre midbrain et hindbrain (MHB, en vert) et le hindbrain (en orange). (B) Représentation schématique du cerveau chez l'adulte. Légende : C : cerebellum ; D : diencéphale ; M : midbrain ; MHB : frontière midbrain-hindbrain ; H : hindbrain ; Ha : habenula ; Hyp : hypothalamus ; OB : bulbe olfactif ; ON : nerf optique ; ORR : région de la cavité optique OV : vésicule otique ; Pal : pallium ; PB : glande pinéale ; R : rétine ; r1–r7 : rhombomères 1 à 7 ; Sub : sub-pallium ; T : telencephale ; Teg : tegmentum. Source : [156].

I.3.2.5. La phase pharyngula

Cette phase a lieu entre 24 et 48 hpf. Au cours de cette phase, sept arcs branchiaux se développent, ils donneront les branchies et les nerfs branchiaux. Les nageoires commencent à se former. Les cellules de la pigmentation se différencient, les mélanophores commencent à s'organiser en un motif caractéristique de stries longitudinales. Le système circulatoire est mis en place. Le cœur commence à battre au début de la phase de pharyngula. Au niveau comportemental, la sensibilité tactile apparait.

I.3.2.6. L'éclosion

L'éclosion se produit lorsque les besoins en oxygène de l'embryon dépassent les capacités de diffusion de ce gaz à travers le chorion et le fluide périvitéllin [86]. Elle a lieu entre 48 hpf et 72 hpf. L'éclosion est due à deux actions combinées :

- **La libération des enzymes d'éclosion par les glandes d'éclosion.** La digestion du chorion est effectuée grâce aux enzymes d'éclosion (he1.1, he1.2 et he1.3 chez le poisson zèbre). Ces enzymes sont libérées par les glandes d'éclosion. Les ébauches des glandes d'éclosion apparaissent à la fin du stade gastrula. Elles sont fonctionnelles lorsque la circulation sanguine est mise en place. Une fois que les embryons ont éclos ces glandes dégénèrent et disparaissent.
- **La déchirure mécanique du chorion par les embryons.** Les mouvements de l'embryon s'intensifient avant l'éclosion, ce qui permet une déchirure mécanique du chorion. De plus, les mouvements de l'embryon permettent d'accélérer la distribution des enzymes d'éclosion au sein de l'espace périvitellin.

Durant la période d'éclosion, l'embryon continue sa croissance. Le développement des intestins a lieu durant cette période. Le développement des nageoires continue. La morphogénèse de la mâchoire et de la bouche commence à ce stade et se poursuit jusqu'au début de la période larvaire. Néanmoins, la morphogenèse des principaux organes est complète.

I.3.2.7. La période larvaire

Une fois que l'éclosion a eu lieu, la période larvaire débute, elle dure environ un mois. La morphogénèse est complète, il s'agit de la dernière phase du développement. C'est une phase de croissance. À 72 hpf, le système visuel est fonctionnel mais immature. La respiration est cutanée à 72 hpf puis la respiration branchiale prend le relais jusqu'à devenir mature à 21 jours post-fécondation (jpf). La vessie natatoire se gonfle à 4 jpf. La bouche s'ouvre à 5 jpf. Le développement de la pigmentation se poursuit. Les larves commencent à nager activement ce qui induit l'apparition de comportements de fuite et de prédation. Les larves de poisson zèbre sont sensibles à diverses modalités de stimulation, comme le toucher, l'audition, la chaleur et la vision. À partir de 4 jpf, les larves exposées à une alternance de stimuli lumineux et obscurs ont un comportement d'augmentation de l'activité locomotrice dans l'obscurité suivi d'un état de repos à la lumière [7]. L'augmentation de l'activité locomotrice lors de la transition lumière-obscurité est due à une augmentation du stress chez les larves. Ces activités locomotrices dépendent de l'intégrité des fonctions cérébrales, du développement du système nerveux et des muscles. Ce comportement est utilisé pour réaliser des tests comportementaux.

I.3.3. Les grandes voies de signalisation du développement

Le développement embryonnaire dépend de processus moléculaires et cellulaires complexes qui confèrent aux cellules embryonnaires leur identité. Différentes voies de signalisation participent à ce processus. Une voie de signalisation est une succession d'étapes impliquant plusieurs molécules dans une cellule ou à sa surface qui fonctionnent

ensemble pour contrôler la différenciation ou les fonctions cellulaires. Une première molécule d'une voie de signalisation reçoit un signal, elle active une autre molécule, ce processus est répété jusqu'à ce que la dernière molécule soit activée et la fonction cellulaire réalisée. Généralement, ces voies aboutissent à l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription. Un facteur de transcription est une protéine se liant sur le promoteur des gènes et régulant leur transcription. Ainsi, une activation ou une interruption anormale des voies de signalisation peut conduire à des dysfonctionnements cellulaires. Au cours du développement, plusieurs voies de signalisation interviennent. Dans cette section, nous allons présenter les principales voies de signalisation du développement.

I.3.3.1. La voie Wnt/β-caténine

Cette voie de signalisation est très conservée entre les espèces et contrôle un grand nombre de décisions cellulaires au cours du développement et au cours de la vie adulte. Quand la voie de Wnt/β-caténine est inactive, la β-caténine se lie à des protéines d'adhérence, **les cadhérines** qui sont situées au niveau des jonctions cellulaires et l'excès de β-caténine est dégradé (Figure I.3.7). La voie de Wnt/β-caténine est activée par la liaison d'un ligand de la famille Wnt à son récepteur (Frizzled) (Figure I.3.7). L'activation de cette cascade moléculaire, conduit à la stabilisation et à l'accumulation de β-caténine, ce qui lui permet de se lier aux **facteurs de transcription de la famille LEF/TCF** et de stimuler la transcription de leurs gènes cibles (Figure I.3.7).

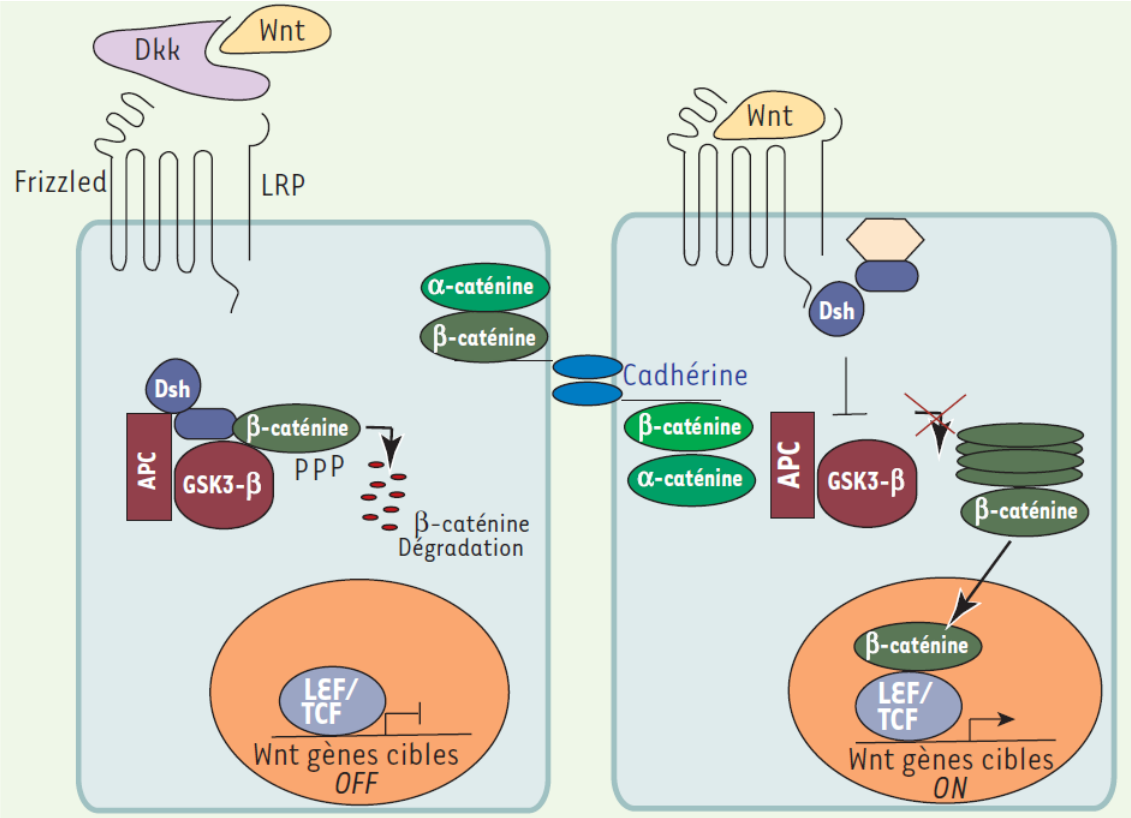


FIGURE I.3.7. – Schéma de la régulation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Source : [14].

Chez l'embryon de poisson zèbre, la β-caténine s'accumule dans les blastomères de la marge dorsale au stade 128 cellules [140]. Cette localisation asymétrique est un marqueur précoce de l'axe dorso-ventral. Ainsi, la β-caténine maternelle entre en jeu dans l'établissement de l'axe dorso-ventral. Après la transition mi-blastuléenne, β-caténine active l'expression de gènes zygotiques comme *Chordin* (qui est un inhibiteur des BMPs, voir sous-section I.3.3.3) ou les FGFs (voir sous-section I.3.3.4). Ainsi, les cibles de β-caténine agissent en inhibant les facteurs de ventralisation.

I.3.3.2. La voie Notch

La voie de signalisation Notch est essentielle au cours du développement des vertébrés et des invertébrés. Cette voie a un rôle dans la différenciation, les interactions entre cellules et dans l'apoptose. L'activation du récepteur transmembranaire Notch est déclenchée par l'interaction avec son ligand transmembranaire (Delta) présenté par une cellule voisine. Notch subit ensuite deux coupures protéolytiques successives (Figure I.3.8). Une fois activé le domaine intracellulaire du récepteur (NICD) sera transloqué jusqu'au noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription en association avec d'autres protéines (Figure I.3.8). Ce complexe permet la transcription de gènes cibles de la famille *hes* (« hairy enhancer of split ») ou *her* (« hes related protein ») qui sont des facteurs de transcription de la famille bHLH (« basic helix-loop-helix »). Ces facteurs de transcription de la famille Hes et Her sont connus pour être des répresseurs transcriptionnels. Ils sont notamment connus pour inhiber les gènes de la neurogenèse tels que *ascl* et *neurog*, ce qui permet la régulation des cellules indifférenciées et donc la maintenance d'un pool de progéniteurs indiférenciés [90]. Lors de la neurogenèse chez les vertébrés, la voie de Notch agit par **inhibition latérale**. Au départ, des cellules voisines de la plaque neurale expriment les gènes *Delta* et *Notch*. Puis une de ces cellules exprime davantage *Delta*. Cette cellule se différencie en neuroblaste et inhibe l'orientation des cellules voisines vers une destinée neuronale en activant la voie Notch chez les cellules adjacentes. Une boucle de rétroaction de Notch est alors mise en place dans les cellules adjacentes au neuroblaste afin de réprimer l'expression de gènes proneuraux *via* les facteurs de transcription de la famille Hes et Her.

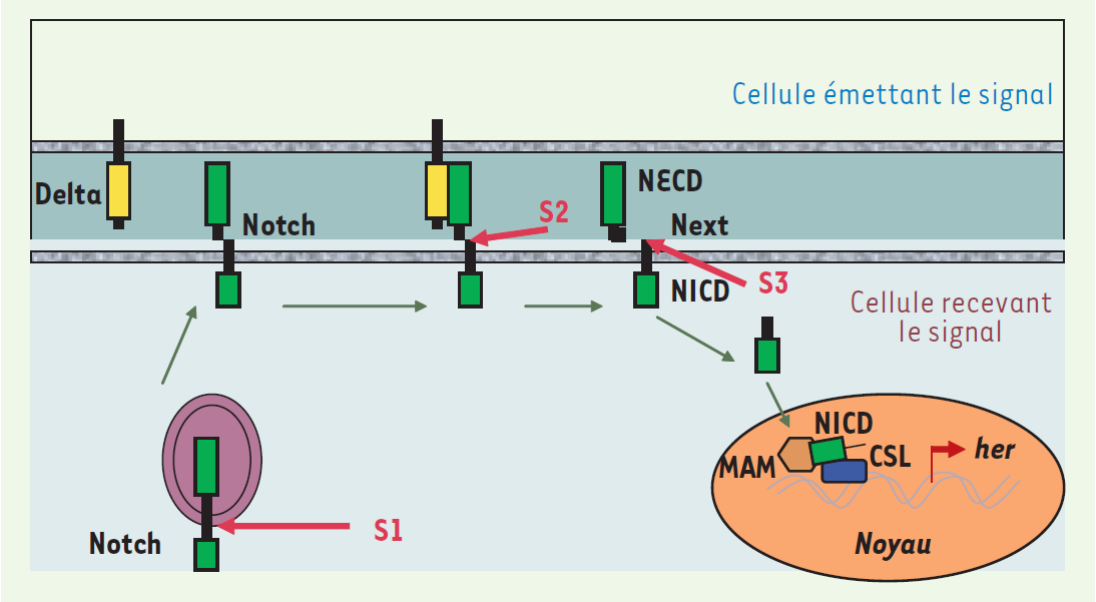


FIGURE I.3.8. – Shéma de la voie de signalisation Delta/Notch. La protéine Notch subit un premier clivage (S1). Après l'intéraction avec son ligand Delta, la protéine Notch subit un second clivage (S2). Le domaine extracellulaire (NECD) de Notch est relargué. Le fragment restant du domaine extracellulaire devient le substrat du complexe γ-sécrétase (S3). Ainsi, le fragment intracellulaire (NICD) est libéré. NICD migre dans le noyau et forme un complexe activateur de la transcription avec d'autres protéines (CSL et MAM). Les cibles de ce complexe activateur sont les gènes de la famille *hes/hey*. Source : [16].

I.3.3.3. La superfamille des TGFβ

Chez le poisson zèbre, la mise en place des axes embryonnaires (dorso-ventral et antéro-postérieur) a lieu au cours de la phase blastula. Les cellules vont acquérir une identité propre en fonction de leurs coordonnées spatiales dans l'embryon. Deux gradients de molécules appartenant à la superfamille des TGFβ permettent de définir ces coordonnées :

- Les **BMPs** (« Bone Morphogenic Proteins ») pour l'axe dorso-ventral.
- Les facteurs **Activine et Nodal** pour l'axe antéro-postérieur.

Pour que le développement embryonnaire se déroule normalement, ces gradients d'activité doivent être **finement régulés** [29]. Les BMPs sont régulées au niveau de leur expression par une protéine de la famille des **FGF** (FGF8) (Figure I.3.9). Les BMPs sont aussi régulées par les protéines **Noggin et Chordin** qui en se fixant sur les BMPs les empêchent de stimuler leur récepteur BMPR (Figure I.3.9).

Les facteurs Activine et Nodal, sont régulés au niveau de leur activité par **Antivin** qui fait partie de la superfamille des TGFβ. Antivin agit comme inhibiteur compétitif de la fixation d'Activine et de Nodal sur leur récepteur ActR (Figure I.3.9).

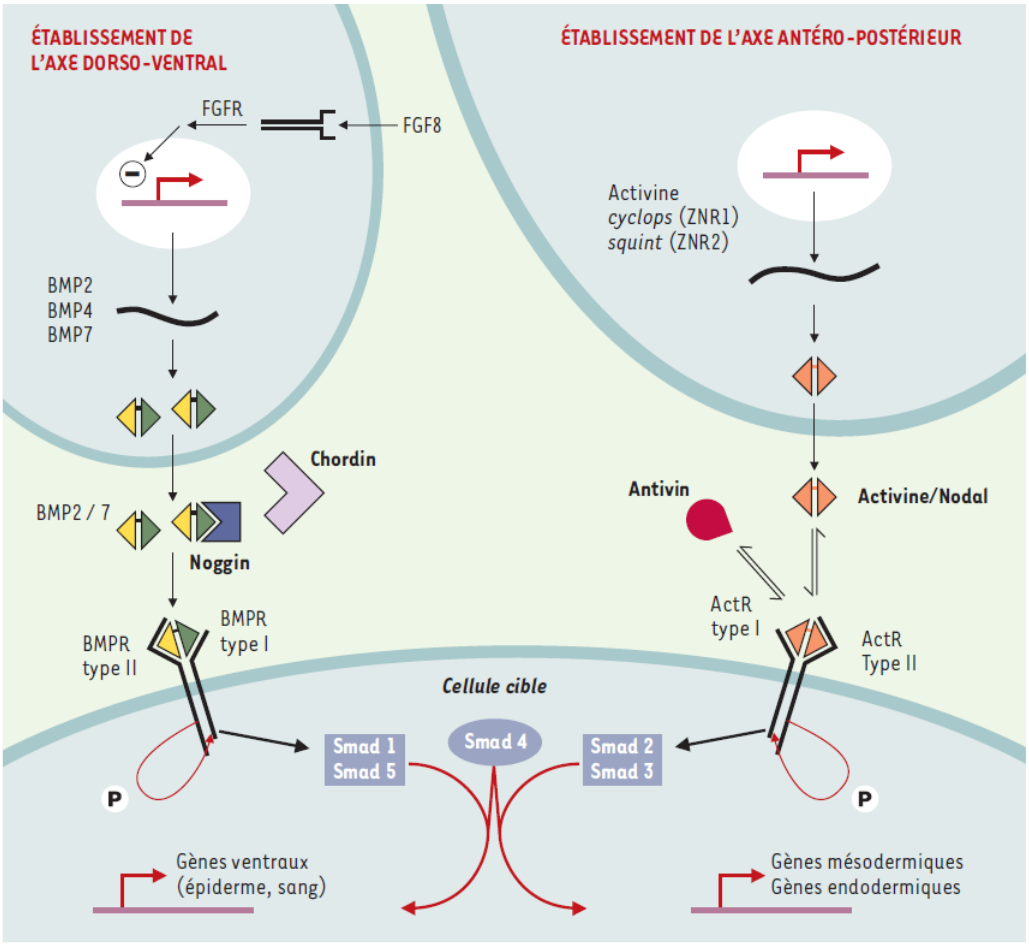


FIGURE I.3.9. – Schéma de la régulation des voies de signalisation responsables de la mise en place des axes embryonnaires. Source : [149].

Des études développementales ont permis de montrer que les facteurs BMPs confèrent aux cellules qu'ils stimulent une identité ventrale [114]. Ainsi, en modifiant la dose de BMP reçue par les cellules, il est possible de manipuler l'axe dorso-ventral en induisant une dorsalisation ou une ventralisation de l'embryon [85]. D'autres études ont montré que le patron embryonnaire suivant l'axe antéro-postérieur est obtenu suivant l'établissement d'un gradient d'activité d'Activine et de Nodal. Ce gradient, décrois progressivement en direction du pôle animal [150]. Il a été mis en évidence que certains éléments sont communs aux deux voies de signalisation BMP et Activine/Nodal [20]. En effet, Smad4 forme un complexe actif par hétérodimérisation avec les protéines Smad1 et Smad5 (qui sont activées par la voie BMP) ou avec les protéines Smad2 et Smad3 (qui sont activées par la voie Activine/Nodal) (Figure I.3.9).

I.3.3.4. La famille des FGFs

La famille des FGFs (« Fibroblast Growth Factors »), est constituée de neuf membres (FGF1 à FGF9). La voie de signalisation des FGFs a un rôle essentiel au niveau de la croissance et de la différenciation des cellules. Les FGFs agissent sur les cellules cibles *via* les récepteurs tyrosine kinases. La dimérisation de ces récepteurs conduit au recrutement

et à l'activation d'effecteurs comme PKC ou la cascade MAPK. Durant le développement précoce, le contrôle de l'expression des gènes des BMPs est effectué par les FGFs, en particulier par FGF8. Chez le poisson zèbre, ce gène est exprimé de façon précoce au niveau de la marge de la blastula, puis sous la forme d'un gradient dorso-ventral dans la région marginale de la gastrula. Il a été montré que la dorsalisation induite par FGF8 est associée à une inhibition des facteurs ventralisants BMP2 et BMP4 au stade blastula [48]. Ainsi, FGF8 est impliquée dans la mise en place de l'axe dorso-ventral. Au cours du développement plus tardif, les FGFs ont un rôle dans le développement des structures postérieures. La superfamille des TGFβ et la famille des FGFs fonctionnent conjointement afin d'établir le patron d'organisation des embryons de poisson zèbre.

I.3.3.5. La voie de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est un dérivé de **la vitamine A**. Il provient de l'alimentation car il ne peut être synthétisé *de novo* dans l'organisme. La vitamine A est convertie par plusieurs réactions enzymatiques. **Le rétinol** est oxydé en **rétinal** par des enzymes de la famille des ADHs et SDRs (« Alcohol dehydrogenases » et « Short-chain dehydrogenases/reductases ») (Figure I.3.10). Le rétinal est ensuite oxydé en **acide rétinoïque** (AR) par les enzymes de la famille des RALDH (« Retinaldehyde dehydrogenases ») (Figure I.3.10). Les composés rétinoïques sont de petite taille et hydrophobes ce qui leur permet de traverser les bicouches lipidiques membranaires. Dans le cytoplasme les rétinoïdes sont pris en charge par les protéines CRBP (« Cellular Retinol Binding Protein ») et par CRABP (« Cellular Retinoic Acid Binding Protein ») (Figure I.3.10). Ces protéines stockent les rétinoïdes ou facilitent leur présentation aux enzymes. CRABP2 permet à l'AR de pénétrer dans le noyau et de se lier à un complexe de transcription composé d'un hétérodimère RAR-RXR (RAR : « Retinoic Acid Receptor », RXR : « Retinoic X Receptor »). L'hétérodimère se lie à des séquences RARE (« Retinoic acid-response element ») présentes sur l'ADN. Plus de 500 gènes répondent à l'AR [101]. Concernant le catabolisme de l'AR, il est dégradé en dérivés oxydés comme l'acide 4-oxorétinoïque ou 4-hydroxyrétinoïque sous l'action des enzymes de la famille des cytochromes p450, les CYP26.

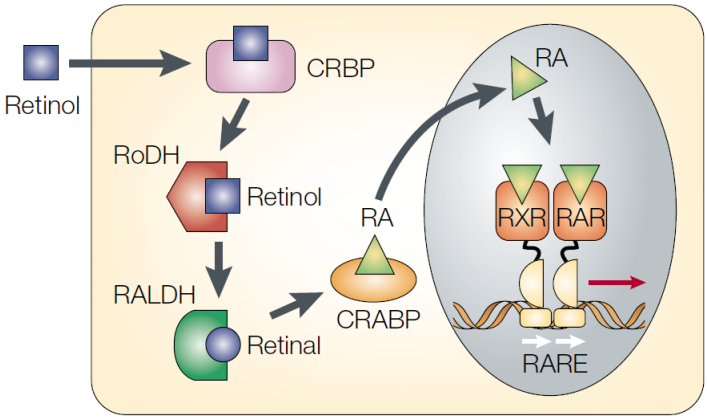


FIGURE I.3.10. – Mécanismes d'action des rétinoïdes. Source : [100].

L'AR est impliqué dans de nombreux processus développementaux, notamment dans la spécification de l'axe antéro-postérieur de l'embryon et dans le développement de

nombreux organes dérivés. Il fournit différentes identités cellulaires selon sa concentration locale et en activant des gènes homéotiques (comme les gènes *hox*). L'AR comme d'autres molécules décrites ci-dessus, est réparti sous la forme d'un gradient qui est régulé par les enzymes du métabolisme et du catabolisme de l'AR.

I.3.3.6. Exemples de processus développementaux

Nous allons voir quelques processus développementaux dans lesquels les voies de signalisation présentées ci-dessus sont impliquées et plus particulièrement la voie de l'AR qui est importante pour notre étude.

I.3.3.6.1. Le développement du cerveau postérieur

l'AR est impliqué dans la mise en place du SNC chez les vertébrés. En fonction de sa concentration, l'AR spécifie les différentes régions du cerveau postérieur, **les rhombomères** [134]. Chaque rhombomère va adopter une identité unique à travers différentes combinaisons de l'expression de facteurs de transcription, dont les gènes *hox* (Figure I.3.11).

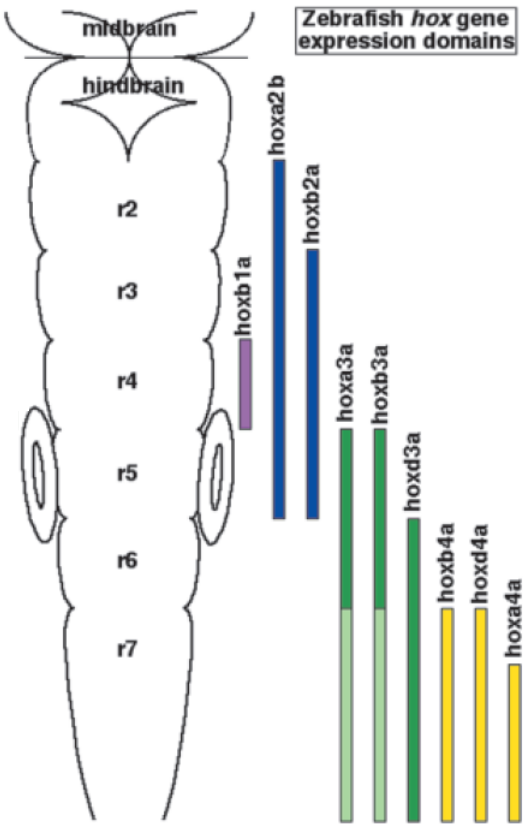


FIGURE I.3.11. – Domaine d'expression des gènes *hox* chez le poisson zèbre. Source : [110].

Ces gènes sont appelés **des gènes homéotiques**, c'est à dire qu'ils sont responsables du plan d'organisation des êtres vivants. Ce sont des facteurs de transcription qui confèrent une identité régionale le long de l'axe antéro-postérieur chez tous les animaux bilatéraux. Les gènes *hox* sont présents dans le gènome sous forme de cluster : 4 clusters chez la plupart des mammifères et 7 chez les téléostéens [65]. Au cours du développement du cerveau postérieur, l'expression des gènes *hox* est régulée par l'AR. Ainsi, une altération de la voie de l'AR au cours de ce processus conduit à des modifications au niveau des rhombomères [100]. Une forte concentration d'AR induit une postériorisation tandis qu'une concentration plus faible d'AR induit une antériorisation des rhombomères. L'AR doit donc être finement régulé. L'action de l'AR dans la mise en place du cerveau postérieur dépend aussi d'autres voies de signalisation comme la voie des FGFs (voir sous-section I.3.3.4) qui permet de définir la frontière entre le cerveau postérieur et le cerveau moyen (« midbrain-hindbrain boundary ») [117] ou la voie des Wnt qui est impliquée dans la régulation de cyp26a1 et donc dans le contrôle du gradient d'AR [117]. Le gradient d'AR permet l'expression différentielle des gènes *hox* et la segmentation en rhombomères qui sont essentielles pour la spécification, l'organisation et la migration des différentes populations neuronales.

I.3.3.6.2. La spécification neuronale

L'AR est aussi impliqué dans la spécification neuronale dans le tube neural [100]. Au niveau de l'axe dorso-ventral dans le tube neural en développement, l'AR est synthétisé par les somites. SHH (Sonic Hedgehog) est exprimé du coté ventral, les BMPs sont exprimées du coté dorsal et les FGFs sont exprimées à l'extrémité postérieure du tube neural [101]. Les premiers neurones à se mettre en place chez les embryons de poissons et d'amphibiens sont les neurones primaires. Ils coordonnent les premiers mouvements de l'embryon et sont donc cruciaux pour leur survie. Chez le poisson zèbre, ces premiers mouvements peuvent être mesurés à l'aide d'un test comportemental appelé test d'activité. Les neurones primaires vont être spécifiés à l'aide du gradient établi par les molécules citées ci-dessus en motoneurones, interneurones et neurones sensoriels (Figure I.3.12).

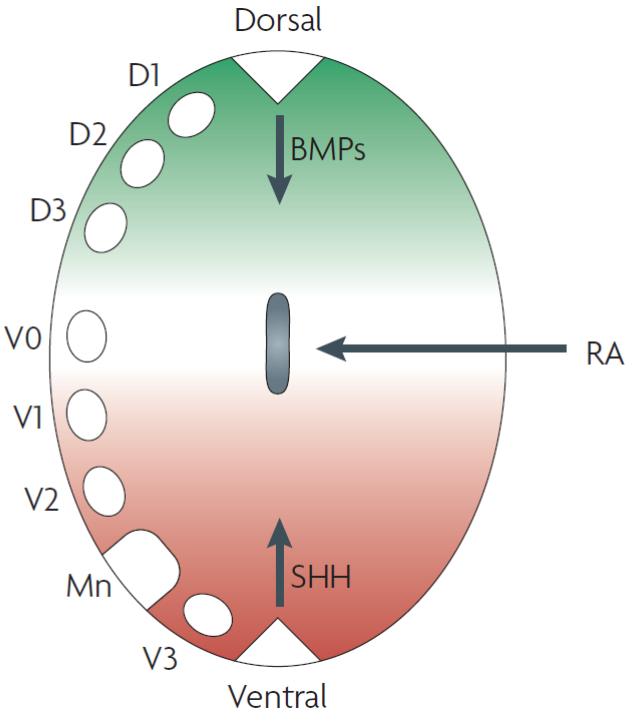


FIGURE I.3.12. – Influence de l'AR sur la spécification neuronale dans le tube neural de l'embryon. D : Dorsal, V : Ventral, Mn : Motoneurones. Source : [101].

L'AR régule le nombre de neurones primaires qui se développent [101]. Ainsi, un excès d'AR mène à une plus grande quantité de neurones primaires. Une diminution d'AR conduit à une diminution du nombre de neurones primaires. L'AR et SHH ont au cours de ce processus des actions antagonistes. En effet, une surexpression de SHH entraine la supression des neurones primaires au profit d'une expension de la plaque neurale [101]. Ainsi, les concentrations en AR et SHH doivent être finement régulées afin de générer le nombre correct de neurones primaires.

I.3.3.6.3. La somitogénèse

La somitogénèse correspond à la formation des somites, ce sont des unités mésodermiques symétriques le long de l'axe antéro-postérieur. La somitogénèse est un processus rythmique et séquentiel. Les somites sont des structures transitoires qui vont mener à la formation des muscles, des os du squelette axial et du dermatome. Les étapes de formation des somites sont équivalentes chez tous les vertébrés. Le nombre total de somites et le temps nécessaire à leur formation sont constants et caractéristiques d'une espèce donnée (autour de 30 minutes pour le poisson zèbre) [115]. Le mésoderme présomitique est un tissu polarisé qui est composé dans sa partie postérieure de progéniteurs mésodermaux immatures et dans sa partie antérieure de cellules matures. Cette polarité est déterminée par des gradients de facteurs de signalisation qui régulent la différenciation du mésoderme. Le mécanisme de segmentation des somites est régulé par une **horloge moléculaire** qui régule la périodicité temporelle du processus et par un **front de détermination** qui régule la périodicité spatiale du processus [26]. L'horloge moléculaire est caractérisée par :

- Une onde progressive d'expression génique qui se déplace vers la partie antérieure du mésoderme présomitique.
- Le ralentissement de l'onde d'expression génique vers la partie antérieure et son arrêt à une position qui préfigure les somites.
- La répétition de ce processus à la formation de chaque nouvelle paire de somite.

Les cellules à différentes positions le long de l'axe antéro-postérieur du mésoderme présomitique sont à des phases différentes du cycle d'oscillation de l'expression des gènes [133]. L'horloge moléculaire de segmentation est un réseau génique complexe. Ce réseau comprend des gènes qui codent pour des protéines qui sont impliquées dans les voies de signalisation de Notch, FGF et Wnt (Figure I.3.13). De plus, les gènes de la famille Hes/Her (« Hairy and enhancer of split/hairy related ») sont aussi exprimés de façon cyclique lors de la somitogénèse. On parle **d'oscillateurs transcriptionnels** [115]. La voie de l'AR est impliquée dans le processus du front de détermination (Figure I.3.13). Le front de détermination est déterminé à la frontière entre deux gradients opposés : le gradient postéro-antérieur de FGF et Wnt et le gradient antéro-postérieur de l'AR (Figure I.3.13). Le signal FGF dans la partie postérieure permet aux cellules de conserver leurs propriétés souches tandis que l'AR dans la partie antérieure conduit à la différenciation des cellules [56].

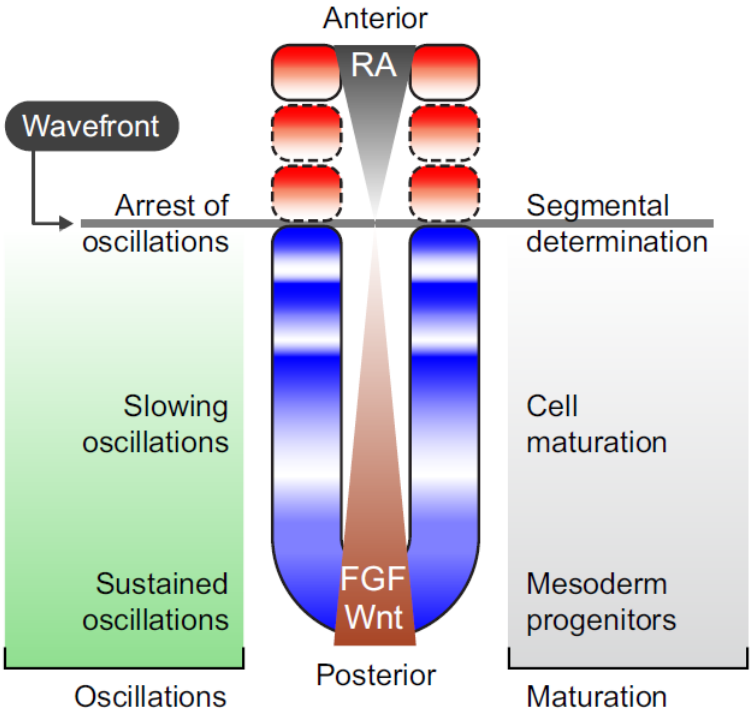


FIGURE I.3.13. – Mécanisme de segmentation des somites. Un gradient de FGF et Wnt provient du tissu postérieur. Un grandient opposé d'AR provient des somites nouvellement formés. Le front de détermination est représenté par une ligne horizontale. Source : [115].

Dans la partie dorsale des somites appelé le dermomyotome, se trouvent les cellules progénitrices qui contribuent à la formation des muscles du tronc et des membres. Ces

cellules peuvent s'engager à tout moment dans un processus de myogenèse afin de former du muscle. Les cellules qui s'engagent dans ce processus sont des cellules exprimant Pax3 qui est un facteur de transcription à homéoboite (comme les facteurs de transcription Hox). Les cellules progénitrices qui entrent dans le processus de myogenèse expriment des facteurs de régulation myogéniques : MyoD, Myf5, Mrf4 et myogénine, ils sont essentiels pour la différenciation et la détermination musculaire [105]. La voie de Notch est impliquée dans la régulation de l'entrée des cellules progénitrices dans ce programme de différenciation. Elle inhibe aussi la différenciation myogénique et permet le maintien de cellules progénitrices dans un état indifférencié, ce qui est aussi le cas dans le processus de neurogenèse.

I.3.4. Effets des rayonnements ionisants sur les organismes

Les systèmes aquatiques sont les récepteurs finaux de nombreux polluants, notamment des radionucléides. En effet, la majorité des installations nucléaires sont connectées aux rivières ou aux mers et océans. Les principaux éléments rejetés par les installations nucléaires sont le césium 137, le cobalt 60, le manganèse 54 et le tritium. La désintégration des trois premiers éléments conduit à l'émission de rayonnement γ, qui comme on l'a vu précédemment, est le rayonnement le plus pénétrant par rapport aux rayonnements α et β. Dans cette partie, nous allons nous concentrer sur les effets d'une exposition aux RI (γ ou X) sur les vertébrés. Dans la littérature, peu d'études portent sur les effets d'une irradiation chronique, une majorité des études traitent de l'effet d'une irradiation aiguë dans un contexte médical. Dans la base de donnée FRED (FASSET Radiation Effects Database), 118 références décrivent les effets d'une irradiation aiguë tandis que 34 références décrivent les effets d'une irradiation chronique [131]. Dans le cadre d'une étude écotoxicologique, il semble plus pertinent d'étudier les effets d'une irradiation chronique qui mime une contamination à long terme de l'environnement.

I.3.4.1. Effets sur le développement

Le développement embryonnaire est une période critique où la sensibilité aux perturbations chimiques et physiques est accrue en raison de la multiplication des cellules. Un effet sur le développement des individus peut avoir un impact déterminant sur toute la population. C'est pour cela qu'il est crucial de déterminer quels sont les effets des RI au cours du développement. Comme expliqué précédemment, la majorité des données de la littérature sont issues d'expositions aiguës de rongeurs, dans ce paragraphe des études portant uniquement sur le poisson zèbre ont été sélectionnées.

Après une exposition aiguë sur des embryons de poisson zèbre à 26 hpf avec des doses allant de 1 Gy à 10 Gy, l'étude de Freeman montre qu'il n'y a pas de modification de la mortalité ou de l'éclosion [45]. En revanche, une diminution de la taille des larves est observée à 10 Gy. Une modification de la fréquence cardiaque est observée à toutes les doses avec une augmentation à 1, 2 et 5 Gy et une diminution à 10 Gy. L'étude de Praveen Kumar montre qu'après une irradiation aiguë à 3 hpf à des doses allant de 1 à 10 Gy, il y a une augmentation de la mortalité embryonnaire à 120 hpf pour toutes les doses [130]. Des déformations ainsi qu'une diminution du taux d'éclosion ont aussi été

relevées pour toutes les doses. Dans cette étude, un effet sur la mortalité et sur l'éclosion est détecté [130] ce qui est en désaccord avec l'étude précédente qui aux mêmes doses ne montre pas d'effet sur ces paramètres [45]. La différence entre ces deux études est le stade de développement auquel les embryons ont été irradiés. En effet, dans la première étude les embryons sont irradiés à 26 hpf [45] tandis que dans la seconde étude les embryons sont irradiés de façon précoce à 3 hpf [130]. Ceci suggère qu'une irradiation précoce a plus d'effets délétères au cours du développement qu'une irradiation plus tardive.

Une autre étude a comparé les effets d'une irradiation chronique et d'une irradiation aiguë sur les embryons de poisson zèbre [123]. Dans le cadre de l'irradiation chronique, les embryons ont été exposés à partir de 3 hpf à des débits de doses de 0,42 mGy/h et de 42 mGy/h. Aucun effet sur la mortalité et aucun défaut morphologique n'ont été détectés. Cependant, une accélération du processus d'éclosion a été mise en évidence. Dans le cadre de l'exposition aiguë, des embryons de 3 hpf ont été exposés à des doses de 0,3 Gy, 1 Gy et 2 Gy. Une diminution du succès d'éclosion est détectée, ainsi qu'un ralentissement de l'éclosion. De plus, à 2 Gy des malformations sont détectées. Une diminution de la taille des larves est observée avec l'augmentation de la dose. Ainsi, dans cette étude les dommages induits par une irradiation chronique semblent avoir moins d'impacts immédiats sur le développement embryonnaire que les dommages induits par une irradiation aiguë. Mais, les effets à long terme des deux types d'irradiations ne sont pas étudiés et l'étude ne permet pas d'établir les causes moléculaires des dommages développementaux observés. Une étude de notre laboratoire, montre qu'après une irradiation chronique d'embryons de poisson zèbre à 3 hpf à des débits de doses de 0,03 et 23,75 mGy/h une accélération de l'éclosion est détectée, ainsi que des dommages aux fibres musculaires [50]. Une autre étude montre qu'après une irradiation du stade 256 cellules (2,5 hpf) jusqu'au stade gastrula (5,5 hpf) à différents débit de doses (0,4 ; 3,9 ; 15 et 38 mGy/h), un effet sur la survie des embryons a été détecté à 38 mGy/h et des malformations ont été détectées à tous les débits de dose [64]. L'observation de mortalité à 38 mGy/h et de malformations à tous les débits de dose est en contradiction avec les résultats obtenus dans les deux études précédentes [123, 50] qui n'observent ni mortalité, ni malformation, pourtant les débits de doses utilisés sont similaires et l'irradiation débute de façon précoce dans ces trois études. Néanmoins, on peut noter une différence au niveau de la source d'irradiation utilisée. En effet, les deux études précédentes [123, 50] ont été effectuées à l'IRSN et utilisent une source de césium 137 tandis que l'autre étude [64] a été réalisée avec une source de cobalt 60. Pour un même flux d'énergie, l'énergie par particule est différente selon le type de source et donc l'impact sur le tissu biologique est potentiellement différent. Pour compléter les résultats obtenus, une étude moléculaire plus poussée a été effectuée par cette équipe [64] avec une analyse de RNA-seq aux débits de doses de 0,54 ; 5,4 et 10,9 mGy/h, ainsi des voies importantes du développement semblent impactées par les RI. À 0,54 et 10,9 mGy/h un impact sur les voies de Notch et de l'AR est montré.

Pour résumer, les effets phénotypiques ont été beaucoup étudiés contrairement aux effets moléculaires. C'est pour cette raison qu'il est intéressant d'étudier les effets moléculaires des RI afin de mieux comprendre l'impact qu'ils peuvent avoir sur le phénotype. De plus, ces effets moléculaires plus fins pourraient être détectés à de plus faible débits de doses et ainsi permettre de prévoir l'apparition d'un phénotype en fonction des voies moléculaires impactées. Cette synthèse a aussi permis de mettre en évidence que les effets phénotypiques étudiés sont parfois en contradiction entre les

études en fonction du protocole d'exposition choisi.

I.3.4.2. Effets sur le système nerveux central

Le SNC en développement est l'un des organes les plus sensibles aux RI. L'analyse de la taille du cerveau, est une méthode classique utilisée en toxicologie afin de voir les effets d'un perturbateur chimique ou physique sur le cerveau. La taille du cerveau a des implications importantes sur les capacités cognitives [35]. Une étude de terrain a été réalisée sur les oiseaux vivant à proximité du réacteur de Tchernobyl [112]. Les oiseaux vivant dans les zones avec les plus forts taux d'irradiations ont des plus petits cerveaux que les autres. De plus, certaines espèces d'oiseaux semblent plus susceptibles aux effets des RI. Une autre étude de terrain réalisée sur les macaques japonais a permis de comparer la taille et la masse de fœtus avant et après l'accident de Fukushima [60]. La masse totale et la taille de la tête sont inférieurs chez les fœtus conçus après l'accident de Fukushima en comparaison aux données acquises sur les fœtus conçus avant l'accident. Ce retard de croissance ne peut être expliqué par une détérioration de l'état nutritionnel des mères car aucune modification de l'indice de masse grasse n'a été relevé. Une autre équipe a irradié aux rayons X des souris gestantes d'embryons au stade E11 à des doses allant de 0,1 Gy à 1 Gy [158]. Des tests comportementaux ainsi que des mesures du volume du cerveau ont été réalisés sur ces embryons devenus adultes. Une microcéphalie (réduction du volume du cerveau) a été détectée à partir de 0,33 Gy. Les tests comportementaux ont montré qu'une dose de 0,1 Gy altère la sociabilité et les performances spacio-cognitives. Une dose de 1 Gy altère aussi la sociabilité mais a des effets supplémentaires comme la modification de la réponse à l'anxiété et l'altération de la mémoire sociale. Ces trois études [112, 60, 158] montrent qu'il y a un impact des RI sur la taille du cerveau et la dernière étude [158] montre que cette diminution de la taille du cerveau a des effets sur le comportement.

Une étude épidémiologique a montré que le risque de déclin cognitif est plus élevé dans le cas d'une exposition aux rayonnements *in utero* ou dans l'enfance [44] ce qui est cohérent avec une susceptibilité plus accrue des stades développementaux. Le déclin cognitif observé, pourrait être en lien avec l'effet des RI sur la migration neuronale [49]. Une autre étude a montré qu'une irradiation du cerveau à 5 Gy (rayons X) chez des souris de 21 jours induit un impact au niveau de la neurogenèse dans la zone subgranulaire qui est associée avec des déficits de la mémoire [135]. Après une irradiation γ, une analyse moléculaire des cerveaux de souris a été effectuée par puce à ARN [162]. L'irradiation à 0,1 Gy induit une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les fonctions protectrices et réparatrices et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'activité neuronale. Ces études [49, 135, 162] montrent un effet des RI sur la neurogenèse et potentielment sur l'activité neuronale. Ce qui pourrait conduire aux effets comportementaux décrit dans d'autres études [158, 44].

Quelques études chez le poisson zèbre traitent de l'effet des RI sur le SNC. Une étude a mis en évidence des microcephalies après une irradiation aiguë à 10 et 20 Gy chez le poisson zèbre [54]. Ce qui est cohérent avec les résultats obtenus chez d'autres espèces. Une autre étude montre qu'après une irradiation aiguë d'embryons de poisson zèbre à 6 hpf, des cellules en apoptose sont détectées dans le SNC à partir d'une exposition à 0,5 Gy [13]. Ce qui pourrait conduire à la microcéphalie observée dans l'étude précedente [54]. À l'échelle moléculaire, une étude a montré une modification de l'expression des

gènes impliqués dans le développement du SNC après une irradiation aiguë à 5 Gy sur des embryons de poisson zèbre de 26 hpf [45]. Cet effet sur les gènes impliqués dans le développement du SNC pourrait se traduire par des effets comportementaux qu'il serait intéressant d'étudier.

I.4. Les modifications épigénétiques

I.4.1. Introduction à l'épigénétique

Les modifications épigénétiques sont des changements dans l'expression des gènes causés par des mécanismes qui n'affectent pas la séquence d'ADN et qui sont transmissibles à la descendance. L'épigénétique permet d'expliquer pourquoi un même génotype peut générer différents phénotypes [9]. Les principaux types de modifications épigénétiques sont :

- **La méthylation de l'ADN** : cette modification est décrite plus en détail au cours de ce chapitre. Il s'agit d'un mécanisme épigénétique clé qui intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la différenciation cellulaire, l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X et l'adaptation à l'environnement.
- **Les modifications des histones** : les histones forment le cœur des nucléosomes qui est l'unité de base d'organisation de la chromatine. L'extrémité N-terminale des histones est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation ou la sumoylation. Ces modifications permettent de réguler l'expression des gènes en modulant l'accessibilité à la chromatine ou en créant des sites de liaison pour des protéines. Les différentes combinaisons de ces modifications formeraient le code histone qui dicterait l'état chromatinien [27].
- **Les ARNs non codants** : ils comprennent notamment les micros-ARNs (miARNs), les ARNs interagissant avec piwi (piARNs), les ARNs interférents (siARNs) et les longs ARNs non codants (lncARNs).
  - Les miARNs sont des petits ARNs constitués de 21 à 23 nucléotides. C'est la famille de petit ARNs non codants la mieux caractérisée. Ils régulent l'expression des gènes après la transcription. L'appariement d'un miARN avec la région non traduite (3'UTR) d'un ARNm au sein du complexe ribonucléoprotéique RISC conduit à l'inhibition de la traduction ou à la dégradation de l'ARNm cible [46].
  - Les piARNs sont spécifiquement exprimés dans la lignée germinale des animaux. Ils ont pour rôle la protection du génome des cellules germinales contre les éléments transposables [46]. Les piARNs agissent en s'associant à des protéines Argonautes appelées PIWI.
  - Les siARNs régulent l'expression des gènes en provoquant la dégradation de l'ARNm [46]. Leur voie de biogenèse est bien caractérisée chez *C. elegans*, en revanche elle n'est pas connue chez les mammifères. La cible des siARNs semble être les éléments transposables comme pour les piARNs.
  - Les lncARNs sont des molécules de plus de 200 nucléotides et allant jusqu'à 100 kb. Ces lncARNs subissent des modifications post-transcriptionnelles

qui augmentent leur stabilité. Ils ont une forte spécificité tissulaire [104]. Ils semblent être impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Le lncARN XIST (« X-inactive specific transcript ») a été particulièrement étudié, il est impliqué dans l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles. XIST agit en recouvrant le chromosome X inactif [104].

I.4.2. Épigénétique et environnement

Dans les années 80, l'épidémiologiste Barker et son équipe étudient des cohortes de patients, ils démontrent une relation inverse entre le poids de naissance et la mortalité mais aussi diverses maladies chroniques. Afin d'interpréter ces résultats ils émettent l'hypothèse qu'une malnutrition maternelle ou fœtale à certaines périodes clés entrainerait chez le fœtus des adaptations qui lui permettrait de survivre. Ces adaptations entraineraient par la suite une susceptibilité accrue aux maladies chroniques de l'adulte [6, 59]. Ces études ont conduit au concept de **l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD)**. C'est une hypothèse selon laquelle les maladies chroniques à l'âge adulte ont au moins une contribution d'origine précoce au cours du développement. Dans ce cadre, l'épigénétique permet de comprendre comment l'environnement peut influer sur l'expression des gènes et ainsi modifier le programme génétique. **Le phénotype d'un organisme résulte d'interactions entre son génotype et son environnement présent et passé.** L'influence de l'environnement peut provenir de différents facteurs (Figure I.4.1) :

- **La nutrition** : les embryons exposés à la famine en Hollande en 1944-1945 au cours du développement précoce ont une plus faible méthylation du gène IGF-2 que leurs frères et sœurs [61]. Une autre étude a montré qu'une modification de la méthylation du gène IGF-2 pourrait avoir un effet sur le développement et la croissance du nouveau-né et permettrait de lier le poids de naissance et la programmation métabolique foetale avec l'obésité tardive [146].
- **Le stress** : chez des rats présentant un syndrome de stress post-traumatique après avoir été exposé à des chats, une étude a montré une augmentation de la méthylation du gène *Bdnf* dans l'hippocampe [136]. La protéine Bdnf est un facteur neurotrophique, elle contribue à la survie des neurones existants et à la différenciation de nouveaux neurones notamment dans le processus de neurogenèse chez les organismes adultes. De plus, cette protéine participe à la plasticité synaptique qui est importante pour la mémoire et l'apprentissage.
- **L'exposition à des produits toxiques** : l'exposition au 17α-éthyinylestradiol (un composant de la pilule contraceptive) chez des poissons zèbre mâles et femelles induit une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène *vitellogénine I* [147]. Vitellogénine I est une protéine impliquée dans la vitellogenèse qui est la constitution des réserves pour l'embryon. Cette modification de la méthylation de l'ADN pourrait induire une augmentation de l'expression de *vitellogénine I* même chez les mâles.
- **L'environnement familial** : une étude a montré que le comportement maternel durant les premières semaines de vie du petit chez les rats influe sur la méthylation du promoteur du gène de récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe. Ces variations du comportement maternel sont associées avec des différences individuelles

dans le comportement et la réponse au stress chez les descendants [106].

- **Les effets stochastiques** : la méthylation du loci A^{vy} chez les souris fait varier la coloration de la fourrure du marron au jaune. La distribution de la méthylation sur ce type d'allèle pourrait être dû à des facteurs environnementaux non caractérisés [33].

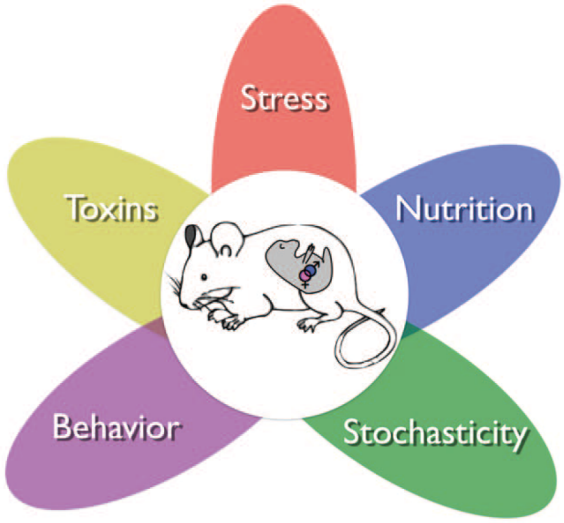


FIGURE I.4.1. – Facteurs environnementaux pouvant affecter l'embryon en développement et les cellules germinales. Chacun de ces facteurs peut agir selon différents méchanismes et entraîner des modifications des marques épigénétiques. Source : [40].

I.4.3. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la première modification épigénétique qui a été découverte et c'est aussi la modification épigénétique la plus étudiée [62]. Au cours de ce projet de thèse, la méthylation de l'ADN a été étudiée. La méthylation de l'ADN est aussi retrouvée chez les invertébrés et chez les plantes, toutefois le taux de méthylation chez les invertébrés est faible. Au cours de cette section nous allons traiter de la méthylation chez les vertébrés.

I.4.3.1. Les protéines de la méthylation de l'ADN : les DNMTs

Le processus de méthylation est catalysé par une famille de protéines appelées **les ADN méthyltransférases (DNMTs)**. Ce sont des enzymes qui catalysent le transfert de groupes méthyle d'une molécule donneuse de méthyle la S-adénosylméthionine (SAM) vers les résidus cytosines (en position C5) engendrant la libération de la molécule S-adénosylhomocystéine (SAH) (Figure I.4.2). Ainsi, la méthylation de l'ADN est une modification chimique qui ne modifie pas la séquence d'ADN.

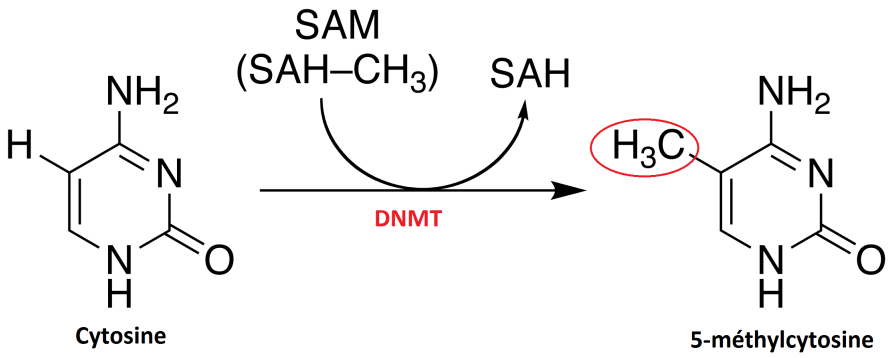


FIGURE I.4.2. – Transfert d'un groupement méthyle depuis la molécule SAM vers une cytosine. Réaction catalysée par l'enzyme DNMT.

Les DNMTs possèdent deux domaines principaux :

- Une région N-terminale qui possède les fonctions de régulation et qui interagît avec d'autres protéines et l'ADN.
- Une région C-terminale catalytique.

Les profils de méthylation de l'ADN sont établis dans les cellules germinales et embryonnaires par les **DNMTs *de novo***. Le profil de méthylation établi est perpétué de cellules en cellules par les **DMNTs de maintenance**. La méthylation *de novo*, correspond à l'ajout de groupements méthyles sur les cytosines des dinocléotides CpG situés sur les deux brins d'ADN. La méthylation de maintenance, correspond au maintien de l'état de méthylation durant la mitose. Chez les mammifères cinq isoformes de DNMTs sont connues (Figure I.4.1) :

- **DNMT1** est impliquée dans la méthylation de maintenance. Elle est recrutée par UHRF1 (qui se lie à l'ADN hémiméthylé) et par PCNA au cours de la phase S de la mitose. DNMT1 méthyle le brin nouvellement synthétisé selon le modèle du brin méthylé [38].
- **DNMT2** est impliquée dans la méthylation de l'ARN [57].
- **DNMT3a et DNMT3b** sont impliquées dans la méthylation *de novo*.
- **DNMT3L** ne possède pas de domaine catalytique, elle a un rôle de cofacteur dans la méthylation *de novo* [58].

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans ce processus de méthylation [21] :

- **La méthylation *via* les propriétés intrinsèques des DNMTs** : le modèle DNMTs *de novo* et de maintenance est remis en cause car les DNMTs *de novo* et de maintenance pouraient coopérer pour établir le patron de méthylation *de novo* [39].
- **La méthylation *via* les petits ARNs** : les piwi ARNs vont en ciblant leur séquence spécifique, entrainer le recrutement de DNMT3L et de DNMT3a, ce qui va entraîner la méthylation des CpG avoisinants. Ce mécanisme a été démontré au niveau des rétrotransposons [89].
- **La méthylation médiée par un cofacteur** : DNMT3L peut se lier à H3K4 et induire le recrutement des DNMT3a et b, ce qui induit la méthylation des dinucléotides CpG des régions d'ADN flanquant ce nucléosome [119].

- **La méthylation en fonction de l'état de la chromatine** : le statut de méthylation de l'histone H3K4 jouerait un rôle dans l'établissement de la méthylation de l'ADN. En effet, l'interaction spécifique des DNMT3 avec l'extrèmité N-terminale de l'histone H3 est inhibée par la méthylation de H3K4 [120]. Il existerait un couplage entre le code histone et la méthylation de l'ADN.

Chez le poisson zèbre, huit isoformes de DNMTs sont connus [79]. Six de ces isoformes sont impliqués dans la méthylation *de novo*. Dnmt3bb.2 et Dnmt3aa sont les principaux contributeurs pour la méthylation *de novo*. L'orthologue de DNMT3L chez le poisson zèbre n'a pas été trouvé.

Fonction	Souris	Poisson zèbre
Méthylation de maintenance	DNMT1	Dnmt1
Méthylation de l'ARN	DNMT2	Dnmt2
Méthylation *de novo*	DNMT3a	Dnmt3aa Dnmt3ab
Méthylation *de novo*	DNMT3b	Dnmt3ba Dnmt3bb.1 Dnmt3bb.2 Dnmt3bb.3
Cofacteur	DNMT3L	N/A

Tableau I.4.1. – Comparaison des isoformes de DNMTs chez la souris et le poisson zèbre. Source : d'après [79].

I.4.3.2. Les sites de méthylation de l'ADN

CpG est une abréviation pour cytosine et guanine séparées par un phosphate qui lie les deux nucléotides ensemble dans l'ADN. La méthylation se produit principalement sur les résidus cytosines des dinucléotides CpG. Les sites CpG peuvent être regroupés en régions que l'on appelle **les îlots CpG**. Un îlot CpG est une région d'ADN de plus de 500 paires de bases (pb) avec un taux de CpG supérieur à 55%. Dans le génome des mammifères, 60 à 80% des résidus CpG sont méthylés [34]. En revanche, au sein des îlots CpG seulement 10% des résidus CpG sont méthylés [34]. Chez les vertébrés, les îlots CpG sont en général localisés au niveau des régions promotrices ou à proximité des sites d'initiation de la transcription (TSS : « transcription start site ») ce qui révèle l'importance de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes. Plus de la moitié des gènes chez les vertébrés contiennent des îlots CpG [76]. Chez la souris 16.026 îlots CpG ont été trouvés, chez l'humain 28.691 et chez le poisson zèbre 12.683 îlots ont été dénombrés [129]. Ainsi, la méthylation des CpG s'effectue sur certains sites ciblés et induit la formation de profils de méthylation tissus et cellules spécifiques. L'étude de ces sites permet d'établir une carte des cytosines méthylées appelée **le méthylome** qui constitue l'empreinte spécifique d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. La méthylation peut aussi être retrouvée sur d'autres sites comme des trinucléotides CpHpG et CpHpH (avec H = A, C ou T), notamment au niveau des cellules souches embryonnaires. Cependant, ce type de méthylation reste faible et sa signification peu étudiée [97].

I.4.3.3. Conséquences de la méthylation de l'ADN

La méthylation des îlots CpG situés au niveau des promoteurs de gènes bloque l'initiation de la transcription [76] (Figure I.4.3). Ceci explique que les îlots CpG sont en général peu méthylés pour les gènes qui sont exprimés [161]. Deux mécanismes non mutuellement exclusifs sont à l'origine de ce processus :

- Les marques de méthylation bloquent la liaison des facteurs de transcription au niveau de la région promotrice et ainsi empêchent l'initiation de la transcription [12].
- Les marques de méthylation de l'ADN sont des sites de liaison spécifiquement reconnus par des protéines, **« les methyl binding protein » (MBPs)**. Les MBPs forment des complexes de remodelage de la chromatine qui contiennent des protéines de modification post-traductionnelles des histones, des protéines de la méthylation de l'ADN et des corépresseurs transcriptionnels. Ces complexes conduisent à l'établissement de l'hétérochromatine, qui rend la zone inaccessible aux protéines de transcription par conséquent, l'expression des gènes est réprimée [47]. La super-famille des protéines MBPs est divisée en trois branches :
  - les protéines contenant un domaine de liaison aux méthyles (« methyl biding domain », MBD)(par exemple MeCP2 et les protéines MBD)
  - les protéines liant les CpG méthylés *via* un domaine SRA (« Set and Ring finger-associated domain »)(par exemple UHRF1 et UHRF2)
  - les protéines à doigts de zinc liant les CpG méthylés (par exemple Kaiso)

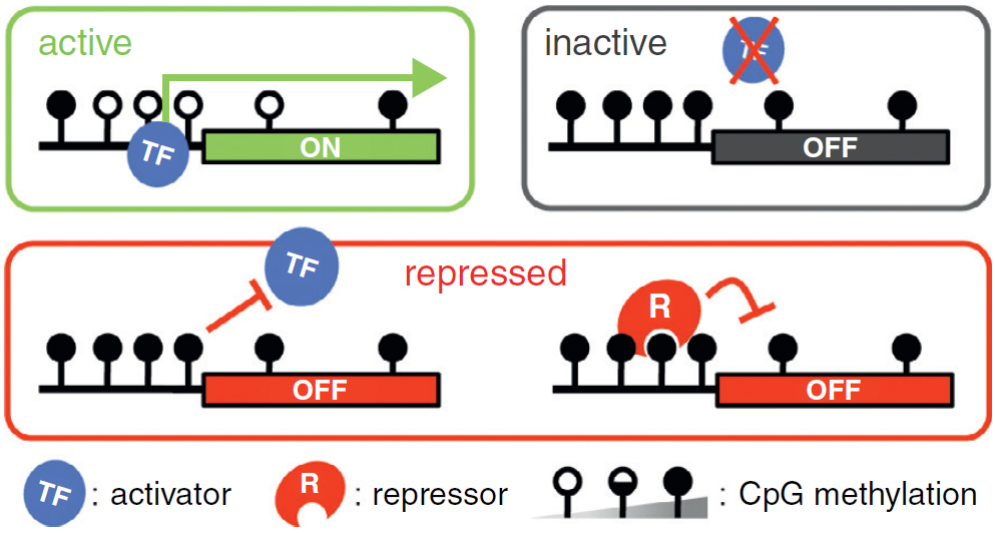


FIGURE I.4.3. – Impact de la méthylation au niveau du promoteur des gènes sur la transcription. Source : [8].

La méthylation en dehors des îlots CpG situés au niveau des promoteur des gènes a des conséquences bien différentes. En effet, la méthylation de CpG dans le corps du gène stimule la phase d'élongation au cours de la transcription et a aussi un impact sur le processus d'épissage alternatif [76]. La méthylation de CpG au niveau des éléments transposables a un rôle dans la stabilité du génome [128]. Les transposons sont des

éléments d'ADN qui peuvent se déplacer dans le génome par un processus appelé transposition. Les transposons sont moins denses en sites CpG et sont souvent hyperméthylés [76]. Il existe aussi une méthylation dans un contexte non CpG au sein des nucléotides CHG ou CHH avec H qui représente A, C ou T. Ce type de méthylation est présente chez les cellules souches embryonnaires et disparait lors de la différenciation cellulaire chez les mammifères [91]. Ce type de méthylation est peu étudié.

I.4.3.4. Le processus de déméthylation de l'ADN

Selon la définition, une modification épigénétique est réversible. Il existe donc un processus appelé **déméthylation**. Il existe deux types de déméthylation :

- **La déméthylation passive** qui est liée à un non maintien de la méthylation de l'ADN suite à la réplication de l'ADN. Ce processus peut être lié à une perte d'expression ou d'activité de DNMT1 mais aussi à l'absence de formation d'un complexe activateur impliquant DNMT1.
- **La déméthylation active** qui est un processus indépendant du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN, on distingue plusieurs voies :
  - La première voie est **la déméthylation par désamination**. Les cytosines sont désaminées par les protéines AIDs et APOBEC, transformant la 5-méthylcytosine (5mC) en thymine. Cela conduit à un mésappariement (site abasique) d'une guanine et d'une thymine qui est corrigé par le mécanisme de réparation par excision de base (BER).
  - La seconde voie est la **déméthylation par hydroxylation et oxydation**. Elle implique les enzymes de la famille TET (Ten-Eleven-Translocation). Ces enzymes catalysent la conversion des 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). Ensuite des oxydations ont lieu pour conduire à la formation de 5-formylcytosine (5fC) et de 5-carboxycytosine (5caC). La base est ensuite éliminée par le mécanisme BER.
  - La troisième voie est la **déméthylation par hydroxylation et désamination**. Les enzymes de la famille TET catalysent la conversion des 5mC en 5hmC. Les 5hmC sont ensuite désaminées par les protéines AID et APOBEC. Ce qui conduit à la formation de 5-hydroxyméthyluracile (5hmU) et donc à un mésappariement uracile et guanine qui va être pris en charge par le mécanisme de réparation BER.

I.4.4. La méthylation de l'ADN au cours du développement

Le zygote est une cellule totipotente car elle va se diviser afin de donner tous les types cellulaires présents dans l'embryon. Ainsi, les gamètes mâles ou femelles sont issus du zygote et ont leur propre patron de méthylation de l'ADN. En conséquence, lors de la spécification des cellules germinales et de la fécondation ces patrons de méthylation de l'ADN doivent être remis à zéro afin de garantir le renouvellement de la totipotence. Ce processus s'appelle **la reprogrammation épigénétique** [42]. Nous allons voir comment se déroule ce processus chez la souris et chez le poisson zèbre.

I.4.4.1. La méthylation de l'ADN au cours du développement de la souris

Chez les mammifères, il existe deux période de reprogrammation de la méthylation de l'ADN : une durant la gamétogénèse et l'autre durant l'embryogénèse.

I.4.4.1.1. Reprogrammation au cours de la gamétogénèse

Chez la souris, après la gastrulation les précurseurs des cellules germinales émergent de l'épiblaste (au temps E7,25 sur la figure I.4.4). Ces cellules prolifèrent et migrent dans les crêtes génitales, c'est ce qui va donner les gonades (entre E10,5 et E11,5 ; figure I.4.4). Ces précurseurs de cellules germinales ont commencé à se différentier en cellules somatiques, il y a donc une reprogrammation des marques épigénétiques (de la méthylation de l'ADN et des modifications des histones) afin de retrouver la pluripotence. Les patrons de méthylation de l'ADN sont effacés au cours de la migration des précurseurs de cellules germinales, ainsi au temps E13,5 le taux de méthylation est inférieur à 10% [127] (Figure I.4.4). La méthylation globale de l'ADN dans l'embryon entier est de plus de 70% [127]. Certaines régions échappent à cet effacement de la méthylation comme les rétrotransposons IAP (« intracisternal A-particule class ») qui restent fortement méthylés [127]. En fonction du sexe de l'embryon des nouveaux patrons de méthylation sont établis. Chez les mâles, le patron de méthylation de l'ADN est initié dans les spermatogonies arrêtées en phase G1 de la mitose et est terminé avant la naissance (Figure I.4.4). Chez les femelles, les ovocytes primaires entrent en méiose et sont bloqués en prophase I de la première division de méiose. Le patron de méthylation de l'ADN est initié après la naissance durant la phase de croissance folliculaire (Figure I.4.4).

I.4.4.1.2. Reprogrammation au cours de l'embryogénèse

La reprogrammation épigénétique n'a pas seulement lieu durant la gamétogenèse, elle a aussi lieu après la fécondation (Figure I.4.4). La déméthylation n'affecte pas les génomes paternel et maternel de la même manière. Pour le génome paternel, les marques de méthylation sont rapidement effacées par démethylation active. En revanche, pour le génome maternel, les marques de méthylation sont perdues par déméthylation passive. Lors de cette seconde vague de déméthylation, les gènes soumis à empreinte parentale ne sont pas déméthylés. Ceci permet de conserver l'origine parentale de l'allèle chez la nouvelle génération et d'avoir uniquement une expression monoallélique de ces gènes soumis à empreinte (« Imprinted gDMRs » sur la figure I.4.4).

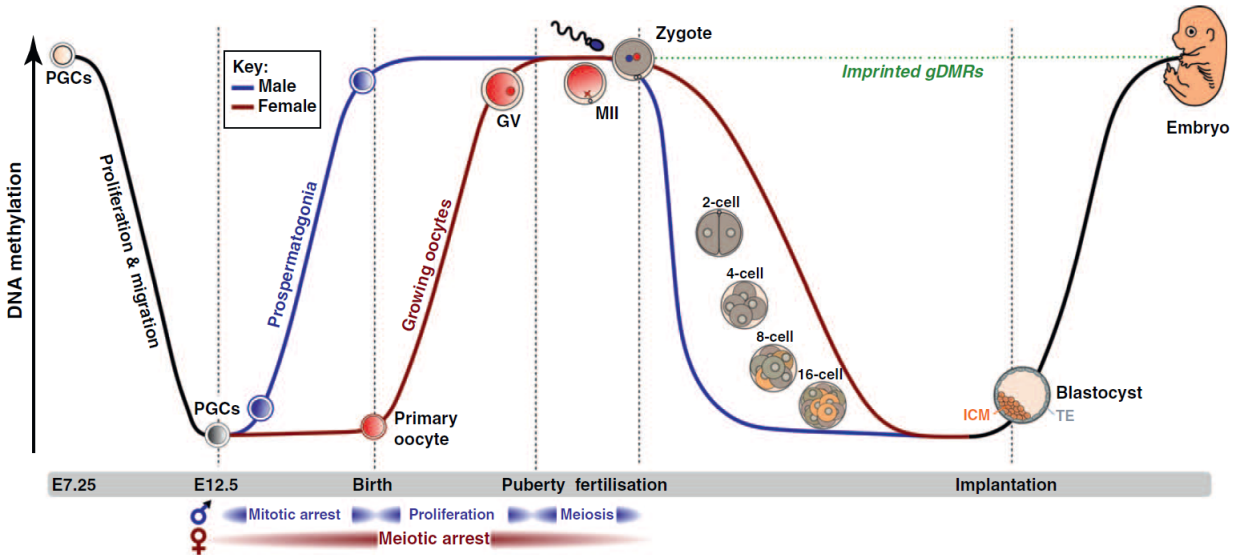


FIGURE I.4.4. – Changement de la méthylation de l'ADN au cours du développement chez la souris. Source : [142].

I.4.4.2. La méthylation de l'ADN au cours du développement du poisson zèbre

Chez le poisson zèbre, le taux de méthylation observé pour les spermatozoïdes est de l'ordre de 91 à 95% (Figure I.4.5), tandis que pour les ovocytes le taux est compris entre 75 et 80% (Figure I.4.5) [129]. Les régions promotrices de gènes impliqués dans le développement précoce et le métabolisme sont hypométhylées chez les spermatozoïdes et les ovocytes. Au contraire, les régions promotrices des gènes impliqués dans le développement plus tardif comme la neurogenèse sont hyperméthylées chez les spermatozoïdes et les ovocytes. En ce qui concerne les gènes spécifiques aux cellules germinales (par exemple *piwi* et *vasa*), ils sont hypométhylés chez les spermatozoïdes et hyperméthylés chez les ovocytes. De plus, pour les gènes *hox* ils sont hypométhylés chez les spermatozoïdes et hyperméthylés chez les ovocytes [129]. Il semblerait que le méthylome des spermatozoïdes soit programmé pour le développement embryonnaire. Une étude a montré que suite à la fécondation, il y a une diminution de la méthylation dans le zygote suivi d'une reméthylation rapide jusqu'au stade gastrula [108]. Cependant, il s'agit de la seule étude à notre connaissance traitant de la méthylation à des stades aussi précoces chez le poisson zèbre. En revanche, d'autres études ont montré une augmentation de la méthylation du stade 16 cellules au stade sphère [129, 74] (Figure I.4.5). Les régions hypométhylées dans les ovocytes sont *de novo* méthylées pour atteindre les taux de méthylation des spermatozoïdes, tandis que les régions hyperméthylées des ovocytes sont passivement déméthylées. Cette méthylation *de novo* et cette déméthylation passive se déroulent simultanément au niveau du méthylome maternel qui est reprogrammé sur le modèle du méthylome paternel. L'effacement de la méthylation durant l'embryogenèse précoce observé chez les mammifères [142] n'a pas été retrouvé chez le poisson zèbre [79] (Figure I.4.5).

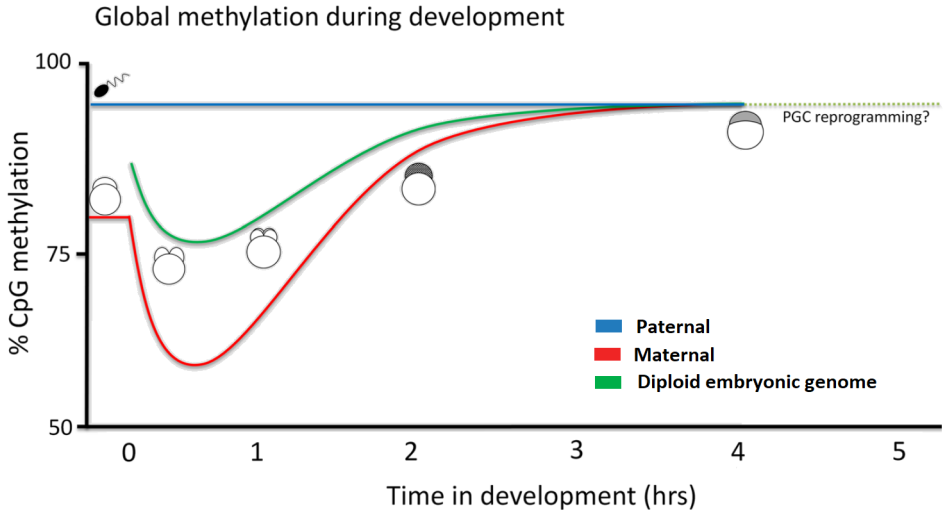


FIGURE I.4.5. – Changement de la méthylation de l'ADN au cours du développement chez le poisson zèbre. Avec en rouge le génome maternel, en bleu le génome paternel et en vert le génome du zygote. Source : D'après [79].

I.4.5. Effets des rayonnements ionisants sur la méthylation de l'ADN

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi d'étudier la méthylation de l'ADN qui est la première modification épigénétique identifiée et celle qui a été la plus étudiée. Les RI sont reconnus pour être des facteurs de dommage à l'ADN qui influencent la méthylation de l'ADN [87]. De plus, les altérations de l'épigénome sont plus fréquentes au cours de l'embryogénèse en raison du fort taux de duplication de l'ADN et de l'établissement du patron de méthylation de l'ADN qui a lieu au cours du développement précoce [160].

Comme on l'a vu précédemment, les RI peuvent induire des cassures double brin de l'ADN qui sont réparées par recombinaison homologue. Une étude a montré, que la recombinaison homologue induit une méthylation *de novo* sur le fragment réparé [137]. Ainsi, la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue pourrait être une source de polymorphisme au sein du patron de méthylation. Une irradiation avec une source de Cobalt 60 à des doses allant de 0,5 Gy à 10 Gy sur des lignées cellulaires a montré une diminution dose dépendante du taux global de 5-méthylcytosine [77]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette hypométhylation permettrait l'expression de gènes qui étaient auparavant réprimés. De plus, cette hypométhylation pourrait provenir d'une diminution du taux de DMNT dans le noyau. Une étude sur les souris montre qu'après une exposition aiguë aux rayons X à des doses de 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5 Gy des changements sexe et tissus spécifiques sont observés [125]. En effet, une hypométhylation est observée dans le foie des femelles dès 0,5 Gy, mais pas dans celui des mâles, une hypométhylation de la rate est observée chez les deux sexes dès 1 Gy. Pour les poumons il ne semble pas y avoir de différence significative par rapport aux contrôles. L'hypométhylation de l'ADN est un signe d'instabilité génomique, ce phénomène semble être observé pour différents cancers et phases pré-cancéreuses [75]. Une exposition aiguë parentale de souris à des doses de 0,7 cGy à 7,6 cGy induit une augmentation significative de la

méthylation de l'ADN au locus A^{vy} chez les progéniture mâles [10]. Cette modification de la méthylation induit un changement de couleur du pelage chez les souriceaux. Ces changements peuvent être évités par une supplémentation maternelle en anti-oxydant. Ceci suggère une implication du stress oxydant dans ces modifications de la méthylation de l'ADN.

Il y a peu d'études qui portent sur l'effet des RI sur la méthylation de l'ADN chez le poisson zèbre. Une étude de l'équipe norvégienne du NMBU porte sur la méthylation de l'ADN chez des embryons issus de parents irradiés à 8,7 mGy/h pendant 27 jours [80]. 5658 régions différentiellement méthylées (DMRs) ont été identifiées, elles sont principalement localisées au niveau de régions régulatrices comme les promoteurs des gènes. Ces DMRs semblent être reliés à des gènes impliqués dans le développement, l'apoptose et la cancérogénèse. Cette étude s'intéresse plus particulièrement aux effets transgénérationnels.

Dans le cadre de la recherche sur les RI, il y a un manque de connaissance sur les effets des RI sur la méthylation de l'ADN chez les vertébrés aquatiques.

I.5. Le concept de l'Adverse Outcome Pathway

I.5.1. Définition de l'AOP

L'Adverse Outcome Pathway est un concept, qui représente les chaînes d'interactions d'un évènement moléculaire initiateur à un effet biologique indésirable pour un individu ou une population. Il est constitué d'une série d'évènements qui englobe plusieurs niveaux d'organisation biologique. Les AOPs, fournissent une structure dans laquelle les connaissances existantes peuvent être organisées. Dans ce cadre, les principales incertitudes et les priorités de recherche peuvent être identifiées. Ce concept est pertinent pour l'évaluation du risque car il permet d'améliorer les approches prédictives nécessaires pour faire progresser la toxicologie et l'écotoxicologie réglementaire. De plus, le concept de l'AOP peut être associé à une étude de biologie des systèmes. La biologie des systèmes, permet d'étudier l'organisation multiéchelle des systèmes vivants et de prendre en compte l'influence entre les différents niveaux d'organisation [96].

I.5.2. Les éléments clés de l'AOP

Chaque AOP débute avec l'interaction d'un agent chimique ou physique avec une cible biologique. Cette interaction est appelée évènement moléculaire initiateur, en anglais **« Molecular Initiating Event »** (MIE), elle conduit à une série d'effets appelés **« Key Events »** (KE) qui aboutissent à un effet délétère pour l'organisme (par exemple mutation ou apoptose) que l'on définit comme un **« Adverse Outcome »** (AO). Ces effets à l'échelle moléculaire, cellulaire ou tissulaire vont conduire à des effets à l'échelle de l'organisme et/ou de la population (Figure I.5.1). Les relations entre les différents niveaux d'organisation biologique peuvent provenir de méthodes *in vitro*, *in vivo* ou de modèles informatiques. Les MIE, KE et AO forment un lexique de mots catalogués et bien définis au sein de l'AOP. Ils s'apparentent à l'ontologie qui est un ensemble structuré de termes et de concepts représentant un champ d'information. Ce concept d'AOP permet de réaliser des analyses globales automatisées sur tous les AOPs rentrés dans la base de données. Les AOPs incluent des données existantes et des données de recherches en cours, ils sont en constante évolution et amélioration. Le concept de l'AOP présente tout de même quelques inconvénients. La contamination ou l'exposition des organismes ou des cellules qui se déroule en amont de l'AOP n'est pas pris en considération. En effet, au sein des AOPs les informations concernant le protocole d'exposition comme la concentration de produit chimique ou pour les RI le débit de dose ainsi que la durée d'exposition ne sont pas disponibles. Un autre type d'AOP commence à être développé, il s'agit des AOPs quantitatifs (qAOPs). Dans ces qAOPs, la compréhension des facteurs critiques pouvant moduler les relations entre les KEs sont

suffisamment bien définis pour permettre une prédiction quantitative de la probabilité ou de la gravité d'apparition d'un AO pour l'activation d'un MIE donné [25]. Ainsi, les informations quantitatives relatives à la compréhension de la transition d'un KE à un autre sont incluses dans la description des relations entre les KEs. Ces informations sont des données concernant une relation dose réponse ou une évolution temporelle, elles peuvent aussi être codées dans des modèles qui simulent une dynamique complexe et non linéaire. Un autre inconvénient des AOPs réside dans le fait que les cellules humaines et les rongeurs (souris et rats) sont les modèles de recherche les plus étudiés, hors les AOPs ne sont pas forcément espèces spécifiques. Néanmoins, l'information concernant l'espèce concernée par un AOP est disponible dans la base de donnée. Les AOPs permettent de simplifier et de clarifier des données de recherche, néanmoins il ne transparait pas toujours que ces recherches ont nécessité plusieurs années. En effet, le lien de causalité entre les KE est mis en évidence par des expériences de gain ou de perte de fonction ou *via* des inhibiteurs de certains mecanismes, qui sont des expériences longues et coûteuses. Néanmoins, les AOPs ont un intérêt majeur en toxicologie où ils permettent d'identifier et d'harmoniser la description des modes d'action d'un élément toxique.

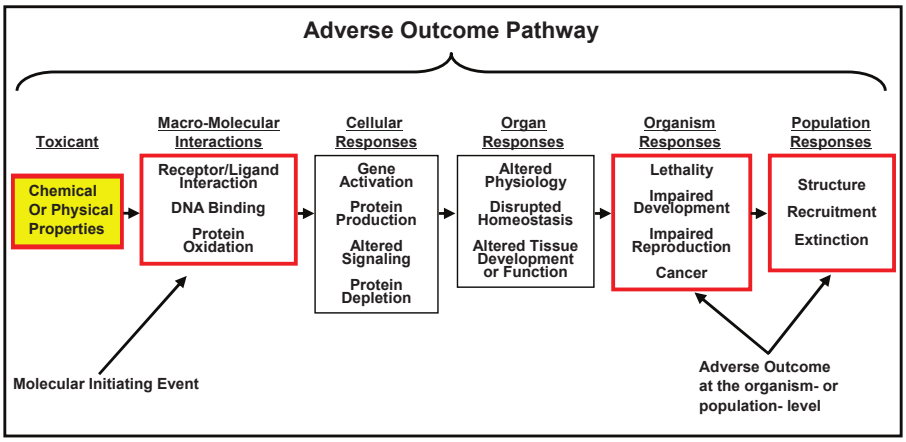


FIGURE I.5.1. – Diagramme des éléments clés d'un AOP. Source : d'après [5].

I.5.3. Les AOPs décrits dans le domaine des rayonnements ionisants

Sur le site internet AOPWiki, il est possible de consulter les AOPs qui ont été déposés par les équipes de recherche. Dans le cadre de ce chapitre concernant les AOPs, nous allons présenter quelques uns de ces AOPs qui concernent les RI. Nous avons sélectionné les stresseurs « Ionizing radiation » (n° 451) et « Gamma radiation » (n° 273).

Le stresseur « Ionizing radiation » comprend quatre AOPs qui s'intitulent « Increased DNA damage leading to increased risk of breast cancer » (AOP n° 293), « Increased reactive oxygen and nitrogen species (RONS) leading to increased risk of breast cancer » (AOP n° 294), « Oxidative DNA damage leading to chromosomal aberrations and mutations » (AOP n° 296) et « Direct deposition of ionizing energy onto DNA leading to lung cancer » (AOP n° 272). Les AOPs n° 293 et n° 294 ont pour AO le cancer du sein. L'AOP n° 272 a pour AO le cancer des poumons. Ce sont des AOPs qui sont

orientés pour une exposition humaine. L'AOP n° 296 est plus général du point de vu de l'espèce visée. Cet AOP encore en développement, montre qu'une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN peut conduire à l'augmentation de cassures à l'ADN et entrainer une réparation inadéquate (Figure I.5.2). Ce processus peut conduire à deux effets indésirables : l'augmentation de mutations et/ou l'augmentation d'abbérations chromosomiques.

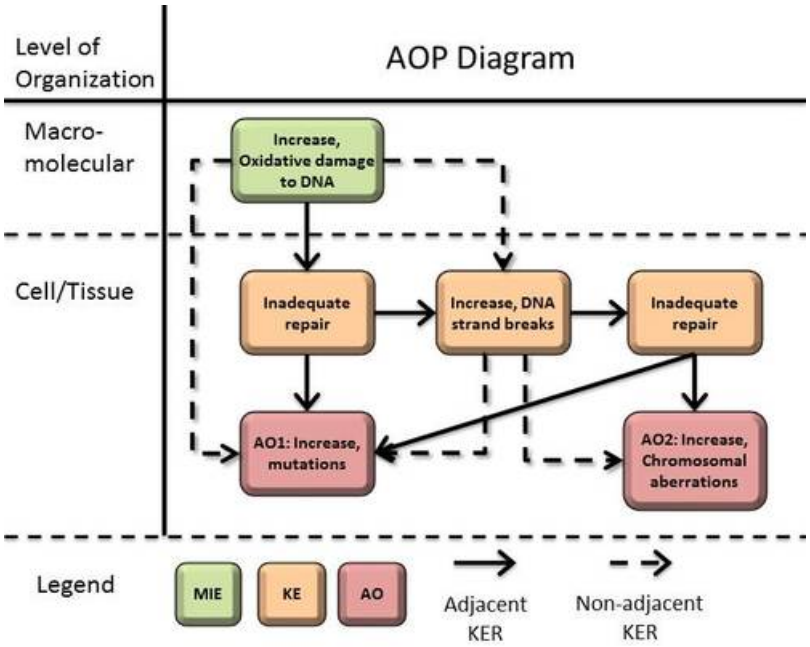


FIGURE I.5.2. – AOP n° 296 déposé sur le site AOPWiki sous le nom « Oxidative DNA damage leading to chromosomal aberrations and mutations ». Source : [23].

Le stresseur « Gamma radiation » comprend deux AOPs qui s'intitulent « Excessive reactive oxygen species production leading to reduced ATP production-associated reproduction decline » (AOP n° 238) et « Excessive reactive oxygen species production leading to oocyte apoptosis-associated reproduction decline » (AOP n° 216). Ce sont deux AOPs en cours de développement. Pour exemple voici le schéma déposé dans le cadre de l'AOP n° 216 (Figure I.5.3). Dans cet AOP l'augmentation de la production de ROS conduit à l'augmentation de dommages à l'ADN. Ce qui aboutit à une augmentation de l'apoptose, qui elle-même entraine l'augmentation de l'atrésie folliculaire aboutissant à une diminution de l'ovogenèse. L'AO de cet AOP est donc la diminution de la fécondité.

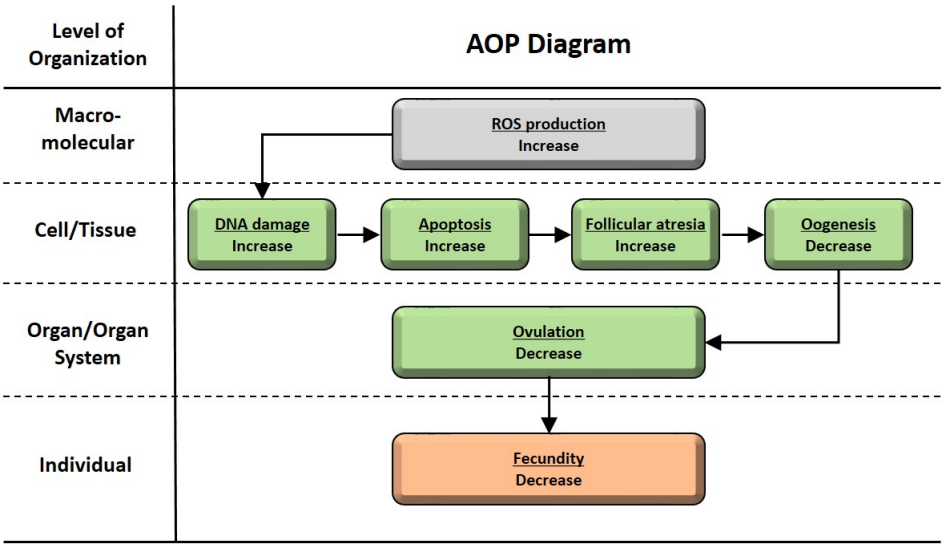


FIGURE I.5.3. – AOP n° 216 déposé sur le site AOPWiki sous le nom « Excessive reactive oxygen species production leading to oocyte apoptosis-associated reproduction decline ». Source : [143].

Au travers de ces exemples, nous avons pu constater qu'il y a peu d'AOPs concernant l'effet des rayonnements γ dans le cadre d'une exposition non humaine.

Deuxième partie

Objectifs et stratégie de recherche

Table des matières

II.1. Objectifs **83**

II.2. Stratégie de recherche **85**

II.1. Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse est d'identifier les modes d'actions toxique des RI sur le développement du poisson zèbre. Compte-tenu du manque de connaissances sur les mécanismes moléculaires des RI aux faibles débits de doses, ce projet de thèse a été axé sur l'étude de ces mécanismes. Pour cela, deux approches complémentaires ont été utilisées. La première consiste en une approche exploratoire à différents stades de développement et différentes échelles biologiques. La seconde s'est concentrée sur l'étude d'un mécanisme épigénétique : la méthylation de l'ADN à un stade de développement précoce.

II.1.1. Évaluation des effets d'une exposition aux rayonnements ionisants au cours du développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes

La première question de recherche s'est focalisée sur les effets des RI sur le développement du poisson zèbre à différents niveaux d'organisation biologique. Ce premier axe se découpe en deux grandes parties :

- L'évaluation des effets des RI aux échelles phénotypiques et comportementales.
- L'évaluation des effets aux échelles tissulaires et moléculaires.

L'objectif de cet axe est de caractériser les modes d'actions toxique et les effets des RI sur le développement du poisson zèbre. Différentes échelles biologiques ont été sélectionnées dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués et leurs liens. Pour cette étude une approche de biologie des systèmes a été utilisée.

II.1.2. Impact des rayonnements ionisants sur la méthylation de l'ADN à un stade précoce de développement chez le poisson zèbre

La seconde question de recherche a pour but de caractériser les effets des RI sur la méthylation de l'ADN à un stade précoce de développement du poisson zèbre. Comme expliqué précédemment la méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus étudiée et donc la mieux documentée. C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier la méthylation de l'ADN. Pour cette étude, des techniques de pointes de « Next Generation Sequencing » ont été utilisées. Ces techniques permettent d'avoir accès à une grande quantité d'informations de façon très précise au niveau moléculaire. Le but est de

caractériser et comprendre les mécanismes d'action toxique et les effets des RI sur un processus épigénétique qui est la méthylation de l'ADN.

II.2. Stratégie de recherche

II.2.1. Le modèle biologique

Les effets des RI ont été évalués sur un organisme aquatique modèle : le poisson zèbre (*Danio rerio*). C'est un petit vertébré couramment utilisé en toxicologie et en biologie du développement. Ce modèle biologique présente de nombreux avantages notamment dus à sa facilité d'élevage et son génome séquencé. Les pontes du poisson zèbre sont abondantes, chaque ponte peut contenir plusieurs centaines d'œufs synchrones et les femelles peuvent pondre une fois par semaine. Dans le cadre de ce travail sur l'étude des effets des RI sur le développement du poisson zèbre, pour chaque expérimentation de nombreux œufs ont été nécessaires ce qui a fait du poisson zèbre un organisme modèle de choix. De plus, le développement embryonnaire et la physiologie du poisson zèbre sont bien décrits. Ce modèle et son développement embryonnaire ont été présentés au cours du chapitre III.

II.2.2. Les stades de développement exposés

Pour ce travail de thèse, les stades embryo-larvaires ont été étudiés. Comme présenté dans les chapitres III et IV, il s'agit d'une période très sensible aux perturbations chimiques et physiques en raison de la multiplication cellulaire et de l'établissement des marques épigénétiques qui a lieu durant cette période. Cette période est donc celle où les effets des RI devraient être les plus délétères. Ainsi, l'OCDE recommande de réaliser les criblages pour le risque chimique sur les stades embryo-larvaires [116].

Pour la première question de recherche une étude dynamique au cours du développement a été réalisée. Ainsi, les stades 24 hpf, 48 hpf, 96 hpf et 120 hpf ont été étudiés. À 24 hpf, les ébauches des organes majeurs sont mis en place et le cœur commence à battre. À 48 hpf, les battements du cœur sont bien établis et le mécanisme d'éclosion commence à se mettre en place. À 96 hpf, les larves ont éclos et la morphogénèse est complète. À 120 hpf, les larves commencent à nager activement ce qui permet l'observation de comportements de fuite et de prédation. Ces stades de développement permettent l'évaluation d'effets létaux et sublétaux comme l'éclosion, les malformations, la fréquence cardiaque et la mobilité des larves.

Pour la seconde question de recherche, un stade de développement précoce a été étudié, le stade shield à 6 hpf. Ce stade se situe au cours de la gastrulation. À ce stade, les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) sont mis en place. Néanmoins, la diversité cellulaire est faible, ce qui facilite l'étude de la méthylation de l'ADN par séquençage de nouvelle génération.

II.2.3. L'exposition aux rayonnements ionisants

II.2.3.1. Dispositif d'irradiation

Les expositions aux RI sont effectuées au sein de la plateforme MICADO'Lab (Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations DOse effet en Laboratoire) (Figure II.2.1). Il s'agit d'une plateforme d'irradiation externe gamma dédiée à l'étude des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants sur les écosystèmes. MICADO'Lab offre des conditions d'exposition uniques en Europe. En effet, la gamme de débits de doses applicables va de 0,005 mGy/h jusqu'à 100 mGy/h. Le plus faible débit de dose qu'il est possible d'obtenir ce situe en dessous de la valeur de référence pour la protection des écosystèmes (0,01 mGy/h) [51]. Le dispositif d'irradiation est composé de quatre sources de césium 137 d'une activité totale de 370 GBq. La plateforme MICADO'Lab a été mise en service en janvier 2017. Ce travail de thèse a fait partie d'un des premiers projets réalisés sur cette plateforme. De ce fait, un temps conséquent de mise au point a été nécessaire pour la mise en place du design expérimental et l'utilisation de la plateforme MICADO'Lab.

FIGURE II.2.1. – Hall d'irradiation MICADO'Lab.

II.2.3.2. Calcul du débit de dose

Avant l'irradiation, la distance des organismes par rapport à la source est calculée en fonction du débit de dose souhaité. Le débit de dose (en Gy/h) est calculé de façon précise en prenant en compte l'atténuation des rayonnements ionisants par les unités expérimentales (incubateurs et boîtes de Pétri) et le milieu (milieu embryon et air). Pour cela, des simulations numériques utilisant le code MCNP (Monte-Carlo N-Particle transport code) ont été réalisées par Nicolas Dubourg (IRSN/LECO). Le schéma du dispositif expérimental ainsi que les informations concernant la source utilisée (activité, débit de dose à 30 cm) sont implémentés dans le logiciel MCNP. Le centre d'intérêt de l'embryon ou de la larve est ensuite défini. C'est sur ce centre d'intérêt que les débits de doses ont été calculés par simulation numérique pour chaque unité expérimentale, en prenant en compte l'atténuation des rayonnements émis par l'incubateur, la boîte de Pétri et l'épaisseur du milieu. Afin de calibrer la prédiction théorique, six dosimètres

Radio Photo Luminescents (RPL) sont placés autours des boites de Pétri (Figure II.2.2). Les débits de dose mesurés à ces positions sont comparés aux débits de dose modélisés. Le ratio entre débit de dose mesuré et débit de dose théorique aux six points mesurés est ensuite utilisé pour corriger la prédiction du débit de dose au point d'intérêt et donc on a :

$$D_{exp}^{int} = D_{th}^{int} \frac{D_{exp}^{dosi}}{D_{th}^{dosi}} \tag{II.2.1}$$

où l'exposant *int*, (respectivement *dosi*) correspond à la position d'intérêt (respectivement dosimètre) et l'indice *th* (respectivement *exp*) correspond à la valeur théorique (respectivement expérimentale).

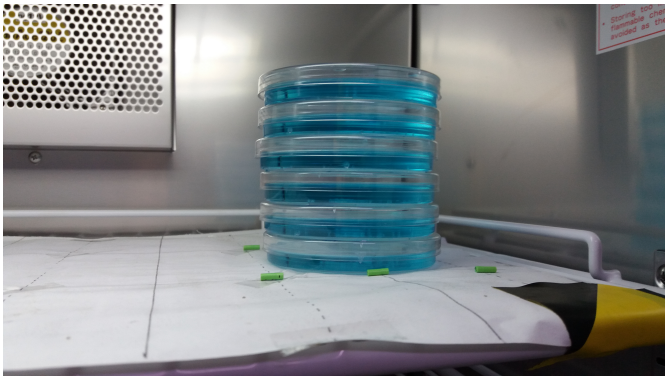


FIGURE II.2.2. – Design expérimental d'une expérience réalisée dans MICADO'Lab. Les dosimètres sont en vert.

II.2.3.3. Choix des débits de dose

Les effets biologiques ont été évalués sur une gamme de débits de dose permettant de balayer des débits de doses typiques des faibles doses et des contextes accidentels. Les débits de doses reçus par les petits mammifères suite à l'accident de Tchernobyl ont été estimés [53] :

- En 1986, les débits de doses sont estimés entre 6000 mGy/h et 1300 mGy/h dans la zone d'exclusion.
- De 1988 à 1990, les débits de doses sont estimés entre 1300 mGy/h et 420 mGy/h.
- Puis de 1995 à 2005, les débits de doses sont estimés entre 0,23 mGy/h et 0,15 mGy/h.

Les débits de doses estimés pour les années 2000 pour les petits mammifères suite à l'accident de Tchernobyl, se rapprochent des débits de doses choisis pour ce projet de thèse. Par ailleurs, l'UNSCEAR (« United Nations Scientific Commitee on the Effects of Atomic Radiation ») définit un faible débit de dose comme étant inférieur à 6 mGy/h dans le cadre d'une exposition humaine [152]. Et le débit de dose de 10 µGy/h (0,01 mGy/h) pour lequel il y a moins de 10% d'effet pour 95% des espèces a été définit comme valeur de référence pour la protection des écosystèmes [51]. Néanmoins, ces valeurs ne sont pas des limites sanitaires mais des recommandations. Dans cette étude, cinq débits de doses (et une condition témoin) ont été choisis : 0,005 mGy/h, 0,05 mGy/h, 0,5 mGy/h, 5 mGy/h et 50 mGy/h. L'objectif de ce travail de thèse est de

mettre en évidence les effets et les modes d'action toxiques d'une irradiation aux RI. En effet, très peu d'études ont été réalisées à ces débits de doses.

II.2.4. Le choix des marqueurs

En écotoxicologie, le terme biomarqueur se réfère à toutes les modifications des paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés sur l'organisme [30]. Ils permettent de mettre en évidence l'exposition ou les effets de contaminants. Néanmoins, les biomarqueurs traduisent souvent la toxicité en elle même mais ne permettent pas de connaître les modes d'action des contaminants. La toxicogénomique s'est considérablement développée ces dernières années. Ces méthodes permettent d'avoir accès aux réponses biologiques plus précoces au niveau moléculaire et de manière globale. Ces réponses biologiques sont décrites comme étant plus sensibles et permettent donc de détecter des effets à de faibles doses de contaminants. De plus, l'étude des paramètres moléculaires combinée à des études à des échelles supérieures permettent d'améliorer considérablement les connaissances sur les mécanismes d'action des contaminants. Après une exposition à un pesticide (3,4-dichloroaniline), une étude a montré une réponse plus rapide au niveau de l'expression des gènes et à des concentrations plus faibles que celles utilisées avec les marqueurs classiques comme la survie et les anomalies du développement chez des embryons de poisson zèbre [159]. De plus cette étude a permis de faire un lien entre ces effets moléculaires précoces et des effets phénotypiques plus tardifs. Dans ce cadre, on fait l'hypothèse que des effets moléculaires peuvent se traduire au niveau de l'individu voire des populations et ainsi impacter les écosystèmes [52]. C'est dans ce contexte que s'est développé le concept d'AOP qui est décrit plus en détail dans le chapitre V.

Pour ce travail de thèse, des approches de toxicogénomiques ont été couplées à des études des effets à des échelles biologiques supérieures, ce qui permet d'avoir une approche intégrative qui s'inscrit dans le cadre de la biologie des systèmes. Ci-dessous, les différentes expérimentations réalisées au cours de ce projet de thèse sont présentées. Elles sont classées en fonction de l'échelle biologique concernée. Un tableau récapitulatif a été réalisé afin de mieux comprendre à quels débits de doses et stade de développement chaque analyse a été effectuée (Tableau II.2.1). Ce travail de thèse a nécessité 44 expérimentations d'exposition aux RI, en incluant les expériences préliminaires qui ont été nécessaires à la prise en main de la plateforme d'irradiation et à la mise au point des protocoles.

Pour ce travail de thèse, plusieurs analyses transcriptomiques *via* le séquençage des ARNm ont été réalisées. Cette approche exploratoire a permis d'avoir une vue d'ensemble des effets sur la modulation de l'expression des gènes après une irradiation gamma.

La première analyse transcriptomique (RNA-seq) a été réalisé dans le cadre de la première question de recherche aux stades de développement de 24, 48 et 96 hpf (Tableau II.2.1). Cette analyse a permis d'avoir une vue d'ensemble des voies de signalisation impactées par une exposition aux RI. Suite à cette analyse transcriptomique le stade 96 hpf et les débits de doses 5 mGy/h et 50 mGy/h ont été sélectionnés afin de réaliser une analyse protéomique en collaboration avec le CRCM (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille) (Tableau II.2.1). Cette analyse protéomique a permis de confirmer l'impact sur des voies de signalisation identifiées suite à l'étude transcriptomique. Afin de confirmer les résultats obtenus avec l'étude transcriptomique, des hybridations d'ARN

in situ (HIS) ont été réalisées, c'est une technique qui permet de visualiser l'expression des gènes à l'intérieur d'un embryon par coloration (Tableau II.2.1). Des observations au microscope électronique à transmission (MET) ont aussi été réalisées (Tableau II.2.1). Une technique de quantification des dommages sur le tissu observé a été mise en place afin d'avoir une approche quantitative. Des paramètres plus classiques en toxicologie ont été étudiés comme la taille des larves, la fréquence cardiaque, l'éclosion et la survie (Tableau II.2.1). En parallèle, une analyse des processus de réparation des cassures doubles-brin *via* l'immunomarquage des foci γ-H2AX a été effectuée (Tableau II.2.1). Cet immunomarquage a nécessité une mise au point conséquente qui a été réalisé en collaboration avec une chercheuse post-doctorante. Pour terminer, une étude comportementale qui est un paramètre intégrateur des effets aux échelles biologique inférieures a été réalisée. L'évaluation des effets à l'échelle comportementale s'est heurtée à des difficultés méthodologiques. En effet, les tests comportementaux chez le poisson zèbre n'avaient jamais été réalisés au sein du laboratoire. En s'appuyant sur la bibliographie et sur les conseils du Dr. Xavier Cousin et du fabriquant du matériel de comportement (Noldus), des tests comportementaux qui ont été validés par des expériences préliminaires ont été mis en place. Dans le cadre de ce travail de thèse, deux tests comportementaux ont été mis au point, le test d'activité des embryons à 24 hpf et le test de locomotion des larves à 120 hpf (Tableau II.2.1).

Dans le cadre de la seconde question de recherche, une analyse transcriptomique à un stade précoce de développement (6 hpf) a été réalisée (Tableau II.2.1). En complément, une analyse de la méthylation de l'ADN a été réalisée au même stade de développement, il s'agit de séquençage bisulfite, (WGBS, « Whole Genome Bisulfite Sequencing ») (Tableau II.2.1). Cette analyse permet de détecter les cytosines méthylées dans le génome du poisson zèbre avec une résolution au nucléotide près.

Ces analyses à haut débit qui ont été réalisé au cours de ce projet sont des analyses coûteuses et longues. En effet, après extraction de l'ARN ou de l'ADN, la réalisation d'une librairie de séquençage nécessite deux jours de travail pour 16 échantillons. Pour la transcriptomique, 192 librairies ont été réalisées. Pour le séquençage bisulfite 24 librairies ont été réalisées. De plus, l'analyse de ces données est longue et complexe. J'ai réalisé les analyses de transcriptomique et Dr. Olivier Armant a réalisé les analyses de séquençage bisulfite.

	Échelle	Analyse	Débits de dose (mGy/h)					Stades de développement
			0,005	0,05	0,5	5	50	
Article n°1	Moléculaire	RNA-seq			x	x	x	24, 48, 96 hpf
	Moléculaire	Protéomique				x	x	96 hpf
	Moléculaire	Marquage γ-H2AX				x	x	24, 48 hpf
	Cellulaire	Hybridation *in-situ*			x	x	x	24 hpf
	Tissulaire	Microscopie électronique			x	x	x	96 hpf
	Individuelle	Fréquence cardiaque			x	x	x	48 hpf
	Individuelle	Taille des larves			x	x	x	48 hpf
	Individuelle	Éclosion	x	x	x	x	x	72 hpf
	Individuelle	Survie	x	x	x	x	x	24 à 120 hpf
	Individuelle	Activité des embryons			x	x	x	24 hpf
	Individuelle	Locomotion des larves			x	x	x	120 hpf
Article n°2	Moléculaire	RNA-seq	x	x	x	x	x	6 hpf
	Moléculaire	WGBS				x	x	6 hpf

Tableau II.2.1. – Tableau récapitulatif des expériences réalisées.

Le test des comètes a été réalisé en réponse à la première question de recherche aux stades 24, 48 et 96 hpf et aux doses de 0,005 ; 0,05 ; 0,5 ; 5 et 50 mGy/h. L'analyse des résultats de ce test a suggéré un manque de sensibilité de détection même au plus fort débit de dose. Afin de trouver un marqueur plus sensible, le marquage des focis γ-H2AX a été réalisé sur des embryons entiers à 24 hpf et 48 hpf. Cette méthode a permis d'avoir une approche ciblée sur les cassures double brin de l'ADN qui est un type de cassure fréquemment rencontré après une exposition aux RI.

De plus, nous souhaitions réaliser le test comportemental de la réponse photomotrice mais en raison de contrainte techniques et de temps il n'a pas pu être réalisé. Ce test est réalisé sur des embryons de 30 à 42 hpf. Il consiste en un stimuli lumineux d'une durée d'une seconde qui conduit les embryons à réaliser une série de comportements robustes et reproductibles [84]. Après le stimuli lumineux il y a trois phases : une phase d'immobilité qui dure 1 à 2 seconde, une phase d'excitation caractérisée par des flexions du corps et une oscillation de la queue qui dure 2 à 5 seconde et une phase réfractaire de 10 à 30 secondes durant laquelle les embryons ne peuvent pas répondre à un second stimuli lumineux. Ce test comportemental permet de tester le fonctionnement du SNC de façon rapide, robuste et reproductible. Ce test nécessitait l'acquisition de caméras infrarouge et d'un dispositif délivrant un stimuli lumineux que nous n'avons pas pu acquérir dans le temps imparti.

Nous souhaitions également réaliser une expérience d'irradiation plus longue à 50 mGy/h afin de voir si avec une exposition plus longue un phénotype plus marqué pouvait être observé. En raison du planning de la plateforme d'irradiation, nous n'avons pas pu disposer d'un créneau dans le temps imparti mais cette expérience reste une piste pour de futures expérimentations.

Troisième partie

Évaluation des effets d'une exposition aux RI au cours du développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes

Table des matières

III.1. Objectifs de l'article scientifique **93**

III.2. Article scientifique **94**

III.3. Principaux résultats et discussion de l'article scientifique **128**

III.1. Objectifs de l'article scientifique

Les contaminations de l'environnement suite aux catastrophes nucléaires de Tchernobyl et de Fukushima-Daiichi, ont entrainé l'exposition des écosystèmes à des substances radioactives. Les phases caractéristiques suivant une exposition à de forts débits de doses sont bien caractérisées chez l'Homme et les animaux. En revanche, les effets sub-létaux dus à une exposition chronique à de faibles doses de RI restent peu étudiés et les effets biologiques à long termes sont méconnus. C'est dans ce cadre que s'inscrit cet article scientifique, qui a pour but d'évaluer les effets d'une exposition à des doses faibles à modérées de RI au cours du développement du poisson zèbre par une approche de biologie des systèmes. Cet article s'inscrit dans le cadre de la première question de recherche. Afin de répondre à cette problématique, nous avons étudié différentes échelles biologiques : de la molécule à l'individu. Une analyse exploratoire sans a priori à l'échelle moléculaire a été effectuée *via* une analyse transcriptomique et une analyse protéomique. Le but de ces analyses exploratoires est d'identifier des voies et des processus biologiques qui sont impactés par les RI. Les réponses moléculaires précoces identifiées ont ensuite conduit à la réalisation d'expérimentations aux échelles cellulaires, tissulaires et individuelles afin de confirmer ou non les résultats moléculaires obtenus et de faire le lien entre les différentes échelles.

III.2. « A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionizing radiation in zebrafish »

Article soumis le 25 juillet 2019, accepté le 13 décembre 2019 et publié le 27 décembre 2019 dans le journal « Scientific Reports ». Les informations supplémentaires ont été insérées à la suite de l'article. Cependant les tableaux supplémentaires 3, 4 et 5 relatifs aux données de transcriptomique n'ont pas été insérés dans le manuscrit en raison de leur volume conséquent. Néanmoins, ils sont disponible avec le lien ci-dessous. Informations supplémentaires : `https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w`

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN

A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish

Sophia Murat El Houdigui[1], Christelle Adam-Guillermin[3], Giovanna Loro[1], Caroline Arcanjo[1], Sandrine Frelon[1], Magali Floriani[1], Nicolas Dubourg[1], Emilie Baudelet[2], Stéphane Audebert[2], Luc Camoin[2] & Olivier Armant[1*]

Contamination of the environment after the Chernobyl and Fukushima Daiichi nuclear power plant (NPP) disasters led to the exposure of a large number of humans and wild animals to radioactive substances. However, the sub-lethal consequences induced by these absorbed radiological doses remain understudied and the long-term biological impacts largely unknown. We assessed the biological effects of chronic exposure to ionizing radiation (IR) on embryonic development by exposing zebrafish embryo from fertilization and up to 120 hours post-fertilization (hpf) at dose rates of 0.5 mGy/h, 5 mGy/h and 50 mGy/h, thereby encompassing the field of low dose rates defined at 6 mGy/h. Chronic exposure to IR altered larval behaviour in a light-dark locomotor test and affected cardiac activity at a dose rate as low as 0.5 mGy/h. The multi-omics analysis of transcriptome, proteome and transcription factor binding sites in the promoters of the deregulated genes, collectively points towards perturbations of neurogenesis, muscle development, and retinoic acid (RA) signaling after chronic exposure to IR. Whole-mount RNA *in situ* hybridization confirmed the impaired expression of the transcription factors *her4.4* in the central nervous system and *myogenin* in the developing muscles of exposed embryos. At the organ level, the assessment of muscle histology by transmission electron microscopy (TEM) demonstrated myofibers disruption and altered neuromuscular junctions in exposed larvae at 5 mGy/h and 50 mGy/h. The integration of these multi-level data demonstrates that chronic exposure to low dose rates of IR has an impact on neuronal and muscle progenitor cells, that could lead to motility defects in free swimming larvae at 120 hpf. The mechanistic understanding of these effects allows us to propose a model where deregulation of RA signaling by chronic exposure to IR has pleiotropic effects on neurogenesis and muscle development.

Living organisms have evolved robust genetic networks to detect DNA damage induced by genotoxic stress and to arrest the cell cycle, allowing time for repairing the damages. The induction of DNA damage either generated from reaction with byproducts of the metabolism or induced by external genotoxic stressors such as ionizing radiations (IR) must be tightly controlled to avoid profound impacts on cell functions. Large scale contaminations of the environment after the Chernobyl and Fukushima Daiichi nuclear power plant (NPP) disasters exposed a large number of humans and wild animals to radioactive substances[1,2]. If the acute exposure phase following these releases led to rather well characterized effects, the sub-lethal effects due to chronic exposures to IR remain understudied and hence, the long-term biological impacts largely unknown. Studies on wild animals reported that brains of birds and monkey fetuses from Chernobyl[3] and Fukushima Daiichi NPP[4] areas respectively, have

[1]Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SRTE/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, 13115, France. [2]Aix-Marseille University, Inserm, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille Proteomics, Marseille, France. [3]Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SDOS/LMDN, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, 13115, France. *email: olivier.armant@irsn.fr

a smaller size. In addition, epidemiological studies on children born from Hiroshima and Nagasaki survivors demonstrated brain development defects[5] and reduced cognitive capacities[6], for doses of IR as low as 0.31 Gy[7].

IR induces DNA double stranded breaks (DSBs) that are detrimental for cell survival if not repaired. DSBs lead to the phosphorylation of the histone variant H2AX on serine 139 by the phospho-inositol-3 kinase ATM and the formation of γ-H2AX nuclear foci at the sites of DSBs that are detectable by specific antibodies, thereby providing a simple assay to assess genotoxicity. Studies on the effects of low dose rates of IR (< 6 mGy/h)[8] on rodents are contradictory as genotoxic effects could be observed in some studies but not in others[9–12]. In addition, these studies were performed on adult organisms which are more resilient to genotoxic stressors than developing embryos. A study on zebrafish embryos exposed at 0.03 mGy/h and 24 mGy/h showed an acceleration of hatching rate, induction of oxidative stress and DNA damage[13]. In another study zebrafish eggs were exposed at 0.54 to 10.9 mGy/h and analysed by high-throughput sequencing at early gastrulation stage, near 5.5 hours post fertilization (hpf)[14]. Changes in important developmental pathways such as lateral inhibition (Notch signaling) and retinoic acid (RA) pathway (involved in anteroposterior patterning) were observed in early gastrula embryos, but a direct assessment of the consequences of these early changes at later developmental stages was not assessed.

The complex gene regulatory networks active in all multicellular organisms are the product of transcriptional regulators interacting with cis-regulatory modules (CRM) like promoters, enhancers, silencers and locus control regions that, together with epigenetics processes, regulate the expression of genes. Molecular changes obtained from transcriptomics and proteomics data are widely used in system biology approaches to generate hypothesis on the physiological effects observed at higher organisational levels, as well as for the identification of biomarkers. However, as cell-signaling target ultimately transcription factors (TF) to modify gene expression, identifying TF that drives changes in gene expression may reveal the key signaling pathways during disease progression. To regulate transcription, TF bind specific DNA sequences in the promoter of the target genes, referred as transcription factor binding sites (TFBS). The enrichment of TFBS in the promoters of the co-expressed genes can be used to predict the TF that drive changes in gene expression and ultimately reveal the underlying regulatory mechanisms of disease progression[15–17]. In this context, establishing links between molecular and physiological alterations leading to adverse effects such as lethality, carcinogenesis or behavioural alterations, fits very well with the concept of adverse outcome pathway (AOP) which establishes causal relationships between an initiating molecular event and the adverse effects at a biological level relevant for risk assessment[18,19].

In the present study we focused on the *in vivo* effects of low to moderate dose rates of IR on embryonic development using zebrafish embryos, a model commonly used in toxicogenomics, disease modelling and developmental biology[20–22]. We assessed the biological effects of chronic exposure of low to moderate dose rates of IR at different levels of organisation from molecular alterations to higher-order alterations such as behaviour. Morphological and functional measurements were performed at various developmental stages, from 24 hpf to 120 hpf larvae and after exposure at three different dose rates of gamma radiation ranging from 0.5 mGy/h to 50 mGy/h. We assessed the potential effects on behaviour by measuring embryonic activity at 24 hpf and performed a visual motor response test on 120 hpf larvae. At the molecular levels we performed a multi-OMICS analysis by studying the effects of IR on both the transcriptome and the proteome. Analysis of the TFBS in the promoters of the deregulated genes pin-points perturbations of key TF in embryonic development. Changes in gene expression were further confirmed by whole mount RNA *in situ* hybridization, and histology assessed by transmission electron microscopy (TEM).

Results

Chronic exposure to low dose rates of IR increases DNA damages and alters behaviour. We challenged zebrafish embryos to chronic exposures of IR from early developmental stage (1 hpf) up to late larval stage (120 hpf) (Fig. 1a). Acute exposures to high doses of gamma rays increase the occurrence of developmental defects[23] and induce DSBs in zebrafish cells[24]. DSBs are difficult to repair and may lead to irreversible effects such as developmental impairments and cancer. To assess these adverse effects, we analysed γ-H2AX foci by whole-mount immunostaining in 24 hpf embryos and 48 hpf larvae and studied embryonic development over a 96 h period. We detected a significant increase of γ-H2AX foci in 24 hpf embryos and 48 hpf larvae for the highest dose (adjusted p-value $< 10^{-3}$ and < 0.01 respectively), but no significant change was observed at lower dose rates (Fig. 1b,c). Other macroscopic endpoints such as embryonic lethality, hatching success and body length were largely unaffected (Table 1, Fig. 1d), which suggests that, in the conditions tested here, chronic exposure to 50 mGy/h of IR induces DNA damages without affecting embryonic survival.

We next assessed if chronic exposure to IR could affect cardiac activity and behaviour, two physiologically integrated parameters proposed to be more sensitive than macroscopic endpoints[25]. Cardiac activity measured in 48 hpf larvae showed a complex non-linear response to the dose rate, as we observed a significant decrease of cardiac beats per minute at the lowest dose rate (0.5 mGy/h, adjusted p-value < 0.05, $n = 69$), and an increase at the two higher dose rates (5 mGy/h adjusted p-value < 0.05, $n = 69$; 50 mGy/h: adjusted p-value < 0.05, $n = 68$) (Fig. 2a). Zebrafish embryonic activity is heavily used to assess chemical toxicity, as it is easily done[26,27]. Such assays detect embryonic burst activity, which correspond to the number of spontaneous tail-coiling of 24 hpf embryos. Twenty-four hour-long chronic exposure to low dose rate of IR induced a significant increase (p-value < 0.05, $n = 156$) of embryonic activity at 5 mGy/h, but not at 0.5 mGy/h nor at the highest dose rate of 50 mGy/h (Fig. 2b). This effect was retrieved consistently in three independent experiments which indicates that this non-linear dose-response is robust. We next measured larval motility at 120 hpf under stress conditions[28]. In this visual motor response test, larvae are exposed to three sharp changes of light intensity to elicit a stress response. A significant decrease of larval motility was observed in the dark phase at the three dose rates (permutation test, p-value < 0.05, Fig. 2c), which suggests that exposures to IR can alter zebrafish escape behaviour at a dose rate as low as 0.5 mGy/h.

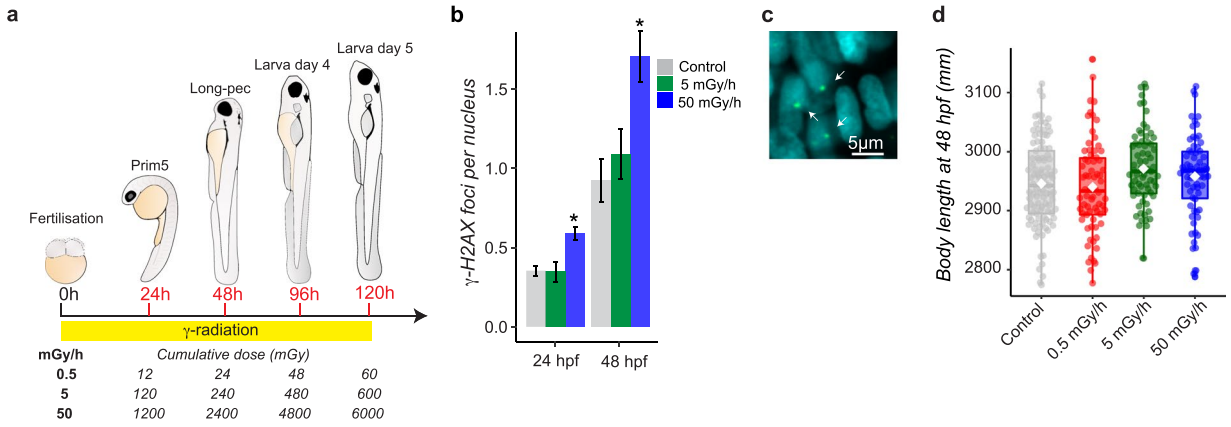


Figure 1. (**a**) Experimental design and dosimetry. The cumulative dose in Gy are indicated for each developmental stages and sampling time (in red). (**b**) Detection of γ-H2AX foci in 24 hpf and 48 hpf embryos by whole-mount immunocytochemistry. Standard-error to the mean is indicated for each exposure (Kruskall-wallis test followed by a pairwise Wilcoxon rank sum post-hoc test and adjusted by the Holm method, adjusted p-value: * < 0.05). (**c**) Examples of positive γ-H2AX foci (green, white arrows) detected in DAPI stained nucleus (blue) by confocal microscopy. (**d**) Means of body length measured at 48 hpf (in mm) are indicated as white lozenge. Dots represent individual data.

Dose rate (mGy/h)	% Survival rate at 24 hpf (95% CI)	% Hatching rate at 72 hpf (95% CI)
Control	84.9 (80.6–88.4)	100 (98.4–100)
0.5	91.3 (85.5–95.0)	100 (96.8–100)
5	88.1 (81.8–92.5)	100 (96.7–100)
50	82.1 (75.6–87.2)	99.3 (95.8–100)

Table 1. Percentage (%) of Embryonic mortality at 24 hpf and hatching rate at 72 hpf with the corresponding 95% confidence intervals (CI) indicated in brackets.

Transcriptomics analysis reveals impairment of major developmental pathway after chronic exposure to IR. Transcriptomics analysis was performed in order to identify the genetic pathways altered upon chronic exposure to low doses of IR. Global analysis of the transcriptome was performed at 24 hpf, 48 hpf and 96 hpf to follow the dynamics of gene expression during zebrafish development. A total of 5.7 billion of good quality reads ($Q > 30$) was produced and differential gene expression assessed in pairwise comparison between the embryos or larvae exposed at 0.5 mGy/h, 5 mGy/h or 50 mGy/h and the stage specific controls. The total number of differentially expressed genes (DEG) within our significance threshold ($|\text{fold change}| \geq 1.5$ and adjusted p-value < 0.01) decreased with the developmental stage (the complete list of significantly deregulated genes is provided in Supplementary Table T4). In addition, fewer genes were differentially expressed for the lower dose rate (0.5 mGy/h) compared to the two highest dose rates (5 mGy/h and 50 mGy/h) (Fig. 3a–c). The quality of mRNAseq data was checked by TaqMan quantitative RT-PCR; the Pearson's correlation coefficients between the two methods ($\rho > 0.6$) were consistent with previous studies (Supplementary Fig. S3)[29,30]. Very few genes were found to be mis-regulated in common between the three dose rates at any of the three stages studied: 12 genes in 24 hpf embryos, 78 genes in 48 hpf larvae and 7 genes in 96 hpf larvae (Fig. 3a–c). The highest overlaps were observed consistently for the two highest dose rates (21% to 49%), indicating that the transcriptional responses under these two conditions were more similar compared to the lower dose-rate.

Searching shared functions among different conditions is a common way to incorporate the biological knowledge provided by biological ontologies. We performed pathways enrichment analysis using the KEGG (with human orthologous genes) and GO repositories (with zebrafish and human orthologues) and found that the most deregulated pathways at the two higher dose rates were related to neurological disorders, cell cycle, neurogenesis and synaptic transmission (Fig. 3d, Supplementary Fig. S4 and S5). A complete list of zebrafish GO terms enriched in each condition is provided in Supplementary Table T5. Key developmental processes such as neurogenesis (GO:0050767, Fisher's exact test p-value $< 1.10^{-4}$), somite development (GO:0061053, p-value $< 1.10^{-5}$), retinol metabolism (GO:0042572, p-value < 0.01) and hematopoiesis (GO:0048534, p-value $< 1.10^{-4}$) were impacted at the two highest dose rates (50 mGy/h and 5 mGy/h). Very few biological pathways were generally enriched at 0.5 mGy/h in 48 hpf and 96 hpf larvae due to the small number of DEG detected in these conditions, but we detected a significant enrichment of cell cycle (GO:0045786, p-value < 0.01) and blood vessels development (GO:0097496, p-value < 0.01) in 24 hpf embryos. The enriched GO terms for the 78 DEG mis-regulated in common for the 3 dose rates at 48 hpf (which corresponds to the highest overlap, Fig. 3b), were composed of genes involved in neuron development (GO:0048666, p-value < 0.01), steroid hormone mediated signalling pathway (GO:0043401, p-value < 0.01) and programmed cell death (GO:0010623, p-value < 0.01) (Supplementary

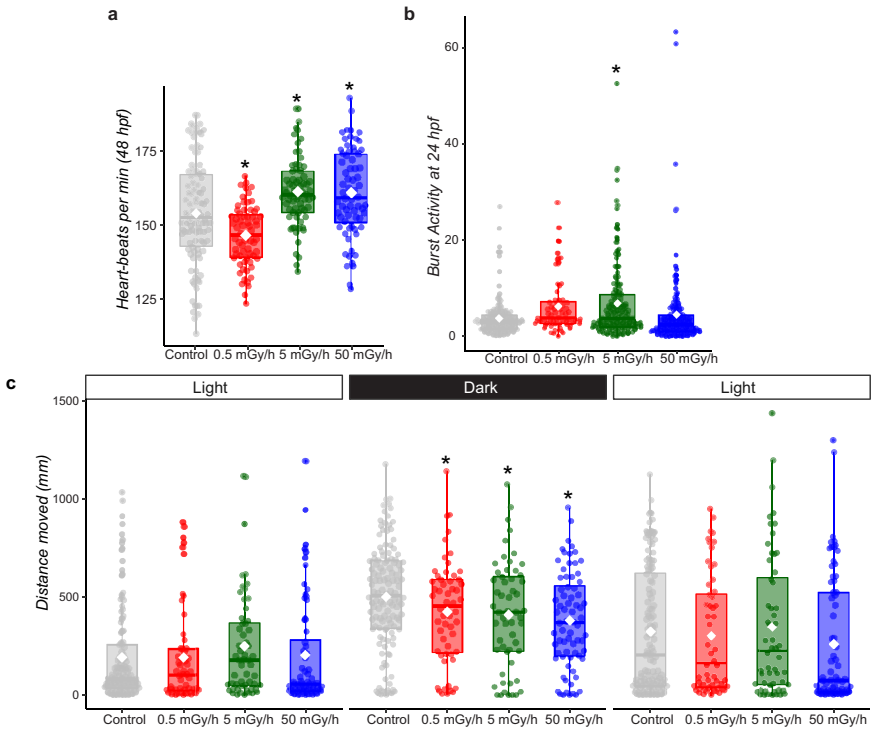


Figure 2. (**a**) Box-plot of cardiac activity shown as heart beats per minute in 48 hpf larvae. Dots represent individual data. Means are indicated as white lozenge (Kruskall-wallis test followed by a pairwise Wilcoxon rank sum post-hoc test and adjusted by the Holm method, adjusted p-value: * < 0.05). (**b**) Box-plot of embryonic burst activity at 24 hpf. Means are indicated as white lozenge (significance of permutation test p-value: * < 0.05). (**c**) Box-plot of larval motility with the visual motor response test 120 hpf followed over three consecutive light cycles of 5 min (indicated at the top). The mean distance travelled by larvae is indicated as white lozenge. Results of a permutation test are indicated (* p-value < 0.05).

Table T6). The protein chaperons *hsp70l* and *hspb1* involved in stress response, were upregulated at 24 hpf at 5 and 50 mGy/h. The detailed analysis of gene expression in the different conditions showed a deregulation of developmental processes at different phases of cell specification and differentiation. For instance, *myog*, *lef1*, *tbx16*, *gata6* and *rdh10b*, expressed during the early phase of embryonic development but not at later stage, were mis-regulated at 24 hpf for the two highest dose rates, while *elavl4* and *cux1*, involved later in the neuronal differentiation process, were altered at 48 hpf and 96 hpf (Supplementary Fig. S6).

Deregulation of transcription factors expression after exposure to chronic irradiation. TF are key regulators that orchestrate the developmental program in a time and tissue specific manner. TF were categorized into families based on their DNA-binding domains (see Material and Methods section and Supplementary Table T3) and their differential expression assessed over developmental time at the three dose rates of IR (Fig. 4a). The number of TF significantly deregulated after exposure to IR was higher in 24 hpf embryos and decreased in the subsequent developmental stages at 5 mGy/h and 50 mGy/h. At the lower dose rate of 0.5 mGy/h, the number of mis-regulated TF peaked at 48 hpf and remained always lower compared to the two other conditions. We then assessed the expression pattern of the 462 TF displaying a significant change in at least one condition by hierarchical clustering. The expression profiles of TF were very similar over developmental time for the exposures at 5 and 50 mGy/h (Fig. 4b). Fewer TF displayed an altered expression profile at 0.5 mGy/h compared to the higher dose rates, as observed before in the global gene expression analysis. Six different clusters were identified based on gene expression pattern. Cluster 1, 2 and 3 were composed of TF downregulated at 24 hpf or 48 hpf, and upregulated or unchanged at 96 hpf. TF belonging to clusters 4, 5 and 6 were in contrast strongly upregulated at 24 hpf and then mostly not changed or upregulated at 48 hpf and 96 hpf (Fig. 4b). Gene Ontology enrichments demonstrated a significant enrichment of TF involved in brain development, somitogenesis and response to cyclic organic compound in all 6 clusters (Fig. 4c). Expression patterns of key master regulators of neurogenesis such as *pax6b*, *her4.4* and *pou4f2*, and mesoderm development, *meox1*, *tal1* and *vox* were impaired (Fig. 4d). Many of these TF were highly expressed at 24 hpf or 48 hpf, but had little or no expression at 96 hpf (*pax6b*, *meox1*, *her4.4*, *vox* on Fig. 4d), consistent with their role during early cell specification processes. An analysis of the 1084 genes involved in the neurogenesis process (GO:0022008) confirmed that many neuronal genes were mis-regulated after chronic exposure, especially at 5 mGy/h and 50 mGy/h (Supplementary Fig. S7). Together, these data suggest that the developmental programs regulating muscle and central nervous system development are impaired in embryos and larvae exposed to 5 and 50 mGy/h, and to a lesser extent at 0.5 mGy/h.

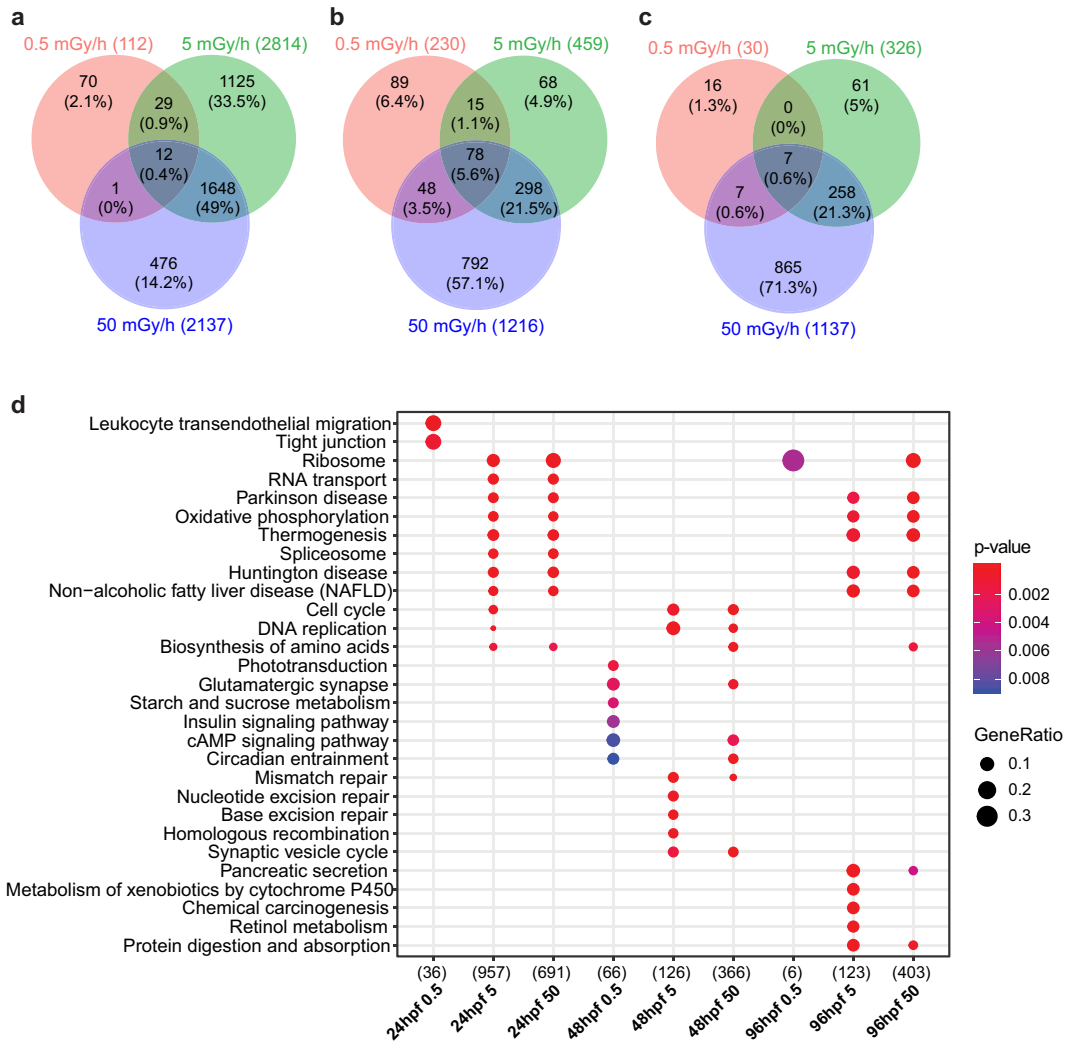


Figure 3. Venn diagram of differentially expressed genes at the three dose rates (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01), at (**a**) 24 hpf, (**b**) 48 hpf and (**c**) 96 hpf. The number of up or down-regulated genes are indicated in brackets. (**d**) Dot plot of KEGG enrichment with human orthology showing the top-enriched pathways. The total numbers of deregulated genes within the KEGG pathways selected on the dot plot are indicated in brackets. Colours indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test, and dots size is proportional to the number of genes constituting the given pathway.

TF binding sites analysis and proteomics coherently highlight impacts on neurogenesis and muscle development. The global analysis of expression data suggests that the development of the central nervous system and the muscles of embryos exposed to chronic irradiation are impaired. During embryogenesis, master transcriptional regulators orchestrate the expression dynamic of many genes and are central in the regulation of gene regulation networks. Genes with altered expression can be used to predict the master transcriptional regulators that drive changes in gene expression[17], thereby pin-pointing the key transcriptional processes affected by chronic exposure to IR. To do so, we analysed the promoter of all deregulated genes at 24 hpf, 48 hpf and 96 hpf, focusing on the highest dose rate of 50 mGy/h as this exposure leads to many DEG (required for such promoter analysis) and displays very similar transcriptomics responses compared to 5 mGy/h. We found that DNA binding sites of key TF involved in neurogenesis (HEY1, HES1, REST, ASCL1, NEUROG2, POU4F2), synaptogenesis (MEF2 family) and myogenesis (MEOX1) were highly enriched in the promoters of DEG at all stages (Fig. 5). We also noted that retinoic acid responsive elements (RARE), specific to the RA pathway, were also enriched in the promoters of DEG (Fig. 5). To confirm potential binding of TF on the promoter of DEG, we compared the list of potential transcriptional targets identified for HES1 and MEF2 in our study, to the ChIP-Seq data availed in ENCODE project[31]. From the initial 865 DNA-binding sites identified *in silico* for HES1 in our promoter analysis, 166 (20%) were *bona fide* transcriptional targets detected by ChIP-Seq experiments. Similarly, 79 out of 311 binding sites identified *in silico* (25%) were also detected in MEF2B ChIP-Seq data.

To further characterise the impacts of chronic irradiation stress observed at the transcriptomics scale, we performed a global analysis at the protein level by a proteomics analysis. This analysis was focused on the 96 hpf larvae exposed at the two highest dose rates, as the required protein quantities were limiting for the earlier

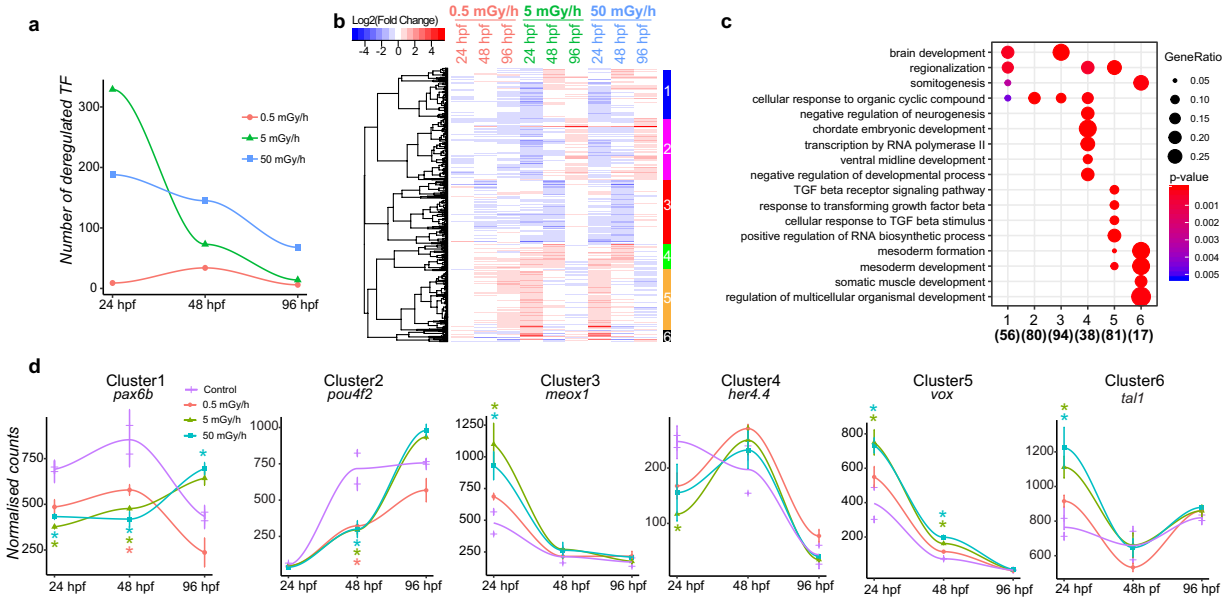


Figure 4. (**a**) Number of transcription factors (TF) with significant deregulation (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) over developmental time at three different dose rates. (**b**) Hierarchical clustering of 462 TF misregulated in at least one comparative analysis. Blue indicate downregulation, white no change and red upregulation, as compared to control conditions. Clusters of co-regulated genes are indicated at the right from 1 to 6. (**c**) GO enrichment of TF classified in 6 different clusters. Cluster number are indicated below, the total number of deregulated TF in each GO term in brackets. (**d**) Expression patterns (as normalised count) of key master regulators during development using loess smoothed conditional means. Cluster numbers are indicated at the top. *|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01.

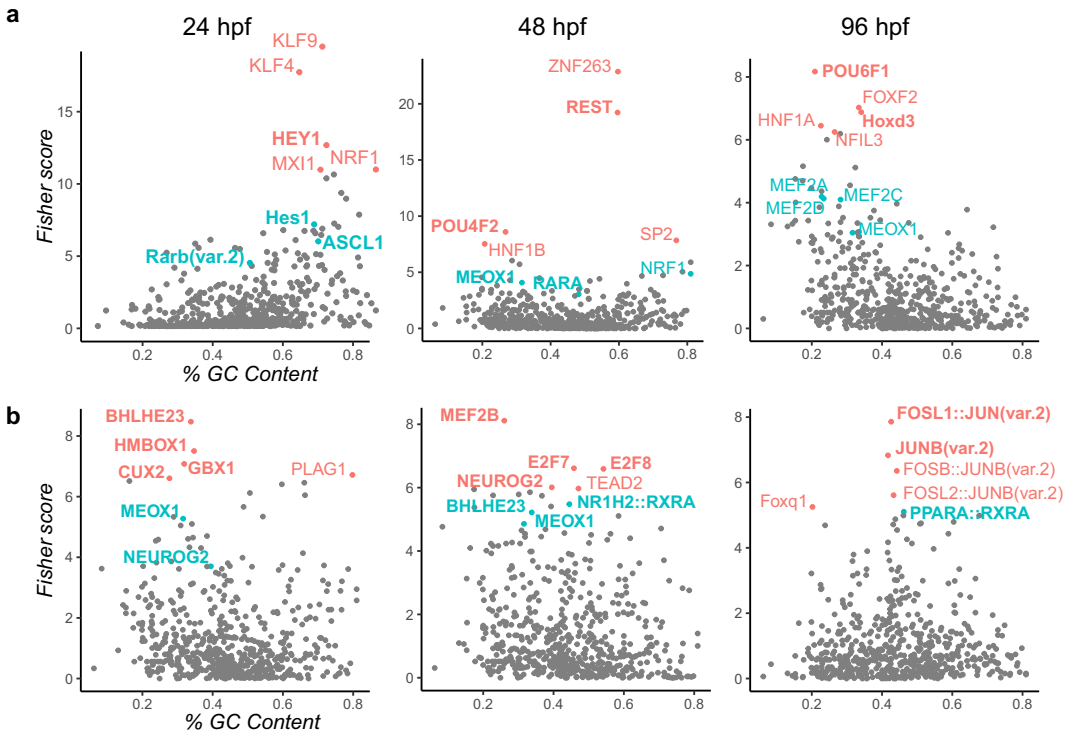


Figure 5. (**a**) Transcription factor binding sites enrichment in the promoters of upregulated genes, and (**b**) in downregulated genes at 24 hpf, 48 hpf and 96 hpf, after exposure to 50 mGy/h. Top 5 enriched transcription factor binding sites are indicated in red, and other binding sites of interest, near the limit of significance, in blue. Master regulators involved in neurogenesis, myogenesis, synaptogenesis and RA pathways are highlighted in bold.

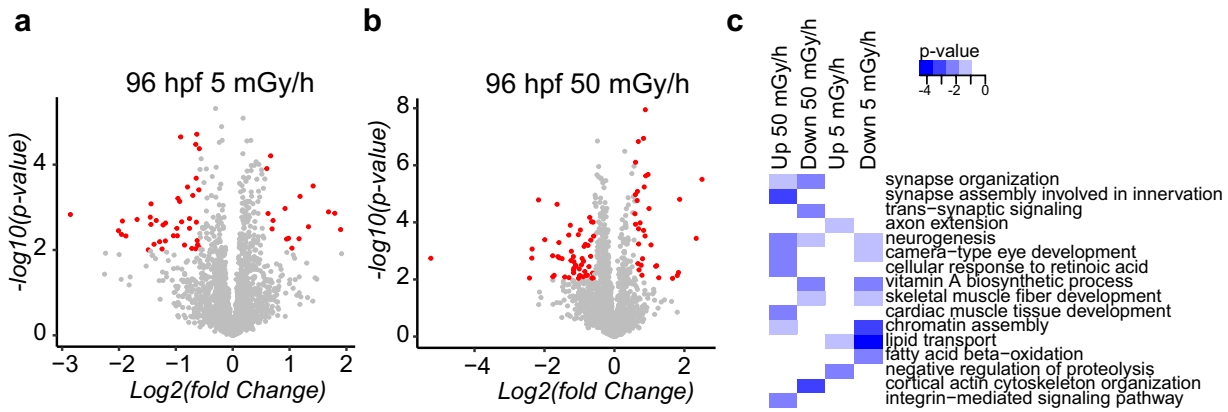


Figure 6. Volcano plots of deregulated proteins in 96 hpf larvae exposed (**a**) at 5 mGy/h and (**b**) at 50 mGy/h. Proteins with significant expression change (|fold change| ≥ 1.5 and p-value < 0.01) after IR exposure are highlighted in red. (**c**) Heatmap of GO terms enriched in the proteomics data. Significant p-values (Fisher's exact test) are in blue (< 0.01) and non-significant p-value in white.

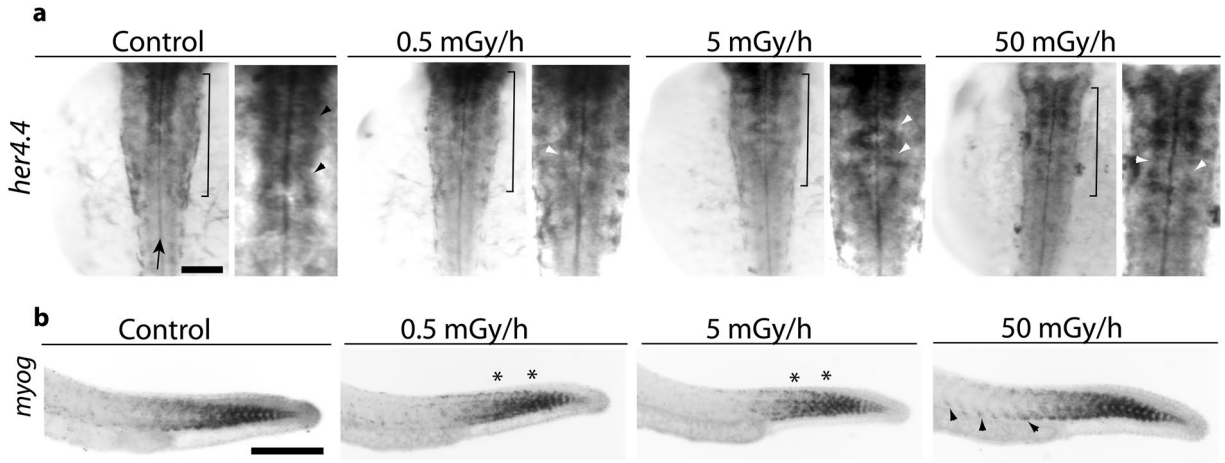


Figure 7. Whole mount RNA *in situ* hybridization on 24 hpf embryos. (**a**) Dorsal view of embryos oriented with anterior (head) towards to the top. Right pictures are higher magnifications of area indicated in the rhombencephalon by the black brackets. Black arrow indicates the position of the central canal. Black arrow heads indicate the position of *her4.4* positive neuronal progenitors flanking the central in control embryos and white arrow heads missing progenitors in exposed embryos. (**b**) Lateral view of 24 hpf embryos labelled with *myog*, anterior to the left. The black arrow heads indicate ectopic expression of *myog* in somites located in the anterior part of the trunk at 50 mGy/h. * Indicates the position of mis-shaped somites in the trunk. Scale bares: 200 µm.

developmental stages and the 0.5 mGy/h conditions had only mild effects (based on the transcriptomics data). We found respectively 56 (Supplementary Table T7) and 88 (Supplementary Table T8) differentially expressed proteins in 96 hpf larvae exposed at 50 mGy/h and 5 mGy/h (Fig. 6a,b). The molecular pathways significantly enriched in the proteomics data (p-value from Fisher's exact test < 0.01) were all related to neurogenesis, somitogenesis, synapse organisation and vitamin A metabolic processes (Fig. 6c). We could not find any direct significant correlations between proteins and mRNA expression (data not shown), as already described in previous multi-omics data[32].

Alteration of gene expression patterns and disruption of muscle ultrastructure. As the molecular data points coherently towards impairments of neurogenesis and muscle development after exposure to low dose rates of IR, we investigated if progenitor cell populations could be altered in the developing central nervous system (neural tube) and muscles (called somites in embryos) of zebrafish embryos. Whole mount RNA *in situ* hybridization analysis was produced on 24 hpf embryos (n = 10), a stage at which both neuronal and muscle progenitors are present. At 24 hpf, *her4.4* labels two strips of neuronal progenitors flanking the central canal in the hindbrain (the most posterior part of the anterior forebrain). We observed gaps and irregular expression of *her4.4* along the central canal in the hindbrain of exposed embryos at the three dose rates (Fig. 7a), which is consistent with the downregulation of *her4.4* observed by mRNAseq at 24 hpf (Fig. 4d). Differentiating muscle progenitors

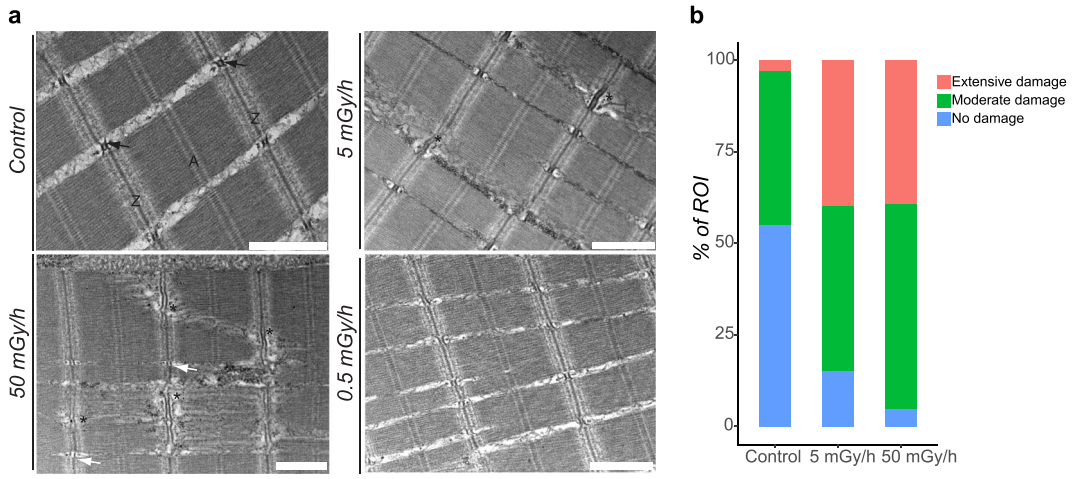


Figure 8. (**a**) Transmission electron microscopy of muscles in 96 hpf larvae. A and Z bands of sarcomeres are indicated. * Indicates altered myofibers. Arrows indicate the triads constituted of t-tubes and the two flanking cisterna of the sarcoplasmic reticulum (black: normal, white: deformed). Scale bares: 1 µm. (**b**) Categorization and quantification of myofiber damage. The percentage of TEM images defined as ROI (region of interest) displaying normal or damaged (moderate or extensive) myofibers was computed from at least 21 independent ROI in triplicate ($n > 71$ for each group).

are labelled in control embryos by *myog* in a well-defined chevron-shape pattern characteristic of developing somites. After exposure to 50 mGy/h, we detected ectopic *myog* positive cells located more anteriorly in the trunk compared to control (Fig. 7b). We could not detect such ectopic expression at 5 mGy/h and 0.5 mGy/h, but observed irregular expression of *myog* (asterisks in Fig. 7b) which suggests that somites have lost their classical chevron-shape.

We then performed an analysis of the muscle fibres and neuromuscular junctions at later developmental stage by transmission electron microscopy (TEM), in 96 hpf larvae. Sarcomeres, the structural unit of muscles, are organized in a regular succession of A and Z-bands in control larvae. In addition, we could detect well-defined t-tubules and the two flanking cisterna of the sarcoplasmic reticulum (Fig. 8a). In contrast, a frequent swelling of the Z-bands and detachments of the myofibers were detected in larvae exposed at 50 mGy/h and 5 mGy/h (Fig. 8a). In addition the cisterna of the sarcoplasmic reticulum were not well shaped at 50 mGy/h but looked normal at 5 mGy/h (Fig. 8a). No effects were detected in the striated muscles at 0.5 mGy/h. Myofiber damages observed by TEM were classified into three categories: no damage, moderate or extensive damages. A significantly higher proportion of damaged myofibers (Pearson's Chi-squared test adjusted by the Holm method, adjusted p-value $< 10^{-10}$) was detected by TEM in larvae exposed to 5 mGy/h and 50 mGy/h compared to control larvae (Fig. 8b).

Discussion

We analysed the biological effects of chronic exposure to IR at 0.5 mGy/h, 5 mGy/h and 50 mGy/h on zebrafish development at multiple levels of biological organisation. At the individual level, we observed a decrease of larval motility at 120 hpf at all dose rates during the dark phase of the larval motility test. Previous studies suggested that locomotion is strongly increased during this phase, allowing the detection of fine effects on photokinesis driven by deep-brain photoreceptors[33,34]. In addition to this effect on larval locomotion, we found subtle but significant changes in embryonic and cardiac activities at 24 hpf and 48 hpf respectively. By using TEM analysis on the striated muscles of 96 hpf larvae, we could observe myofiber disruptions and malformed sarcoplasmic reticulum at 5 mGy/h and 50 mGy/h. Muscle contraction being dependent on functional sarcoplasmic reticulum, these results suggest that neuromuscular functions could be impaired after exposure to IR at 5 mGy/h and 50 mGy/h. In favour of such hypothesis, the transcriptomics data showed that zebrafish genes mediating Ca^{2+} release in the sarcoplasmic reticulum, such as *ryr3* and *tnnt2d* were significantly downregulated (fold change < 2 and adjusted p-value < 0.01) in 24 hpf embryos at 5 mGy/h and 50 mGy/h. An alteration of myosin filaments at 0.03 mGy/h and 23.75 mGy/h has already been observed after exposure of zebrafish embryos[13], which is in accordance with our results that show disruption of myofibers by TEM. However, the direct links between altered neuromuscular junctions, somitogenesis defects and decreased larval locomotion remain to be clearly established.

At the molecular and cellular levels, we found that the biological processes of neurogenesis and muscle development were affected at dose rates as low as 0.5 mGy/h. In a precedent transcriptomics analysis of acute exposure of 26 hpf zebrafish embryos to high dose of IR (> 1 Gy), Freeman *et al.* showed misregulation of few genes involved in neurogenesis and cardiovascular development[23]. In the field of low dose rates, a recent study evaluated the effect of IR at 0.54 mGy/h and 10.9 mGy/h on 5.5 hpf embryos and showed that major developmental signalling pathways like Notch, RA signalling and apoptosis, were impaired during early zebrafish embryonic development[14]. However, this transcriptomics analysis was made after relative short irradiation time (5.5 hpf), and on developmental stage (mid-epiboly embryos) where the three embryonic layers (ectoderm, endoderm and mesoderm) are present but no cell-type specifications (such as neurogenesis or myogenesis) occurred yet. The

developmental consequences of early perturbations in Notch or RA signalling on neurogenesis were thus not directly assessed in this study. Our analysis extend those findings in the field of chronic low doses and provides a deeper mechanistic understanding of the motility effects observed at the individual level. Our data provide evidence that both neuronal and muscle development are affected at stages where these processes are ongoing (24 hpf to 96 hpf). However, in contrast to Hurem *et al.*[14], we did not detect drastic phenotypes such as embryonic deformities or mortality in zebrafish embryos exposed at dose rates as high as 50 mGy/h (total absorbed dose = 1.2 Gy at 24 hpf). Other studies that used either acute[35,36] or chronic[13] exposures to similar dose of IR did not detect strong developmental defects, in accordance with our data. Such discrepancy at the individual level could be due to differences in the maintenance of zebrafish embryos during the exposure to IR (for instance presence or absence of methylene blue in the embryos medium) or to the use of different gamma-sources (^{60}Co and ^{137}Cs).

Our transcriptomics analysis showed that only 5.6% of the DEG (78 genes) were common to all dose rates in 48 hpf larvae, while this number dropped to less than 1% at 24 hpf and at 96 hpf. We demonstrated that the criterion used to define DEG in our transcriptomics study ($|\text{fold change}| \geq 1.5$ and adjusted p-value < 0.01) is robust, since we could validate down or up-regulation by qRT-PCR and RNA *in situ* hybridization. The GO term analysis of genes deregulated in common in all conditions at 48 hpf showed that neuronal development, apoptosis and steroid hormone signalling (which includes thyroid hormones, vitamin D, and RA[37]) were impacted at dose rate as low as 0.5 mGy/h.

The study of TF expression profiles is commonly used as a fingerprint of gene regulatory networks activity that can predict adverse outcomes observed at higher organisational levels. In our study the molecular profiling of TF highlighted similar molecular responses at 5 mGy/h and 50 mGy/h for all developmental stages analysed. In comparison the transcriptomics effects at 0.5 mGy/h were moderate, but neurogenesis effects were still detected at the molecular level. The proteomics analysis on 96 hpf larvae exposed to 5 mGy/h and 50 mGy/h confirmed our transcriptomics data, as neurogenesis, muscle development and RA signalling were also perturbed at the protein level. Perturbations in synapse organisation were highlighted in the proteomics and the transcriptomics data at 96 hpf and 48 hpf respectively. In addition, the TFBS analysis demonstrated the enrichment of MEF2 DNA binding sites in the promoter of the DEG of the 96 hpf larvae exposed at 50 mGy/h, a gene family is involved in the development of inhibitory and excitatory synapses in the brain of mouse embryos[38]. It is thus possible that synaptogenesis is impaired in the IR exposed 96 hpf zebrafish larvae. Caution must be taken to TF binding site prediction as it is prone to false positive discovery, but the high overlap (> 20%) between TF binding sites prediction and human ChIP-Seq data from the ENCODE project supports the notion that the transcriptional responses to IR could contain direct transcriptional targets of MEF2 or HES1.

RA signalling was perturbed at different levels in our global analysis. Indeed, the transcriptomics data showed a deregulation of the RA pathway at the gene level (Supplementary Fig. S8) and we found an enrichment of RARE in the promoters of DEG. In addition, vitamin A metabolic process, a synonymous term for the RA pathway, was also enriched significantly in the functional analysis of the proteomic data in 96 hpf larvae at 50 mGy/h and 5 mGy/h. These three pieces of evidences strongly suggest that RA signalling is impacted by chronic exposure to IR at 5 mGy/h and 50 mGy/h. RA signalling was also deregulated in the transcriptomics data gained at 0.5 mGy/h, but changes in gene expression were milder compared to the two highest dose rates. From these we can conclude that RA signalling, neurogenesis and somitogenesis are impaired in embryos exposed to dose rates higher than 5 mGy/h for a duration of at least 24 hpf. Lower dose rate (0.5 mGy/h) or shorter exposure time to IR led also probably to RA deregulation, as observed in our transcriptomics data at 24 hpf and as proposed in Hurem *et al.* on 5 hpf embryos[14], but further functional analysis on RA signalling and its alteration by IR are needed to clearly establish a direct impact on neurogenesis and somitogenesis.

The RA pathway is a well-known morphogen involved in the anteroposterior patterning of the neural tube[39] and its function is conserved among vertebrates. Another crucial role of RA is the control of primary neurons number in the spinal cord of fish and amphibians, which forms a neuronal circuit to coordinate escape movements and are thus crucial for larval survival after hatching[40–42]. The deregulation of the RA pathways could thus be one mechanism linking neurogenesis defects and the impairment of embryonic activities at 24 hpf and larval locomotion observed in our study. The RA pathway is also involved in somitogenesis[43] and in neurites outgrowth[44]. Interestingly, evidences are also accumulating to link reduced or increased RA signalling with developmental defects like microcephaly and craniofacial malformations[45,46]. It is thus likely that the deregulation of this pathway can lead, at least in parts, to the congenital effects observed in exposed fetus in Chernobyl and Fukushima Daiichi. To investigate this possibility, it will be very interesting to raise the chronically irradiated zebrafish embryos to later developmental stages in order to study their brain size as well as the possible induction of apoptosis and DNA repair markers that could lead to cognitive dysfunctions and impairment of learning capabilities.

During neurogenesis, Notch-mediated lateral-inhibition plays a central role in the selection of undifferentiated progenitors to become committed neurons. In vertebrate embryos, the inhibition of the proneural genes *neurog1* and *ascl1*, which direct progenitors towards the neuronal fate, is mediated by transcription factors of the Hairy/Enhancer of Split family[47,48]. In addition, *her4* has another role during development as it is involved in the establishment of peripheral neuron projections in the trigeminal ganglion[49]. Our transcriptomics data showed that the *her4* family members (*her4.1, her4.2, her4.3* and *her4.4*) are downregulated (all fold change < -2 and adjusted p-value < 0.05) in 24 hpf embryos. By using whole mount *in situ* RNA hybridization, we found *her4.4* downregulation in groups of cells close to the central canal at all dose rates. The function of these cells is not known, but their location near the central canal suggests that they could be neuronal progenitors, and that IR could interfere with their differentiation into functional neurons. IR can also have an effect on neuronal migration. For instance, *in utero* acute irradiation of rat lead to ectopic neural populations in the cerebral cortex and hippocampus[50]. The disruption of expression pattern of *her4.4* observed in our study could thus be linked to an

effect of IR on neuronal migration, but further studies (for instance by immunostaining of different neuronal populations by sox2, blbp and neuN) are required to better characterise this phenotype.

Interestingly, other members of the Hairy/Enhancer of Split family were, in contrast to the *her4* family, upregulated at 24 hpf after exposure to lR, for instance *her1* and *her7* (fold change < -2 and adjusted p-value < 0.05). These genes also function downstream of Notch-signalling but are necessary for the somite clock: the genetic network that regulates somite patterning in a time-dependant manner[51]. The analysis of *myogenin* (*myog*) expression pattern, a key TF during muscle development, highlighted clear ectopic expression in anterior parts of the trunk at 50 mGy/h, where *myog* should not be expressed anymore, irregular expression of *myog* at 0.5 mGy/h and 5 mGy/h. A significant overexpression of *myog* was detected in the mRNAseq data at 50 mGy/h, which is consistent with the supernumerary *myog* cells observed by RNA *in situ* hybridization. These observations on gene expression in the neural tube and somites are coherent with the impairments of the genetic networks regulating neurogenesis and muscle development observed at the molecular levels.

The integration of the multi-level data acquired in this study highlights that RA signalling is a major pathway perturbed during embryonic development after chronic exposure to IR. In the AOP framework we can thus propose that the disruption of RA signaling could be a major key event leading to the perturbation of somitogenesis and neurogenesis with harmful consequences on cognition and behavior.

Material and Methods

Animal experimentation and ethics. Animals were housed in the IRSN animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live zebrafish. Animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decret 2013–118). All experiments were approved by the Comité d'Ethique en Expérimentation Animale at the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (C2EA, IRSN, France) and authorised by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#11488. Six to 9 month-old adults wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of the AB strain were provided by Amagen (Gif-sur-Yvette, France). Fish were maintained under constant conditions in a ZebTEC system (Techniplast, France) at 28 ± 1 °C, 350–450 µS/cm, pH 7.5 and 12/12 h dark-light cycles. Fish were fed three times per day with TetraMin tropical fish food flakes (Tetra Werke, Germany). Health was monitored by daily inspection. Males and females were kept separated in 8 L tanks, 20 fish per tank, until mated. Males and females were kept separated in the same 1.7 L breeding tank (Beach Style Design, Techniplast, France) the night before mating, keeping the temperature constant at 28 ± 1 °C during the reproduction. Couples were mated the next morning during 15 min in fresh water. Eggs from all clutches were pooled and grown in 25 mL embryo medium (60 mg/L Instant Ocean, 0.01% (w/v) of methylene blue) under constant temperature (28.5 ± 0.2 °C) and dark-light cycles in MIR-154 incubator (Panasonic). Viable embryos were grown up to 120 hpf, reporting embryonic mortality daily. All experiments were conducted with a percentage of fertilization $> 80\%$.

Irradiation and dosimetry. Embryos were chronically exposed to gamma irradiation from the four-cell stage (1 hpf) up to 120 hpf by a ^{137}Cs source of 370 GBq (Framatome ANP, Pierrelatte, France) in the MICADO experimental irradiation facility (IRSN, Cadarache, France). Clutches from 20 couples were polled and 50 fertilized embryos placed in 25 mL of 60 mg/L Instant Ocean, 0.01% (w/v) of methylene blue. Each condition consisted of three dishes (technical replicates), and the whole irradiation process was performed independently at least 3 times (three biological replicates). Non-fertilized eggs (coagulated eggs) were removed under the binocular at 24 hpf. Data loggers were placed in the MIR-154 incubators (Panasonic) in order to measure temperature stability during irradiation. Absorbed dose rates in 100 mm diameter Petri-dish containing 25 mL of fish water and air kerma rates were computed with the Monte-Carlo N-Particle transport code (MCNPX version X-24E). Operational dosimetry with radio-photoluminescent dosimeters (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation Japan) was used to confirm the simulations of the exposure to dose rates of 50 mGy/h, 5 mGy/h and 0.5 mGy/h and monitoring the radiation exposure. The effective dose rates were 46.80 ± 0.98 mGy/h, 5.13 ± 0.02 mGy/h and 0.48 ± 0.00 mGy/h (Supplementary Table T1). For hatching tests, homogeneous dose rate within 96 plates was checked, as before, for the three doses by MCNP computations followed by operational dosimetry with radio-photoluminescent dosimeters.

Sequencing libraries preparation and data generation. Sequencing libraries were prepared from 1 µg of total RNA (extracted as described in Supplementary Material and Methods) with stranded TrueSeq mRNA version 2 kits and unique dual indexes from Illumina following manufacturer instructions. cDNA integrity, quality and concentration were assessed on DNA 1000 Chips (Bioanalyzer 2011, Agilent). Libraries were multiplexed at 2 nM and run on a NovaSeq. 6000 to produced 50 bases long paired-end reads at the Clinical Research Sequencing Platform (Broad Institute, MIT, United States).

Transcriptomics data analysis. Quality over read length, duplication rates, insert size, adaptors contamination, nucleotide composition and mapping rates were controlled for each sample with an in house Perl script wrapping fastqc v0.11.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), cutadapt v1.10[52] and Picard v2.5.0 (http://broadinstitute.github.io/picard/). Raw reads were subjected to quality selection (Phred score $Q > 30$) and adapter trimming with Trimgalor v0.4.2. Between 77–132 millions of good quality reads were produced for each sample (Supplementary Table T2). Trimmed reads were mapped against the GRCz11 zebrafish reference genome using RNA-STAR v020201[53], with the known exon-exon junctions from Ensembl release 95[54]. For all samples, the percentage of uniquely mapped reads against the reference genome was $> 70\%$, aligned pairs duplication level $< 0.7\%$ and percentage of adapters $< 0.1\%$. Details on Phred quality over read length, mapping statistics against the zebrafish genome and %GC are provided in Supplementary Fig. S2. Hierarchical clustering

of the variance stabilized expression data was produced with Pearson's correlation and complete-linkage method. Potential outliers were removed in order to increase the power of the differential analysis. This led to the selection of 46 samples from the original set of 53 samples (Supplementary Fig. S1). Transcriptomics data were analysed in R using rlog normalised expression data and differential expression analysis obtained with DESeq. 2 v1.22.2[55]. Genes with |fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01 (False Discovery Rate) were considered as differentially expressed. Hierarchical clustering of normalised expression data (rlog) or fold changes from DESeq. 2 were made with the R package *hclust* using Pearson's correlation and the complete-linkage method.

Functional enrichments of transcriptomics data. Gene ontology (GO)[56] and KEGG[57] functional enrichments were performed using the R packages *topGO*[58] and *clusterProfiler*[59]. Enrichments with GO were performed with the zebrafish deregulated genes obtained from DESeq. 2. For KEGG analysis, we used the human gene orthologues with at least 30% homology using *biomaRt*[60]. Enrichments with p-value from Fisher's exact test < 0.01 were considered significant. MA-plots, heat maps, histograms and Venn diagrams were produced using the R package *ggplot2*[61]. Selection of genes involved in the RA pathway were fetched with *biomaRt* using the GO terms: retinol metabolic process (GO:0042572) and retinoid metabolic process (GO:0001523). The selection of genes involved in neurogenesis was performed the same way using the GO term: neurogenesis (GO:0022008). Selection of DNA-binding TF was made, as published before[30], using a selection of 609 curated DNA-binding domains, except that the list was updated for Interpro v72[62] (Supplementary Table T3). Ensembl genes identifiers for all TF mapped in GRCz11 release 95 were retrieved using *biomaRt*. A total of 462 unique TF with a significant change (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) in at least one comparative analysis were used for hierarchical clustering of averaged fold changes.

Transcription factor binding site analysis. Significantly (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) up and downregulated genes after exposure to 50 mGy/h at 24 hpf, 48 hpf and 96 hpf were searched for enrichments of TF DNA binding sites in their promoter sequences. A set of 5000 randomly chosen promoters was used as background. Promoter sequences were defined as DNA genomic sequences 2 kb upstream and 50 bp downstream the transcriptional start site and were retrieved via the Perl Applied Program Interface from Ensembl release 95. The resulting promoter sequences were searched for enrichment of TFBS with OPOSSUM v3[63] and hidden Markov matrix models from Jaspar core-vertebrate database v2018[64]. Binding sites with Z-score > 6 and Fisher-score > 3 were considered significantly enriched. ChiP-Seq data in Bed format were retrieved from ENCODE[31] for HES1 (ENCSR091JXL) and MEF2B (ENCSR177VFS). Enriched TFBS from OPPOSOM and binding sites from ChIP-Seq data were compared at the level of genomic coordinates by fetching human orthologues of zebrafish genes and checking overlap in 2 kb promoters of each potential target gene using the R package *GenomicRanges*[65].

Mass spectrometry analysis. Mass spectrometry analysis were done as already described previously[66]. Briefly, peptides obtained after trypsinisation were diluted in solvent A (0.1% v/v formic acid in 2% v/v acetonitrile) and concentrated using a pre-column (C18 PepMap100, 2 cm × 100 µm I.D, 100 Å pore size, 5 µm particle size, Dionex). Peptides were separated on a reverse phase Liquid Chromatography column (PepMap RSLC C18, 50 cm × 75 µm I.D, 100 Å pore size, 2 µm particle size, Dionex). Peptides were eluted by a two steps linear gradient of 4–20% v/v acetonitrile/H_2O, 0.1% v/v formic acid for 220 min and 20–45% v/v acetonitrile/H_2O, 0.1% v/v formic acid for 20 min at 300 nL/min flow rate and 40 °C. Peptide ionization was performed using an EASY-Spray nanosource (2.2 kV and capillary temperature set at 275 °C), and MS spectra acquired with an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) using the following settings: m/z 400–160, FWHM resolution of 120 000 (measured at 200 m/z), AGC target set at 4.105 with 50 ms Maximum Injection Time, time between Masters Scans set to 3 seconds. The more abundant precursor ions were selected for MS/MS analysis. Collision induced dissociation fragmentations at 35% were performed and analyzed in the ion trap using: "Inject Ions for All Available Parallelizable time", maximum injection time of 300 ms, AGC target set at 4.10^3, charge state screening enabled to include precursors with 2 and 7 charges, dynamic exclusion enabled with one repeat count and duration of 60 sec.

Quantitative proteomics processing. Data processing was performed using MaxQuant v1.6.1.0, computing relative intensities based on label-free quantification (LFQ) with the MaxLFQ algorithm. Mass spectra and differential protein expression analysis were performed as described before using Perseus v1.6.1.3[66]. Briefly precursors ions identification was performed using the *Danio rerio* UniProt protein database (12th of February 2019 with 58994 entries) supplemented with 245 proteins commonly found as contaminants and a false positive rate of 1% for protein identification. Normalised intensity LFQ were log2 transformed to obtain a normal distribution and differentially expressed proteins identified by a multiple ANOVA t-test or student t-test, controlling the false positive rate (1% with 250 permutations). |fold-change| ≥ 1.5 and p-values < 0.01 were considered as significant. Functional analysis of proteomic data was performed with topGO using zebrafish proteins identifiers.

γ-H2AX analyses. Dechorionated 24 hpf embryos and 48 hpf larvae were fixed in 4% w/v paraformaldehyde (PAF) overnight at 4 °C and transferred in 100% v/v methanol at −20 °C until use. Samples were rehydrated in a decreasing gradient of methanol diluted in phosphate-buffered solution (PBS) v/v at 70%, 50% and 25% for 5 min each and washed 4 times 5 min in PBS +0.1% v/v Tween 20 (PBST). Embryos and larvae were permeabilized with proteinase K at 10 µg/mL for 3 and 30 min respectively, and fixed for 20 min in 4% w/v PAF at 4 °C. The samples were washed 5 times 5 min in PBST, incubated 3 hours at room temperature with blocking buffer 0.2% w/v BSA and 1% v/v DMSO diluted in PBST, and incubated at 4 °C overnight with the γ-H2AX antibody (GTX127342, GeneTex, France) diluted at 1:200 in blocking solution. The next day, samples were washed five times 15 min in PBST, and incubated 2 h at room temperature with anti-rabbit-FITC antibody (F0382, Sigma-Aldrich, France)

diluted to 1:200 in PBST. After 5 washes of 5 min in PBST, nuclei were stained 1.5 h in 300 nM DAPI in PBS, washed 2 times 5 min in PBST and kept protected from light at 4 °C until confocal analysis. Image acquisition was performed using a laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, France) equipped with a 20x dry objective. For FITC fluorescence, excitation was set to 488 nm and emission acquired between 510/550 nm. For DAPI detection, excitation was performed at 405 nm and detection between 420/500 nm. Embryos and larvae were mounted on 35 mm imaging dish with a polymer coverslip bottom (Ibidi, Germany) and oriented laterally in a 2% w/v methyl-cellulose solution for image acquisition. Ten embryos or larvae per condition were analysed, focusing in the trunk region located above the yolk extension. Smooth filtering was applied on TIFF images in ImageJ[67] to increase the signal to noise ratio and background subtracted for each image. An average of 50 regions of interest (ROI) were chosen per embryos or larvae in duplicated experiments. At least 1200 nuclei were detected for each condition with the ImageJ tool ROI manager, and γ-H2Ax foci counted with the ImageJ function *Find Maxima* to compute the number of positive foci per nuclei. Analyse of normality showed that these data were not normally distributed. Hence, a Kruskall-wallis test was performed followed by pairwise Wilcoxon rank sum test as post-hoc tests and p-values were adjusted by the Holm method. Adjusted p-values < 0.05 were considered as significant.

Body length measurement. Ten 48 hpf old larvae were immobilized in 2% w/v methylcellulose with 0.02% w/v MS-222 (Sigma-Aldrich, France) in PBS 1X to avoid movement during measurement. Pictures were taken under a Nikon SMZ800 stereomicroscope equipped with a high-resolution camera (acA1300-50gm, Basler, Germany). Images analysis to measure body length were performed with DanioScope v1.1.110 (Noldus Information Technology, Netherlands) from 67 to 101 larvae per condition. After control of normality, a one way ANOVA test was performed.

Cardiac activities. Larvae were acclimated for 30 min in the illuminated incubator (AquaLytic, Germany) at 28 ± 1 °C located in the behavioural room. Ten 48 hpf larvae immobilized in 2% w/v methylcellulose with 0.02% w/v MS-222 (Sigma-Aldrich, France) in PBS 1X to avoid movements with an acclimation step of two minutes in the behavioural room. MS-222 concentration used in the present study was about 2 times higher than the EC_{50} found for 72 hpf zebrafish larvae 1 h after exposure[68], in order to ensure that larvae were immotile during the short time of video recording (< 3 min). All larvae swam normally when placed back in clean embryo medium. Video recording was performed under a stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to a high-resolution camera (acA1300-60gm, Basler, Germany). A delay of 30 sec was respected before each video acquisition to avoid stress bias. The Media Recorder Software v.4.0.542.1 (Noldus Information Technology, Netherlands) was used for recording 30 sec long videos at frame rate = 25 Hz. Analysis were performed using DanioScope Software v.1.1.110 (Noldus Information Technology, Netherlands). The cardiac frequency measurement was computed from at least 61 larvae per condition. As these data were not normally distributed, a Kruskall-wallis test was performed followed by pairwise Wilcoxon rank sum test as post-hoc tests and the p-values were adjusted by the Holm method. Adjusted p-values < 0.05 were considered significant.

Embryonic activity and larval motility tests. For all behavioural experiments embryos or larvae were acclimated for 30 min in the illuminated incubator (AquaLytic, Germany) at 28 ± 1 °C located in the behavioural room (itself set to 28 °C). For the embryonic activity at 24 hpf, ten embryos were immobilized in 2% w/v methylcellulose in PBS to avoid drift during video recording performed under a stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to a high resolution camera (acA1300-60gm, Basler, Germany). A delay of 2 min was respected before each video acquisition to avoid stress bias. Media Recorder Software v.4.0.542.1 (Noldus Information Technology, Netherlands) was used for recording 5 min long videos at frame rate = 25 Hz. Analysis were performed using DanioScope Software v.1.1.110 (Noldus Information Technology, Netherlands). Burst activity, determined as the percentage of time the embryo is moving, was computed from 147 to 250 embryos per condition in triplicates.

For the visual motor test, triplicated experiments of 56 to 128 larvae (120 hpf) per condition were placed in 24 wells plates filled with 2 mL of embryo medium. Test was performed the afternoon which is the most stable period for larval activity[69]. Control and exposed larvae were placed within each plate to avoid batch effects and analysed in the DanioVision Observation Chamber coupled with the DanioVision Temperature Control Unit (Noldus Information Technology, Netherlands) set to 28 ± 0.1 °C. An acclimation period of 10 min with light off was allowed for each plate inside the DanioVision Observation Chamber. Recording of videos started to track larval motility (defined as the distance moved in mm) over 3 phases: i) 5 min with light on, ii) 5 min light off and iii) 5 min light on. Videos were recorded and analysed with Ethovision XT Software v.13.0.1216 (Noldus Information Technology, Netherland). Statistical analysis of embryonic and larval locomotor activities was made by applying a linear mixed effect model with treatments as fixed effect using the R package *nlme*. Indeed, larvae within one replicate are more similar to each other than larvae in other replicates, especially in terms of growth since the videos were not strictly taken at the same time during the day. Replicates were thus used as a random effect in the model. Permutation tests, based on the linear mixed effect model were used to compare each treatment to control. Permutation tests were made with the R package *pgirmess*. p-value < 0.05 were considered as significant.

Transmission electron microscopic analysis. Samples preparation and TEM microscopy analysis were performed as described previously[70]. More specifically, 96 hpf larvae were individually fixed with 2.5% w/v glutaraldehyde in 0.1 M, pH 7.4 sodium cacodylate buffer for two days at 4 °C. Larvae were washed three times 5 min with the same buffer and post-fixed 1 h with 1% w/v osmium tetroxide in cacodylate buffer. Embryos were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in monomeric resin (Epon 812, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Sections for optical and electron microscopy of 500 nm and 80 nm respectively were obtained using an ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). TEM observations were made on 80 nm thick and 3 mm long sections mounted on copper grids. Images were taken with an

electron microscope (Tecnai 12G Biotowin, Netherlands) equipped with a CCD camera (Megaview III, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany) with an accelerating voltage of 100 KeV. At least 20 ROI were taken for each individual in triplicates. ROI were categorised for the two highest dose rates (50 mGy/h and 5 mGy/h) and control groups according to the degree of surface damage observed: no damage, moderate or extensive damage. The percentage of TEM images defined as ROI was computed from at least 21 independent ROI in triplicate ($n > 71$ for each group). Data being categorical, the statistical analysis was done using a Pearson Chi-squared test and the p-values adjusted by the Holm method. Adjusted p-value < 0.05 were considered as significant.

Whole mount RNA *in situ* hybridization and image acquisition. Antisense RNA probes labelled with digoxygenin (DIG) for *her4.4* and *myogenin* were generated from 24 hpf embryos as follows. Total RNA extraction from 24 hpf embryos was performed using a TRIzol/chloroform extraction (Life Technologies), with the exception that an additional chloroform extraction step was performed before the isopropyl alcohol precipitation of nucleic acids. Reverse transcription was made using SuperScript III (Life Technologies), dNTP, polydT primers and 1 µg of total RNA following manufacturer instructions. Gene specific PCR amplification was done using Taq platinum kit (Life Technologies) with 1 µL of RT and using the primers pairs: *her4.4* forward CCTGACGGAGAACTGAACACA, *her4.4* reverse GCAGAGCAAGAATCCTTCAATGA, *myogenin* forward AGTTGGTGTGGAGCAGTTGT, *myogenin* reverse GCCTTCCTGACTGCCTTAAGT. PCR were validated by electrophoresis on 1.2% w/v agarose gel and cloned into PCRII dual promoter bacterial vector following kit instructions (TOPO TA Cloning, Invitrogen). Chemically competent TOP10′ *E. coli* (Invitrogen) were transformed with 2 µL of ligation product, plated on Petri dish with LB agar with 100 µg/mL Ampicillin and incubated over night at 37 °C. At least three colonies for each construct were picked and grown individually in liquid LB medium with 100 µg/mL of Ampicillin overnight at 37 °C. Plasmid DNA were extracted following the alkaline lysis protocol and sent for Sanger sequencing to check cDNA identity and orientation of cloning in the PCRII vector. Antisense RNA probes were generated by cutting the DNA plasmid at the 5′ end of the cDNA, followed by a phenol/chloroform extraction of the linearized vector, and *in vitro* transcription of the Dig RNA probes with T7 or Sp6 RNA polymerase and the Dig-UTP labelling mix (Roche). Whole mount RNA *in situ* hybridization labelling was made following the protocol from Zfin (https://zfin.org/ZFIN/Methods/ThisseProtocol.html). At least 10 embryos were used per condition. Briefly, 24 hpf embryo were fixed overnight at 4 °C in 4% w/v PAF and transferred in 100% v/v methanol at −20 °C until use. Samples were rehydrated in a decreasing gradient of methanol diluted in PBS v/v at 70%, 50% and 25% for 5 min each and then washed 4 times 5 min in PBST. Embryos and larvae were incubated in proteinase K at 10 µg/mL for 3 min, fixed for 20 min in 4% w/v PAF at 4 °C and washed 3 times 5 min in PBST. Embryos were incubated 4 hours at 65 °C with RNA hybridization buffer and put in contact overnight with 100 ng of gene specific DIG-labelled RNA probes diluted in RNA hybridization buffer. Embryos were washed 15 min at 65 °C in four consecutive washing buffers, 3 times in PBST at room temperature, incubated 3 h at room temperature with blocking buffer and incubated at 4 °C with anti-Digoxigenin-AP Fab fragment antibody (Roche Diagnostics GmbH, Germany) diluted 1:4000 in blocking buffer. Then, embryos were washed 5 times with PTW buffer before staining with NBT/BCIP (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Each *in situ* hybridization staining was repeated at least 2 times. Expression patterns were observed under a Nikon binocular (SMZ800N) equipped with a Toupcam U3CMOS 10000KPA camera (ToupTek Photonics, China). Images of representative embryos were taken for each group, when phenotypes could be observed under the binocular in at least 50% of the embryos ($n = 10$).

Supplementary material and methods. A description of protocols for hatching rate, extraction of total RNA and proteins, as well as Taq-man assay can be found in Supplementary Material and Methods.

Data availability

All transcriptomics data are accessible in the GEO repository under the accession number GSE134634.

Received: 25 July 2019; Accepted: 13 December 2019;
Published online: 27 December 2019

References

1. Smith, J. T. & Beresford, N. A. Introduction. in *Chernobyl — Catastrophe and Consequences* 1–34, https://doi.org/10.1007/3-540-28079-0_1 (Springer Berlin Heidelberg, 2005).
2. Garnier-Laplace, J., Beaugelin-Seiller, K. & Hinton, T. G. Fukushima Wildlife Dose Reconstruction Signals Ecological Consequences. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 5077–5078 (2011).
3. Møller, A. P., Bonisoli-Alquati, A., Rudolfsen, G. & Mousseau, T. A. Chernobyl Birds Have Smaller Brains. *PLoS One* **6**, e16862 (2011).
4. Hayama, S.-I. *et al.* Small head size and delayed body weight growth in wild Japanese monkey fetuses after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. *Sci. Rep.* **7**, 3528 (2017).
5. Miller, R. W. & Blot, W. J. Small head size after in-utero exposure to atomic radiation. *Lancet (London, England)* **2**, 784–7 (1972).
6. Otake, M. & Schull, W. J. *In utero* exposure to A-bomb radiation and mental retardation; a reassessment. *Br. J. Radiol.* **57**, 409–414 (1984).
7. Otake, M., Schull, W. J. & Lee, S. Threshold for radiation-related severe mental retardation in prenatally exposed A-bomb survivors: a re-analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**, 755–63 (1996).
8. UNSCEAR. *Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2010: 57th session: summary of low-dose radiation effects on health*. (2010).
9. Graupner, A. *et al.* Gamma radiation at a human relevant low dose rate is genotoxic in mice. *Sci. Rep.* **6**, 32977 (2016).
10. Olipitz, W. *et al.* Integrated Molecular Analysis Indicates Undetectable Change in DNA Damage in Mice after Continuous Irradiation at ~ 400-fold Natural Background Radiation. *Environ. Health Perspect.* **120**, 1130–1136 (2012).
11. Osipov, A. N. *et al.* Comparison *in vivo* Study of Genotoxic Action of High- Versus Very Low Dose-Rate gamma-Irradiation. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* **2**, 223–32 (2004).

12. Wickliffe, J. K. *et al*. Exposure to chronic, low-dose rate gamma-radiation at Chornobyl does not induce point mutations in Big Blue mice. *Environ. Mol. Mutagen.* **42**, 11–18 (2003).
13. Gagnaire, B. *et al*. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. *Aquat. Toxicol.* **169**, 69–78 (2015).
14. Hurem, S. *et al*. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. *PLoS One* **12**, e0179259 (2017).
15. Mennetrier, L. *et al*. zHSF1 modulates *zper2* expression in zebrafish embryos. *Chronobiol. Int.* **35**, 1008–1015 (2018).
16. Etard, C. *et al*. Loss of function of myosin chaperones triggers Hsf1-mediated transcriptional response in skeletal muscle cells. *Genome Biol.* **16**, 267 (2015).
17. Veerla, S. & Höglund, M. Analysis of promoter regions of co-expressed genes identified by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* **7**, 384 (2006).
18. Bal-Price, A. *et al*. Developing and applying the adverse outcome pathway concept for understanding and predicting neurotoxicity. *Neurotoxicology* **59**, 240–255 (2017).
19. Ankley, G. T. *et al*. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 730–741 (2010).
20. Strähle, U. *et al*. HeRBi: Helmholtz Repository of Bioparts. *Zebrafish* **13**, 234–5 (2016).
21. Ferg, M. *et al*. Gene transcription in the zebrafish embryo: regulators and networks. *Brief. Funct. Genomics* **13**, 131–43 (2014).
22. Howe, D. G. *et al*. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Res.* **41**, D854–D860 (2012).
23. Freeman, J. L., Weber, G. J., Peterson, S. M. & Nie, L. H. 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 (2014).
24. Pereira, S. *et al*. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environ. Toxicol. Chem.* **30**, 2831–2837 (2011).
25. Hellou, J. Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **18**, 1–11 (2011).
26. Menelaou, E. *et al*. Embryonic motor activity and implications for regulating motoneuron axonal pathfinding in zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1080–1096 (2008).
27. Drapeau, P. *et al*. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* **68**, 85–111 (2002).
28. Pham, D.-H. *et al*. Use of Zebrafish Larvae as a Multi-Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles. *Sci. Rep.* **6**, 37145 (2016).
29. Everaert, C. *et al*. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci. Rep.* **7**, 1559 (2017).
30. Armant, O. *et al*. Genome-wide, whole mount *in situ* analysis of transcriptional regulators in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **380**, 351–62 (2013).
31. Davis, C. A. *et al*. The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D794–D801 (2018).
32. Haider, S. & Pal, R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr. Genomics* **14**, 91–110 (2013).
33. Fitzgerald, J. A., Kirla, K. T., Zinner, C. P. & Vom Berg, C. M. Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Sci. Rep.* **9**, 13647 (2019).
34. Fernandes, A. M. *et al*. Deep Brain Photoreceptors Control Light-Seeking Behavior in Zebrafish Larvae. *Curr. Biol.* **22**, 2042–2047 (2012).
35. Bladen, C. L., Lam, W. K., Dynan, W. S. & Kozlowski, D. J. DNA damage response and Ku80 function in the vertebrate embryo. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3002–10 (2005).
36. Geiger, G. A. *et al*. Zebrafish as a "Biosensor"? Effects of Ionizing Radiation and Amifostine on Embryonic Viability and Development. *Cancer Res.* **66**, 8172–8181 (2006).
37. Benoit, G., Malewicz, M. & Perlmann, T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* **14**, 369–376 (2004).
38. Harrington, A. J. *et al*. MEF2C regulates cortical inhibitory and excitatory synapses and behaviors relevant to neurodevelopmental disorders. *Elife* **5**, e20059 (2016).
39. Maden, M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 843–853 (2002).
40. Brustein, E. *et al*. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol. Paris* **97**, 77–86 (2003).
41. Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 755–765 (2007).
42. Goulding, M. Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 507–18 (2009).
43. Vermot, J. & Pourquié, O. Retinoic acid coordinates somitogenesis and left–right patterning in vertebrate embryos. *Nature* **435**, 215–220 (2005).
44. Chen, N. & Napoli, J. L. All- *trans* -retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARα. *FASEB J.* **22**, 236–245 (2008).
45. Collins, M. D. & Mao, G. E. Teratology of Retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 399–430 (1999).
46. Koide, T. Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes Dev.* **15**, 2111–2121 (2001).
47. Hans, S. *et al*. her3, a zebrafish member of the hairy-E(spl) family, is repressed by Notch signalling. *Development* **131**, 2957–2969 (2004).
48. Bae, Y.-K., Shimizu, T. & Hibi, M. Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* **132**, 1375–85 (2005).
49. So, J.-H. *et al*. Her4 is necessary for establishing peripheral projections of the trigeminal ganglia in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 22–26 (2009).
50. Najm, I. M., Tilelli, C. Q. & Oghlakian, R. Pathophysiological mechanisms of focal cortical dysplasia: a critical review of human tissue studies and animal models. *Epilepsia* **48**(Suppl 2), 21–32 (2007).
51. Choorapoikayil, S., Willems, B., Ströhle, P. & Gajewski, M. Analysis of her1 and her7 Mutants Reveals a Spatio Temporal Separation of the Somite Clock Module. *PLoS One* **7**, e39073 (2012).
52. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB net. journal* **17**, 10 (2011).
53. Dobin, A. *et al*. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
54. Zerbino, D. R. *et al*. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
55. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq. 2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
56. Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. & Thomas, P. D. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **47**, D419–D426 (2019).
57. Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K. & Tanabe, M. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **47**, D590–D595 (2019).
58. Adrian Alexa, J. R. topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.36.0. (2019).

59. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q.-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).
60. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–1191 (2009).
61. Wickham, H. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. In *ggplot2* 1–7, https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3_1 (Springer New York, 2009).
62. Mitchell, A. L. *et al.* InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **47**, D351–D360 (2019).
63. Kwon, A. T., Arenillas, D. J., Worsley Hunt, R. & Wasserman, W. W. oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. *G3 (Bethesda).* **2**, 987–1002 (2012).
64. Khan, A. *et al.* JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **46**, D260–D266 (2018).
65. Lawrence, M. *et al.* Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003118 (2013).
66. Dubois, C. *et al.* Differential modification of the C. elegans proteome in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. *Sci. Total Environ.* **676**, 767–781 (2019).
67. Rueden, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
68. Rombough, P. J. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (Danio rerio) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **148**, 463–469 (2007).
69. MacPhail, R. C. *et al.* Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* **30**, 52–58 (2009).
70. Armant, O. *et al.* Zebrafish exposure to environmentally relevant concentration of depleted uranium impairs progeny development at the molecular and histological levels. *PLoS One* **12**, e0177932 (2017).

Acknowledgements

Confocal images were produced at the microscopy facility ZOOM (CEA, Cadarache, France) supported by the Région Provence-Alpes Côte d'Azur, the Conseil Général des Bouches du Rhône, the French Ministry of Research, CNRS, IRSN and CEA. Mass spectrometry analysis were performed at the Marseille Proteomics facility which is supported by IBISA, Plan Cancer, Canceropôle PACA, Région Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur, Institut Paoli-Calmettes, Plateforme Technologie Aix-Marseille and Fonds Européen de Développement Régional. We want to thank Claire Della Vedova (IRSN, France) and Dr. Mohamedamine Benadjaoud (IRSN, France) for their critical inputs on the statistical analysis of behavioural data. We want to thank Dr. Xavier Cousin (IFREMER, France) for his advises on the experimental set up of the embryonic activity test and larval motility tests performed in this work. We want to thank Isabelle Cavalié, Virginie Camilleri, Dr. Olivier Simon and Dr. Beatrice Gagnaire for their technical help in the zebrafish maintenance at IRSN (Cadarache, France) that was required for this work. We also want to thank Adrien Moulin for its technical help on the Linux cluster CADUX at IRSN (Cadarache, France).

Author contributions

S.M., C.A.G. and O.A. conceptualized the work and S.M. realised all animal experiments. S.M. and O.A. realised and analysed the transcriptomics data. S.M. and C.A. produced and analysed the behavioural data. N.D. performed the dosimetry and MCNPX simulations. M.F. acquired the TEM images. G.L. performed the confocal analysis of γ-H2AX. S.M., S.F., L.C., E.B. and S.A. produced and analysed the proteomics data. All authors contributed to write the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w.

Correspondence and requests for materials should be addressed to O.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish

Sophia Murat El Houdigui[a], Christelle Adam-Guillermin[c], Giovanna Loro[a], Caroline Arcanjo[a], Sandrine Frelon[a], Magali Floriani[a], Nicolas Dubourg[a], Emilie Baudelet[b], Stéphane Audebert[b], Luc Camoin[b] & Olivier Armant[a*]

Supplementary Information

Supplementary Table T1: Results of MCNPX simulations and operational dosimetry obtained with radio photoluminescent dosimeter (mGy/h) at the target dose rates of 50 mGy/h, 5 mGy/h and 0.5 mGy/h. The corrected dose rate takes under account the layer of medium in the petri dish, considering that embryos younger than 48 hpf are located at the bottom and swimming larvae (> 48 hpf) 1 mm below water level. Tests 1 to 6 correspond to simulations and measures for 24 hpf embryos in the chorion at the bottom of the petri-dish, while tests 7 to 12 correspond to dose corrected for 48 hpf swimming larvae. The average and standard deviation (sd) are indicated for each condition.

Supplementary Table T2: Quality control of sequencing reads of the 58 samples analysed by mRNAseq. Replicates number, dose rate, irradiation batch and developmental stage are indicated for each sample, as well as the reads number obtained and the % of reads with Phred score (Q) > 30 (R1: read1, R2: read2).

Supplementary Table T3: List of Interpro domains specific to transcription factors. Functional category "a" indicates the high probability of the Interpro domain to be part of genuine transcription factors, as described before [30] (based on Interpro v25). The last column indicates if the domain is novel (present in the Interpro v72 database) or deprecated (absent in Interpro v72).

Supplementary Table T4: List of significantly (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value ≤ 0.01) deregulated zebrafish genes in each pair-wise comparative analysis.

Supplementary Table T5: List of zebrafish GO terms enriched in each comparative analysis. P-values from Fisher's exact test are indicated.

Supplementary Table T6: List of zebrafish GO terms enriched in the 78 genes mis-regulated in common at the three dose rates at 48 hpf. P-values from Fisher's exact test are indicated.

Supplementary Table T7: List of the 56 zebrafish proteins differentially expressed in 96 hpf larvae exposed at 5 mGy/h.

Supplementary Table T8: List of the 88 zebrafish proteins differentially expressed in 96 hpf larvae exposed at 50 mGy/h.

Supplementary Figure S1: Assessment of biological variability of samples by hierarchical clustering. (**a**) Hierarchical clustering of all biological replicates. Potential outliers are indicated in red. (**b**) Hierarchical clustering of biological replicates after removal of potential outliers. The irradiation batch is indicated for each sample (I10, I17, I32), as well as the developmental time (24 hpf, 48 hpf and 96 hpf), the exposed condition (C: control, 05mG: 0.5 mGy/h, 5mG: 5 mGy/h, 50mG: 50 mGy/h) and the replicate number. Yellow indicates small and red high Euclidean distances.

Supplementary Figure S2: Quality controls of sequencing data. (**a**) Mean Phred Score quality (Q) across each base in the reads for 53 samples. (**b**) (%) GC content of reads for 53 samples (as read counts). (**c**) % of mapped reads falling into genomic features.

Supplementary Figure S3: Correlation of log2(fold change) obtained by TaqMan quantitative RT-PCR and mRNAseq. Spearman correlation coefficient (rho) are indicated.

Supplementary Figure S4: Dot plot of zebrafish GO terms. Top 10 pathways obtained from GO enrichment sorted by significance based on p-values from the Fisher's exact test.

Supplementary Figure S5: Dot plot of GO pathways using human orthologues. GO terms are sorted by significance based on p-values from the Fisher's exact test.

Supplementary Figure S6: Mean of normalised expression, with standard error bars, over developmental time at the three dose rates and in control condition. *: significant change ($|\text{fold change}| \geq 1.5$ and adjusted p-value ≤ 0.01).

Supplementary Figure S7: Volcano plots of the 1084 genes involved in neurogenesis (annotated in the Gene Ontology database with the term GO:0022008). Each dot

corresponds to a gene. Red: significant differential expression (|fold Change| ≥ 1.5 and adjusted p-value ≤ 0.01), grey: no change.

Supplementary Figure S8: Heatmap of the average of log2 fold change (from mRNAseq) of 12 genes expressed consistently in all conditions and involved in the RA pathway (annotated with the GO terms GO:0042572, retinol metabolic process, or GO:0001523, retinoid metabolic process). Red color indicates upregulation and blue downregulation compared to controls (white no change). 0.5: 0.5 mGy/h, 5: 5 mGy/h, 50: 50 mGy/h.

Supplementary Material & Methods

Analysis of hatching rate

160 fertilized eggs per condition were distributed individually into 96 wells plates containing 250 µL of zebrafish embryo medium. Embryonic development was observed daily under the binocular (Leica EZ4HD, France). The number of hatched eggs was recorded at 53, 55 and 72 hpf. The hatching rate was determined as a proportion of hatched eggs over the total living eggs at a given time.

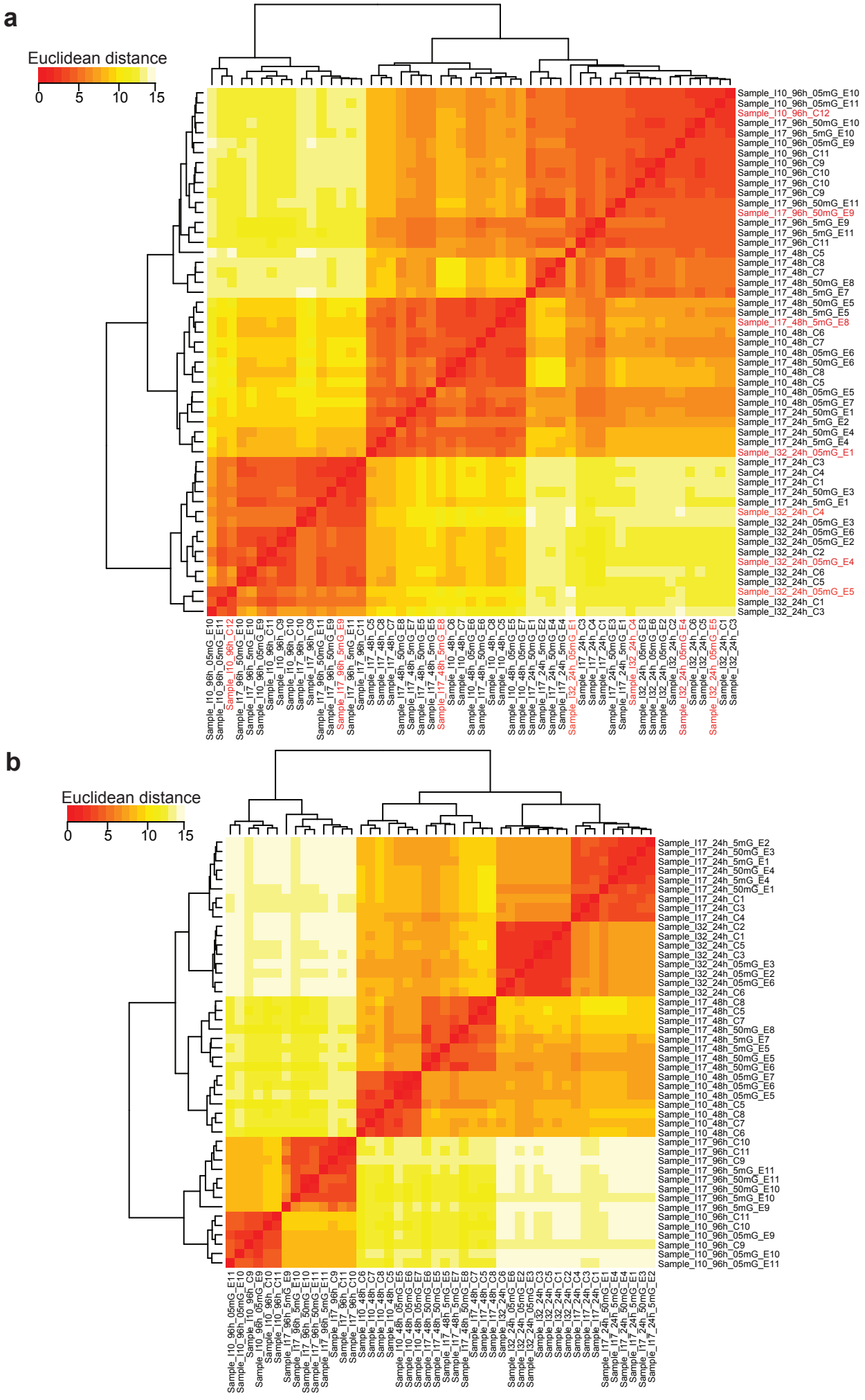
RNA extraction and TLDA TaqMan array

Biological replicates (3 to 6 per condition) were made from pools of 40 embryos or larvae at 24 hpf, 48 hpf and 96 hpf. Total RNA extraction was performed using extraction by grinding (Precellys 24, Bertin Instruments, France) with ceramic beads tubes (CK14 tubes, Bertin Instruments, France) and a TRIzol/chloroform extraction (Life Technologies). RNA integrity (RIN), quality and concentration were assessed using RNA Nano Chips (Bioanalyser 2011, Agilent). No signs of RNA degradation were detected, all samples had a RIN > 8. Reverse transcription was made from 0.1 µg of total RNA with the High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit (Applied Biosystems) following manufacturer instructions. Quantitative PCR were made on a QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with 384-well microfluidic TaqMan Array Card (Applied Biosystems). Comparative threshold (Ct) were analysed by ExpressionSuite Software for QuantStudio 6 & 7 Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems) and exported to DataAssist v3.01 (Applied Biosystems). Five

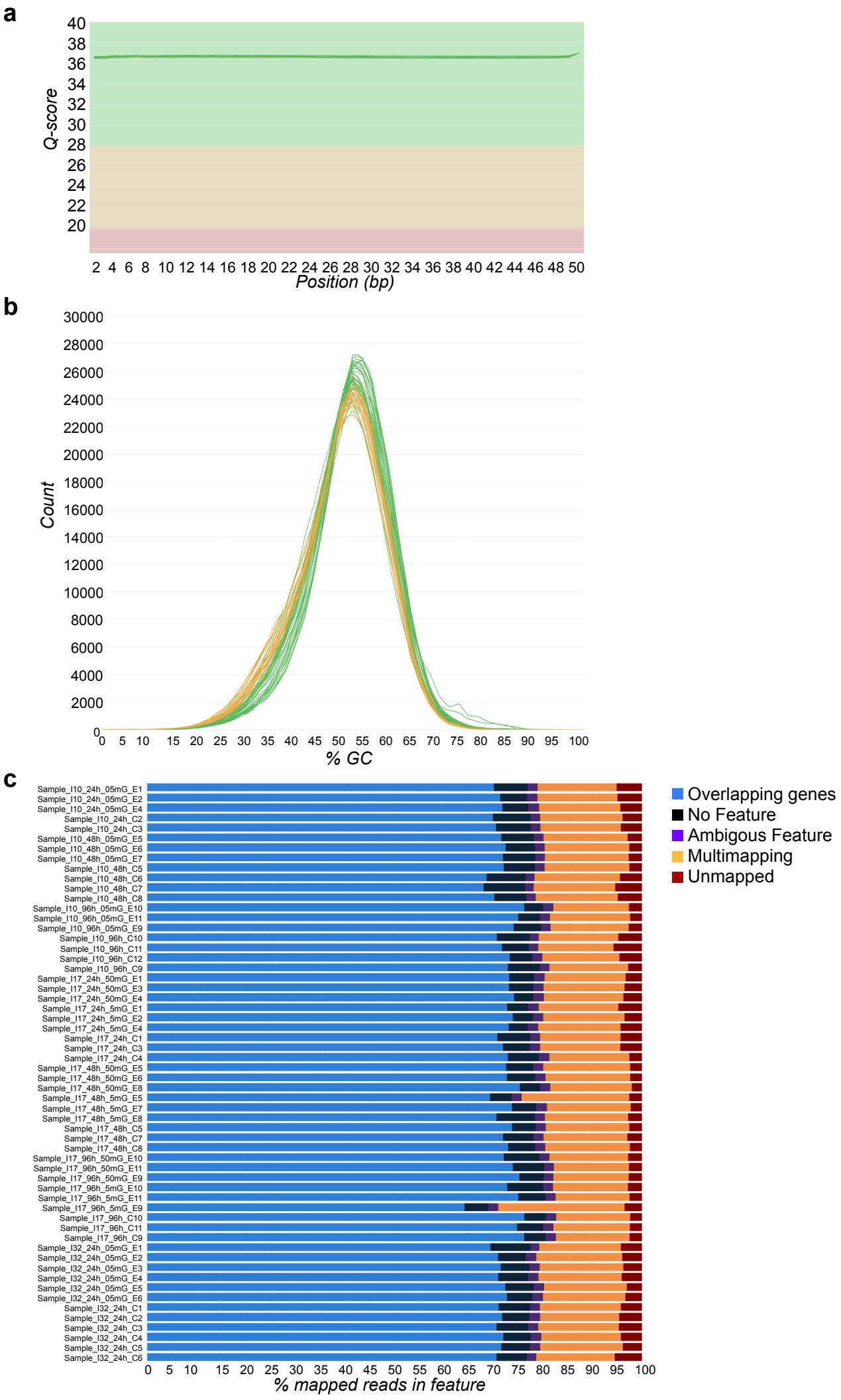
endogenous controls (*apoa1a*, *cdk4*, *cox6a1*, *pcna* and *psmb5*) were used to normalize expression. Fold change were calculated compared to control group. Pearson coefficient was calculated between TaqMan Array Card fold change and RNAseq data fold change with R software.

Protein extraction

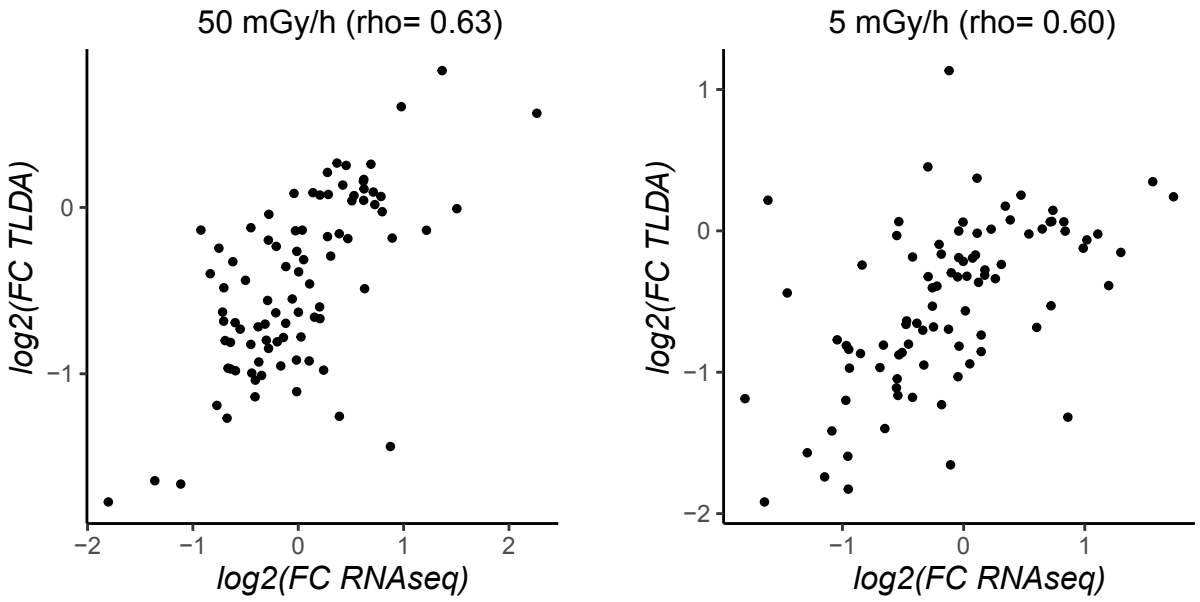
Proteins were extracted from 96 hpf larvae (n=20) in triplicated experiments in RIPA buffer supplemented extemporaneously with 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, France). Samples were homogenized twice at 5000 rpm for 20 sec in the Precellys grinder system (Bertin Technologies, France) at 4 °C. After 15 min incubation on ice, lysates were centrifuged at 5000 g at 4 °C for 10 min and supernatant used for protein quantification with BCA kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. 20 µg of proteins were precipitated on ice for 20 min by the addition of 10 % v/v TCA (Sigma, France). Pellets were washed with ice-cold ethylacetate/ethanol (v/v), and resuspended at 30 °C in the dark under agitation at 1600 rpm in UTC924 buffer (9 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 20 mM Tris, pH 9.5) for 1.5 hours. The pH was adjusted to 8.5-8.6 with 50 mM Tris HCl pH 8.5 to get a final concentration of 2-3 µg/µL of proteins. Electrophoresis of 15 µg of proteins per replicate were done on a NuPAGE gel 4-12% (Life Technologies) for 6 min at 80 V using in MOPS buffer (Thermo Fisher Scientific) and stained by coomassie blue (Imperial protein stain, Thermo Fisher Scientific). Protein bands were then excised with a scalpel and digested overnight at 37°C with 0.6 µg trypsin (Promega, USA).



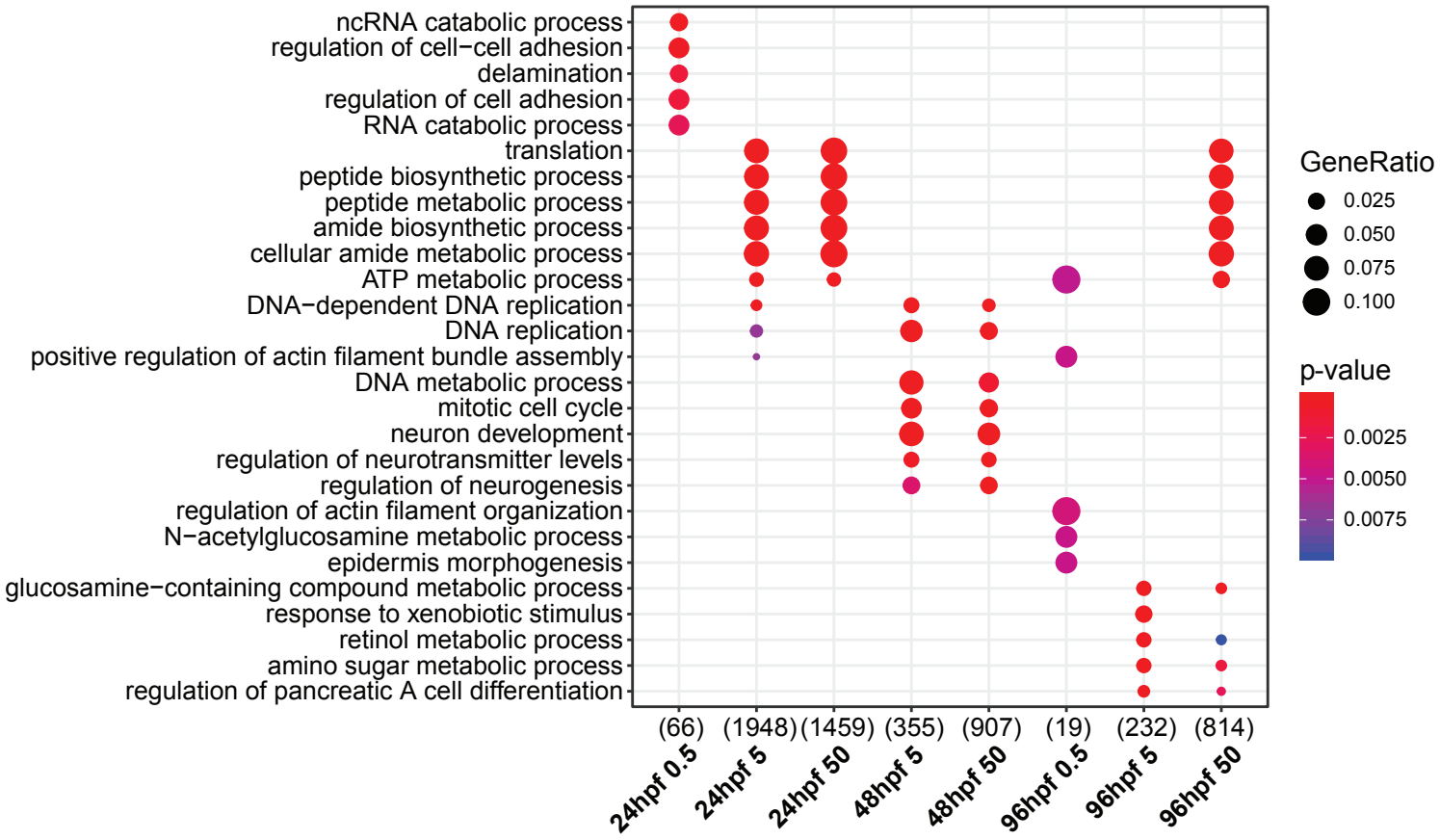
Supplementary Figure S1



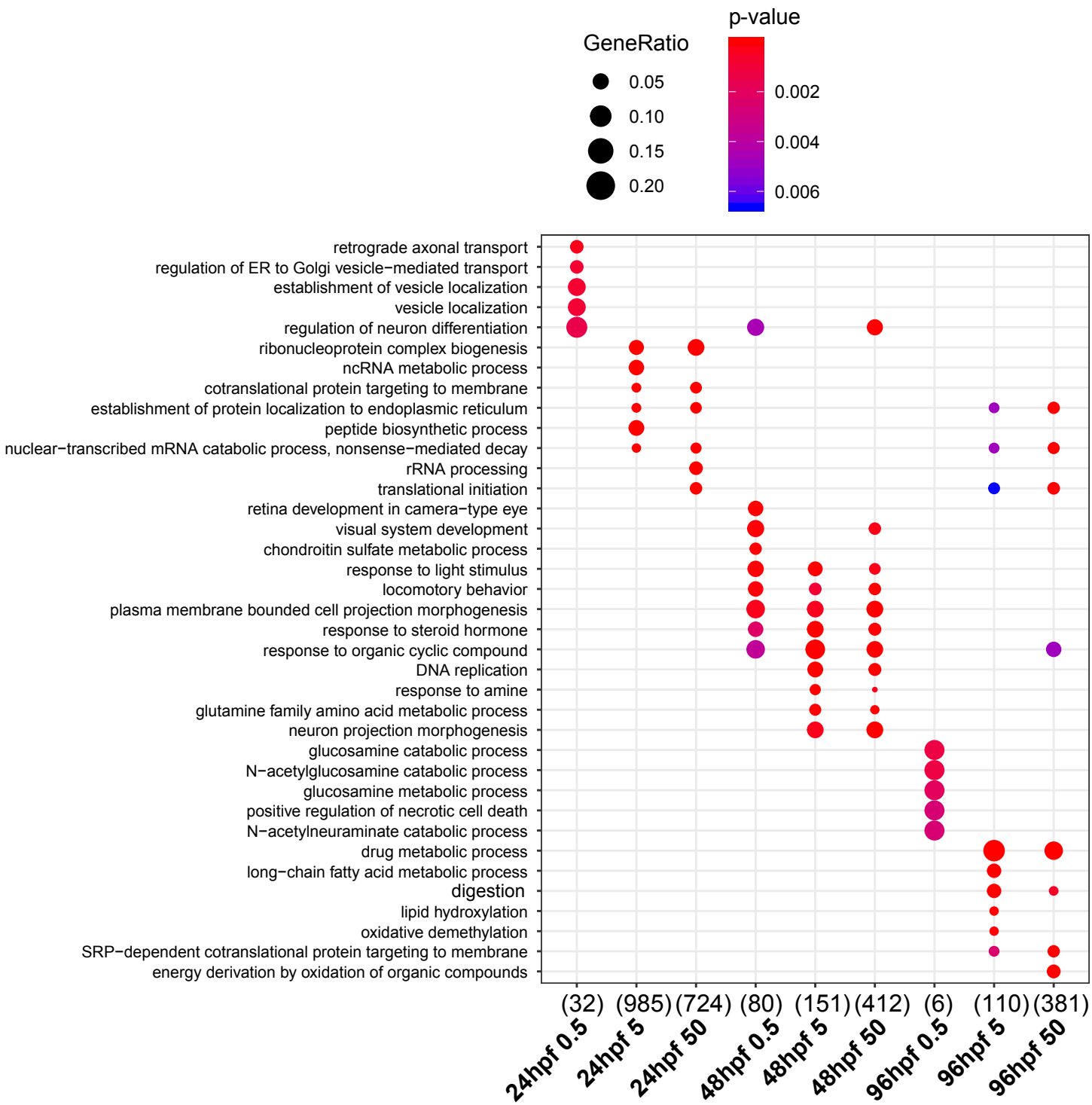
Supplementary Figure S2



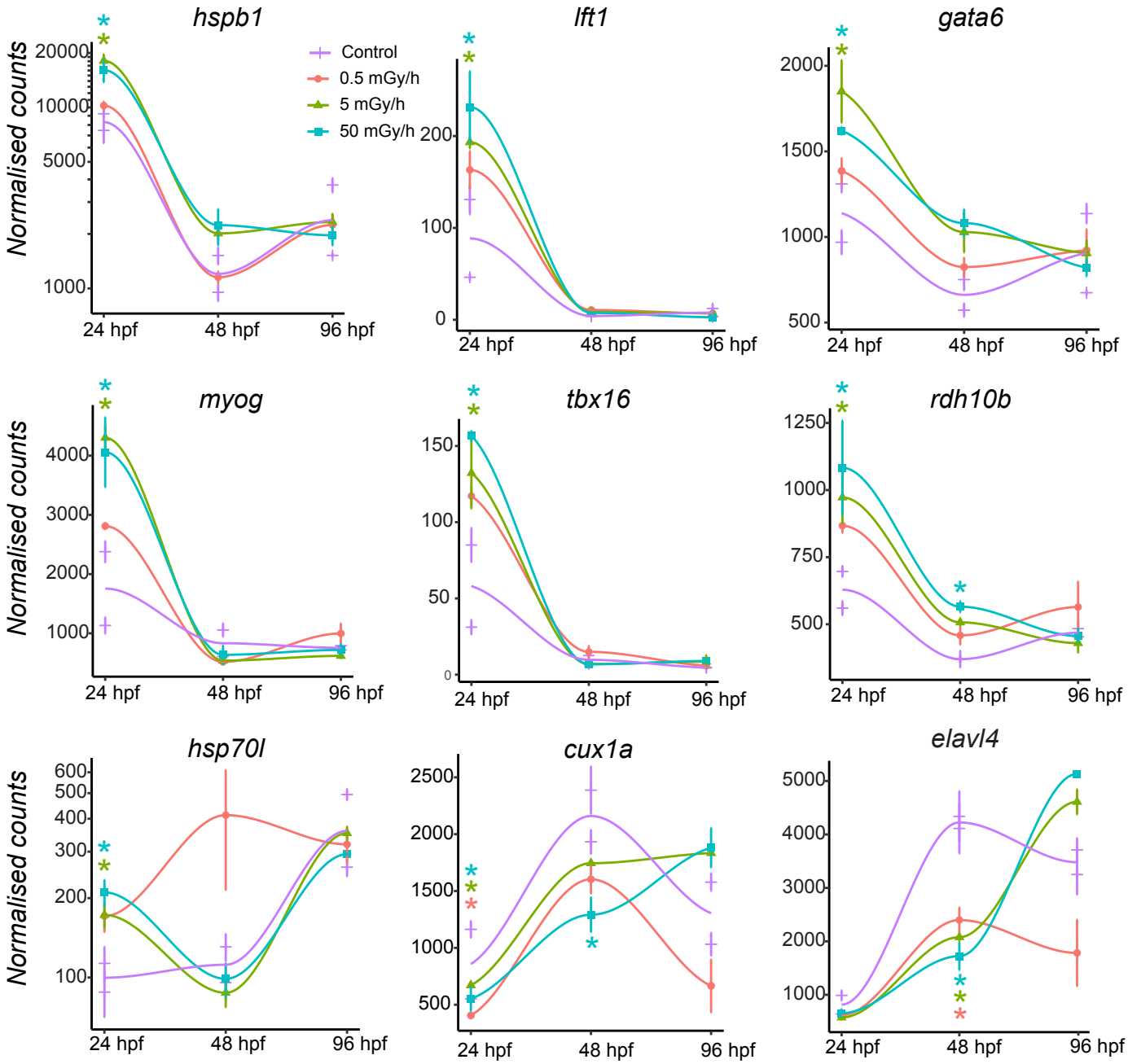
Supplementary Figure S3



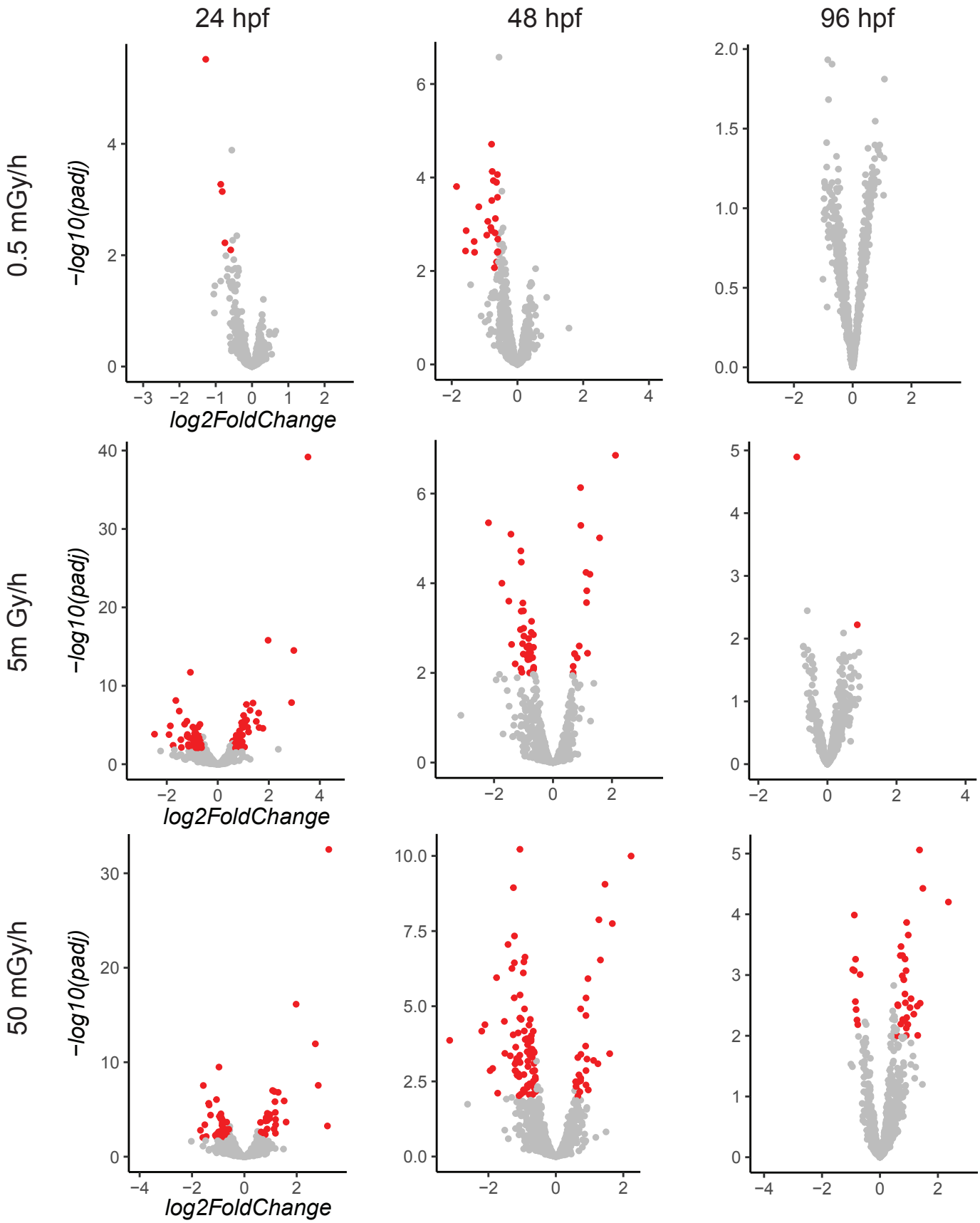
Supplementary Figure S4



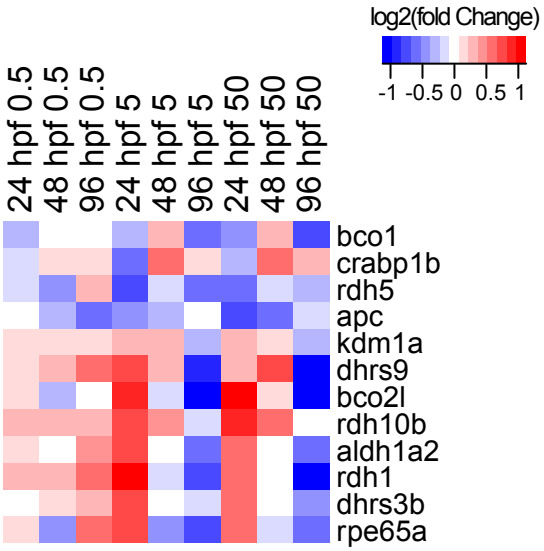
Supplementary Figure S5



Supplementary Figure S6



Supplementary Figure S7



Supplementary Figure S8

Supplementary Table 1

Target= 50 mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	63.1168	0.0035	48.22		
2	59.7533	0.0036	45.65		
3	60.6307	0.0036	46.32		
4	60.1735	0.0036	45.97		
5	61.884	0.0035	47.28		
6	61.9783	0.0035	47.35	**46.80**	**0.98**
7	61.3128	0.0037	46.84		
8	58.0429	0.0038	44.35		
9	58.8079	0.0038	44.93		
10	58.2608	0.0038	44.51		
11	60.1519	0.0038	45.96		
12	60.1714	0.0037	45.97	**45.43**	**0.98**

Target= 5 mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	5.98406	0.0024	5.13		
2	5.98896	0.002	5.13		
3	6.02901	0.0029	5.16		
4	5.97657	0.0025	5.12		
5	5.98929	0.0025	5.13		
6	5.99333	0.0023	5.13	**5.13**	**0.02**
7	5.63259	0.0025	4.82		
8	5.6685	0.0029	4.86		
9	5.57349	0.0033	4.77		
10	5.66473	0.0036	4.85		
11	5.69105	0.0059	4.87		
12	5.56204	0.0024	4.76	**4.82**	**0.05**

Target= 0.5 mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	0.519629	0.0144	0.49		
2	0.505474	0.004	0.48		
3	0.507387	0.0114	0.48		
4	0.512226	0.0099	0.48		
5	0.513982	0.0093	0.48		
6	0.513566	0.0119	0.48	**0.48**	**0.00**
7	0.47859	0.0121	0.45		
8	0.473933	0.0075	0.45		
9	0.463613	0.0051	0.44		
10	0.474284	0.0108	0.45		
11	0.480029	0.0102	0.45		
12	0.478105	0.013	0.45	**0.45**	**0.01**

Supplementary Table 2

Sample	Replicate	Dose rate mGy/h	Stage	Irradiation batch	Total R1	% > Q30 R1	Total R2	% > Q30 R2	Total
05mG_24h	Sample_I10_24h_05mG_E1	05mG	24h	I10	41913039	99.99	41913039	99.99	83826078
05mG_24h	Sample_I10_24h_05mG_E4	05mG	24h	I10	44401576	99.99	44401576	99.99	88803152
05mG_24h	Sample_I10_24h_05mG_E2	05mG	24h	I10	47242168	99.99	47242168	99.99	94484336
05mG_48h	Sample_I10_48h_05mG_E5	05mG	48h	I10	38798546	99.97	38798546	99.97	77597092
05mG_48h	Sample_I10_48h_05mG_E7	05mG	48h	I10	45576387	99.99	45576387	99.99	91152774
05mG_48h	Sample_I10_48h_05mG_E6	05mG	48h	I10	50573389	99.98	50573389	99.98	101146778
05mG_96h	Sample_I10_96h_05mG_E11	05mG	96h	I10	44243961	99.99	44243961	99.99	88487922
05mG_96h	Sample_I10_96h_05mG_E10	05mG	96h	I10	48320637	99.99	48320637	99.99	96641274
05mG_96h	Sample_I10_96h_05mG_E9	05mG	96h	I10	49384249	99.97	49384249	99.97	98768498
C_24h	Sample_I10_24h_C2	C	24h	I10	44723307	100	44723307	100	89446614
C_24h	Sample_I10_24h_C3	C	24h	I10	48322990	99.99	48322990	99.99	96645980
C_48h	Sample_I10_48h_C5	C	48h	I10	46734618	99.97	46734618	99.97	93469236
C_48h	Sample_I10_48h_C7	C	48h	I10	50826601	99.99	50826601	99.99	101653202
C_48h	Sample_I10_48h_C6	C	48h	I10	53318199	99.99	53318199	99.99	106636398
C_48h	Sample_I10_48h_C8	C	48h	I10	57294177	100	57294177	100	114588354
C_96h	Sample_I10_96h_C10	C	96h	I10	44078866	99.99	44078866	99.99	88157732
C_96h	Sample_I10_96h_C11	C	96h	I10	49202976	100	49202976	100	98405952
C_96h	Sample_I10_96h_C9	C	96h	I10	53973047	100	53973047	100	107946094
C_96h	Sample_I10_96h_C12	C	96h	I10	54142072	100	54142072	100	108284144
50mG_24h	Sample_I17_24h_50mG_E1	50mG	24h	I17	43129440	99.99	43129440	99.99	86258880
50mG_24h	Sample_I17_24h_50mG_E3	50mG	24h	I17	51508225	99.99	51508225	99.99	103016450
50mG_24h	Sample_I17_24h_50mG_E4	50mG	24h	I17	55599620	99.99	55599620	99.99	111199240
50mG_48h	Sample_I17_48h_50mG_E6	50mG	48h	I17	46960050	99.99	46960050	99.99	93920100
50mG_48h	Sample_I17_48h_50mG_E5	50mG	48h	I17	57311143	99.99	57311143	99.99	114622286
50mG_48h	Sample_I17_48h_50mG_E8	50mG	48h	I17	63127230	100	63127230	100	126254460
50mG_96h	Sample_I17_96h_50mG_E11	50mG	96h	I17	43547091	100	43547091	100	87094182
50mG_96h	Sample_I17_96h_50mG_E9	50mG	96h	I17	54400774	100	54400774	100	108801548
50mG_96h	Sample_I17_96h_50mG_E10	50mG	96h	I17	65403006	99.98	65403006	99.98	130806012
5mG_24h	Sample_I17_24h_5mG_E2	5mG	24h	I17	39467651	99.99	39467651	99.99	78935302
5mG_24h	Sample_I17_24h_5mG_E4	5mG	24h	I17	42248035	99.98	42248035	99.98	84496070
5mG_24h	Sample_I17_24h_5mG_E1	5mG	24h	I17	52362894	99.99	52362894	99.99	104725788
5mG_48h	Sample_I17_48h_5mG_E8	5mG	48h	I17	42512726	99.98	42512726	99.98	85025452
5mG_48h	Sample_I17_48h_5mG_E5	5mG	48h	I17	50556627	99.97	50556627	99.97	101113254
5mG_48h	Sample_I17_48h_5mG_E7	5mG	48h	I17	66495789	99.99	66495789	99.99	132991578
5mG_96h	Sample_I17_96h_5mG_E11	5mG	96h	I17	43832168	100	43832168	100	87664336
5mG_96h	Sample_I17_96h_5mG_E10	5mG	96h	I17	45062602	99.99	45062602	99.99	90125204
5mG_96h	Sample_I17_96h_5mG_E9	5mG	96h	I17	45474269	100	45474269	100	90948538
C_24h	Sample_I17_24h_C3	C	24h	I17	40480792	99.96	40480792	99.96	80961584
C_24h	Sample_I17_24h_C1	C	24h	I17	46119497	100	46119497	100	92238994
C_24h	Sample_I17_24h_C4	C	24h	I17	51310846	100	51310846	100	102621692
C_48h	Sample_I17_48h_C5	C	48h	I17	45260166	99.99	45260166	99.99	90520332
C_48h	Sample_I17_48h_C8	C	48h	I17	46988056	99.99	46988056	99.99	93976112
C_48h	Sample_I17_48h_C7	C	48h	I17	49184219	99.99	49184219	99.99	98368438
C_96h	Sample_I17_96h_C9	C	96h	I17	45107672	100	45107672	100	90215344
C_96h	Sample_I17_96h_C10	C	96h	I17	49587991	99.97	49587991	99.97	99175982
C_96h	Sample_I17_96h_C11	C	96h	I17	54422077	99.97	54422077	99.97	108844154
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E2	05mG	24h	I32	46924250	100	46924250	100	93848500
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E5	05mG	24h	I32	49716321	99.99	49716321	99.99	99432642
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E3	05mG	24h	I32	52121243	100	52121243	100	104242486
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E1	05mG	24h	I32	52826874	100	52826874	100	105653748
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E6	05mG	24h	I32	55481337	99.99	55481337	99.99	110962674
05mG_24h	Sample_I32_24h_0.5mG_E4	05mG	24h	I32	62317456	99.99	62317456	99.99	124634912
C_24h	Sample_I32_24h_C6	C	24h	I32	41854845	99.99	41854845	99.99	83709690
C_24h	Sample_I32_24h_C3	C	24h	I32	44201895	99.98	44201895	99.98	88403790
C_24h	Sample_I32_24h_C4	C	24h	I32	48031701	99.99	48031701	99.99	96063402
C_24h	Sample_I32_24h_C5	C	24h	I32	51135001	100	51135001	100	102270002
C_24h	Sample_I32_24h_C1	C	24h	I32	53116912	99.99	53116912	99.99	106233824
C_24h	Sample_I32_24h_C2	C	24h	I32	53225554	99.99	53225554	99.99	106451108

Supplementary Table 6

GO ID	GO Description	p-value	Ensembl geneID
GO:0042462	eye photoreceptor cell development	0.00043916	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000011989/ENSDARG00000019566
GO:0001754	eye photoreceptor cell differentiation	0.00123495	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000011989/ENSDARG00000019566
GO:0042461	photoreceptor cell development	0.00151927	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000011989/ENSDARG00000019566
GO:0048666	neuron development	0.00183896	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000011989/ENSDARG00000093357/ENSDARG00000017007/ENSDARG00000019566/ENSDARG00000045639/ENSDARG00000103937
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	0.00184156	ENSDARG00000074684/ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0005977	glycogen metabolic process	0.00274645	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	0.00274645	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0044042	glucan metabolic process	0.00274645	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process	0.00332231	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0043401	steroid hormone mediated signaling pathway	0.00354339	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0046530	photoreceptor cell differentiation	0.00354339	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000011989/ENSDARG00000019566
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	0.00362957	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0006112	energy reserve metabolic process	0.00362957	ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0071383	cellular response to steroid hormone stimulus	0.00367306	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	0.00372343	ENSDARG00000074684/ENSDARG00000002197/ENSDARG00000013721/ENSDARG00000105039/ENSDARG00000100352
GO:0006097	glyoxylate cycle	0.00392107	ENSDARG00000074684
GO:0009755	hormone-mediated signaling pathway	0.00579812	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0048545	response to steroid hormone	0.00579812	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	0.00597272	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0010623	programmed cell death involved in cell development	0.00782702	ENSDARG00000011989
GO:0019918	peptidyl-arginine methylation, to symmetrical-dimethyl arginine	0.00782702	ENSDARG00000033134
GO:0043576	regulation of respiratory gaseous exchange	0.00782702	ENSDARG00000027529
GO:0045576	mast cell activation	0.00782702	ENSDARG00000010420
GO:0046487	glyoxylate metabolic process	0.00782702	ENSDARG00000074684
GO:0046666	retinal cell programmed cell death	0.00782702	ENSDARG00000011989
GO:0046668	regulation of retinal cell programmed cell death	0.00782702	ENSDARG00000011989
GO:0046671	negative regulation of retinal cell programmed cell death	0.00782702	ENSDARG00000011989
GO:0110111	negative regulation of animal organ morphogenesis	0.00782702	ENSDARG00000011989
GO:0071396	cellular response to lipid	0.00831568	ENSDARG00000017007/ENSDARG00000004861/ENSDARG00000031768
GO:0048562	embryonic organ morphogenesis	0.00952709	ENSDARG00000070107/ENSDARG00000040606/ENSDARG00000078052/ENSDARG00000062262/ENSDARG00000103937

Supplementary Table 7

UniProtKB/ TrEMBL ID	*UniProtKB gene name*	*log2(fold change)*	*-log10(pval)*	*Zfin id*
A0A0N9P0E6	opn1lw2	-0.93	3.14	opn1lw2
A0A0R4I9C3	rbm42	1.17	2.26	rbm42
A0A0R4IS09	col14a1b	-1.95	2.36	col14a1b
A0A2R8PVL6	timm44	1.41	3.50	timm44
A0A2R8Q8V9	eml4	-0.64	2.65	NA
A0A2R8QTL0	mylpfa	-0.79	3.48	mylpfa
A0A2R8QTM1	cand2	-1.88	2.33	cand2
A0A2R8QV67	vtg4	0.67	4.21	vtg4
A0A2R8RI79	NA	1.33	2.54	si:zfos-1505d6.3
A0A2R8RQJ2	NA	1.90	2.48	NA
A0A2R8RX88	fus	0.92	2.97	fus
A2BFS9	tcnbb	0.98	2.27	tcnbb
A5WWB7	mybpc1	-1.22	2.59	mybpc1
A7E2K5	crybb1l2	-0.65	4.47	crybb1l2
A7MCR8	NA	1.80	2.86	si:dkey-26g8.5
A8KBU7	mybphb	-0.72	2.04	mybphb
A8WG31	NA	1.69	2.89	NA
B0V0U4	galnt2	-1.44	2.60	galnt2
B8A518	tuba1c	-0.76	2.74	tuba1c
E7F351	acsl2	-0.76	2.51	acsl2
E7F8M1	crybb1l1	-0.59	4.37	crybb1l1
E7FFZ3	NA	0.95	2.26	si:dkey-46g23.2
E9QDR6	NA	-0.62	2.22	si:ch211-183d21.1
E9QF07	myh7bb	-1.04	2.33	myh7bb
F1Q699	mybpc2b	-0.90	2.66	mybpc2b
F1QCK4	ryr1a	-1.18	2.63	ryr1a
F1QF69	soul5	0.69	2.49	soul5
F1QIP9	NA	1.18	3.26	zgc:165518
F1QVM8	cep350	-1.68	2.71	cep350
F1QW04	tcirg1b	-0.98	2.51	tcirg1b
F8W5L3	oat	-1.44	3.08	oat
M1EVR1	SLC12A5	-1.34	2.69	NA
Q08C39	mrps5	-1.24	2.02	NA
Q08CP3	neo1a	-1.45	2.77	NA
Q32Q50	map2k2a	-1.48	2.00	NA
Q4V9E0	fmoda	-1.94	2.68	NA
Q508P8	smyhc1	-0.96	3.21	NA
Q52JI7	cryba4	-0.63	4.71	cryba4
Q5PR28	bfsp2	-1.38	2.13	NA
Q5RIL8	hsd3b2	-2.85	2.83	hsd3b2
Q5U373	cab39l	0.71	2.69	cab39l
Q6DGY4	cryba1b	-0.64	3.68	cryba1b
Q6NY70	epcam	0.62	2.85	NA
Q6PBN3	prph2b	-0.70	3.28	prph2b
Q6XNL8	acta1b	-0.59	2.06	acta1b
Q7SZM5	mmp2	-0.97	2.33	NA
Q7ZTV9	alpl	-0.91	4.65	NA
Q7ZTX2	wdr5	-1.18	2.21	wdr5
Q7ZTZ7	bckdk	1.04	2.04	NA
Q7ZUB0	myl13	-0.65	2.03	myl13
Q8UUZ6	cryaa	-1.28	2.19	cryaa
Q90WT1	crybb1	-0.59	3.41	crybb1
Q9PU59	nipsnap1	-2.01	2.45	NA
R4GE02	NA	0.60	3.91	si:ch211-113a14.11
X1WC82	rps28	-0.62	2.12	rps28
X1WEZ4	col6a4a	-0.85	2.12	col6a4a

Supplementary Table 8

UniProtKB/	*UniProtKB*	*log2(fold change)*	*-log10(pval)*	*Zfin id*
A0A0A0VG08	mt-co2	-0.75	3.19	mt-co2
A0A0N9P0E6	opn1lw2	-0.97	3.73	opn1lw2
A0A0R4IA33	nots	-0.63	2.05	nots
A0A0R4IRS1	ap1m1	-1.03	2.04	ap1m1
A0A0R4ISJ3	xrn2	-0.87	3.16	xrn2
A0A0R4IWP3	psmb2	-2.35	3.06	psmb2
A0A140LGG1	plxna1a	-1.16	2.40	plxna1a
A0A140LGT2	cpeb4a	-0.81	2.13	cpeb4a
A0A140LH63	si	0.73	3.98	i:ch73-368j24.12
A0A2R8Q5Z6	actn3a	0.65	4.77	actn3a
A0A2R8Q7K6	vil1	-0.71	4.17	vil1
A0A2R8QAE1	LOC100334800	-0.98	2.14	NA
A0A2R8QBD4	ythdf2	-1.17	2.80	ythdf2
A0A2R8QFA6	timm8a	-0.77	2.15	timm8a
A0A2R8QKL9	tgm1l1	0.69	3.77	tgm1l1
A0A2R8QMT2	wdr7	-1.17	2.23	NA
A0A2R8QP59	stxbp1b	-0.62	2.00	stxbp1b
A0A2R8QPB1	gad1b	-1.16	2.62	gad1b
A3KNH4	plod3	0.79	2.15	plod3
A3KQL1	necab2	-0.64	2.05	necab2
A4JYG9	ncam2	-5.25	2.74	NA
A5PF53	arhgap35b	-0.90	2.09	arhgap35b
A5PN62	ddah2	-1.42	2.09	ddah2
A5X6X5	ttn.2	0.88	7.95	NA
A6H8Q2	crtac1a	1.18	2.46	NA
A7E2J3	NA	-1.11	2.50	NA
A8E560	atp6v0d1	-0.88	2.64	NA
A8E7L6	nudcd1	-1.30	3.56	nudcd1
A8KBU7	mybphb	0.85	5.24	mybphb
B0UXI4	syn1	-0.62	2.22	syn1
B2GS08	actb1	-2.36	2.75	NA
B3DIE8	tpp1	-0.65	4.02	NA
B8A4G3	ppm1aa	-0.94	2.51	ppm1aa
B8A569	myhz1.3	1.87	4.81	myhz1.3
B8A611	engase	-1.17	2.32	engase
E7EZ79	mybpc3	0.77	2.50	mybpc3
E7F0E2	gnpda2	-2.43	2.05	gnpda2
E7F2X5	itga1	0.80	2.73	itga1
E7F3A6	tcerg1b	-1.58	2.76	NA
E9QDR6	NA	-1.10	2.47	i:ch211-183d21.1
F1Q699	mybpc2b	0.90	5.63	mybpc2b
F1Q7I4	b3glcta	0.60	4.97	b3glcta
F1QF69	soul5	0.88	3.52	soul5
F1QYS7	acss1	-1.23	2.99	acss1
F1R4W2	lgals3a	-1.61	2.80	lgals3a
F1R7N8	ttn.2	1.05	3.21	ttn.2
F1R8W4	desma	0.60	6.11	desma
F1RAM4	NA	-0.68	2.81	zgc:110339
G1K2X0	ttn.1	0.83	6.94	ttn.1
G8IHU0	lama2	0.60	3.93	NA
Q07DR3	dctn1a	-1.72	2.14	NA
Q0P414	NA	2.50	5.51	NA
Q1LVH7	celf5a	-0.84	2.28	celf5a
Q568F8	ssbp1	-2.17	4.79	NA
Q588C3	dnmt3ba	0.59	4.30	NA
Q5NJL3	matn3a	0.96	5.68	NA
Q5RHK5	mtmr9	-1.99	3.39	mtmr9
Q5RIG8	srgap1b	1.83	2.24	srgap1b
Q5TYT1	nrcama	-1.30	2.06	nrcama
Q5U3E5	slc6a1b	-1.50	2.73	slc6a1b
Q5XJM8	wdfy1	0.67	2.56	NA
Q68EI7	fuca2	1.80	2.14	NA
Q6DRM4	parvaa	-1.26	3.90	parvaa

Q6IQE4	tnni2a.4	0.99	4.48	NA
Q6NZW3	cfl2	-1.01	2.37	cfl2
Q6P1J5	atp5f1d	-0.67	3.38	NA
Q6PI45	igbp1	-0.92	2.73	NA
Q6ZM52	sart3	-1.00	2.13	sart3
Q7T1B1	hbbe3	-0.61	4.01	NA
Q7T1R2	tgfbi	1.66	2.04	NA
Q7T2E6	xab2	-1.76	2.83	NA
Q7ZT36	pvalb3	-1.24	2.66	pvalb3
Q7ZTZ7	bckdk	1.21	2.48	NA
Q7ZUB0	myl13	0.69	3.24	myl13
Q7ZV01	NA	-1.76	2.10	NA
Q7ZV33	tm9sf3	1.27	2.06	NA
Q7ZVJ0	pfn2l	-0.83	3.23	pfn2l
Q7ZVP3	matn1	2.34	3.44	NA
Q7ZVX4	rab14	-0.59	3.52	rab14
Q7ZVX8	atp6v1d	-1.59	3.29	atp6v1d
Q804W0	pvalb1	-0.61	2.04	pvalb1
Q90YJ0	col1a2	0.66	5.09	NA
Q9DDS7	cd81a	-0.73	2.45	NA
Q9I8U9	tnnt3a	0.83	3.72	tnnt3a
X1WDH8	NA	0.70	2.33	i:dkey-261m9.19
X1WGK9	NA	0.68	6.83	zgc:153405
X4YKC7	CRP	-1.64	4.63	NA
Z4YJ68	cisd2	-1.03	3.57	cisd2

III.3. Principaux résultats et discussion de l'article scientifique

La première étape de ce travail a consisté à mesurer les foyers de réparation des cassures double brin de l'ADN chez des embryons de 24 et 48 hpf à 5 mGy/h et 50 mGy/h. Pour cela, une technique d'immunomarquage sur embryons entiers à été utilisée, couplée à une quantification des focis de réparation par imagerie confocale. Une augmentation significative du nombre de foyers γ-H2AX a été détectée à 24 hpf et 48 hpf pour le plus fort débit de dose (50 mGy/h).

D'autres marqueurs à l'échelle individuelle ont été étudiés : la survie des embryons, le taux d'éclosion et la taille des larves. Aucun de ces marqueurs ne semble être affecté significativement par l'exposition aux RI. Ces résultats suggèrent que dans nos conditions, à 50 mGy/h des dommages à l'ADN sont induits sans que cela n'affecte la survie ou le développement des embryons.

Nous avons ensuite analysé la fréquence cardiaque des larves ainsi que leur comportement. Ce sont des paramètres intégrateurs qui sont plus sensibles que les paramètres à l'échelle individuelle précédemment cités. Nous avons mesuré la fréquence cardiaque chez des larves de 48 hpf. Les résultats montrent une réponse non monotone. En effet, à 0,5 mGy/h une diminution significative de la fréquence cardiaque a été trouvée, tandis qu'aux deux autres débits de doses (5 mGy/h et 50 mGy/h), une augmentation significative de la fréquence cardiaque est observée. Nous avons ensuite mesuré l'activité des embryons à 24 hpf. Pour ce paramètre, une augmentation significative de l'activité est observée à 5 mGy/h mais pas aux deux autres débits de doses (0,5 mGy/h et 50 mGy/h). Par la suite, un test de locomotion des larves sous condition de stress a été réalisé à 120 hpf. Ce test consiste en trois changements brusques de l'intensité lumineuse, ce qui induit un stress chez les larves de poisson zèbre. Une diminution significative a été observée durant la phase d'obscurité aux trois débits de doses. Ce qui nous laisse penser qu'une exposition aux RI altère le comportement de fuite chez les larves de poisson zèbre même à de faibles débits de dose.

L'analyse du transcriptome a été réalisé aux trois débits de doses à 24 hpf, 48 hpf et 96 hpf afin de suivre la dynamique de l'expression des gènes au cours du développement du poisson zèbre. Cette analyse a dans un premier temps mis en évidence que le nombre de gènes différentiellement exprimé diminue avec le stade de développement. De plus, le nombre de gènes différentiellement exprimés détecté à 0,5 mGy/h est inférieur en comparaison aux deux autres débits de doses (5 mGy/h et 50 mGy/h). Peu de gènes différentiellement exprimés sont en commun entre les trois débits de dose. En revanche, entre 5 mGy/h et 50 mGy/h de nombreux gènes sont en communs. Ceci nous indique que la réponse transcriptionnelle est plus similaire entre les deux plus fort débits de doses. L'analyse des fonctions biologiques en commun entre les différentes conditions a montré

qu'à 5 mGy/h et 50 mGy/h les principaux processus impactés sont la neurogenèse, le développement des muscles et le métabolisme de l'AR. Peu de processus sont enrichis à 0,5 mGy/h en raison du faible nombre de gènes différentiellement exprimés.

Les facteurs de transcription sont les régulateurs clés du développement embryonnaire. Le nombre de facteurs de transcription différentiellement exprimés après exposition aux RI est plus élevé à 24 hpf puis diminue à 48 hpf et 96 hpf à 5 mGy/h et 50 mGy/h. À 0,5 mGy/h le nombre de facteurs de transcription différentiellement exprimés est à son maximum à 48 hpf. Une analyse par clustering hiérarchique a montré que les profils d'expression des 462 facteurs de transcription différentiellement exprimés sont très similaires aux débits de doses 5 mGy/h et 50 mGy/h. Cette analyse a aussi permis de mettre en évidence 6 clusters en fonction du patron d'expression. L'analyse d'enrichissement des voies biologiques sur les facteurs de transcription a mis en évidence un effet des RI sur les voies de la neurogenèse et de la somitogenèse dans les différents clusters. En effet, le patron d'expression de facteurs de transcription clés de la neurogenèse et du développement musculaire sont impactés. Ces données suggèrent que les programmes développementaux régulant le développement des muscles et du SNC sont fortement impactés chez les embryons et larves exposés à 5 mGy/h et 50 mGy/h et dans une moindre mesure chez ceux exposés à 0,5 mGy/h.

Les gènes dont l'expression est impactée peuvent être utilisés pour prédire les régulateurs transcriptionnels qui induisent les changements dans l'expression des gènes, ce qui permet de mettre en évidence les processus transcriptionnels clés affectés par l'exposition aux RI. Nous avons analysé les promoteurs des gènes différentiellement exprimés à 24 hpf, 48 hpf et 96 hpf à 50 mGy/h. Les sites de liaison à l'ADN de facteurs de transcription clés de la neurogenèse, de la somitogenèse et de la voie de l'AR sont enrichis dans les promoteurs des gènes différentiellement exprimés aux trois stades de développement.

Une analyse de protéomique a été réalisée sur le stade de développement 96 hpf aux deux plus forts débits de doses (5 mGy/h et 50 mGy/h). Les voies significativement enrichies dans cette analyse sont la neurogenèse, la somitogenèse, l'organisation des synapses et la voie métabolique de la vitamine A. Ces résultats sont en accord avec les données transcriptomiques.

Les données moléculaires mettent en évidence un impact des RI sur la neurogenèse et le développement des muscles. Une analyse par hybridation d'ARN *in situ* a été réalisée afin d'étudier les populations de cellules progénitrices dans le SNC et les muscles. Une expression irrégulière de *her4.4* (marqueur des cellules progénitrices neuronales) a été observée le long du canal central du hindbrain aux trois débits de dose, ce qui est cohérent avec la sous-expression de *her4.4* au niveau transcriptionnel. Après exposition à 50 mGy/h, une expression ectopique de *myog* (marqueur des cellules progénitrices musculaires) est détectée. À 0,5 mGy/h et 5 mGy/h, une expression irrégulière de *myog* est observée. Ces résultats montrent un impact des RI sur les deux types de cellules progénitrices que nous avons étudié.

Une analyse à l'échelle tissulaire a ensuite été effectuée avec un microscope électronique à transmission (TEM). Un détachement des myofibrilles et une altération des jonctions neuro-musculaires ont été observés de façon significative à 5 mGy/h et 50 mGy/h. Ces résultats suggèrent que les fonctions neuro-musculaires pourraient être impactées à 5 mGy/h et 50 mGy/h.

Nos données aux différentes échelles biologiques, montrent que le développement

neuronal et le développement musculaire sont affectés par une exposition à des débits de doses faibles à modérés aux RI. La dérégulation de la voie de l'AR pourrait être un des mécanismes liant l'impact sur le développement neuronal aux effets comportementaux observés dans notre étude. En effet, l'AR joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire et la neurogenèse. De plus, la voie de l'AR est aussi impliquée dans la somitogenèse. Dans le cadre de la définition d'un AOP, notre étude permet de proposer qu'après une exposition aux RI, la perturbation de la voie de l'AR pourrait être un événement clé conduisant à la perturbation de la somitogenèse et de la neurogenèse avec des conséquences délétère sur le comportement des embryons et des larves de poisson zèbre.

Quatrième partie

Impact des RI sur la méthylation de l'ADN à un stade précoce de développement chez le poisson zèbre

Table des matières

IV.1. Objectifs de l'article scientifique **133**

IV.2. Article scientifique **134**

IV.3. Principaux résultats et discussion de l'article scientifique **185**

IV.1. Objectifs de l'article scientifique

Une meilleure compréhension des effets d'une exposition aux RI est nécessaire pour protéger les écosystèmes. Les RI sont connus pour induire des mutations et des réarrangements chromosomiques, mais ils peuvent aussi induire des modifications des marques épigénétiques. La méthylation de l'ADN est la première modification épigénétique découverte et c'est aussi la plus étudiée. Cet article a pour but d'évaluer l'impact des RI sur la méthylation de l'ADN et d'établir le lien potentiel avec la régulation de la transcription à un stade précoce de développement chez le poisson zèbre. Cet article s'inscrit dans le cadre de la seconde question de recherche. Afin de répondre à cette problématique, une analyse transcriptomique par RNA-seq a été réalisée au stade shield et à des débits de doses allant de 50 à 0,005 mGy/h. Une analyse du méthylome par séquençage bisulfite a aussi été réalisée sur les deux plus forts débits de doses à 50 mGy/h et 5 mGy/h. Le lien entre ces deux analyses a ensuite été étudié.

IV.2. « Ionizing radiation induces promoter DNA hypomethylation and perturbs transcriptional activity of genes involved in morphogenesis during gastrulation in zebrafish »

Article soumis le 13 mai 2020, accepté le 1er juin 2020 et publié le 4 juin 2020 dans le journal « International Journal of Molecular Sciences ». Les informations supplémentaires ont été insérées à la suite de l'article. L'article est disponible au lien suivant : https://doi.org/10.3390/ijms21114014

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Ionising Radiation Induces Promoter DNA Hypomethylation and Perturbs Transcriptional Activity of Genes Involved in Morphogenesis during Gastrulation in Zebrafish

Sophia Murat El Houdigui [1], Christelle Adam-Guillermin [2] and Olivier Armant [1,*]

[1] PSE-ENV/SRTE/LECO, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Cadarache, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France; sophia.murat@gmail.com
[2] PSE-SANTE/SDOS/LMDN, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Cadarache, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France; christelle.adam-guillermin@irsn.fr
* Correspondence: olivier.armant@irsn.fr

Received: 13 May 2020; Accepted: 1 June 2020; Published: 4 June 2020

Abstract: Embryonic development is particularly vulnerable to stress and DNA damage, as mutations can accumulate through cell proliferation in a wide number of cells and organs. However, the biological effects of chronic exposure to ionising radiation (IR) at low and moderate dose rates (<6 mGy/h) remain largely controversial, raising concerns for environmental protection. The present study focuses on the molecular effects of IR (0.005 to 50 mGy/h) on zebrafish embryos at the gastrula stage (6 hpf), at both the transcriptomics and epigenetics levels. Our results show that exposure to IR modifies the expression of genes involved in mitochondrial activity from 0.5 to 50 mGy/h. In addition, important developmental pathways, namely, the Notch, retinoic acid, BMP and Wnt signalling pathways, were altered at 5 and 50 mGy/h. Transcriptional changes of genes involved in the morphogenesis of the ectoderm and mesoderm were detected at all dose rates, but were prominent from 0.5 to 50 mGy/h. At the epigenetic level, exposure to IR induced a hypomethylation of DNA in the promoter of genes that colocalised with both H3K27me3 and H3Kme4 histone marks and correlated with changes in transcriptional activity. Finally, pathway enrichment analysis demonstrated that the DNA methylation changes occurred in the promoter of important developmental genes, including morphogenesis of the ectoderm and mesoderm. Together, these results show that the transcriptional program regulating morphogenesis in gastrulating embryos was modified at dose rates greater than or equal to 0.5 mGy/h, which might predict potential neurogenesis and somitogenesis defects observed at similar dose rates later in development.

Keywords: AOP; development; ionising radiation; epigenetic; DNA methylation; transcriptomics; zebrafish; gastrulation; germ layer

1. Introduction

Chronic exposure to pollutions is associated in wild animals with immunosuppression, increased sensitivity to stress and cancerogenesis, all contributing to loss of fitness and raising concerns for species conservation [1–7]. Ionising radiation (IR) can induce double-strand DNA breaks that may lead to cellular senescence, cell death or cancer [8,9]. The early phases of embryonic development are particularly sensitive to stress and DNA mutations [10], as somatic mutations can accumulate through cell proliferation in a wide number of cells and organs, increasing the risks of morphological defects and cancers [11], especially at high doses of IR (more than 0.1 Gy). However, the biological effects of low dose rates of IR (defined by UNSCEAR at < 6 mGy/h) [12] remain largely unknown.

Tight control of transcriptional activity is necessary to orchestrate the dynamic processes of embryonic development. Epigenetic modifications like DNA methylation, histone modifications and noncoding RNAs, are important modulators of gene activity during development. Just after fertilisation, the zygote divides rapidly during the cleavage stage, relying on the maternally deposited material (mRNA and proteins) for cell division, until it reaches the maternal to zygotic transition (MZT) [13,14]. The level of DNA methylation changes dramatically during this early phase of embryogenesis, as the parental DNA methylation marks are erased rapidly in order to reach totipotency [15]. This process of DNA methylation reprogramming is observed in rodents and zebrafish, which suggests that it could be a common process in vertebrates, but differences exists between these species. In mice, erasure of DNA methylation marks is almost complete and few loci escape, like imprinted genes. In contrast, studies in zebrafish demonstrated that DNA methylation marks are not extensively erased but are rather decreased just after fertilisation [16,17]. After the MZT, the diploid embryonic genome becomes activated and starts to produce mRNA, which requires the epigenetic marks, including DNA methylation patterns, to be re-established in order to proceed with morphogenesis. At gastrulation, the morphogenetic mechanism of convergence and extension shapes the rudimentary body plan, together with the formation of the three germ layers, ectoderm, mesoderm and endoderm, at the origin of all tissues and organs in the organism. The gene regulatory networks that drive vertebrate germ layer morphogenesis are well documented, especially in zebrafish and in *Xenopus* as these species are easily amenable to experimentations after fertilisation [18,19], which allows a detailed analysis of altered processes.

Changes in epigenetic marks have already been observed after exposure to high and low doses of IR (lower than 0.1 Gy). At high doses (5 Gy), the expression levels of DNMTs and methyl CpG binding proteins (MeCP2) were decreased, leading to global DNA hypomethylation [20], a sign of genomic instability [21] and one of the first epigenetic abnormality discovered in cancer cells [22]. However, fewer studies are available in the field of low doses. For instance, exposure of pregnant mouse from 0.7 to 7.6 cGy resulted into dose- and sex-dependent epigenetic modifications at the A^{vy} locus in the offspring [23]. In another study, exposure of zebrafish embryos to IR at 10.9 mGy/h for 3 h modified the H3K4me3 histone mark in important developmental genes like *vegfab*, *geminin* and *hnf4a*, but effects on DNA methylation were not investigated [24]. Altogether, these results suggest that IR can induce epigenetic changes during embryogenesis. However, how these epigenetic changes affect gene expression, with possible harmful consequences on embryonic development, remains largely unknown.

We previously demonstrated that IR at 0.5, 5 and 50 mGy/h alter the transcriptional program of neurogenesis and somitogenesis in 24 hpf zebrafish embryos, and that these molecular perturbations correlated with decreased larval motility at 120 hpf [25]. The present study focuses on the transcriptomic and epigenetic effects of IR on gastrulation. Increasing dose rates of gamma IR spanning five orders of magnitude, from 0.005 to 50 mGy/h, were used. The two lower dose rates, 0.005 and 0.05 mGy/h, encompass the benchmark dose rate of 0.01 mGy/h recommended for ecosystem radiological protection [26] and were thus defined as low dose rates. The dose rates of 0.5 and 5 mGy/h, in the range of the DCRL [27] where phenotypical effects start to be observed in juvenile fish, were defined here as moderate. Finally, we defined 50 mGy/h, typical of exposures shortly after the Chernobyl accident, as a high dose rate. A system biology approach was chosen to study the epigenetic modifications (by whole genome bisulphite sequencing, WGBS) and changes in transcriptional activities (by RNA-seq) induced by IR during gastrulation (6 h post-fertilisation, hpf). This stage of development corresponds to the shield stage, roughly at the middle of the gastrulation, when the three embryonic germ layers (mesoderm, endoderm and ectoderm) are being set up [28]. The effects of IR on gene expression were investigated by RNA-seq at all dose rates (from 0.005 to 50 mGy/h). DNA methylation changes were studied at 5 and 50 mGy/h, two dose rates at which we anticipated more detectable effects.

2. Results

2.1. A Transcriptome-Wide Analysis Reveals Changes in the Expression of Genes Involved in Morphogenesis after Exposure to IR

A transcriptomic analysis was performed in order to identify the biological pathways altered by IR during the early phase of zebrafish development. Fertilised embryos were exposed continuously to IR until the shield stage (6 hpf) at dose rates of 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 mGy/h. A total of 37 samples including controls (at least 3 replicates per condition) was used for pairwise differential expression analysis (Figure S1). No obvious morphological changes or increased mortality were observed at any of the dose rates tested here. The number of differentially expressed genes (DEG) within our significance threshold (|fold change| $\geq$ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) increased nonlinearly with the dose rate: 39 DEG at 0.005 mGy/h, 25 DEG at 0.05 mGy/h, 654 DEG at 0.5 mGy/h, 668 DEG at 5 and 2637 DEG at 50 mGy/h. No DEG was common to the five dose rates (Figure 1a). The largest overlap was observed for the two highest dose rates, 5 and 50 mGy/h (589 DEG, 21.6%, n = 2716 genes), which suggests that the transcriptomic responses induced in these two conditions were partially overlapping. The three embryonic layers, ectoderm, mesoderm and endoderm, are formed during gastrulation. After exposure to IR, genes involved in the specification of the three germ layers were impacted at all dose rates tested here (Figure 1b). Well-known transcription factors (TF) involved in morphogenesis, like members of the *fox*, *tbx*, *cdx*, *lft*, *lhx*, *sox*, *bmp* or *gata* families, were misregulated. Two different clusters were identified based on hierarchical clustering of gene expression. Cluster 1 (red) was composed of genes upregulated at 5 and 50 mGy/h but also, to a lower extend, at the other dose rates, while cluster 2 (green) was composed of genes mostly downregulated in the different conditions. Exposure to IR can thus alter the expression of genes important for germ layer morphogenesis at 5 and 50 mGy/h, but also at low dose rates below 0.5 mGy/h.

We then checked if some genes displayed a dose-dependent response to radiation by analysing the different expression patterns of 3319 DEG (see Material and Methods). Four different patterns of expression were discriminated in response to increasing dose rates of radiations (Figure 1c). Two clusters were composed of genes that responded nonlinearly to the dose rates. Cluster 1 (n = 750 genes) was characterised by genes strongly upregulated only at 0.5 mGy/h, while genes in cluster 2 (n = 794 genes) were downregulated at 0.5 mGy/h but upregulated at 50 mGy/h (Figure 1c,d). In contrast, genes in clusters 3 (n = 459 genes) and cluster 4 (n = 927 genes) displayed a linear response to the dose rate, the genes being increasingly upregulated or downregulated from 0.5 to 50 mGy/h (Figure 1c,d). These results indicate that a part of the transcriptional response to IR follows a dose-dependent response.

2.2. Moderate and High Dose Rates of IR Impact Biological Pathways Involved in Ectoderm and Mesoderm Development

A pathway enrichment analysis was performed using the Gene Ontology (GO) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) repositories. Key developmental processes such as regulation of mesodermal fate (erythrocyte, myeloid cell differentiation and somitogenesis), ectodermal fate (nervous system development) as well as canonical Wnt signalling were impacted at the two highest dose rates (Figure 2, Table S1 and Figure S2a). In addition, several genes of the retinoic acid pathway (RA) involved in the regionalisation of the three germ layers along the anteroposterior axis (*crabp2b*, *rarab*, *aldh1a2*) were upregulated at 5 and 50 mGy/h (Table S2). Fewer biological pathways were enriched in the other conditions (from 0.005 to 0.5 mGy/h) due to the small number of DEG. However, a significant enrichment of genes involved in mitochondrion activity (electron transport chain, oxidative phosphorylation and ATP synthesis-coupled electron transport) was found at 0.5 mGy/h and higher dose rates (Figures S2 and S3). As IR exposure leads to partially overlapping transcriptomic response at 5 and 50 mGy/h (21.6%, 589 DEG), we checked the common deregulated pathways in these two conditions. A significant enrichment of pathways involved in embryonic development (pattern specification process and canonical Wnt signalling pathway), cell differentiation (polarised epithelial cell differentiation),

mesoderm development (somitogenesis) and metabolism (regulation of lipid biosynthetic process and peptide metabolic process) was found (Figure S4).

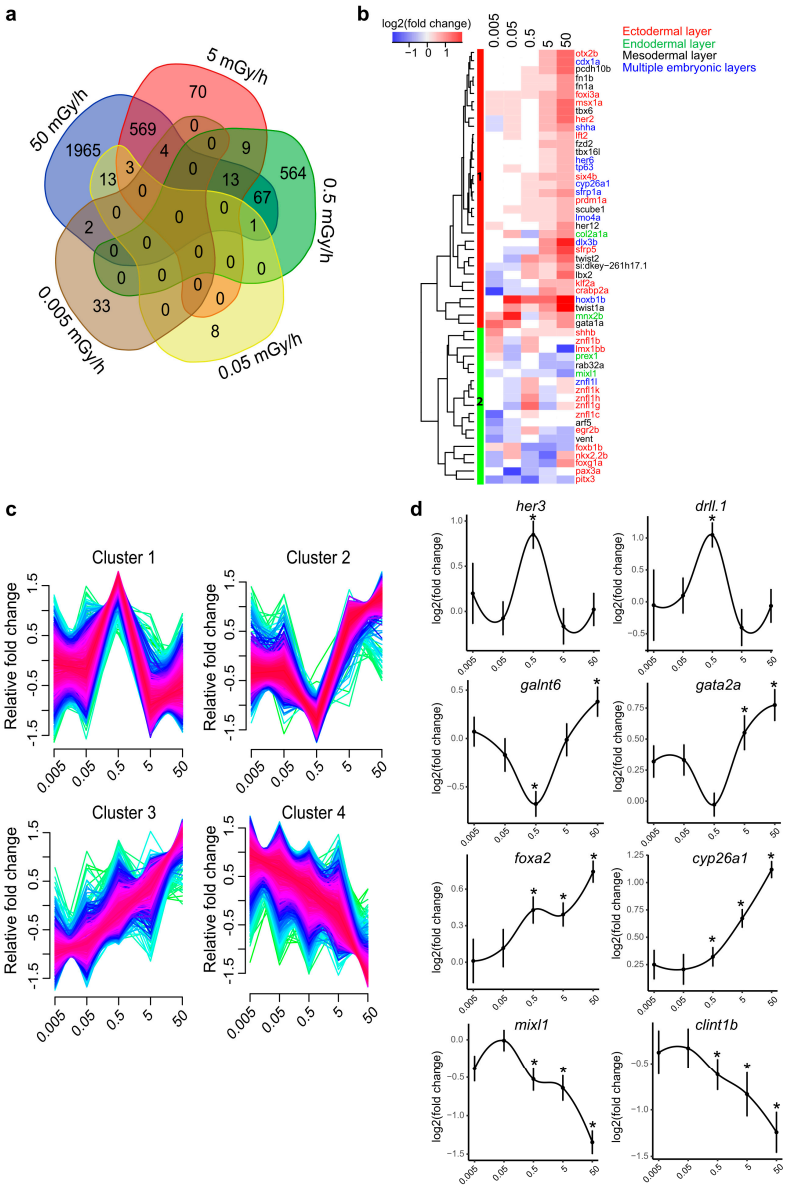


Figure 1. Transcriptomic analysis of shield embryos (6 hpf) exposed to ionising radiation (IR). Dose rates are indicated in mGy/h. (**a**) Venn diagram of differentially expressed genes at the five dose rates (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted *p*-value < 0.01). (**b**) Hierarchical clustering of log2 fold change across all dose rates of genes known to be expressed in the different germ layers during gastrulation (based on ZFIN annotations, see Material and Methods). Known expression in the ectoderm (red), endoderm (green), mesoderm (black) or in multiple embryonic layers (blue) is indicated. Upregulated genes are displayed in red, downregulated genes in blue and no changes in white. Cluster 1 (red) and cluster 2 (green) are indicated. (**c**) Expression patterns obtained by fuzz-mean clustering of 3319 selected DEG misregulated in at least one condition (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted *p*-value < 0.01). The fold-change were normalised on the same scale, and the y-axes indicate relative fold change. Genes with high cluster membership are displayed as red lines, those with moderate membership in blue and low membership in green. (**d**) Example of gene expression patterns across the different dose rates using loess-smoothed conditional means. Two genes are displayed for each of the four clusters detected by fuzzy-mean clustering. Mean of log2 (fold change) are indicated as dots and standard errors are indicated as vertical bars (* adjusted *p*-value < 0.01).

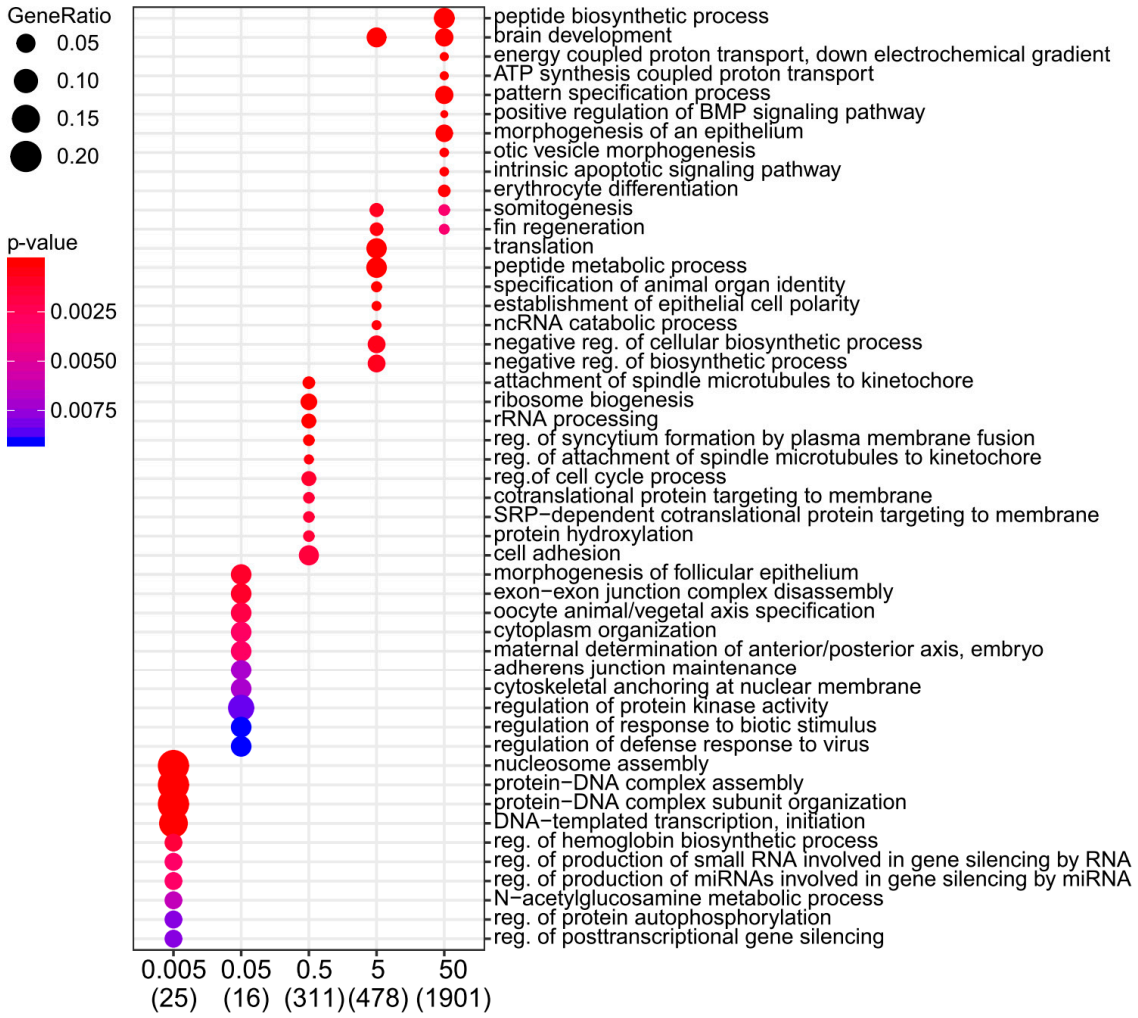


Figure 2. Dot plot of zebrafish GO (Gene Ontology) term enrichment showing the top 10 enriched pathways. Dose rates are indicated at the bottom in mGy/h. The total number of deregulated genes within the GO pathways selected on the dot plot are indicated in brackets. Colours indicate the *p*-values from Fisher's exact test, and dots size is proportional to the number of differentially expressed genes (DEG) in the given pathway.

2.3. Promoter Analysis Reveals Enrichment of Master Regulators Expressed in the Three Germ Layers and Involved in Mitochondria Energetic Metabolism

We analysed the promoter (genomic sequence 2 kb upstream and 50 bp downstream the transcriptional start site) of all DEG to identify master transcriptional regulators that orchestrate gene expression, focusing on the three highest dose rates as such analysis requires large number of DEG. This analysis allows the characterisation of the upstream transcription factors potentially responsible for the observed transcriptional changes in the RNA-seq data. We found 84 different TF DNA-binding sites enriched in the promoter of the DEG at 0.5 mGy/h, 51 at 5 mGy/h and 80 at 50 mGy/h (Figure S5 and Table S3). By checking the expression of these TF during zebrafish embryogenesis, we found that 24% were expressed during gastrulation (Table S3). We then analysed the DNA-binding sites in common between the three dose rates and found an enrichment of TF involved in the development of the three germ layers (FOXG1, NKX6-1 and POU3F3) as well as TF regulating glycolysis in mitochondria (FOXK1 and FOXK2) [29] (Table S3). These data show that TF regulating morphogenesis or involved in energetic metabolism were altered by exposure to IR at dose rates greater or equal to 0.5 mGy/h.

2.4. Embryonic Exposure to Moderate and High Dose Rates of IR Induces Promoter Hypomethylation

To assess whether IR can modify epigenetic marks and thereby modulate transcriptional activity, we analysed DNA methylation at the whole genome scale using WGBS on shield stage embryos. The two highest dose rates of 5 and 50 mGy/h were used as these exposures lead to many DEG. The methylation levels of 18,322,470 and 17,759,785 CpG were quantified, respectively, at 5 and 50 mGy/h, and compared to controls. The global methylation level of 5-methyl cytosine (5mC) in the CpG context was close to 80% in the control group (Figure 3a), in accordance to previous zebrafish studies on similar embryonic stages [16]. No change in global methylation levels was detected after exposure to IR (Figure 3a). As expected, a fraction of known CpG islands (CGIs) was highly methylated in control embryos and confirmed the quality of the WGBS data (Figure 3b). The pairwise differential analysis of CpG methylation levels between control and exposed conditions highlighted 8190 and 7560 differentially methylated cytosines, respectively, at 5 and 50 mGy/h (adjusted p-value < 0.05 and methylation difference $\geq 10\%$). To check if exposure to IR can modify methylation levels in CGIs, methylation levels between the control and exposed embryos at 5 and 50 mGy/h were compared. Both hypo- and hypermethylation of CGIs were detected, but hypomethylated CGIs were predominant in both conditions (Figure 3c,d). As CpG are usually used as a proxy for promoter localisation, we checked directly the methylation status of known promoters. As for CGIs, a fraction of known promoters was highly methylated in the zebrafish genome (Figure 3e) and promoter hypomethylation was predominant after exposure to IR at 5 and 50 mGy/h (Figure 3f,g). It is usually assumed that promoter hypomethylation is associated with an open chromatin state that activates transcription. To check whether IR-induced DNA hypomethylation was associated with an active or inactive transcriptional state, we mapped the 5mC obtained by WGBS against the histone marks H3K27me3 and H3K4me3 from a published ChIP-Seq dataset made at the same developmental stage [30], as these marks are associated with promoters repression and activation, respectively, after the MZT [31]. High levels of 5mC were observed in the vicinity of both histone marks in controlled conditions, as expected (Figure 3h,k). Furthermore, DNA hypomethylation was observed in the vicinity of both H3K27me3 (Figure 3i,j) and H3K4me3 (Figure 3l,m) marks, showing that DNA hypomethylation could be associated with both repressed and active promoters. High doses of IR are known to induce genomic instabilities and can be associated with the mobilisation of transposons. To check if such processes might occur in our exposure scenario, the DNA methylation level of the different transposon families present in zebrafish [32] was checked. No change in DNA methylation was detected in DNA transposons or retrotransposons (Figure S6).

To further assess how DNA methylation is impacted after exposure to IR, we grouped 5mC into differentially methylated regions (DMR), a common way to study DNA methylation differences across biological samples and assess their possible function in transcriptional regulation [33] (see Material and Methods). We found 1858 and 1208 DMR (methylation difference > 10%, permutation p-value < 0.01) in the zebrafish genome after exposure to 5 and 50 mGy/h, respectively. Among these, 297 DMR (either hyper- or hypomethylated) were found in common at both dose rates and separated by less than 2 kb. The comparison of their methylation status at 5 and 50 mGy/h showed that DMR were mostly hypomethylated compared to controls, and 60% (corresponding to 177 DMR) were differentially methylated concordantly at 5 and 50 mGy/h (Figure 4a). DMR localised in promoter regions are classically considered to modulate gene expression in vertebrates. We, therefore, studied more closely the distribution of DMR around the different genomic feature (promoters, introns, exons, UTRs and intergenic regions). Most DMR were located in intergenic regions or introns but up to 20% of the DMR were located at less than 3 kb from known promoters (Figure 4e). Focusing on DMR located close to promoters, we found that DMR were enriched at the TSS in both exposed groups (Figure 4b). In addition, the discrimination between hypo- and hypermethylation showed that DMR localised in the TSS region were hypomethylated at both dose rates (Figure 4c,d). Taken together, these results show that exposure to IR leads to a reduction of DNA methylation in gene promoter and indicate a potential functional role on the modulation of transcriptional activity.

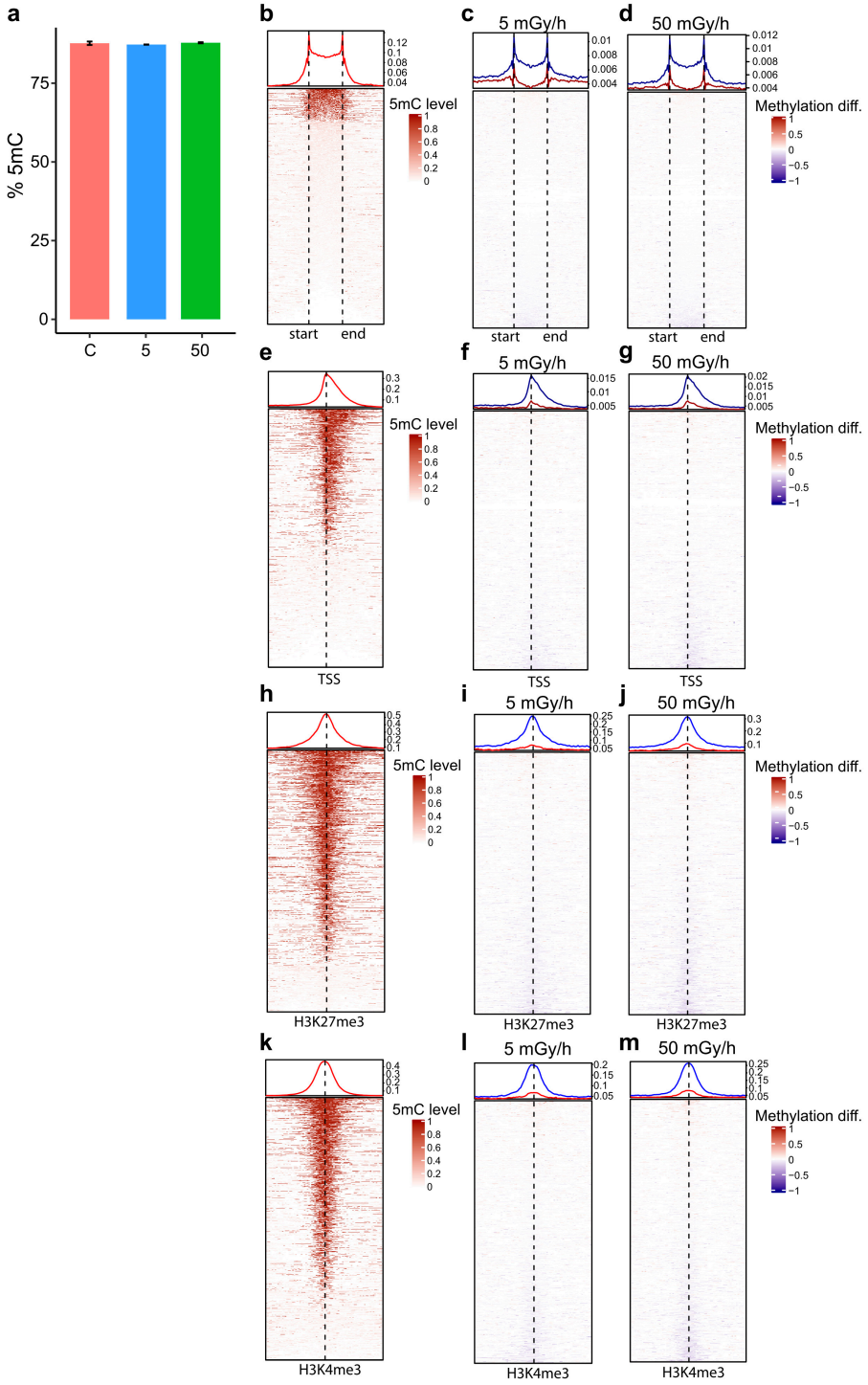


Figure 3. Analysis of 5mC abundancy in the CpG context after exposure to IR at 5 and 50 mGy/h in shield embryos. (**a**) Mean percentage of 5mC in control (C, red), 50 mGy/h (50, green) and 5 mGy/h (5, blue). Standard errors for the biological replicates are indicated. (**b**–**m**) Dot plots of 5mC mapped in a window 2 kb up and down to known genomic features. Start–end of CpG islands (CGIs) as well as localisation of transcriptional start (TSS) or the histone marks H3K27me3 and H3K4me3 are indicated by the dashed lines. The fraction of 5mC in the +/− 2 kb genomic window is indicated at the top of each dot plot. (**b**) Fraction of 5mC in control embryos in CGIs, (**e**) in TSS, (**h**) in H3K27me3 and (**k**) in H3K4me3. Fraction of differentially methylated cytosine (5mC) in exposed embryos (5 and 50 mGy/h) in (**c**,**d**) CGIs, (**f**,**g**) TSS, (**i**,**j**) H3K27me3 and (**l**,**m**) H3K4me3. Blue: hypomethylated compared to control and red: hypermethylated.

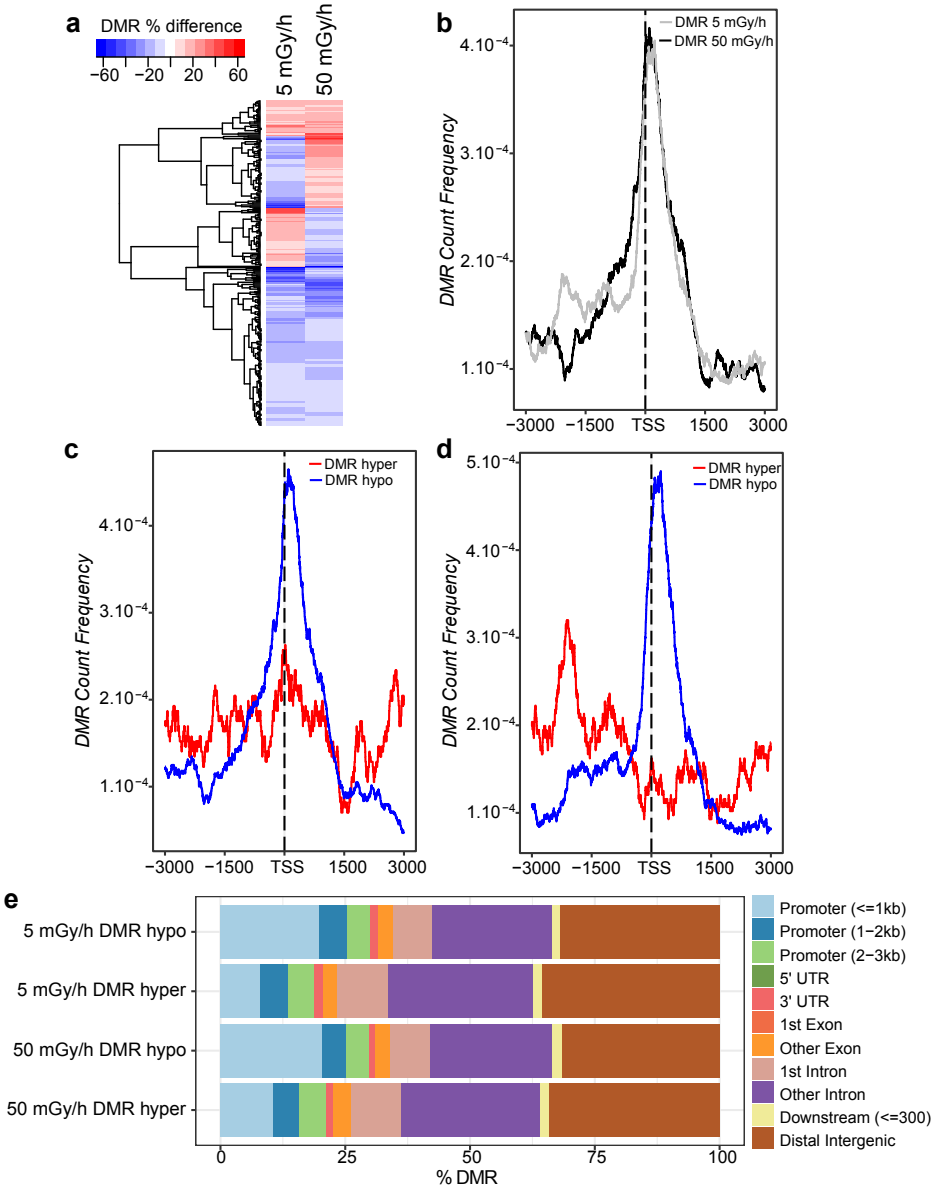


Figure 4. Analysis of differentially methylated regions (DMR). (**a**) Heatmap of methylation difference (%) in DMR detected at 5 and 50 mGy/h. Blue DMR: hypomethylation, red DMR: hypermethylation and white: no change. (**b**) DMR count frequency in a 6 kb window relative to known TSS (dashed line) at 50 mGy/h (black) and 5 mGy/h (grey). (**c**) Distribution of hypomethylated (blue) and hypermethylated (red) DMR in a 6 kb window centred to known TSS (dashed line) at 50 mGy/h and (**d**) at 5 mGy/h. (**e**) Distance of hypermethylated and hypomethylated DMR to known genomic features (TSS, gene promoter, exons, introns and intergenic regions).

2.5. Promoter Hypomethylation after Exposure to Moderate and High Dose Rates of IR Modulates Transcriptional Activity of Important Developmental Genes

To check if promoter hypomethylation can have an impact on gene activity, we crossed the WGBS data with the expression analysis made by RNA-seq. A total of 600 hypomethylated DMR, located at less than 500 bp of known TSS and hypomethylated at 5 or 50 mGy/h, were selected, and the expression of the corresponding genes was analysed by hierarchical clustering (Figure 5). We observed two different clusters of genes: cluster 1 (red) was composed of genes expressed at low level in controls and upregulated after irradiation at 5 and 50 mGy/h, while cluster 2 (green) was composed of genes that were mostly downregulated in the exposed conditions compared to controls.

DMR hypomethylation was thus correlated with a modulation of transcriptional activity, but not strictly with the upregulation of gene expression. We then checked if we could detect differentially methylated promoters (hyper- or hypomethylated) associated with significant transcriptional changes (DEG with adjusted p-value < 0.05). We detected 227 DEG with DMR at 50 mGy/h (Figure 6, two first outer circles), containing a differentially methylated promoter, and 99 genes at 5 mGy/h (Figure 6, two inner circles). For instance, *twist1a* expressed in mesoderm during gastrulation [34] was significantly upregulated eight times (adjusted p-value < 10^{-7}) in zebrafish embryos exposed at 50 mGy/h compared to controls, and displayed a 10% hypomethylation in a DMR located 804 bp upstream *twist1a* TSS (Figure 7a, upper panel). Another gene, *blf*, expressed in mesoderm and involved in convergent extension during gastrulation [35], contained a hypermethylated DMR (29%) located 2258 bp upstream TSS and was downregulated 1.8-fold in embryos exposed at 50 mGy/h (adjusted p-value < 10^{-2}) (Figure 7a, lower panel). At 5 mGy/h, *fgf4* implicated in left–right symmetry was downregulated 2.6-fold and a hypomethylated (10%) DMR was detected at 205 bp from its TSS (Figure 7b, upper panel). Similarly, a DMR located in the *bmp2b* promoter (distance to the TSS = 0), a morphogen involved in specification of the ventral fate in gastrulation [36], was hypomethylated at 5 mGy/h and associated with transcriptional activation (adjusted p-value < 0.05 and fold change = 1.7). These results confirm that DMR located in important genes regulating morphogenesis can be associated with significant transcriptional changes, but also highlight that, in our data, promoter hypomethylation was not strictly associated with transcriptional activation.

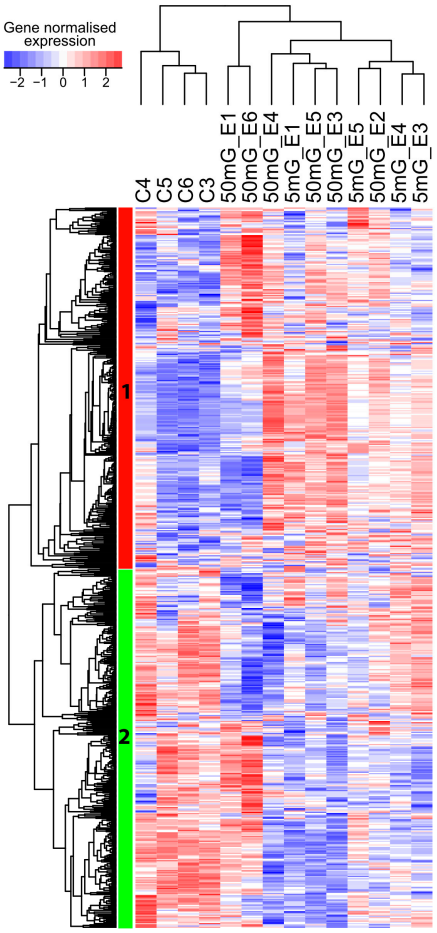


Figure 5. Heat map of normalised expression of 600 genes with a hypomethylated promoter (DMR < 500 bp from TSS) at 50 mGy/h (50 mG), 5 mGy/h (5 mG) and control (C). Biological replicates in each condition are displayed. Blue: low expression, white: moderate expression and red: high expression.

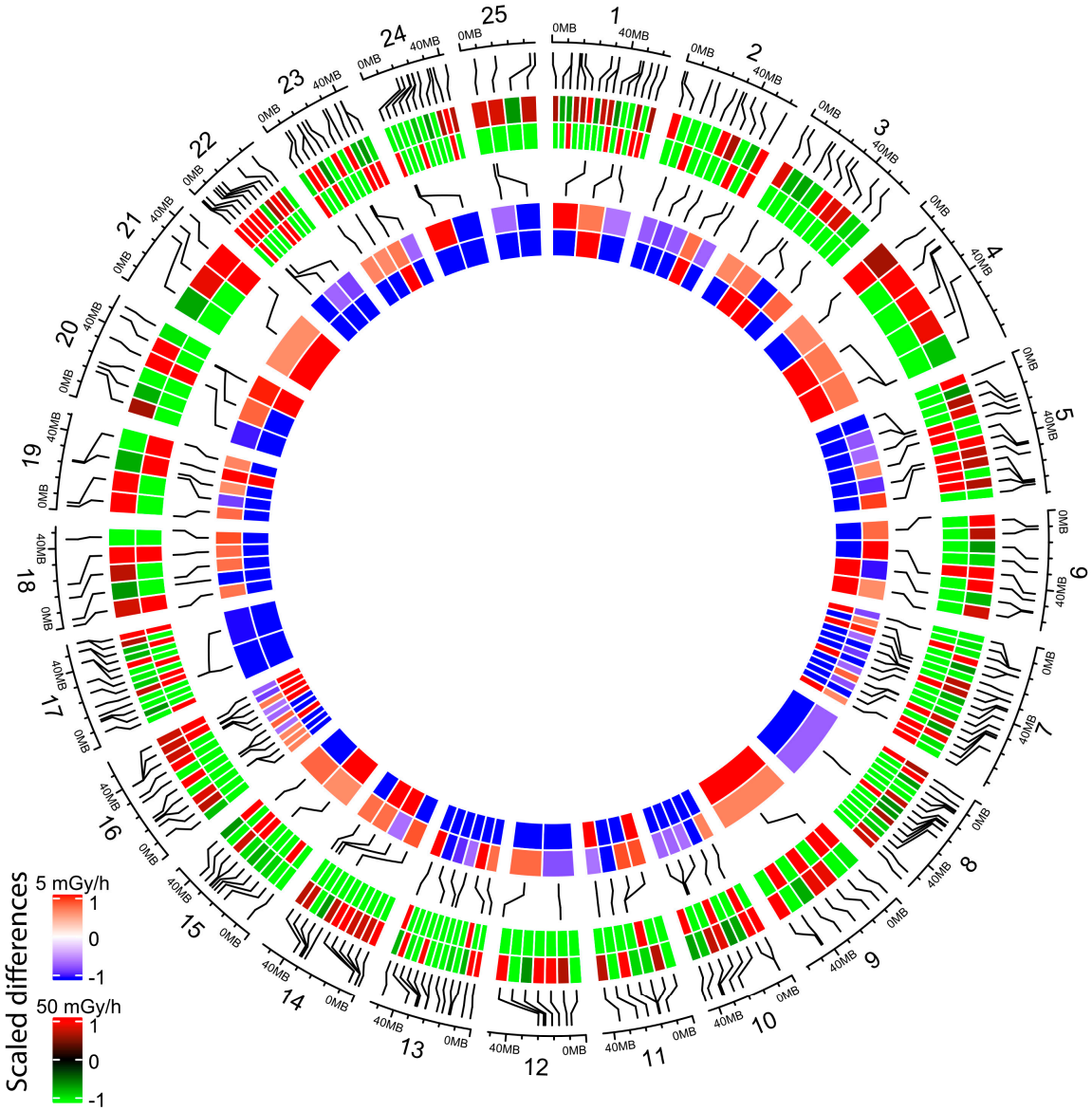


Figure 6. Circos plot of differentially methylated promoter associated with DEG at 50 mGy/h (two outer circles) and 5 mGy/h (two inner circles). Zebrafish chromosome number are indicated from 1 to 25 and approximate genomic locations are displayed by black lines. Promoter methylation changes (defined as DMR located at < 3 kb from TSS, % methylation difference ≥ 10% and permutation p-value < 0.05) and gene expression changes (fold change of DEG with adjusted p-value < 0.05) were normalised on the same scale to visualise effect of promoter methylation on gene expression. Outer circle: % methylation difference in DMR at 50 mGy/h (hypermethylation: red, no change: white and hypomethylation: green). Second circle: DEG at 50 mGy/h (upregulation: red, no change: white and downregulation: green). Third circle: % methylation difference in DMR at 5 mGy/h (hypermethylation: red, no change: white and hypomethylation: blue). Inner circle: DEG at 5 mGy/h (upregulation: red, no change: white and downregulation: blue).

Finally, a functional annotation of the differentially methylated promoter was made using DMR located at less than 3 kb from known TSS. The GO pathways associated with promoter methylation changes were involved in general process of embryonic development (developmental growth, specification of symmetry and regulation of gastrulation), ectoderm development (telencephalon development, hindbrain development, spinal cord development, regulation of neuron development, synaptic signalling and neurogenesis) and mesoderm development (somitogenesis) (Figure 8).

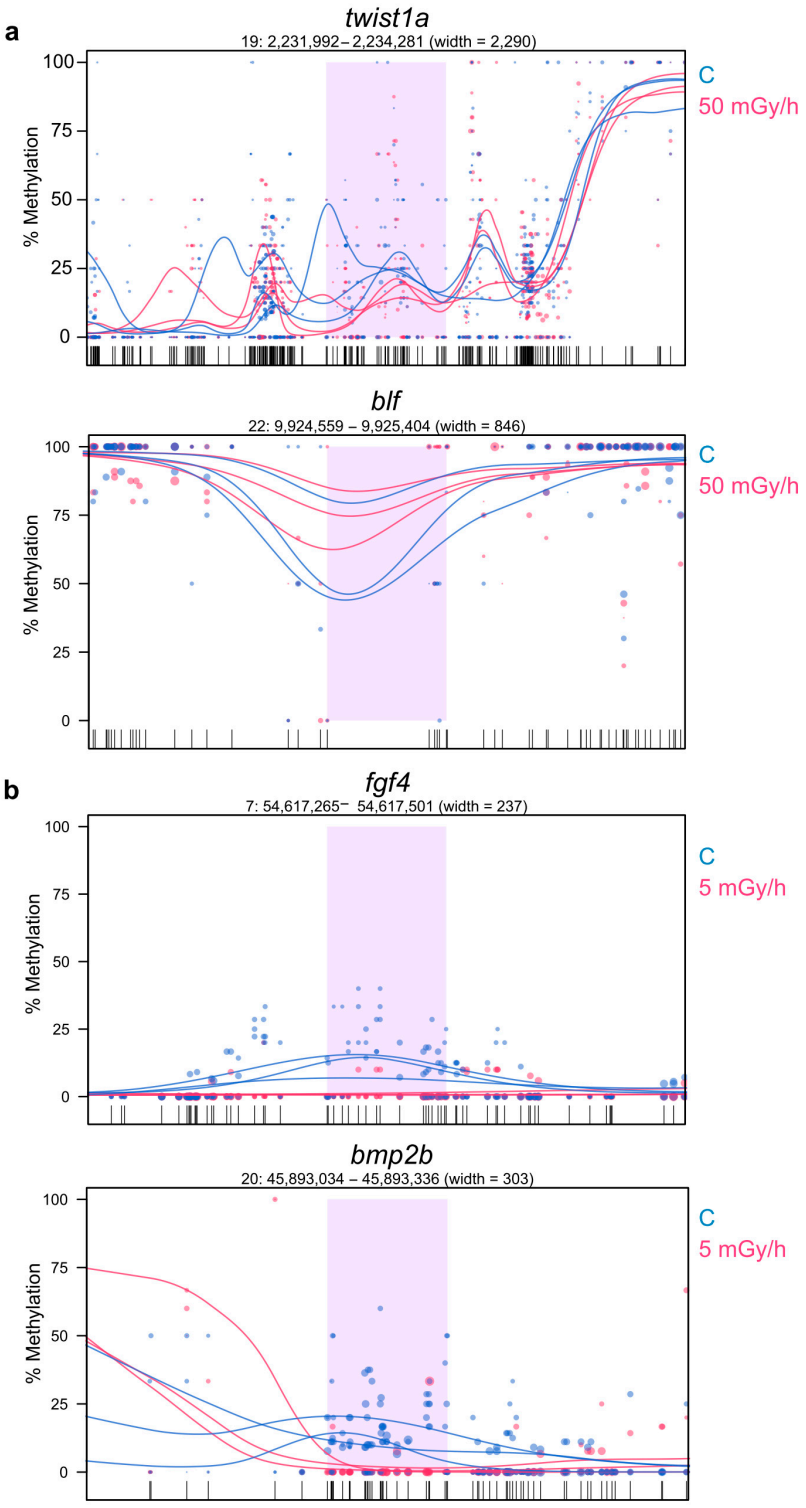


Figure 7. Example of methylation profile of DMR located in the promoter of DEG gene at (**a**) 50 mGy/h and (**b**) 5 mGy/h. The purple part corresponds to the DMR detected with significant methylation change (permutation p-value < 0.05 and methylation difference $\geq 10\%$). The gene name and the genomic coordinated are indicated at the top. Locations of methylated CpG measured in the whole genome bisulphite sequencing (WGBS) data are indicated at the bottom by black vertical lines. Methylation of CpG appears as circles for each biological replicate with a dot size proportional to the reads coverage. The lines correspond to the model of CpG methylation level for each sample. Red: 50 or 5 mGy/h and blue: control.

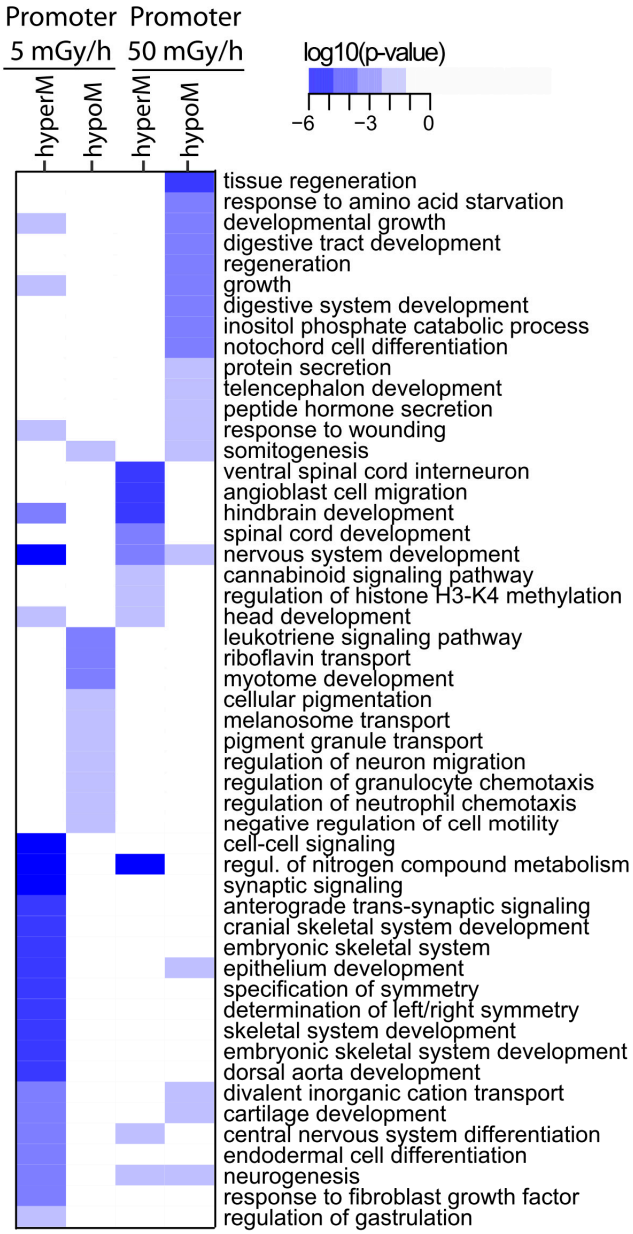


Figure 8. Heat map of GO enrichment of gene promoter displaying significant methylation changes. DMR with permutation *p*-values < 0.05 and located less than 3 kb from the TSS were used. Dose rates and methylation state are indicated at the top. Colours indicate the enrichment *p*-values obtained from Fisher's exact test.

3. Discussion

In this study, we investigated how the early step of zebrafish embryonic development can be altered after exposure to IR by studying genome-wide gene expression and DNA methylation. No morphological abnormalities or increased embryonic lethality could be observed at any of the dose rates tested here. This is in agreement with earlier studies that showed that IR exposure at less than 150 mGy does not impact embryonic survival directly [37], but rather induces subtle neuromuscular and motility defects [25]. However, we observed different molecular effects depending on the dose rates, from modification of mitochondrial processes at moderate and high dose rates (> 0.5 mGy/h), to perturbation of important TF involved in morphogenesis of ectoderm and mesoderm at the two highest dose rates (5 and 50 mGy/h). The transcriptional profile obtained at 5 mGy/h was largely overlapping the one at 50 mGy/h, and, as expected, dose rates at 0.5 mGy/h and below induced subtle

changes on gene expression. However, a high number of unique genes were found at 50 and 0.5 mGy/h indicating that a particular transcriptional response might occur at these two dose rates. In addition, the expression of several genes varied proportionally with dose rates from 0.5 to 50 mGy/h, while others displayed nonlinear patterns especially around 0.5 mGy/h. These results suggest that, in our study, a linear dose–response with irradiation is not a common feature to all genes and all dose rates. Rather, we observe that a specific set of genes responded linearly with dose rates between 0.5 and 50 mGy/h, but not at lower dose rates. Similar nonlinear response to gamma radiation has already been described in mouse and plants for cytogenetic damages like micronuclei and chromosomic aberrations [38].

Functional analysis made on the transcriptomic data showed a significant enrichment of genetic pathways involved in neuroectoderm and mesoderm development at 5 and 50 mGy/h. More specifically, molecular processes regulating neurogenesis (GO:0060322: head development, GO:0007399: nervous system development and GO:0030902: hindbrain development), somitogenesis (GO:0061053: somite development) and differentiation of blood cells (GO:0061515: myeloid cell differentiation and GO:0043249: erythrocyte differentiation) were significantly enriched at the two highest dose rates. However, these organs are not formed yet in shield embryos (6 hpf). The detailed analysis of the deregulated genes present in these GO terms, highlights the presence of many genes involved in Notch signalling (*deltaB*, *her6*, *her12* and *notch3*), as well as morphogens (*shha* and *bmp2b*) and TF (*sox2*, *six3b*, *otx2a* and *lft1*). All these genes are known to be expressed during gastrulation but are also involved in organogenesis later in development (reviewed in [39–41]). We thus interpreted these results as a deregulation of morphogenesis in the corresponding germ layers, neuroectoderm and mesoderm for the central nervous system and somite development, respectively. The deregulation of TF specifically expressed in the ectoderm (*msx1a*, *otx2b*, *lft2* and *her2*) and in the mesoderm (*tbx16l*, *fzd2*, *tbx6* and *twist1a*), during gastrulation, support the hypothesis that ectoderm and mesoderm were impacted at the molecular level by IR. How these molecular effects affect gastrulation or neurogenesis and somitogenesis at the cellular level was not investigated in the present study. And further studies are required to confirm the observed transcriptional changes at other levels. However, it was observed in our previous study (using the same experimental settings) that IR at 5 and 50 mGy/h altered the expression of genes involved in neurogenesis and somitogenesis in 24, 48 and 96 hpf zebrafish embryos and larvae, and these molecular effects were linked to neuromuscular impairments and larval motility defects in 5 days old larvae [25]. From these complementary sets of data, it can be proposed that IR at 5 and 50 mGy/h deregulates gastrula stage neuroectoderm and mesoderm morphogenesis, which might lead later in development to central nervous system and muscle impairments. Another study demonstrated neuromuscular impairment as well as a decrease of acetylcholinesterase expression during chronic exposure at similar dose rates, reinforcing prior results showing that IR at more than 5 mGy/h can lead to neuromuscular disorders [42]. All these results indicate that the developing central nervous system seems particularly vulnerable to stress and DNA damage [11,43]. In line with this observation, epidemiological studies conducted on Hiroshima and Nagasaki survivors demonstrated brain development defects and reduced cognitive performance in foetus exposed in uterus at doses higher than 0.31 Gy [44–46]. Likewise, recent field studies showed similar effects on wild animals, as decreased brain and body size were reported in monkey foetuses obtained in Fukushima Prefecture [47] and brain size of young birds living in the Chernobyl exclusion zone were also found to be smaller than in control area [48]. Taken together, our results indicate that the functional defects in neurogenesis and muscle development observed at 24 hpf and up to 5 days post fertilisation, might have their root, at least in part, in early developmental perturbations in the morphogenesis of the neuroectoderm and the mesoderm.

In a recent study, Hurem et al. [49] described the effects of IR (at dose rates higher than 0.54 mGy/h) on zebrafish gastrulation. The authors described a deregulation of RA and Notch signalling, as well as other important developmental genes like *vegfab*, *apoA1b*, *sox2* and *vox*. In addition, the authors used the Ingenuity software (QIAGEN, Inc., California, USA https://targetexplorer.ingenuity.com/) to describe potential upstream regulators (*myc*, *tp53*, *tnf* and *hnf4a*) and potential disease networks

(brain malformation, growth failure, necrosis and hypoplasia of organs). If the effect on important developmental pathways (in particular RA and Notch signalling) was clear, the authors did not describe how IR can alter the morphogenesis of the three germ layers. In addition, the relationship between upstream regulators and downstream effects did not reveal any clear hypothesis on how the TF expressed during gastrulation were altered and how these effects could translate to detrimental effects at later stages (besides the potential role of *myc* in the induction of tumorigenesis and t*p53* induction of apoptosis). Presumably, the usage of the Ingenuity software precluded such analysis, as its knowledge-base is using annotations from human, rat and mouse [50] but not zebrafish. In the present study, we confirmed the deregulation of Notch and RA signalling at 5 and 50 mGy/h. Furthermore, we found that other pathways such as Wnt and BMP signalling were also altered. The identification of DNA-binding site of key TF expressed in ectoderm and the mesoderm in the DEG promoter consolidates the hypothesis that exposure to IR at dose rates higher than 5 mGy/h deregulates morphogenesis during gastrulation, with potential harmful consequences on neurogenesis and somitogenesis later in development.

In addition to the effects on the transcriptome, our WBGS results demonstrated that embryonic exposure to IR at 5 and 50 mGy/h can alter DNA methylation patterns outside, but also in the vicinity of TSS. Between 20% and 25% of the DMR were located in promoter regions (distance < 3 kb from TSS), while 60% to 70% of the DMR were located inside intronic or intergenic regions. Importantly, the functional annotation of differentially methylated promoters (DMR located at < 3kb from TSS) showed an enrichment of genes involved in embryonic development, neurogenesis and somitogenesis. These results correlate nicely with the transcriptomic data and collectively point towards a deregulation of genes involved in the morphogenesis of ectoderm and mesoderm upon exposure to 5 and 50 mGy/h. Mechanistically, these data suggest that IR could lead to changes in promoter methylation at the origin of the modulation of gene activity we observed at the transcriptomics level. It was already shown that exposure to high doses of IR decreases the expression levels of DNMTs and MeCP2 leading to global DNA hypomethylation [20,51]. If such mechanisms occur during embryonic development for low doses of IR remains to be confirmed, but no changes in DNMT expression was detected in our data (data not shown). How IR induces promoter hypomethylation during embryogenesis remains to be deciphered, as well as whether these methylation changes modify gene activity directly or not.

The distinction between hypo- and hypermethylated regions showed that most DNA methylation changes in promoters and in CGIs corresponded to a hypomethylation of these DNA regions. Previous studies demonstrated that demethylation of promoters positively modulate transcription [52]. By crossing the WGBS data with the expression data obtained by RNA-seq, we detected that hypomethylated DMR located at less than 500 bp from TSS were linked with transcriptional activation in about half of the cases, the other half of the genes being downregulated after exposure compared to controls. In addition, both H3K4me3 activating and H3K27me3 repressing marks were found in the vicinity of the hypomethylated DMR. Even if developmental genes can be poised for activation and thus harbour both H3K4me3 and H3K27me3 marks [53], these results show that DMR can be located in functional gene promoter. But establishing a clear link between DNA hypomethylation and gene activation remains difficult, as other factors (histone code, nucleosome assembly and TF-binding sites occupancy) affect also the chromatin state. Thus, the interaction of DMR with histone marks remains to be determined, for instance, by producing ChIP against H3K4me3 and H3K27me3 on irradiated embryos. In addition, functional studies on particular target genes will help deciphering the causal relationship between methylation changes, transcriptional regulation and adverse outcomes.

Hypomethylation of DNA has already been observed in previous studies after acute exposure to high dose of IR (0.5 to 5 Gy) either in cell lines [54] or in rodents [55–57]. Global DNA hypomethylation can lead to genomic instability [58,59] and the reactivation of transposable elements. We did not observe any changes in global methylation levels, nor in LINE elements or other transposable elements in the zebrafish genome, which suggest that the highest total dose rate used in this study (50 mGy/h during 6 h, i.e., total dose of 300 mGy) is not sufficient to cause genomic instability. Rather, our results indicate

that the DMR associated with a role in gene regulation could be part of the stress response induced by IR. A recent study on zebrafish analysed the effects of a 27 days parental exposure at 8.7 mGy/h on DNA methylation changes in nonexposed F1 embryos at 50% of epiboly (5.5 hpf) [60]. Kamstra et al. found 5658 DMRs, predominantly located at regulatory regions (promoters and enhancers), and did not observe differences in the number of hypo- and hypermethylated DMR. As a comparison, we found 1858 and 1208 DMRs after exposure to 5 and 50 mGy/h, respectively. Despite differences in the exposure scenario (parental compared to direct exposure of embryos), these results suggest that longer exposure to IR (27 days compared to the 6 h used in our study) induce more effect on DNA methylation. DMRs and DEGs analyses on the F1-derived progeny pointed to an alteration of axonal guidance signalling. If axonal guidance is not a biological process ongoing in gastrulating embryos, these results can suggest an impairment of neurogenesis later in development (as proposed by the authors), which is in accordance with our present study where fertilised eggs were directly exposed to IR. These results raise the possibility that modification of DNA methylation patterns induced by IR can occur more frequently in the vicinity of developmental genes that could constitute IR-sensitive hotspots.

Our transcriptomic analysis detected potential effects of IR on mitochondrial energetic metabolism at dose rates higher than 0.5 mGy/h, indicating that this organelle could be sensitive to IR. Previous studies detected effects on mitochondrial activity for high doses (> 0.1 Gy) [61]. Our data show that mitochondrial activity could be altered at low dose rates (< 6 mGy/h). The fact that mitochondria possess less efficient DNA repair mechanisms compared to the nuclear genome [62] could, at least in part, explain our observation. Interestingly, mitigation of oxidative stress and DNA methylation share one biomolecule in their biological pathway, i.e., the S-adenosylmethionine (SAM). Indeed, the intracellular oxidative stress can be reduced in the cells by the synthesis of glutathione, a potent antioxidative molecule [63]. The limiting substrate for glutathione biosynthesis is the cysteine, which is itself synthesised from methionine via transsulphuration [64]. During glutathione synthesis, the methionine is converted into cysteine through reactions that involve SAM. As SAM is also the substrate used by DNMT enzyme to methylate DNA, a competition between DNA methylation and glutathione synthesis can occur in case of limited SAM bioavailability [65]. Thus, the redox status in the cell has an influence on SAM usage and may impact DNA methylation [66]. IR is known to increase the production of reactive oxygen species (ROS) [42] and produce DNA damages even in early gastrula embryos [67]. In the case of prolonged exposure to oxidative stress, glutathione stock can be depleted to protect cell from oxidative stress, which can result in an impairment of DNA methylation [68–70]. In our study, we found an impact on genes involved in oxidative stress and in mitochondrial redox processes at all dose rates but especially at dose rates higher than or equal to 5 mGy/h, suggesting that the redox balance during embryogenesis can be modified during exposure to IR. We found, for instance, that *gpx4a* and *gbx4b* expression, involved in the reduction of hydrogen peroxide, is increased at 5 and 50 mGy/h, as well as *duox*, *bco2l* and *nox1* at 50 mGy/h, which are involved in oxidative stress protection. It is thus possible that the increases of oxidative stress after exposure to IR can lead to partial depletion the SAM stock, at the expense of DNA methylation. However, such scenario would lead to global DNA hypomethylation of the genome, which is not observed in our data, but for much higher doses of IR [54–57,71]. More likely, our data points towards changes in mitochondrial activity as part of the stress response induced by IR, but more data on mitochondrial activity after exposure to low/moderate dose rates of IR (> 0.5 mGy/h) are needed to answer this question.

Our study explored the effects of low to high dose of IR on early embryonic development of zebrafish. Promoter hypomethylation at 5 and 50 mGy/h was associated with significant modulation on gene expression highlighting changes in the expression of gene involved in germ layer development. This observation underlines the role of the epigenetic mechanisms in the understanding of the effects caused by IR. Concordantly, many important developmental pathways like RA, BMP and Wnt signalling were impacted at the transcriptional level at 5 and 50 mGy/h, while few effects were detected at lower dose rates (0.5, 0.05 and 0.005 mGy/h). The transition between the effects induced by low and high dose rates seems thus to be located between 0.5 and 5 mGy/h during embryogenesis (total dose between 3

and 30 mGy, respectively). This is less than the proposed low dose and low dose rate limits defined so far in human (100 and 6 mGy/h [12]), but in the range of the expected dose rates giving rise to observable effects in the fish (0.4 to 4 mGy/h). In addition, we showed that transcription of genes involved in mitochondrial physiology was impacted at dose rates > 0.5 mGy/h. Taken together, our data suggest that the early developmental perturbations in the morphogenesis of the neuroectoderm and the mesoderm might predict the functional defects in neurogenesis and muscle development observed at later stages. From these different data, we propose a model of adverse outcome pathway of IR on embryonic development where perturbations of germ layer morphogenesis during gastrulation can contribute to the neurological and muscle disorders observed at later developmental stages.

4. Methods

4.1. Animal Experimentation and Ethics

Animal care was performed as described before [25]. Briefly, 6–9 month-old adults wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of the AB strain (Amagen, Gif-sur-Yvette, France) were maintained in a ZebTEC system (Techniplast, Decine Charpieu, France) at 28 ± 1 °C, 350–450 µS/cm, pH 7.5 and a photoperiod of 12/12 h. In particular, 20 fishes were housed per 8 L tank. Animals were fed three times per day with TetraMin food flakes (Tetra Werke, Germany). Health was monitored by daily inspection. Embryos were obtained by mating 2 males and 2 females in 1.7 L breeding tanks for 15 min in fresh water (Beach Style Design, Techniplast, France) at a temperature of 28 ± 1 °C. Eggs from all spawn were pooled and grown in 25 mL embryo medium (60 mg/L Instant Ocean, 0.01% (w/v) of methylene blue) under constant temperature (28.5 ± 0.2 °C) and dark light cycles in MIR-154 incubator (Panasonic). Viable embryos were grown up to 6 hpf. All experiments were conducted with a percentage of fertilisation > 80%.

4.2. Irradiation

Gamma ray irradiations were performed in the MICADO experimental irradiation facility (IRSN, Cadarache, France) with four ^{137}Cs sources of 370 GBq (Framatome ANP, Pierrelatte, France). The background level in the installation outside the irradiator was measured by operational dosimetry and was always <0.1 µGy/h. Fertilised embryos were exposed to gamma irradiation from 1 hpf (four-cell stage) up to 6 hpf. Absorbed dose rates in 100 mm diameter petri dish containing 25 mL of fish water and air kerma rates were computed with the Monte-Carlo N-Particle transport code (MCNPX version X-24E). Operational dosimetry with radiophotoluminescent dosimeters (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation, Tokyo Japan) was used to confirm the simulations at 50, 5, 0.5, 0.05 and 0.005 mGy/h. The effective dose rates were 46.80 ± 0.98, 5.08 ± 0.02, 0.47 ± 0.005, 0.052 ± 0.001 and 0.0044 ± 0.0001 mGy/h (Table S4).

4.3. Sequencing Libraries Preparation and Data Generation for Transcriptomic Analysis

Total RNA extraction of biological replicates (3 to 6 per condition) were made from pools of 40 embryos at 6 hpf. Total RNA extraction was performed by TRIzol/chloroform extraction (Life Technologies). RNA integrity (RIN), quality and concentration were assessed using RNA Nano Chips (Bioanalyzer 2100, Agilent). All samples had a RIN > 8. Sequencing libraries were generated from 1 µg of total RNA following the TruSeq mRNA stranded protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). After quality check and concentration determination on DNA1000 Chips (Bioanalyzer 2100, Agilent, Les Ulis, France), libraries were run on a NovaSeq 6000 platform to produce 50 bases long paired-end reads (Clinical Research Sequencing Platform, Broad Institute, MIT, Cambridge, USA). Between 27 and 158 million of good-quality reads (Q > 30) were produced for each sample (Table S5), which corresponds to the minimal coverage recommended by ENCODE (https://www.encodeproject.org/about/experiment-guidelines/). 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 [72] and the known exon–exon junctions from Ensembl release 95 [73]. Normalisation and differential expression analysis were performed with DESeq2 v1.22.2 [74]. Biological reproducibility was assessed by hierarchical clustering of the variance stabilised expression data (rlog) obtained from DESeq2 with Pearson's correlation and complete linkage method. To increase the power of analysis of the differential gene expression analysis, we selected 37 samples with good reproducibility from the original set of 45 samples (Figure S1). Genes with |fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01 (false discovery rate) were considered as differentially expressed in all analysis, except for the comparison of RNA-seq data with DMR where a threshold for the adjusted p-value < 0.05 was used. Hierarchical clustering of normalised expression data (rlog) or fold changes from DESeq2 were made with the R package hclust using Pearson's correlation and the complete-linkage method. Fuzzy-mean clustering was used to cluster genes based on their expression patterns across the five different dose rates of ionising radiation. To do so, we normalised on the same scale, the fold change of 3319 significant DEG (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) in at least one condition and applied fuzzy-mean clustering [75] using the R package mfuzz using the parameters c = 4 and m = 2. Expression profiles were plotted with the R package ggplot2.

4.4. Gene Ontology Analysis

Gene ontology (GO) enrichment was performed using the R packages topGO [76] and clusterProfiler [77] using the zebrafish DEG obtained from DESeq2 (Table S1). For KEGG enrichment, the human orthologous genes were used, as described before [25]. Enrichments with p-value from Fisher's exact test ≤ 0.01 were considered significant. MA-plots, heat maps, histograms and Venn diagrams were produced using the R package ggplot2 [78].

4.5. TF-Binding Sites Enrichment

Significantly (|fold change| ≥ 1.5 and adjusted p-value < 0.01) DEG found at 50, 5 and 0.5 mGy/h were searched for enrichment of TF DNA-binding sites in their promoter sequence. A set of 5000 randomly chosen promoters was used as background. Promoter sequences were defined as DNA genomic sequence located 2 kb upstream and 50 bp downstream the transcriptional start site, and were retrieved with the Perl Applied Program Interface from Ensembl release 95. The resulting promoter sequences were searched for enrichment of TFBS with oPOSSUM v3 [79] using the hidden Markov matrix models from Jaspar core-vertebrate database v2018 [80]. Binding sites with z-score > 6 and Fisher-score > 3 were considered significantly enriched.

4.6. Purification of Genomic DNA

Biological replicates (3 per condition) were made from pools of 40 embryos at 6 hpf. Embryos were incubated under agitation at 55 °C during 3 h in extraction buffer (Tris 80 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM and SDS 0.5%) with 1 mg/mL of proteinase K. To avoid RNA contamination, samples were incubated 30 min at 37 °C with RNAse A (1 mg/mL). A phenol/chloroform extraction was performed followed by DNA precipitation with isopropyl alcohol. DNA pellets were resuspended in buffer AE (Qiagen, Courtaboeuf, France) and concentration assessed by fluorometric quantification (Qubit, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Quality of DNA was assessed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel; no signs of DNA degradation or RNA contamination were detected.

4.7. Bisulphite Conversion and Production of WGBS Data

Precisely, 300 ng of extracted genomic DNA was used for bisulphite conversion using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo research, Irvine, CA, USA) following manufacturer's instructions. All samples were spiked-in with 0.5 ng of PUC 19 nonmethylated DNA (Zymo research, Irvine, USA) to control bisulphite conversion rate (Table S6). Quality control of converted DNA was assessed on RNA

Pico Chip (Bioanalyzer 2011, Agilent, Les Ulis, France) and by measuring recovered ssDNA quantity with a Nanodrop (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette) spectrophotometer. Sequencing libraries were prepared from 50 ng of converted DNA with TruSeq DNA Methylation Kit and indexes from Illumina following manufacturer's instructions. DNA integrity, quality and concentration were assessed on High Sensitivity DNA Chip (Bioanalyzer 2011, Agilent, Les Ulis, France). Libraries were multiplexed at 2 nM and run on a HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, USA) to produce 50 bases long paired-end reads at the CerBMgie platform (IGBMC, Illkirch, France).

4.8. Bioinformatic Analysis of WGBS Data

Between 154 and 181 million of good-quality reads were produced for each sample (Table S7 and Figure S7). Read quality was assessed with FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Adapter sequences and low read quality (Phred score < 30) were trimmed with TrimGalore! v0.6.4 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Trimmed reads were mapped against a fully C-to-T converted version of the zebrafish genome (GRCz11) with Bismark v0.16.3 [81] with the following options: –bowtie2 -X 1000 -N 1 –ambig_bam –nucleotide_coverage -un –ambiguous –phred33-quals. Methylation bias (M-bias) plots were generated with bismark_methylation_extractor with the options –mbias_only –no_overlap. PCR duplicates were removed using the Bismark function deduplicate_bismark and methylation levels obtained with bismark_methylation_extractor using the following options: –bedGraph –cytosine_report –gzip –no_overlap -p –ignore_3prime 6 –ignore 13 –ignore_r2 13 –ignore_3prime_r2 6. Bisulphite conversion rates were >96% (Table S6) and mapping efficiency against the zebrafish genome were >67% for all samples. Methylation levels in the CpG context were analysed with the R package DSS [82]. Methylation levels at each CpG site was determined in the biological triplicates from nearby CpGs using DMLtest function (window size of 300 base pairs) which uses an empirical Bayesian procedure to estimate the dispersion among all CpGs within the smoothing window. Methylation difference in pairwise comparison (exposed compared to control) was then assessed by a Wald test and adjusted *p*-value (False Discovery Rate) computed at each CpG site. Differentially methylated cytosines were considered significant at a threshold FDR < 5% and methylation differences ≥ 10%. Differentially methylated regions (DMR) were analysed with DMRichR [83–85] as a wrapper for dmrseq [84] and bsseq [85]. Briefly, CpG count matrix obtained from Bismark cytosine reports were filtered for at least 1X coverage per CpG across all samples. DMR were identified from pairwise comparison by a permutation test. To do so, each region with at least 3 CpG was compared to a null distribution created from a set of background regions meeting the same criteria (1X coverage across all samples and at least 3 CpG). Permutation *p*-value < 0.05 was considered significant, as published before [83]. Visualisation of DMR smoothed methylation values were generated with bsseq.

4.9. Association with Genomic Features

Heatmap of DEG associated with germ layers information was obtained by querying the expression database from ZFIN for the stage "gastrula" and the expression domains "ectoderm," "endoderm" and "mesoderm" and selecting the DEG with |fold change| ≥ 1.5 and adjusted *p*-value < 0.01 in at least one comparative analysis. Clustering of expression differences (fold change) data was performed using the default of the R package heatmap.2. For CpG analysis, the genomic coordinates of known TSS were retrieved from all Ensembl transcripts (GRCv11 release 95) via the R package GenomicFeatures and GenomicRanges [86]. CpG islands, LINE, SINE and transposon genomic coordinates were retrieved from the USCS database (danRer11). Dot plot of cytosine methylation levels mapped to TSS and CpG islands were produced with the R packages EnrichedHeatmap [87] and circlize [88] using a distance to the feature of interest of 2 kb and a sliding window of 50 bp. Mapping of DMR coordinates to genomic features was performed with the R packages GenomicRanges and ChIPSeeker [89]. Circos plot of DMR and DEG was produced with the R package circlize with DMR located <3 kb from the TSS.

4.10. Analysis of H3K3me3 and H3K27me3 ChIP Data

ChIP-seq datasets made on shield zebrafish embryos against H3K3me3 (SRR372771) and H3K27me3 (SRR372772) marks were trimmed for quality (Q > 10). Adapter removal was made with TrimGalore! v0.6.4. Reads were then mapped against the zebrafish genome (GRCv11) with bowtie v1.2.2 using the parameter -m1. Uniquely mapped reads were used for peak detection using MACS2 using an effective genome size of $1.3.10^9$ bp. Genomic coordinates of the ChIP peaks were manipulated in R with the package GenomicRanges and dot plot of cytosine methylation levels mapped around H3K27me3 and H3K4me3 produced with the R packages EnrichedHeatmap and circlize.

5. Declarations

5.1. Ethics Approval and Consent to Participate

Animals were housed in the IRSN animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live zebrafish. Animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013-118). All experiments were approved by the Ethics Committee #81 and authorised by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#11488.

5.2. Availability of Data and Materials

The datasets generated in this study are publicly available in the GEO repository under the accession number GSE146198.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/4014/s1, Figure S1: Assessment of biological variability of RNAseq samples, Figure S2: Enrichment of biological pathways, Figure S3: Volcano plot displaying the differential expression, Figure S4: Dot plot of zebrafish GO term, Figure S5: Transcription factor binding sites enrichment in the promoters of DEG, Figure S6: Dot plot of differential methylation levels of transposon, Figure S7: Assessment of biological variability of WGBS samples, Table S1: Complete list of zebrafish GO terms enriched in the RNAseq data, Table S2: List of deregulated genes involved in the retinoic acid signalling, Table S3: Table of TF binding sites, Table S4: Results of MCNPX simulations and operational dosimetry, Table S5: Quality control of sequencing reads of the 45 biological samples analysed by RNAseq, Table S6: Quality control of bisulfite conversion rate of the 12 samples analysed by WGBS, Table S7: Quality controls of sequencing reads of the 12 samples analysed by WGBS.

Author Contributions: Conceptualisation, C.A.-G. and O.A.; formal analysis, S.M.E.H. and O.A.; project administration, O.A.; writing—original draft, S.M.E.H. and O.A. and writing—review and editing, C.A.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the CNRS NEEDS-Environment, grant number 178366.

Acknowledgments: We want to thank Nicolas Dubourg for the computation with MCNPX and operational dosimetry measures, as well as Isabelle Cavalié, Virginie Camilleri, Caroline Arcanjo, Olivier Simon and Beatrice Gagnaire for the zebrafish maintenance required for this work. We also want to thank Philippe Beudaert and Adrien Moulin (IRSN/DTR/D3NSI) for their help on the IRSN's Linux cluster CADUX at IRSN (Cadarache, France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Husseneder, C.; Donaldson, J.R.; Foil, L.D. Impact of the 2010 Deepwater Horizon oil spill on population size and genetic structure of horse flies in Louisiana marshes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18968. [CrossRef] [PubMed]
2. Whitehead, A.; Dubansky, B.; Bodinier, C.; Garcia, T.I.; Miles, S.; Pilley, C.; Raghunathan, V.; Roach, J.L.; Walker, N.; Walter, R.B.; et al. Genomic and physiological footprint of the Deepwater Horizon oil spill on resident marsh fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 20298–20302. [CrossRef] [PubMed]
3. Peterson, C.H.; Rice, S.D.; Short, J.W.; Esler, D.; Bodkin, J.L.; Ballachey, B.E.; Irons, D.B. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* **2003**, *302*, 2082–2086. [CrossRef] [PubMed]
4. Gonzalez-Astudillo, V.; Henning, J.; Valenza, L.; Knott, L.; McKinnon, A.; Larkin, R.; Allavena, R. A Necropsy Study of Disease and Comorbidity Trends in Morbidity and Mortality in the Koala (Phascolarctos cinereus) in South-East Queensland, Australia. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17494. [CrossRef]

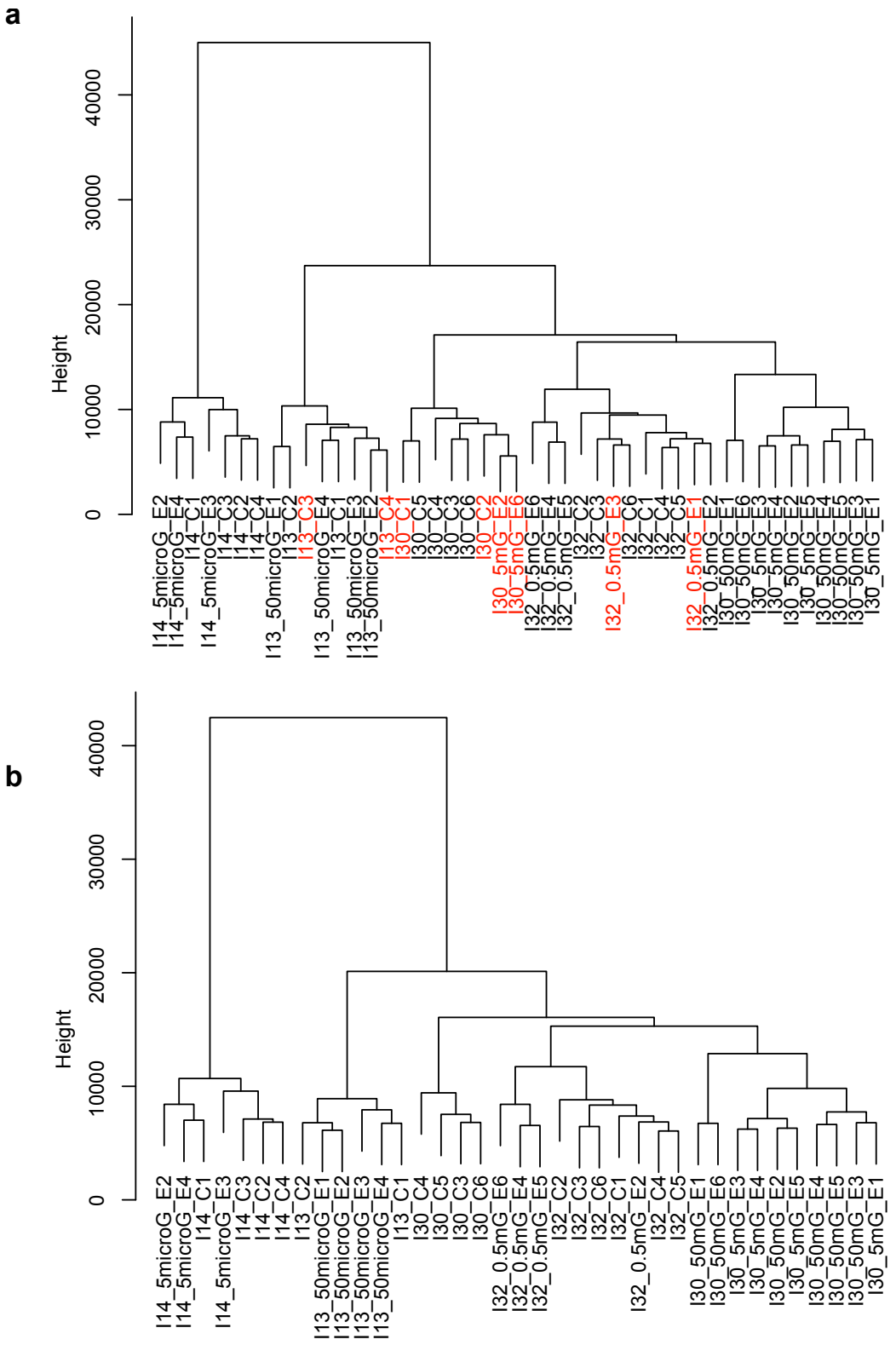
5. Lair, S.; Measures, L.N.; Martineau, D. Pathologic Findings and Trends in Mortality in the Beluga (Delphinapterus leucas) Population of the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, from 1983 to 2012. *Vet. Pathol.* **2016**, *53*, 22–36. [CrossRef]
6. Pesavento, P.A.; Agnew, D.; Keel, M.K.; Woolard, K.D. Cancer in wildlife: Patterns of emergence. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 646–661. [CrossRef]
7. McAloose, D.; Newton, A.L. Wildlife cancer: A conservation perspective. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 517–526. [CrossRef]
8. Alexandrov, L.B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D.C.; Aparicio, S.A.J.R.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; Bignell, G.R.; Bolli, N.; Borg, A.; Børresen-Dale, A.L.; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421. [CrossRef]
9. Hakem, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* **2008**, *27*, 589–605. [CrossRef]
10. Perera, F.; Herbstman, J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod. Toxicol.* **2011**, *31*, 363–373. [CrossRef]
11. Rice, D.; Barone, S., Jr. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 511–533. [PubMed]
12. UNSCEAR. *Sources and Effecs of Ionizing Radiation*; United Nations Office: Vienna, Austria, 2000.
13. Schier, A.F. The maternal-zygotic transition: Death and birth of RNAs. *Science* **2007**, *316*, 406–407. [CrossRef] [PubMed]
14. Haberle, V.; Li, N.; Hadzhiev, Y.; Plessy, C.; Previti, C.; Nepal, C.; Gehrig, J.; Dong, X.; Akalin, A.; Suzuki, A.M.; et al. Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters. *Nature* **2014**, *507*, 381–385. [CrossRef]
15. Reik, W.; Dean, W.; Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **2001**, *293*, 1089–1093. [CrossRef]
16. Potok, M.E.; Nix, D.A.; Parnell, T.J.; Cairns, B.R. Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Cell* **2013**, *153*, 759–772. [CrossRef]
17. Jiang, L.; Zhang, J.; Wang, J.-J.; Wang, L.; Zhang, L.; Li, G.; Yang, X.; Ma, X.; Sun, X.; Cai, J.; et al. Sperm, but Not Oocyte, DNA Methylome Is Inherited by Zebrafish Early Embryos. *Cell* **2013**, *153*, 773–784. [CrossRef]
18. Kiecker, C.; Bates, T.; Bell, E. Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 923–947. [CrossRef]
19. Farrell, J.A.; Wang, Y.; Riesenfeld, S.J.; Shekhar, K.; Regev, A.; Schier, A.F. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science (80-)* **2018**, *360*, 3131. [CrossRef]
20. Loree, J.; Koturbash, I.; Kutanzi, K.; Baker, M.; Pogribny, I.; Kovalchuk, O. Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: Possible implications for radiation-induced carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 805–815. [CrossRef]
21. Lee, E.; Iskow, R.; Yang, L.; Gokcumen, O.; Haseley, P.; Luquette, L.J.; Lohr, J.G.; Harris, C.C.; Ding, L.; Wilson, R.K.; et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science (80-)* **2012**, *337*, 967–971. [CrossRef]
22. Gama-sosa, M.A.; Slagel, V.A.; Trewyn, R.W.; Oxenhandler, R.; Kuo, K.C.; Gehrke, C.W.; Ehrlich, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 6883–6894. [CrossRef]
23. Bernal, A.J.; Dolinoy, D.C.; Huang, D.; Skaar, D.A.; Weinhouse, C.; Jirtle, R.L. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants. *FASEB J.* **2013**, *27*, 665–671. [CrossRef]
24. Lindeman, L.C.; Kamstra, J.H.; Ballangby, J.; Hurem, S.; Martín, L.M.; Brede, D.A.; Teien, H.C.; Oughton, D.H.; Salbu, B.; Lyche, J.L.; et al. Gamma radiation induces locus specific changes to histone modification enrichment in zebrafish and Atlantic salmon. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212123. [CrossRef]
25. Murat El Houdigui, S.; Adam-Guillermin, C.; Loro, G.; Arcanjo, C.; Frelon, S.; Floriani, M.; Dubourg, N.; Baudelet, E.; Audebert, S.; Camoin, L.; et al. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20241. [CrossRef]
26. Garnier-Laplace, J.; Della-Vedova, C.; Andersson, P.; Copplestone, D.; Cailes, C.; Beresford, N.A.; Howard, B.J.; Howe, P.; Whitehouse, P. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J. Radiol. Prot.* **2012**, *30*, 215–233. [CrossRef]
27. ICRP. Annex d. Radiation effects in reference animals and plants. *Ann. ICRP* **2008**, *38*, 179–229. [CrossRef]

28. Schier, A.F.; Talbot, W.S. Molecular Genetics of Axis Formation in Zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39*, 561–613. [CrossRef]
29. Sukonina, V.; Ma, H.; Zhang, W.; Bartesaghi, S.; Subhash, S.; Heglind, M.; Foyn, H.; Betz, M.J.; Nilsson, D.; Lidell, M.E.; et al. FOXK1 and FOXK2 regulate aerobic glycolysis. *Nature* **2019**, *566*, 279–283. [CrossRef]
30. Pauli, A.; Valen, E.; Lin, M.F.; Garber, M.; Vastenhouw, N.L.; Levin, J.Z.; Fan, L.; Sandelin, A.; Rinn, J.L.; Regev, A.; et al. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome Res.* **2012**, *22*, 577–591. [CrossRef]
31. Lindeman, L.C.; Andersen, I.S.; Reiner, A.H.; Li, N.; Aanes, H.; Østrup, O.; Winata, C.; Mathavan, S.; Müller, F.; Aleström, P.; et al. Prepatterning of Developmental Gene Expression by Modified Histones before Zygotic Genome Activation. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 993–1004. [CrossRef]
32. Chalopin, D.; Naville, M.; Plard, F.; Galiana, D.; Volff, J.-N. Comparative Analysis of Transposable Elements Highlights Mobilome Diversity and Evolution in Vertebrates. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 567–580. [CrossRef] [PubMed]
33. Olek, A.; Walter, J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 275–276. [CrossRef] [PubMed]
34. Naylor, R.W.; Skvarca, L.B.; Thisse, C.; Thisse, B.; Hukriede, N.A.; Davidson, A.J. BMP and retinoic acid regulate anterior-posterior patterning of the non-axial mesoderm across the dorsal-ventral axis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12197. [CrossRef] [PubMed]
35. Sumanas, S.; Zhang, B.; Dai, R.; Lin, S. 15-Zinc finger protein Bloody Fingers is required for zebrafish morphogenetic movements during neurulation. *Dev. Biol.* **2005**, *283*, 85–96. [CrossRef] [PubMed]
36. Nguyen, V.H.; Schmid, B.; Trout, J.; Connors, S.A.; Ekker, M.; Mullins, M.C. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the Neural crest progenitors, are established by a bmp2b/swirl pathway of genes. *Dev. Biol.* **1998**, *199*, 93–110. [CrossRef]
37. Bladen, C.L.; Lam, W.K.; Dynan, W.S.; Kozlowski, D.J. DNA damage response and Ku80 function in the vertebrate embryo. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3002–3010. [CrossRef]
38. Zaichkina, S.I.; Rozanova, O.M.; Aptikaeva, G.F.; Achmadieva, A.C.; Klokov, D.Y. Low Doses of Gamma-Radiation Induce Nonlinear Dose Responses in Mammalian and Plant Cells. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* **2004**, *2*, 154014204905198. [CrossRef]
39. Miller, R.K.; McCrea, P.D. Wnt to build a tube: Contributions of Wnt signaling to epithelial tubulogenesis. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 77–93. [CrossRef]
40. Bier, E.; De Robertis, E.M. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science* **2015**, *348*, aaa5838. [CrossRef]
41. Siebel, C.; Lendahl, U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 1235–1294. [CrossRef]
42. Gagnaire, B.; Cavalié, I.; Pereira, S.; Floriani, M.; Dubourg, N.; Camilleri, V.; Adam-Guillermin, C. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *169*, 69–78. [CrossRef]
43. El Ghouzzi, V.; Bianchi, F.T.; Molineris, I.; Mounce, B.C.; Berto, G.E.; Rak, M.; Lebon, S.; Aubry, L.; Tocco, C.; Gai, M.; et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2440. [CrossRef]
44. Miller, R.W.; Blot, W.J. Small head size after in-utero exposure to atomic radiation. *Lancet* **1972**, *2*, 784–787. [CrossRef]
45. Otake, M.; Schull, W.J. In utero exposure to A-bomb radiation and mental retardation; a reassessment. *Br. J. Radiol.* **1984**, *57*, 409–414. [CrossRef]
46. Otake, M.; Schull, W.J.; Lee, S. Threshold for radiation-related severe mental retardation in prenatally exposed A-bomb survivors: A re-analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* **1996**, *70*, 755–763. [CrossRef]
47. Hayama, S.-I.; Tsuchiya, M.; Ochiai, K.; Nakiri, S.; Nakanishi, S.; Ishii, N.; Kato, T.; Tanaka, A.; Konno, F.; Kawamoto, Y.; et al. Small head size and delayed body weight growth in wild Japanese monkey fetuses after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3528. [CrossRef]
48. Møller, A.P.; Bonisoli-Alquati, A.; Rudolfsen, G.; Mousseau, T.A. Chernobyl birds have smaller brains. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16862. [CrossRef]

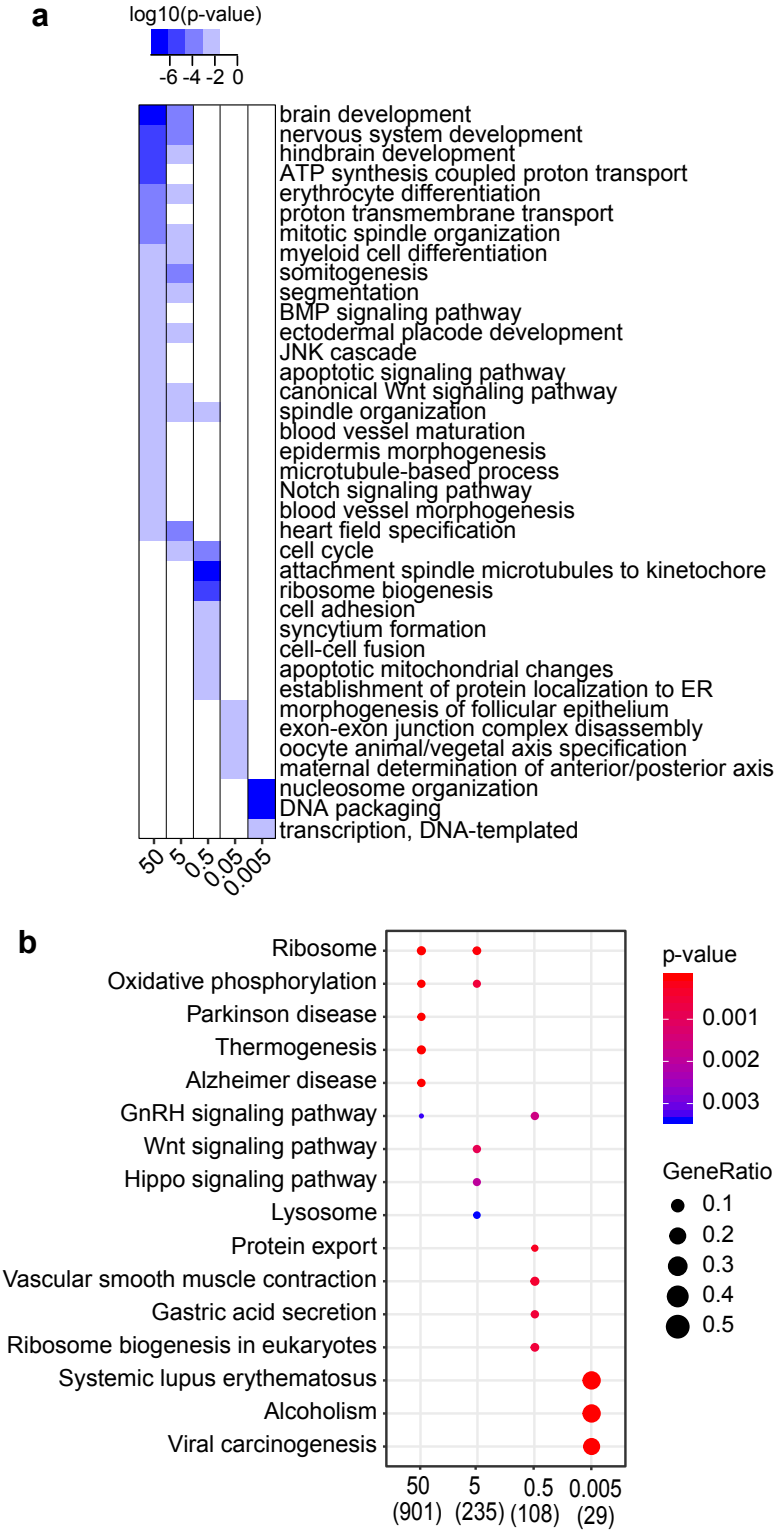
49. Hurem, S.; Martín, L.M.; Brede, D.A.; Skjerve, E.; Nourizadeh-Lillabadi, R.; Lind, O.C.; Christensen, T.; Berg, V.; Teien, H.-C.; Salbu, B.; et al. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179259. [CrossRef]
50. Krämer, A.; Green, J.; Pollard, J.; Tugendreich, S. Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 523–530. [CrossRef]
51. Raiche, J.; Rodriguez-Juarez, R.; Pogribny, I.; Kovalchuk, O. Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 39–47. [CrossRef]
52. Baubec, T.; Schübeler, D. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *25*, 85–92. [CrossRef]
53. Vastenhouw, N.L.; Zhang, Y.; Woods, I.G.; Imam, F.; Regev, A.; Liu, X.S.; Rinn, J.; Schier, A.F. Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature* **2010**, *464*, 922–926. [CrossRef]
54. Kalinich, J.F.; Catravas, G.N.; Snyder, S.L. The Effect of gamma Radiation on DNA Methylation. *Radiat. Res.* **1989**, *197*, 185–197. [CrossRef]
55. Pogribny, I.; Koturbash, I.; Tryndyak, V.; Hudson, D.; Stevenson, S.M.L.; Sedelnikova, O.; Bonner, W.; Kovalchuk, O. Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus. *Mol. Cancer Res.* **2005**, *3*, 553–561. [CrossRef]
56. Miousse, I.R.; Kutanzi, K.R.; Koturbash, I. Effects of ionizing radiation on DNA methylation: From experimental biology to clinical applications. *Int. J. Radiat. Biol.* **2017**, *93*, 457–469. [CrossRef]
57. Kovalchuk, O.; Burke, P.; Besplug, J.; Slovack, M.; Filkowski, J.; Pogribny, I. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *548*, 75–84. [CrossRef]
58. Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2545–2550. [CrossRef]
59. Chen, R.Z.; Pettersson, U.; Beard, C.; Jackson-Grusby, L.; Jaenisch, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **1998**, *395*, 89–93. [CrossRef]
60. 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. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13. [CrossRef]
61. Kam, W.W.Y.; Banati, R.B. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 607–619. [CrossRef]
62. Alexeyev, M.; Shokolenko, I.; Wilson, G.; LeDoux, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity—Critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012641. [CrossRef]
63. Di Pietro, G.; Magno, L.A.V.; Rios-Santos, F. Glutathione S-transferases: An overview in cancer research. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 153–170. [CrossRef]
64. Lu, S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Asp. Med.* **2009**, *30*, 42–59. [CrossRef]
65. Cyr, A.R.; Domann, F.E. The redox basis of epigenetic modifications: From mechanisms to functional consequences. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 551–589. [CrossRef]
66. Lee, D.H.; Jacobs, D.R.; Porta, M. Hypothesis: A unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 1799–1802. [CrossRef]
67. Honjo, Y.; Ichinohe, T. Cellular responses to ionizing radiation change quickly over time during early development in zebrafish. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 516–527. [CrossRef]
68. Kloypan, C.; Srisa-art, M.; Mutirangura, A.; Boonla, C. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochem. Funct.* **2015**, *33*, 375–384. [CrossRef]
69. Niedzwiecki, M.M.; Hall, M.N.; Liu, X.; Oka, J.; Harper, K.N.; Slavkovich, V.; Ilievski, V.; Levy, D.; van Geen, A.; Mey, J.L.; et al. Blood glutathione redox status and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults. *Epigenetics* **2013**, *8*, 730–738. [CrossRef]
70. Lertratanangkoon, K.; Wu, C.J.; Savaraj, N.; Thomas, M.L. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. *Cancer Lett.* **1997**, *120*, 149–156. [CrossRef]
71. Wang, J.; Zhang, Y.; Xu, K.; Mao, X.; Xue, L.; Liu, X.; Yu, H.; Chen, L.; Chu, X. Genome-wide screen of DNA methylation changes induced by low dose X-ray radiation in mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90804. [CrossRef]

72. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [CrossRef] [PubMed]
73. Zerbino, D.R.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Bhai, J.; Billis, K.; Cummins, C.; Gall, A.; Girón, C.G.; et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D754–D761. [CrossRef] [PubMed]
74. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [CrossRef] [PubMed]
75. Futschik, M.E.; Carlisle, B. Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **2005**, *3*, 965–988. [CrossRef] [PubMed]
76. Adrian Alexa, J.R. *TopGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*, R package version 2.36.0; Bioconductor; 2019; Available online: http://www.bioconductor.org/ (accessed on 1 June 2020). [CrossRef]
77. Yu, G.; Wang, L.G.; Han, Y.; He, Q.Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J. Integr. Biol.* **2012**, *16*, 284–287. [CrossRef] [PubMed]
78. Wickham, H. Ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. In *Ggplot2 1–7*; Springer: New York, NY, USA, 2009. [CrossRef]
79. Kwon, A.T.; Arenillas, D.J.; Worsley Hunt, R.; Wasserman, W.W. oPOSSUM-3: Advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. *G3 (Bethesda)* **2012**, *2*, 987–1002. [CrossRef]
80. Khan, A.; Fornes, O.; Stigliani, A.; Gheorghe, M.; Castro-Mondragon, J.A.; van der Lee, R.; Bessy, A.; Chèneby, J.; Kulkarni, S.R.; Tan, G.; et al. JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D260–D266. [CrossRef]
81. Krueger, F.; Andrews, S.R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1571–1572. [CrossRef]
82. Feng, H.; Conneely, K.N.; Wu, H. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e69. [CrossRef]
83. Laufer, B.I.; Hwang, H.; Vogel Ciernia, A.; Mordaunt, C.E.; LaSalle, J.M. Whole genome bisulfite sequencing of Down syndrome brain reveals regional DNA hypermethylation and novel disorder insights. *Epigenetics* **2019**, *14*, 672–684. [CrossRef]
84. Korthauer, K.; Chakraborty, S.; Benjamini, Y.; Irizarry, R.A. Detection and accurate false discovery rate control of differentially methylated regions from whole genome bisulfite sequencing. *Biostatistics* **2019**, *20*, 367–383. [CrossRef] [PubMed]
85. Hansen, K.D.; Langmead, B.; Irizarry, R.A. BSmooth: From whole genome bisulfite sequencing reads to differentially methylated regions. *Genome Biol.* **2012**, *13*, R83. [CrossRef] [PubMed]
86. Lawrence, M.; Huber, W.; Pagès, H.; Aboyoun, P.; Carlson, M.; Gentleman, R.; Morgan, M.T.; Carey, V.J. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003118. [CrossRef] [PubMed]
87. Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M.; Ishaque, N. EnrichedHeatmap: An R/Bioconductor package for comprehensive visualization of genomic signal associations. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 234. [CrossRef] [PubMed]
88. Gu, Z.; Gu, L.; Eils, R.; Schlesner, M.; Brors, B. Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2811–2812. [CrossRef]
89. Yu, G.; Wang, L.-G.; He, Q.-Y. ChIPseeker: An R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2382–2383. [CrossRef]

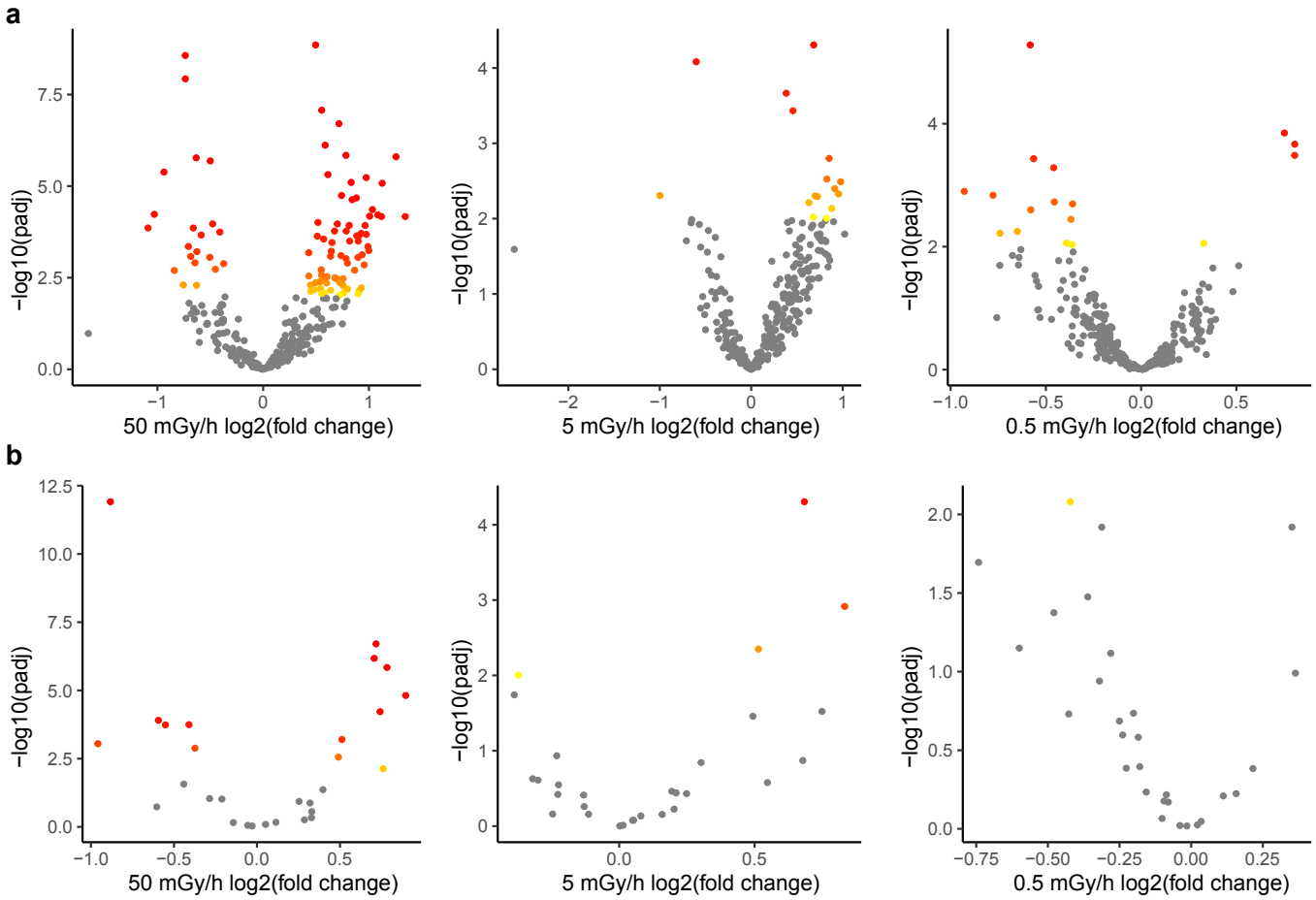
© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



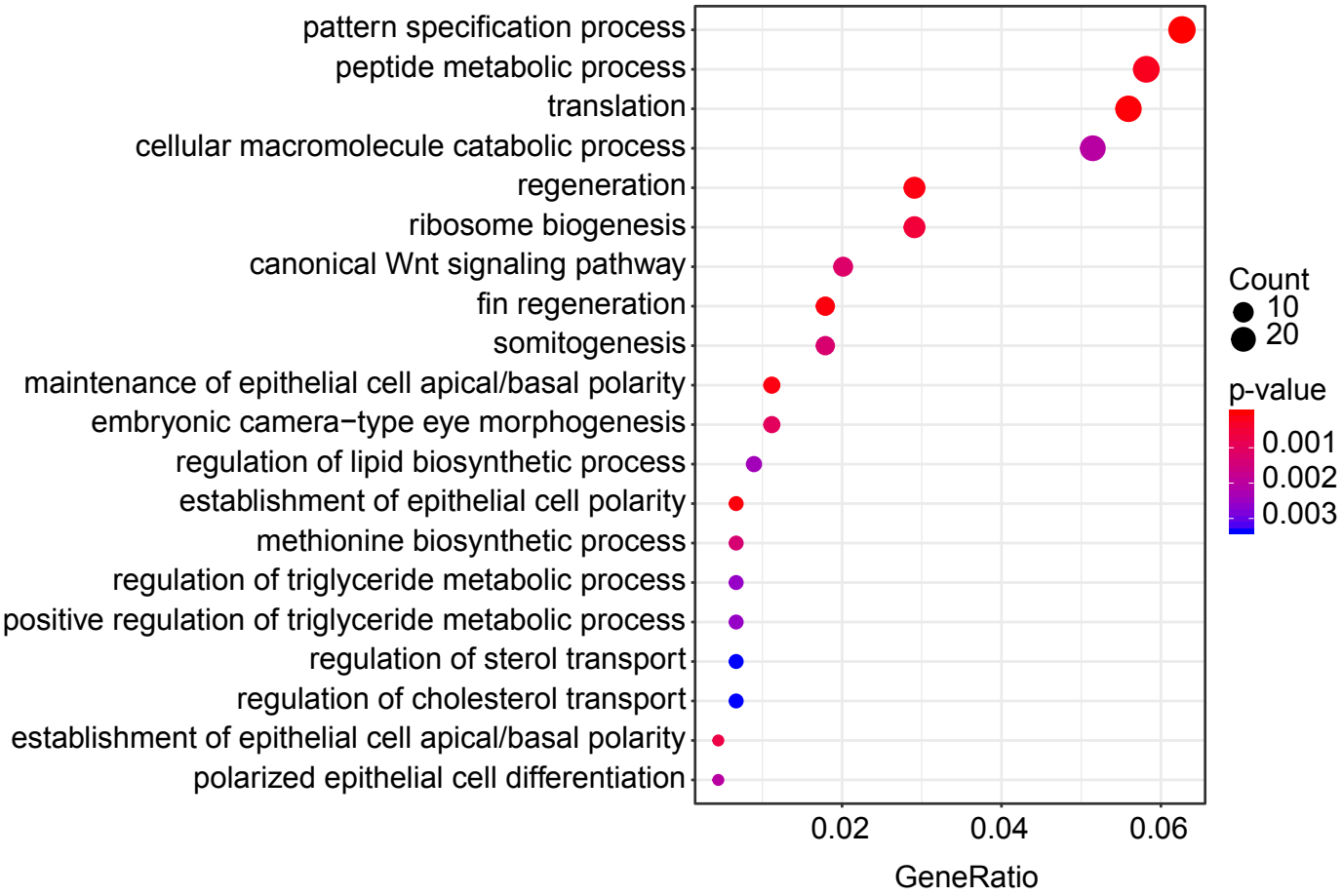
Supplementary Figure 1: Assessment of biological variability of RNAseq samples by hierarchical clustering. (a) Dendrogram obtained by hierarchical cluster of all samples generated by RNAseq. Potential outliers (red) were removed to increase the power of the subsequent differential analysis. (b) Dendrogram obtained by hierarchical cluster of the 37 selected samples used for the differential expression analysis. For each sample, the irradiation batch is indicated (I13, I14, I30, I32), as well as the replicate number and the dose rate used for exposure (C: non exposed control, 50mG: 50 mGy/h, 5mG: 5 mGy/h, 0.5mG: 0.5 mGy/h, 50microG: 0.05 mGy/h, 5microG: 0.005 mGy/h).



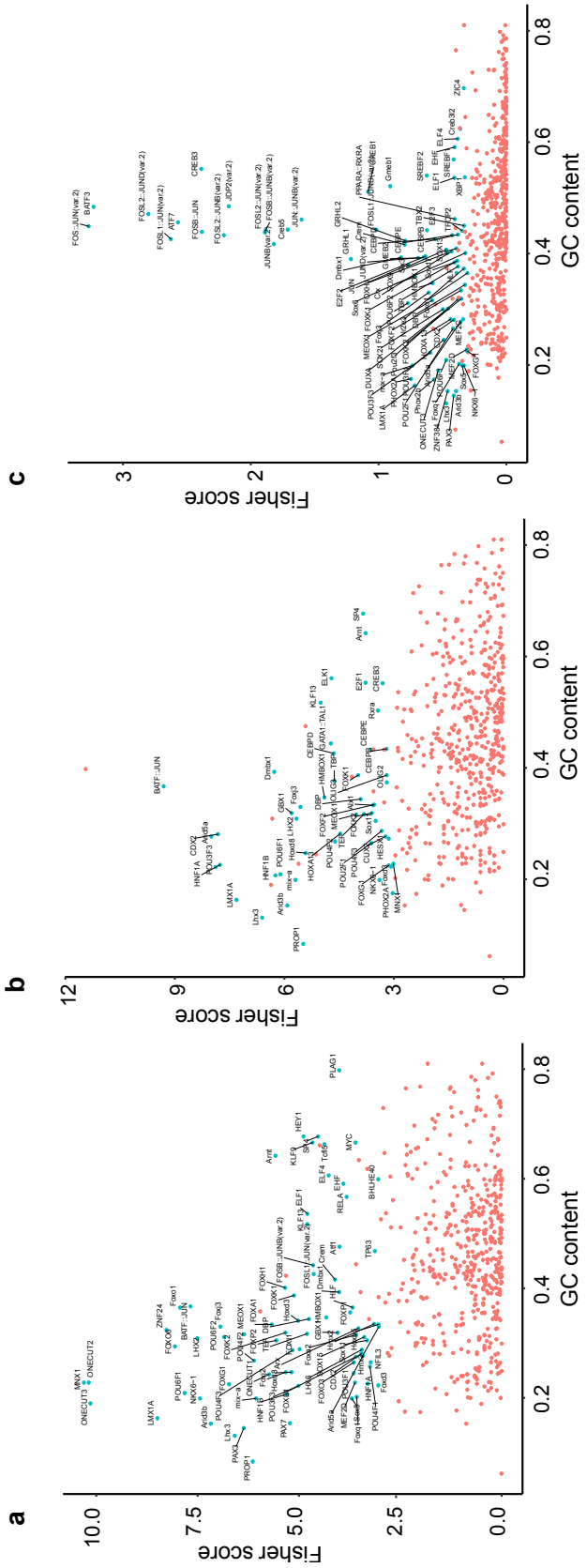
Supplementary Figure 2: Enrichment of biological pathways deregulated in 6 hpf embryos after exposure to IR at 0.005 mGy/h, 0.05 mGy/h, 0.5 mGy/h, 5 mGy/h and 50 mGy/h. (a) Heat map of representative zebrafish GO pathways. Dose rates are indicated at the bottom in mGy/h. Colours indicate the p-values from exact Fisher's test. (b) Dot plot of KEGG enrichment pathways using human gene orthology. Dose rates are indicated at the bottom in mGy/h. Note that no KEGG pathway was found to be enriched in the condition 0.05 mGy/h because of the small number of DEG. The total numbers of deregulated genes within the KEGG pathways selected on the dot plot are indicated in brackets. Colours indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test and dots size is proportional to the number of genes constituting the given pathway.



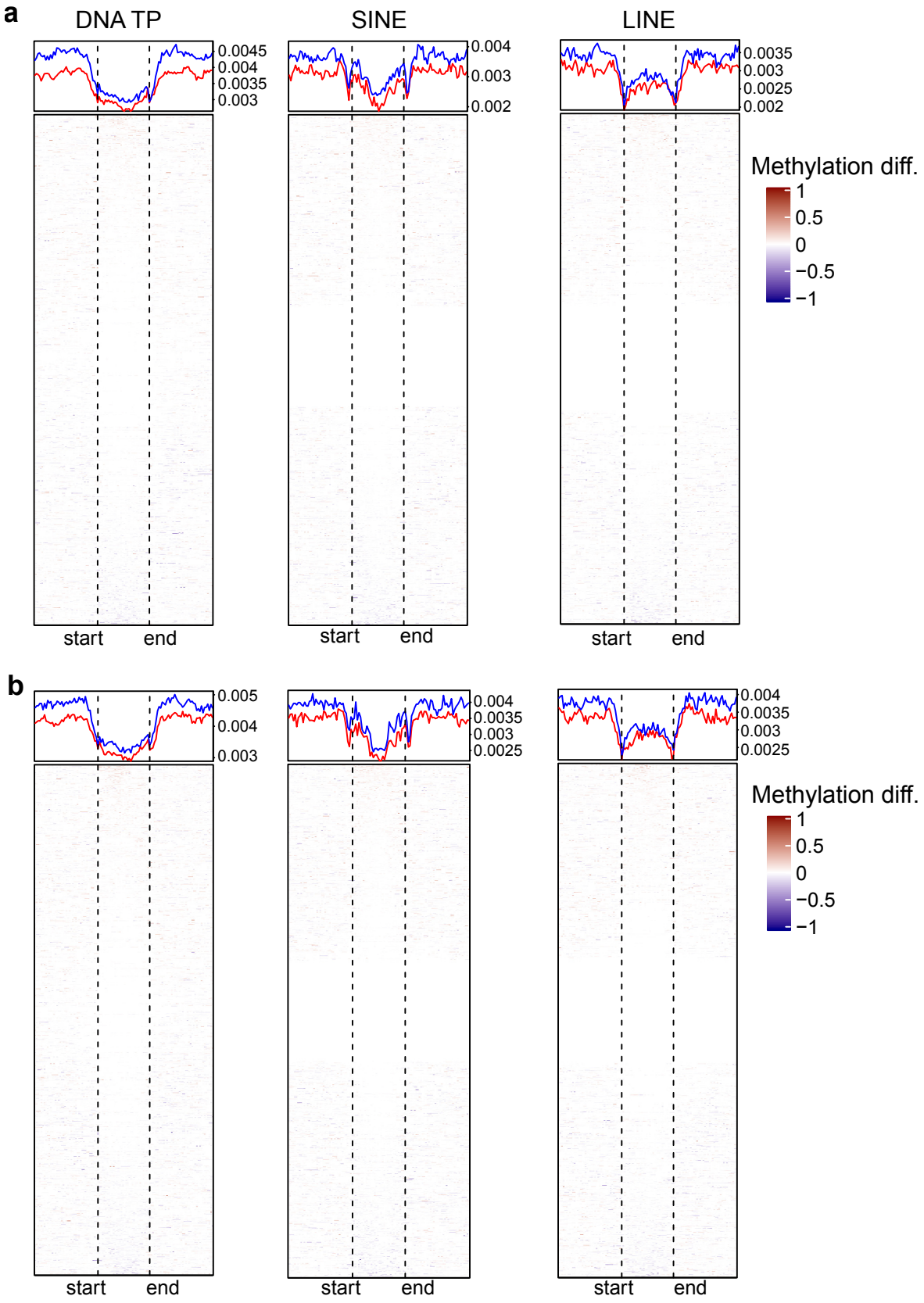
Supplementary Figure 3: Volcano plot of expression for genes annotated in the zebrafish genome with the GO term (a) "mitochondrion" (GO:0005739) and (b) "Response to oxidative stress" (GO:0006979) at 50 mGy/h, 5 mGy/h and 0.5 mGy/h. DEG ($|\text{fold change}| \geq 1.5$ and adjusted p-value ($\text{padj} < 0.01$) are represented in red and yellow colours.



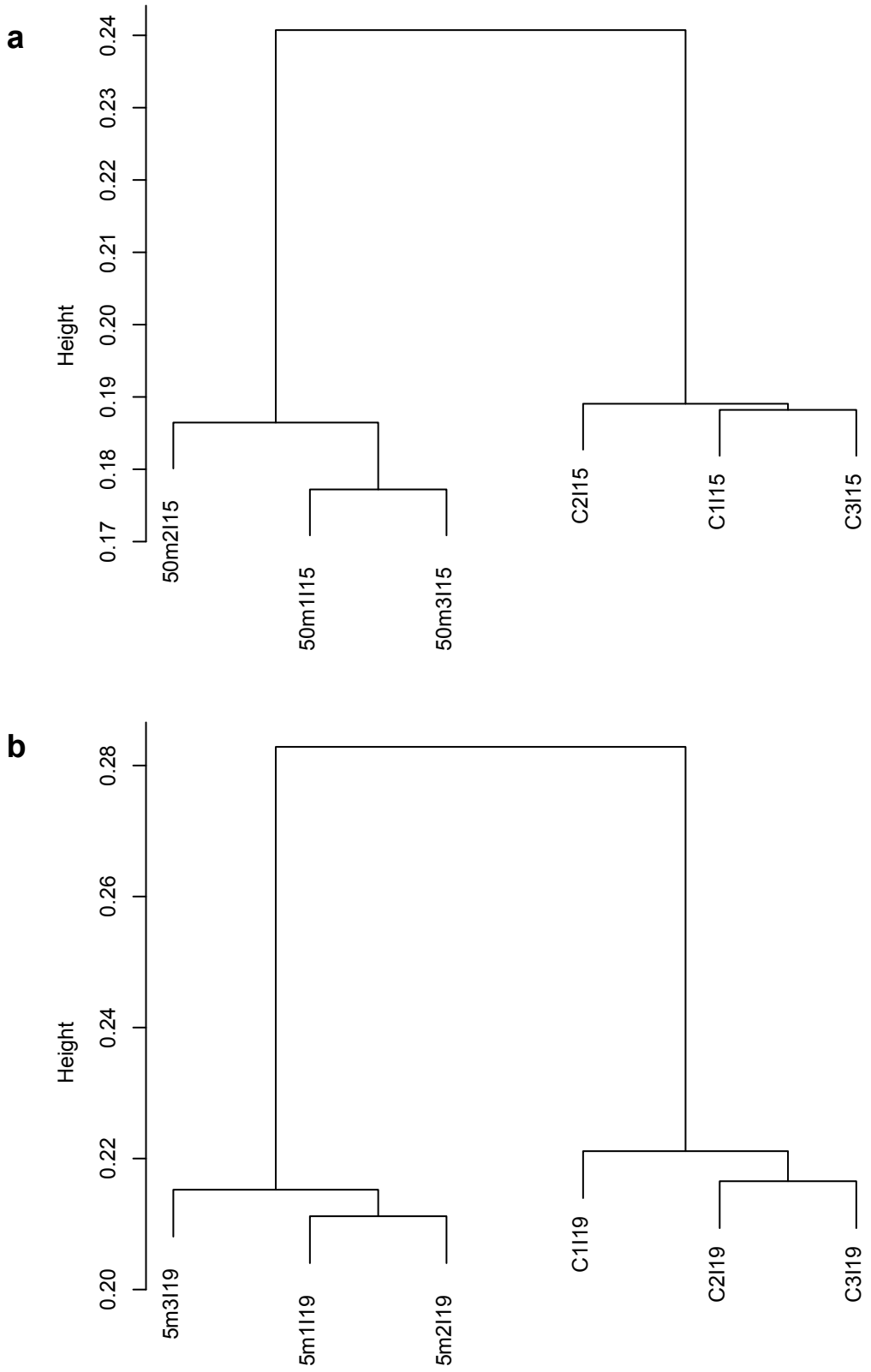
Supplementary Figure 4: Dot plot of zebrafish GO term enrichment showing the biological pathways enriched in common between 50 mGy/h and 5 mGy/h based on the RNAseq data. Colours indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test and dots size is proportional to the number of genes constituting the given pathway.



Supplementary Figure 5: Transcription factor binding sites enrichment in the promoters of DEG at (a) 50 mGy/h (b) 5 mGy/h and (c) 0.5 mGy/h. Blue dot indicates significant enrichment of the DNA binding site (Z-score > 6 and Fisher-score > 3).



Supplementary Figure 6: Dot plot of differential methylation levels of transposon (indicated as DNA TP) and retrotransposons (SINE and LINE elements) at (a) 50 mGy/h and (b) 5 mGy/h. The % of methylation differences are shown in a window of 2 kb up and down the transposon (start and end indicated by the dashed lines). A minor fraction of cytosine is differentially methylated (fraction < 0.005) as indicated at the top of each dot plot (blue: hypomethylated compared to control, red: hypermethylated).



Supplementary Figure 7: Assessment of biological variability of WGBS samples by hierarchical clustering.

Supplementary Table T1: Complete list of zebrafish GO terms enriched in the RNAseq data at 0.005 mGy/h, 0.05 mGy/h, 0.5 mGy/h, 5 mGy/h and 50 mGy/h. The p-values from the Fisher's exact test are indicated.

Supplementary Table T2: List of deregulated genes involved in the retinoic acid signalling. The log2(fold change) and adjusted p-values of all genes annotated in the zebrafish genome with the GO terms "regulation of retinoic acid receptor signalling" (GO:0048385), "response to retinoic acid" (GO:0032526) and "retinoic acid receptor signalling pathway" (GO:0048384) are displayed. Significantly regulated genes in the RNAseq data are indicated in bold (adjusted p-value $<$ 0.01).

Supplementary Table T3: Table of TF binding sites enriched significantly (Z-score $>$ 6 and Fisher's score $>$ 3) in the promoter of genes deregulated in the RNAseq data at 50 mGy/h, 5 mGy/h and 0.5 mGy/h. The Z-scores and Fisher-scores obtained from oPOSSUM are indicated for each TF binding sites. The last two columns indicate respectively if the given TF binding sites was enriched in the three conditions and expressed in gastrula embryos (based on Zfin expression patterns, http://zfin.org/).

Supplementary Table T4: Results of MCNPX simulations and operational dosimetry obtained with radio photoluminescent dosimeter (mGy/h) at the target dose rates of 50 mGy/h, 5 mGy/h, 0.5 mGy/h, 0.05 mGy/h and 0.005 mGy/h (sd: standard deviation to the mean).

Supplementary Table T5: Quality control of sequencing reads of the 45 biological samples analysed by RNAseq. Replicates number, dose rate, irradiation batch and developmental stage are indicated for each sample, as well as the reads number obtained and the % of reads with Phred score Q $>$ 30 (R1: read1, R2: read2).

Supplementary Table T6: Quality control of bisulfite conversion rate of the 12 samples analysed by WGBS. Replicates number, dose rate, irradiation batch and developmental stage are indicated for each sample, as well as the % conversion of C to T.

Supplementary Table T7: Quality controls of sequencing reads of the 12 samples analysed by WGBS. Replicates number, dose rate, irradiation batch and developmental stage are indicated for each sample, as well as the reads number obtained and the % of reads with Phred score Q $>$ 30.

Supplementary Table T1

50 mGy/h

GO.ID	Gene Ontology Term	Fisher's p-value
GO:0043043	peptide biosynthetic process	4,20E-27
GO:0006412	translation	5,30E-27
GO:0043604	amide biosynthetic process	1,20E-26
GO:0006518	peptide metabolic process	1,10E-25
GO:0043603	cellular amide metabolic process	9,20E-23
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic pro...	3,50E-21
GO:0009058	biosynthetic process	5,30E-12
GO:0044249	cellular biosynthetic process	1,00E-11
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	1,60E-11
GO:0009790	embryo development	2,80E-11
GO:0008152	metabolic process	3,30E-10
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic ...	6,40E-10
GO:0048856	anatomical structure development	3,90E-09
GO:0044237	cellular metabolic process	7,00E-09
GO:0032502	developmental process	1,00E-08
GO:0007420	brain development	2,10E-08
GO:0007275	multicellular organism development	5,80E-08
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic proc...	9,00E-08
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic proces...	9,70E-08
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	9,90E-08
GO:0060322	head development	1,60E-07
GO:0009792	embryo development ending in birth or eg...	2,20E-07
GO:0043009	chordate embryonic development	3,50E-07
GO:0044267	cellular protein metabolic process	3,70E-07
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	4,50E-07
GO:0048731	system development	4,90E-07
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic pro...	6,50E-07
GO:0022037	metencephalon development	1,10E-06
GO:0007399	nervous system development	1,50E-06
GO:0007417	central nervous system development	1,50E-06
GO:0048598	embryonic morphogenesis	1,50E-06
GO:0071704	organic substance metabolic process	1,70E-06
GO:0002181	cytoplasmic translation	1,70E-06
GO:0048513	animal organ development	2,10E-06
GO:0019538	protein metabolic process	3,20E-06
GO:0030902	hindbrain development	6,00E-06
GO:0044238	primary metabolic process	7,40E-06
GO:0009888	tissue development	1,40E-05
GO:0010467	gene expression	1,60E-05
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	1,70E-05
GO:0015985	energy coupled proton transport, down el...	2,00E-05
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	2,00E-05
GO:0001732	formation of cytoplasmic translation ini...	2,70E-05
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	3,90E-05

GO:0007389	pattern specification process	4,70E-05
GO:0060429	epithelium development	8,50E-05
GO:0002183	cytoplasmic translational initiation	9,00E-05
GO:0030513	positive regulation of BMP signaling pat...	9,00E-05
GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	9,20E-05
GO:0021549	cerebellum development	0,00012
GO:0003002	regionalization	0,00015
GO:0071600	otic vesicle morphogenesis	0,00015
GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	0,00015
GO:0030218	erythrocyte differentiation	0,0002
GO:1902600	proton transmembrane transport	0,00022
GO:0009967	positive regulation of signal transducti...	0,00022
GO:0048729	tissue morphogenesis	0,00023
GO:0034101	erythrocyte homeostasis	0,00024
GO:0050790	regulation of catalytic activity	0,00034
GO:0007052	mitotic spindle organization	0,00039
GO:0010092	specification of animal organ identity	0,00043
GO:0050821	protein stabilization	0,00043
GO:0007163	establishment or maintenance of cell pol...	0,00043
GO:0035295	tube development	0,00046
GO:0043170	macromolecule metabolic process	0,00049
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic proces...	0,0005
GO:0043087	regulation of GTPase activity	0,00051
GO:0090596	sensory organ morphogenesis	0,00054
GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic...	0,00056
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metab...	0,00056
GO:0048857	neural nucleus development	0,00059
GO:0010647	positive regulation of cell communicatio...	0,00062
GO:0002262	myeloid cell homeostasis	0,00063
GO:0009887	animal organ morphogenesis	0,00063
GO:0035239	tube morphogenesis	0,00068
GO:0023056	positive regulation of signaling	0,00069
GO:0048562	embryonic organ morphogenesis	0,00071
GO:0044272	sulfur compound biosynthetic process	0,00071
GO:0043547	positive regulation of GTPase activity	0,00074
GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic pr...	0,00076
GO:0044093	positive regulation of molecular functio...	0,00079
GO:0043085	positive regulation of catalytic activit...	0,00101
GO:0048646	anatomical structure formation involved ...	0,00106
GO:0090287	regulation of cellular response to growt...	0,00112
GO:0007423	sensory organ development	0,00112
GO:0051345	positive regulation of hydrolase activit...	0,00116
GO:0018208	peptidyl-proline modification	0,00118
GO:0090100	positive regulation of transmembrane rec...	0,00124
GO:0006457	protein folding	0,00133
GO:0030010	establishment of cell polarity	0,00151
GO:0030099	myeloid cell differentiation	0,00163
GO:0048872	homeostasis of number of cells	0,00171

GO:0006413	translational initiation	0,00185
GO:0019637	organophosphate metabolic process	0,00189
GO:0006414	translational elongation	0,0019
GO:0031076	embryonic camera-type eye development	0,00194
GO:0046034	ATP metabolic process	0,00195
GO:0030177	positive regulation of Wnt signaling pat...	0,00196
GO:0030916	otic vesicle formation	0,00206
GO:0060788	ectodermal placode formation	0,00206
GO:0030154	cell differentiation	0,00216
GO:0017144	drug metabolic process	0,00232
GO:0051403	stress-activated MAPK cascade	0,00237
GO:0060059	embryonic retina morphogenesis in camera...	0,00237
GO:0000165	MAPK cascade	0,00239
GO:0033036	macromolecule localization	0,0024
GO:0008630	intrinsic apoptotic signaling pathway in...	0,00242
GO:0022008	neurogenesis	0,00244
GO:0071599	otic vesicle development	0,00245
GO:0009953	dorsal/ventral pattern formation	0,00245
GO:0048568	embryonic organ development	0,00264
GO:0060485	mesenchyme development	0,00264
GO:0061053	somite development	0,00283
GO:0032501	multicellular organismal process	0,00291
GO:0023014	signal transduction by protein phosphory...	0,00301
GO:0048880	sensory system development	0,00309
GO:0001654	eye development	0,00319
GO:0150063	visual system development	0,00319
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	0,00319
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metaboli...	0,00319
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate meta...	0,00319
GO:0001822	kidney development	0,00333
GO:0001756	somitogenesis	0,0034
GO:0043049	otic placode formation	0,00343
GO:0031101	fin regeneration	0,00346
GO:0072001	renal system development	0,00369
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	0,00376
GO:0060562	epithelial tube morphogenesis	0,00376
GO:0048869	cellular developmental process	0,00395
GO:0072521	purine-containing compound metabolic pro...	0,00417
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic p...	0,00419
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	0,00433
GO:0035282	segmentation	0,00449
GO:0009127	purine nucleoside monophosphate biosynth...	0,00451
GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate bios...	0,00451
GO:0048699	generation of neurons	0,00473
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	0,0048
GO:0048592	eye morphogenesis	0,00486
GO:0030509	BMP signaling pathway	0,00504
GO:0071772	response to BMP	0,00504

GO:0071773	cellular response to BMP stimulus	0,00504
GO:0030510	regulation of BMP signaling pathway	0,00513
GO:0097190	apoptotic signaling pathway	0,00513
GO:0048468	cell development	0,00522
GO:0071696	ectodermal placode development	0,0053
GO:0007254	JNK cascade	0,00535
GO:0006596	polyamine biosynthetic process	0,00539
GO:0009086	methionine biosynthetic process	0,00539
GO:0009309	amine biosynthetic process	0,00539
GO:0042401	cellular biogenic amine biosynthetic pro...	0,00539
GO:0043114	regulation of vascular permeability	0,00539
GO:0031098	stress-activated protein kinase signalin...	0,00545
GO:0001655	urogenital system development	0,00548
GO:0099132	ATP hydrolysis coupled cation transmembr...	0,00548
GO:0021548	pons development	0,00571
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein...	0,00575
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	0,00587
GO:0072358	cardiovascular system development	0,00594
GO:0060070	canonical Wnt signaling pathway	0,00594
GO:0008610	lipid biosynthetic process	0,00595
GO:0045197	establishment or maintenance of epitheli...	0,00617
GO:0072332	intrinsic apoptotic signaling pathway by...	0,00617
GO:0007051	spindle organization	0,00618
GO:0048048	embryonic eye morphogenesis	0,00618
GO:0001955	blood vessel maturation	0,00632
GO:0003128	heart field specification	0,00632
GO:0035090	maintenance of apical/basal cell polarit...	0,00632
GO:0036444	calcium import into the mitochondrion	0,00632
GO:0045199	maintenance of epithelial cell apical/ba...	0,00632
GO:0048730	epidermis morphogenesis	0,00632
GO:0090162	establishment of epithelial cell polarit...	0,00632
GO:2000114	regulation of establishment of cell pola...	0,00632
GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosyntheti...	0,00644
GO:0007017	microtubule-based process	0,00644
GO:0008104	protein localization	0,00648
GO:0007219	Notch signaling pathway	0,00659
GO:0048193	Golgi vesicle transport	0,00669
GO:0072175	epithelial tube formation	0,00684
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	0,00696
GO:0021575	hindbrain morphogenesis	0,00697
GO:0001568	blood vessel development	0,00722
GO:0006790	sulfur compound metabolic process	0,00725
GO:0006417	regulation of translation	0,00745
GO:0034248	regulation of cellular amide metabolic p...	0,00745
GO:0071363	cellular response to growth factor stimu...	0,00747
GO:0046907	intracellular transport	0,00761
GO:0022900	electron transport chain	0,00785
GO:0044257	cellular protein catabolic process	0,00792

GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	0,00795
GO:0006629	lipid metabolic process	0,00809
GO:0070848	response to growth factor	0,00812
GO:0042278	purine nucleoside metabolic process	0,00822
GO:0046128	purine ribonucleoside metabolic process	0,00822
GO:0001667	ameboidal-type cell migration	0,00842
GO:0030163	protein catabolic process	0,00876
GO:0001944	vasculature development	0,00887
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organi...	0,00905
GO:0032872	regulation of stress-activated MAPK casc...	0,00905
GO:0070302	regulation of stress-activated protein k...	0,00905
GO:0071697	ectodermal placode morphogenesis	0,00913
GO:0042246	tissue regeneration	0,00945
GO:0072359	circulatory system development	0,00952
GO:0006595	polyamine metabolic process	0,00955
GO:0035088	establishment or maintenance of apical/b...	0,00955
GO:0061245	establishment or maintenance of bipolar ...	0,00955
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic proce...	0,00971
GO:0006900	vesicle budding from membrane	0,00977
GO:0051188	cofactor biosynthetic process	0,00987

5mGy/h

GO.ID	**Gene Ontology Term**	**Fisher's p-value**
GO:0048856	anatomical structure development	3,60E-06
GO:0006412	translation	3,60E-06
GO:0043043	peptide biosynthetic process	4,40E-06
GO:0006518	peptide metabolic process	4,80E-06
GO:0032502	developmental process	6,90E-06
GO:0007275	multicellular organism development	1,00E-05
GO:0009790	embryo development	1,20E-05
GO:0048513	animal organ development	1,90E-05
GO:0043604	amide biosynthetic process	2,20E-05
GO:0010092	specification of animal organ identity	2,70E-05
GO:0007420	brain development	3,10E-05
GO:0007389	pattern specification process	3,70E-05
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic pro...	4,60E-05
GO:0043603	cellular amide metabolic process	6,20E-05
GO:0060322	head development	6,60E-05
GO:0048731	system development	7,30E-05
GO:0043009	chordate embryonic development	7,90E-05
GO:0007417	central nervous system development	8,50E-05
GO:0009792	embryo development ending in birth or eg...	8,50E-05
GO:0009888	tissue development	9,70E-05
GO:0003128	heart field specification	0,00011
GO:0090162	establishment of epithelial cell polarit...	0,00011
GO:0003002	regionalization	0,00013
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	0,00022

GO:0034661	ncRNA catabolic process	0,00026
GO:0031101	fin regeneration	0,00038
GO:0007399	nervous system development	0,0004
GO:0048598	embryonic morphogenesis	0,00044
GO:0022037	metencephalon development	0,00056
GO:0042246	tissue regeneration	0,00064
GO:0031327	negative regulation of cellular biosynth...	0,00067
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	0,0007
GO:0009890	negative regulation of biosynthetic proc...	0,00073
GO:0044249	cellular biosynthetic process	0,00077
GO:0001756	somitogenesis	0,00081
GO:0061053	somite development	0,00083
GO:0009086	methionine biosynthetic process	0,00088
GO:0045198	establishment of epithelial cell apical/...	0,00091
GO:0009058	biosynthetic process	0,00098
GO:0060429	epithelium development	0,00119
GO:0022008	neurogenesis	0,0012
GO:0007034	vacuolar transport	0,00137
GO:0009887	animal organ morphogenesis	0,00142
GO:2000113	negative regulation of cellular macromol...	0,00152
GO:0048468	cell development	0,00155
GO:0035282	segmentation	0,00158
GO:0021575	hindbrain morphogenesis	0,00189
GO:0030154	cell differentiation	0,00195
GO:0009067	aspartate family amino acid biosynthetic...	0,00201
GO:0090596	sensory organ morphogenesis	0,00216
GO:0048699	generation of neurons	0,00221
GO:0042060	wound healing	0,00222
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	0,00227
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	0,0024
GO:0048596	embryonic camera-type eye morphogenesis	0,00254
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic proc...	0,00265
GO:0016075	rRNA catabolic process	0,00268
GO:0021693	cerebellar Purkinje cell layer structura...	0,00268
GO:0021698	cerebellar cortex structural organizatio...	0,00268
GO:0030859	polarized epithelial cell differentiatio...	0,00268
GO:0035089	establishment of apical/basal cell polar...	0,00268
GO:0061162	establishment of monopolar cell polarity	0,00268
GO:0061339	establishment or maintenance of monopola...	0,00268
GO:0021587	cerebellum morphogenesis	0,00272
GO:0015031	protein transport	0,00297
GO:0010558	negative regulation of macromolecule bio...	0,00297
GO:0030900	forebrain development	0,00307
GO:0048593	camera-type eye morphogenesis	0,00315
GO:0048592	eye morphogenesis	0,0033
GO:0045184	establishment of protein localization	0,00352
GO:0048646	anatomical structure formation involved ...	0,00368
GO:0030902	hindbrain development	0,00373

GO:0000097	sulfur amino acid biosynthetic process	0,00378
GO:0006555	methionine metabolic process	0,00378
GO:0045197	establishment or maintenance of epitheli...	0,00378
GO:0021549	cerebellum development	0,00379
GO:0015833	peptide transport	0,00383
GO:0048869	cellular developmental process	0,0042
GO:0032501	multicellular organismal process	0,0042
GO:0007049	cell cycle	0,00425
GO:0031099	regeneration	0,00435
GO:0030182	neuron differentiation	0,00459
GO:0035088	establishment or maintenance of apical/b...	0,00493
GO:0061245	establishment or maintenance of bipolar ...	0,00493
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic ...	0,00507
GO:0006111	regulation of gluconeogenesis	0,00525
GO:0010677	negative regulation of cellular carbohyd...	0,00525
GO:0045721	negative regulation of gluconeogenesis	0,00525
GO:0045912	negative regulation of carbohydrate meta...	0,00525
GO:0046168	glycerol-3-phosphate catabolic process	0,00525
GO:0048532	anatomical structure arrangement	0,00525
GO:0021536	diencephalon development	0,00554
GO:0061515	myeloid cell development	0,0056
GO:0048562	embryonic organ morphogenesis	0,00586
GO:0070507	regulation of microtubule cytoskeleton o...	0,0061
GO:0009057	macromolecule catabolic process	0,00663
GO:0007051	spindle organization	0,0068
GO:0031076	embryonic camera-type eye development	0,0068
GO:0048048	embryonic eye morphogenesis	0,0068
GO:0042886	amide transport	0,00683
GO:0060070	canonical Wnt signaling pathway	0,00694
GO:0060059	embryonic retina morphogenesis in camera...	0,00727
GO:0048729	tissue morphogenesis	0,00803
GO:0008104	protein localization	0,0082
GO:0009952	anterior/posterior pattern specification	0,00823
GO:0045934	negative regulation of nucleobase-contai...	0,00832
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein...	0,00857
GO:0019509	L-methionine salvage from methylthioaden...	0,00858
GO:0043102	amino acid salvage	0,00858
GO:0051149	positive regulation of muscle cell diffe...	0,00858
GO:0051155	positive regulation of striated muscle c...	0,00858
GO:0062014	negative regulation of small molecule me...	0,00858
GO:0071265	L-methionine biosynthetic process	0,00858
GO:0071267	L-methionine salvage	0,00858
GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	0,00859
GO:0001570	vasculogenesis	0,00924
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	0,00924
GO:0009880	embryonic pattern specification	0,00924
GO:0032886	regulation of microtubule-based process	0,00924
GO:0016226	iron-sulfur cluster assembly	0,00953

GO:0031163	metallo-sulfur cluster assembly	0,00953
GO:0043174	nucleoside salvage	0,00953
GO:0060030	dorsal convergence	0,00953
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic pro...	0,00974

0.5mGy/h

GO.ID	**Gene Ontology Term**	**Fisher's p-value**
GO:0008608	attachment of spindle microtubules to ki...	7,20E-07
GO:0042254	ribosome biogenesis	2,60E-06
GO:0006364	rRNA processing	2,50E-05
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	6,40E-05
GO:0060142	regulation of syncytium formation by pla...	7,30E-05
GO:0071840	cellular component organization or bioge...	8,60E-05
GO:0016072	rRNA metabolic process	9,60E-05
GO:0051988	regulation of attachment of spindle micr...	0,00039
GO:0007049	cell cycle	0,00049
GO:0010564	regulation of cell cycle process	0,00115
GO:0034470	ncRNA processing	0,00134
GO:0022402	cell cycle process	0,00135
GO:0006613	cotranslational protein targeting to mem...	0,00145
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein ta...	0,00145
GO:0018126	protein hydroxylation	0,00145
GO:0007155	cell adhesion	0,00167
GO:0022610	biological adhesion	0,00167
GO:0090068	positive regulation of cell cycle proces...	0,00186
GO:0045047	protein targeting to ER	0,00234
GO:0072599	establishment of protein localization to...	0,00234
GO:0034660	ncRNA metabolic process	0,00241
GO:0006396	RNA processing	0,00257
GO:0000768	syncytium formation by plasma membrane f...	0,00349
GO:0006949	syncytium formation	0,00349
GO:0140253	cell-cell fusion	0,00349
GO:0018197	peptidyl-aspartic acid modification	0,00371
GO:0042264	peptidyl-aspartic acid hydroxylation	0,00371
GO:0045931	positive regulation of mitotic cell cycl...	0,00371
GO:0016043	cellular component organization	0,00415
GO:0051983	regulation of chromosome segregation	0,00418
GO:0120031	plasma membrane bounded cell projection ...	0,00478
GO:0006612	protein targeting to membrane	0,00494
GO:0051489	regulation of filopodium assembly	0,00549
GO:0000278	mitotic cell cycle	0,00551
GO:0030031	cell projection assembly	0,00571
GO:0051726	regulation of cell cycle	0,00577
GO:0070972	protein localization to endoplasmic reti...	0,00578
GO:1901988	negative regulation of cell cycle phase ...	0,0067
GO:0008637	apoptotic mitochondrial changes	0,00759
GO:1902750	negative regulation of cell cycle G2/M p...	0,00759
GO:0007051	spindle organization	0,00769

GO:0098813	nuclear chromosome segregation	0,00843
GO:0000422	autophagy of mitochondrion	0,00998
GO:0045880	positive regulation of smoothened signal...	0,00998
GO:0061726	mitochondrion disassembly	0,00998

0.05mGy/h

GO.ID	**Gene Ontology Term**	**Fisher's p-value**
GO:0016333	morphogenesis of follicular epithelium	0,001
GO:1903259	exon-exon junction complex disassembly	0,001
GO:0060832	oocyte animal/vegetal axis specification	0,002
GO:0007028	cytoplasm organization	0,003
GO:0007314	oocyte anterior/posterior axis specifica...	0,003
GO:0007315	pole plasm assembly	0,003
GO:0008358	maternal determination of anterior/poste...	0,003
GO:0007308	oocyte construction	0,004
GO:0007309	oocyte axis specification	0,004
GO:0007351	tripartite regional subdivision	0,005
GO:0008595	anterior/posterior axis specification, e...	0,005
GO:0007350	blastoderm segmentation	0,0061
GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	0,0067
GO:0034331	cell junction maintenance	0,0071
GO:0034334	adherens junction maintenance	0,0071
GO:0090286	cytoskeletal anchoring at nuclear membra...	0,0071
GO:0043954	cellular component maintenance	0,0081
GO:0045859	regulation of protein kinase activity	0,0084
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulu...	0,0091
GO:0050688	regulation of defense response to virus	0,0091

0.005mGy/h

GO.ID	**Gene Ontology Term**	**Fisher's p-value**
GO:0006334	nucleosome assembly	4,20E-07
GO:0031497	chromatin assembly	4,60E-07
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	5,30E-07
GO:0034728	nucleosome organization	5,90E-07
GO:0006323	DNA packaging	6,80E-07
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	1,00E-06
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	1,40E-06
GO:0006352	DNA-templated transcription, initiation	3,50E-06
GO:0071103	DNA conformation change	4,80E-06
GO:0006325	chromatin organization	0,00013
GO:0034622	cellular protein-containing complex asse...	0,00028
GO:0051276	chromosome organization	0,0007
GO:0065003	protein-containing complex assembly	0,00103
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic proc...	0,00138
GO:0046984	regulation of hemoglobin biosynthetic pr...	0,00158
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	0,00162
GO:0043933	protein-containing complex subunit organ...	0,00163
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic ...	0,00165

GO:0006351	transcription, DNA-templated	0,00196
GO:0097659	nucleic acid-templated transcription	0,00228
GO:0032774	RNA biosynthetic process	0,00233
GO:0010467	gene expression	0,00235
GO:0070920	regulation of production of small RNA in...	0,00316
GO:1903798	regulation of production of miRNAs invol...	0,00316
GO:0016070	RNA metabolic process	0,00329
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic pro...	0,00614
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthe...	0,00628
GO:0006044	N-acetylglucosamine metabolic process	0,00631
GO:0044249	cellular biosynthetic process	0,00679
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic...	0,00699
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	0,00708
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	0,00717
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	0,00744
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	0,00777
GO:0031952	regulation of protein autophosphorylatio...	0,00788
GO:0060147	regulation of posttranscriptional gene s...	0,00788
GO:0060964	regulation of gene silencing by miRNA	0,00788
GO:0060966	regulation of gene silencing by RNA	0,00788
GO:0070534	protein K63-linked ubiquitination	0,00788
GO:0046483	heterocycle metabolic process	0,00849
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic pro...	0,0085
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic pro...	0,00877
GO:0009058	biosynthetic process	0,00892
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	0,00939
GO:0042661	regulation of mesodermal cell fate speci...	0,00945
GO:1905770	regulation of mesodermal cell differenti...	0,00945
GO:1905902	regulation of mesoderm formation	0,00945
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic proces...	0,01048
GO:0035196	production of miRNAs involved in gene si...	0,01102
GO:0022607	cellular component assembly	0,01168
GO:0031050	dsRNA processing	0,01258
GO:0070918	production of small RNA involved in gene...	0,01258
GO:2000380	regulation of mesoderm development	0,01258
GO:0007501	mesodermal cell fate specification	0,01414
GO:0044085	cellular component biogenesis	0,01569
GO:0001710	mesodermal cell fate commitment	0,0157
GO:0060968	regulation of gene silencing	0,01882
GO:1901071	glucosamine-containing compound metaboli...	0,02037
GO:0007339	binding of sperm to zona pellucida	0,02192
GO:0035803	egg coat formation	0,02192
GO:0042663	regulation of endodermal cell fate speci...	0,02192
GO:0009988	cell-cell recognition	0,02347
GO:0020027	hemoglobin metabolic process	0,02347
GO:0035036	sperm-egg recognition	0,02347
GO:0042541	hemoglobin biosynthetic process	0,02347
GO:1903224	regulation of endodermal cell differenti...	0,02347

GO:0001714	endodermal cell fate specification	0,02501
GO:0001711	endodermal cell fate commitment	0,02655
GO:0043249	erythrocyte maturation	0,02655
GO:0044238	primary metabolic process	0,02763
GO:0006040	amino sugar metabolic process	0,0281
GO:0042659	regulation of cell fate specification	0,0281
GO:0006360	transcription by RNA polymerase I	0,03117
GO:0010453	regulation of cell fate commitment	0,0327
GO:0048333	mesodermal cell differentiation	0,0327
GO:0001838	embryonic epithelial tube formation	0,03423
GO:0001841	neural tube formation	0,03423
GO:0035987	endodermal cell differentiation	0,03423
GO:0060795	cell fate commitment involved in formati...	0,03423
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	0,035
GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport	0,03576
GO:0044237	cellular metabolic process	0,03672
GO:0071704	organic substance metabolic process	0,03746
GO:0071391	cellular response to estrogen stimulus	0,04034
GO:0000209	protein polyubiquitination	0,04186
GO:0022904	respiratory electron transport chain	0,04186
GO:0043170	macromolecule metabolic process	0,04198
GO:0003014	renal system process	0,04489
GO:0006119	oxidative phosphorylation	0,04489
GO:0006383	transcription by RNA polymerase III	0,04489
GO:0007338	single fertilization	0,04489
GO:0043627	response to estrogen	0,04489
GO:0006414	translational elongation	0,0464
GO:0009566	fertilization	0,0464
GO:0010470	regulation of gastrulation	0,0464
GO:0001706	endoderm formation	0,04791
GO:0008037	cell recognition	0,04791
GO:0001707	mesoderm formation	0,05093
GO:0035195	gene silencing by miRNA	0,05543
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization	0,05842
GO:0016441	posttranscriptional gene silencing	0,05842
GO:0035194	posttranscriptional gene silencing by RN...	0,05842
GO:0048332	mesoderm morphogenesis	0,05842
GO:0048821	erythrocyte development	0,05842
GO:2000027	regulation of animal organ morphogenesis	0,05842
GO:0006470	protein dephosphorylation	0,05844
GO:0046777	protein autophosphorylation	0,05992
GO:0006996	organelle organization	0,05993
GO:0048477	oogenesis	0,06141
GO:0048469	cell maturation	0,06289
GO:0016331	morphogenesis of embryonic epithelium	0,06586
GO:0018208	peptidyl-proline modification	0,06586
GO:0007292	female gamete generation	0,06882
GO:0071695	anatomical structure maturation	0,0703

GO:0072175	epithelial tube formation	0,0703
GO:0040029	regulation of gene expression, epigeneti...	0,07324
GO:0031047	gene silencing by RNA	0,07471
GO:0035148	tube formation	0,07471
GO:0001945	lymph vessel development	0,07618
GO:0060828	regulation of canonical Wnt signaling pa...	0,07618
GO:0007492	endoderm development	0,07911
GO:0001704	formation of primary germ layer	0,08057
GO:0045333	cellular respiration	0,08057
GO:0007163	establishment or maintenance of cell pol...	0,08203
GO:0061515	myeloid cell development	0,08203
GO:0045454	cell redox homeostasis	0,08639
GO:0016458	gene silencing	0,08784
GO:0010629	negative regulation of gene expression	0,08793
GO:0021700	developmental maturation	0,08929
GO:0031101	fin regeneration	0,08929
GO:0043666	regulation of phosphoprotein phosphatase...	0,08929
GO:0010921	regulation of phosphatase activity	0,09073
GO:0016311	dephosphorylation	0,09419
GO:0008152	metabolic process	0,09432
GO:0035304	regulation of protein dephosphorylation	0,09506
GO:0007281	germ cell development	0,09649
GO:0035303	regulation of dephosphorylation	0,09793

Supplementary Table T2

		50mGy/h		5mGy/h	
zfin_id_symbol	**Ensembl genes**	**log2(fold change)**	**adjusted p-value**	**log2(fold change)**	**adjusted p-value**
zic2a	ENSDARG00000015554	0,02	9,4E-01	-0,20	2,8E-01
crabp2b	ENSDARG00000030449	0,90	**4,1E-11**	0,51	**4,1E-03**
rarga	ENSDARG00000034117	0,64	**1,2E-03**	0,37	1,3E-01
rarab	ENSDARG00000034893	0,48	**6,4E-05**	0,39	**8,2E-03**
pitx2	ENSDARG00000036194	-0,26	9,9E-02	-0,11	6,1E-01
cdx4	ENSDARG00000036292	0,79	**3,4E-10**	0,29	8,7E-02
zic2b	ENSDARG00000037178	-0,08	5,9E-01	0,06	7,2E-01
aldh1a2	ENSDARG00000053493	0,66	**2,9E-10**	0,52	**4,9E-05**
raraa	ENSDARG00000056783	0,26	9,4E-02	0,02	9,3E-01
ctbp1	ENSDARG00000057007	0,40	2,2E-02	0,49	1,7E-02
apc	ENSDARG00000058868	-0,09	6,9E-01	-0,13	5,9E-01
tgif1	ENSDARG00000059337	0,04	7,7E-01	0,00	9,9E-01
wwtr1	ENSDARG00000067719	0,27	2,1E-01	-0,13	6,4E-01
foxc1a	ENSDARG00000091481	1,02	**4,1E-08**	0,63	**8,2E-03**
cdx1a	ENSDARG00000114554	1,84	**4,6E-32**	1,01	**2,2E-07**

Supplementary Table T3

Dose rate	TF Name	Z-score	Fisher-score	Common	Gastrula Expression (Zfin)
50mGy/h	KLF9	50,956	4,665		
50mGy/h	**Arid3b**	**49,624**	**7,175**	**yes**	
50mGy/h	MNX1	40,483	10,185		**yes**
50mGy/h	**Foxj3**	**36,183**	**6,938**	**yes**	
50mGy/h	ZNF24	34,406	8,269		
50mGy/h	**LMX1A**	**33,834**	**8,492**	**yes**	
50mGy/h	FOXA1	33,761	5,667		**yes**
50mGy/h	**NKX6-1**	**33,651**	**7,44**	**yes**	**yes**
50mGy/h	HNF1A	33,35	3,302		**yes**
50mGy/h	**FOXK2**	**32,805**	**5,332**	**yes**	
50mGy/h	Foxd3	31,836	3,042		
50mGy/h	**Lhx3**	**30,325**	**6,584**	**yes**	
50mGy/h	Foxj2	29,2	5,327		
50mGy/h	FOXP2	28,708	5,558		**yes**
50mGy/h	**POU6F1**	**26,607**	**7,82**	**yes**	
50mGy/h	POU4F1	25,625	3,249		
50mGy/h	Foxq1	25,435	3,575		
50mGy/h	PROP1	25,418	6,141		
50mGy/h	ONECUT3	25,359	10,144		**yes**
50mGy/h	FOXO6	25,333	8,06		**yes**
50mGy/h	PAX3	25,036	6,361		**yes**
50mGy/h	**FOXG1**	**24,532**	**6,725**	**yes**	**yes**
50mGy/h	Foxa2	24,101	3,588		
50mGy/h	**mix-a**	**23,917**	**6,061**	**yes**	
50mGy/h	FOXI1	23,584	4,985		
50mGy/h	SOX15	22,999	3,39		**yes**
50mGy/h	Sox5	22,911	3,698		
50mGy/h	ONECUT2	22,767	10,305		
50mGy/h	PAX7	22,741	5,223		
50mGy/h	Hoxd8	21,649	5,183		
50mGy/h	**DBP**	**21,049**	**4,753**	**yes**	
50mGy/h	HNF1B	20,608	5,291		**yes**
50mGy/h	**POU3F3**	**20,42**	**5,013**	**yes**	**yes**
50mGy/h	TEF	19,749	4,8		**yes**
50mGy/h	LHX2	19,681	7,509		**yes**
50mGy/h	HLF	19,47	3,676		
50mGy/h	**FOXK1**	**19,198**	**5,122**	**yes**	
50mGy/h	POU4F3	18,582	5,158		
50mGy/h	POU3F1	18,173	3,651		**yes**
50mGy/h	FOXP1	18,083	3,736		
50mGy/h	**Arid5a**	**18,081**	**3,42**	**yes**	
50mGy/h	POU6F2	16,417	6,848		
50mGy/h	BATF::JUN	16,392	7,676		
50mGy/h	HEY1	16,362	4,887		**yes**
50mGy/h	GBX1	16,214	4,043		
50mGy/h	LHX6	16,095	3,45		
50mGy/h	Hoxd3	15,631	5,018		
50mGy/h	FOXH1	15,569	5,342		**yes**
50mGy/h	Tcfl5	15,389	4,374		
50mGy/h	ONECUT1	14,583	5,735		
50mGy/h	FOXO3	14,344	3,644		
50mGy/h	NFIL3	14,104	3,229		**yes**
50mGy/h	Arnt	13,771	5,58		
50mGy/h	**MEOX1**	**13,684**	**6,354**	**yes**	
50mGy/h	KLF13	12,439	4,795		
50mGy/h	FOXD1	12,396	3,599		
50mGy/h	POU4F2	12,332	6,11		

50mGy/h	Arx	12,277	3,532		
50mGy/h	EHF	11,802	3,904		
50mGy/h	MEF2D	11,795	3,617		
50mGy/h	Foxo1	11,596	7,934		
50mGy/h	ELF1	11,427	4,792		
50mGy/h	SP4	11,208	4,529		
50mGy/h	PLAG1	10,918	4,006		
50mGy/h	**CDX2**	**10,788**	**3,458**	**yes**	
50mGy/h	ELF4	9,883	4,266		
50mGy/h	**HMBOX1**	**9,085**	**4,325**	**yes**	
50mGy/h	Atf1	9,002	3,997		
50mGy/h	Hmx2	8,978	3,147		
50mGy/h	Sox11	8,843	3,319		
50mGy/h	Crem	8,788	4,11		
50mGy/h	BHLHE40	8,648	3,043		**yes**
50mGy/h	Hmx3	8,46	3,028		
50mGy/h	FOSL1::JUN(var.2)	8,326	4,636		
50mGy/h	FOSB::JUNB(var.2)	8,137	4,65		
50mGy/h	Hoxb5	7,993	3,038		
50mGy/h	TP63	7,44	3,126		**yes**
50mGy/h	RELA	6,86	3,824		**yes**
50mGy/h	MYC	6,838	3,606		**yes**
50mGy/h	**Dmbx1**	**6,654**	**4,01**	**yes**	
5mGy/h	**Arid3b**	**25,855**	**5,919**	**yes**	
5mGy/h	MNX1	21,244	3,016		**yes**
5mGy/h	**Lhx3**	**18,673**	**6,608**	**yes**	
5mGy/h	CEBPB	18,053	3,203		**yes**
5mGy/h	CEBPD	17,797	4,65		
5mGy/h	CEBPE	17,787	3,621		
5mGy/h	**DBP**	**17,405**	**3,908**	**yes**	
5mGy/h	**FOXK2**	**15,523**	**3,604**	**yes**	
5mGy/h	**LMX1A**	**15,497**	**7,312**	**yes**	
5mGy/h	HOXA13	15,311	4,47		
5mGy/h	**NKX6-1**	**15,16**	**3,394**	**yes**	**yes**
5mGy/h	TEF	14,982	3,82		**yes**
5mGy/h	HESX1	14,788	3,142		
5mGy/h	Hoxd8	14,669	5,418		
5mGy/h	**POU6F1**	**14,102**	**6,11**	**yes**	
5mGy/h	PHOX2A	13,891	3,035		**yes**
5mGy/h	SP4	13,463	3,842		
5mGy/h	**FOXG1**	**13,441**	**3,142**	**yes**	**yes**
5mGy/h	**mix-a**	**13,343**	**5,697**	**yes**	
5mGy/h	KLF13	13,261	5,007		
5mGy/h	**Arid5a**	**12,891**	**8,003**	**yes**	
5mGy/h	Foxd3	12,566	3,075		
5mGy/h	**Dmbx1**	**12,219**	**6,279**	**yes**	
5mGy/h	BATF::JUN	11,897	9,309		
5mGy/h	**Foxj3**	**11,809**	**5,561**	**yes**	
5mGy/h	LHX2	11,67	5,666		**yes**
5mGy/h	HNF1B	11,466	6,245		**yes**
5mGy/h	ELK1	10,751	4,71		
5mGy/h	POU4F3	10,427	3,337		
5mGy/h	PROP1	10,266	5,484		
5mGy/h	Rxra	10,032	3,434		
5mGy/h	**FOXK1**	**9,89**	**3,977**	**yes**	
5mGy/h	HNF1A	9,718	7,765		**yes**
5mGy/h	**CDX2**	**9,662**	**7,82**	**yes**	
5mGy/h	Arnt	9,036	3,776		
5mGy/h	E2F1	9,009	3,778		
5mGy/h	FOXF2	8,928	3,544		

5mGy/h	GATA1::TAL1	8,881	4,728		
5mGy/h	OLIG2	8,478	3,195		**yes**
5mGy/h	Sox11	8,227	3,501		
5mGy/h	GBX1	8,12	5,805		
5mGy/h	**MEOX1**	**7,917**	**4,034**	**yes**	
5mGy/h	**POU3F3**	**7,469**	**7,883**	**yes**	**yes**
5mGy/h	POU4F2	7,358	4,61		
5mGy/h	**HMBOX1**	**7,284**	**4,903**	**yes**	
5mGy/h	CUX2	6,868	3,231		
5mGy/h	POU2F1	6,355	3,616		
5mGy/h	OLIG3	6,163	3,197		**yes**
5mGy/h	TBP	6,093	4,63		
5mGy/h	CREB3	6,074	3,306		**yes**
5mGy/h	Alx1	6,044	3,57		
0.5mGy/h	FOS::JUN(var.2)	40,754	32,686		
0.5mGy/h	BATF3	40,712	32,299		
0.5mGy/h	FOSL2::JUND(var.2)	33,741	28,011		
0.5mGy/h	CREB3	32,608	23,871		**yes**
0.5mGy/h	ATF7	30,867	25,692		**yes**
0.5mGy/h	FOSB::JUN	27,136	23,824		
0.5mGy/h	FOSL1::JUN(var.2)	26,502	26,251		
0.5mGy/h	FOSL2::JUNB(var.2)	25,6	22,107		
0.5mGy/h	JDP2(var.2)	25,206	21,724		
0.5mGy/h	**Foxj3**	**22,032**	**6,077**	**yes**	
0.5mGy/h	**FOXG1**	**21,907**	**3,08**	**yes**	**yes**
0.5mGy/h	Gmeb1	21,614	9,09		
0.5mGy/h	JUN::JUNB(var.2)	21,374	16,026		
0.5mGy/h	JUNB(var.2)	20,941	18,194		
0.5mGy/h	Creb5	20,734	17,104		
0.5mGy/h	FOSB::JUNB(var.2)	20,604	18,833		
0.5mGy/h	**Arid3b**	**20,574**	**3,934**	**yes**	
0.5mGy/h	FOSL2::JUN(var.2)	20,243	18,895		
0.5mGy/h	MEF2C	19,98	3,386		
0.5mGy/h	**FOXK2**	**18,384**	**3,513**	**yes**	
0.5mGy/h	Crem	18,269	7,952		
0.5mGy/h	FOSL1::JUND(var.2)	17,897	10,166		
0.5mGy/h	GRHL1	17,772	12,164		**yes**
0.5mGy/h	ZNF384	17,677	4,598		
0.5mGy/h	SOX9	17,166	7,187		**yes**
0.5mGy/h	Sox5	16,847	3,451		
0.5mGy/h	CREB1	16,451	10,826		
0.5mGy/h	**Dmbx1**	**16,417**	**8,236**	**yes**	
0.5mGy/h	E2F2	16,141	6,336		
0.5mGy/h	E2F3	15,396	6,205		
0.5mGy/h	HLF	15,311	3,896		
0.5mGy/h	SOX13	15,3	3,905		
0.5mGy/h	Foxq1	14,909	3,693		
0.5mGy/h	GRHL2	14,373	7,913		**yes**
0.5mGy/h	Sox17	14,26	4,069		
0.5mGy/h	**CDX2**	**13,893**	**4,112**	**yes**	
0.5mGy/h	Foxo1	13,334	3,047		
0.5mGy/h	JUND(var.2)	13,106	6,499		
0.5mGy/h	Sox6	13,09	3,202		
0.5mGy/h	**LMX1A**	**12,975**	**7,168**	**yes**	
0.5mGy/h	**Arid5a**	**12,721**	**3,6**	**yes**	
0.5mGy/h	**Lhx3**	**12,399**	**4,705**	**yes**	
0.5mGy/h	SOX21	12,337	4,958		
0.5mGy/h	**DBP**	**11,807**	**3,24**	**yes**	
0.5mGy/h	GMEB2	11,587	6,902		
0.5mGy/h	MEF2D	11,546	3,085		

0.5mGy/h	JUN	11,303	7,656		
0.5mGy/h	EHF	11,057	4,053		
0.5mGy/h	FOXH1	10,912	4,623		**yes**
0.5mGy/h	POU3F1	10,648	4,901		**yes**
0.5mGy/h	SREBF2	10,595	6,232		
0.5mGy/h	**HMBOX1**	**10,36**	**5,763**	**yes**	
0.5mGy/h	PPARA::RXRA	10,294	4,035		
0.5mGy/h	ONECUT3	10,089	5,334		**yes**
0.5mGy/h	Six3	10,043	4,7		
0.5mGy/h	**NKX6-1**	**10,033**	**3,327**	**yes**	**yes**
0.5mGy/h	POU6F2	9,692	7,701		
0.5mGy/h	POU2F1	9,68	4,173		
0.5mGy/h	ELF1	9,572	4,065		
0.5mGy/h	TBX2	9,561	3,313		**yes**
0.5mGy/h	**mix-a**	**9,273**	**7,344**	**yes**	
0.5mGy/h	CEBPD	9,144	5,589		
0.5mGy/h	CEBPE	8,829	4,233		
0.5mGy/h	ELF4	8,727	3,805		
0.5mGy/h	Phox2b	8,376	5,666		
0.5mGy/h	HOXA13	8,304	4,36		
0.5mGy/h	Pou2f3	8,238	3,789		
0.5mGy/h	TBP	8,196	3,78		
0.5mGy/h	PAX3	7,978	4,124		**yes**
0.5mGy/h	CEBPB	7,97	3,783		**yes**
0.5mGy/h	DUXA	7,871	4,571		
0.5mGy/h	**POU6F1**	**7,607**	**4,707**	**yes**	
0.5mGy/h	XBP1	7,524	3,246		**yes**
0.5mGy/h	**POU3F3**	**7,427**	**5,938**	**yes**	**yes**
0.5mGy/h	TFCP2	7,181	3,468		
0.5mGy/h	**FOXK1**	**7,135**	**3,843**	**yes**	
0.5mGy/h	Crx	6,974	4,282		
0.5mGy/h	ZIC4	6,646	3,333		
0.5mGy/h	Nr2e3	6,541	3,326		
0.5mGy/h	PHOX2A	6,437	7,465		**yes**
0.5mGy/h	**MEOX1**	**6,299**	**5,803**	**yes**	
0.5mGy/h	SREBF1	6,284	4,126		
0.5mGy/h	Creb3l2	6,163	3,611		
0.5mGy/h	FOXF2	6,102	3,548		

Supplementary Table T4

Target= 50mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	63,12	0,0035	48,22		
2	59,75	0,0036	45,65		
3	60,63	0,0036	46,32		
4	60,17	0,0036	45,97		
5	61,88	0,0035	47,28		
6	61,98	0,0035	47,35	**46,80**	**0,98**

Target= 5mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	5,98	0,0024	5,07		
2	5,99	0,0020	5,07		
3	6,03	0,0029	5,11		
4	5,98	0,0025	5,06		
5	5,99	0,0025	5,07		
6	5,99	0,0023	5,08	**5,08**	**0,02**

Target= 0.5mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	0,520	0,0144	0,48		
2	0,505	0,0040	0,47		
3	0,507	0,0114	0,47		
4	0,512	0,0099	0,47		
5	0,514	0,0093	0,47		
6	0,514	0,0119	0,47	**0,47**	**0,005**

Target= 0.05mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	0,062	0,008	0,052		
2	0,061	0,004	0,052		
3	0,061	0,006	0,051		
4	0,061	0,005	0,052		
5	0,061	0,006	0,052		
6	0,060	0,004	0,051	**0,052**	**0,001**

Target= 0.005mGy/h

Test	MCNP simulation 370 GBq (mGy/h)	MCNP sd	Corrected measure (mGy/h)	**Average dose rate (mGy/h)**	**sd**
1	0,00523	0,0161	0,0044		
2	0,00516	0,0164	0,0043		
3	0,00534	0,0183	0,0045		
4	0,00510	0,0067	0,0043		
5	0,00518	0,0093	0,0044		
6	0,00521	0,0096	0,0044	**0,0044**	**0,0001**

Supplementary Table T5

Sample	Replicate	Dose rate mGy/h	Stage	Irradiation batch	Total R1	% > Q30 R1	Total R2	% > Q30 R2	Total
C_shield	Sample I13 Shield C1	Control	Shield	I13	41240186	100	41240186	100	82480372
C_shield	Sample I13 Shield C2	Control	Shield	I13	57781441	99.99	57781441	99.99	115562882
C_shield	Sample I13 Shield C3	Control	Shield	I13	50167295	100	50167295	100	100334590
C_shield	Sample I13 Shield C4	Control	Shield	I13	49483237	99.97	49483237	99.97	98966474
0.05mG_shield	Sample I13 Shield 50microG E1	0.05 mGy/h	Shield	I13	79190394	100	79190394	100	158380788
0.05mG_shield	Sample I13 Shield 50microG E2	0.05 mGy/h	Shield	I13	67704675	99.97	67704675	99.97	135409350
0.05mG_shield	Sample I13 Shield 50microG E3	0.05 mGy/h	Shield	I13	42235059	99.99	42235059	99.99	84470118
0.05mG_shield	Sample I13 Shield 50microG E4	0.05 mGy/h	Shield	I13	43961553	100	43961553	100	87923106
C_shield	Sample I14 Shield C1	Control	Shield	I14	36012731	99.97	36012731	99.97	72025462
C_shield	Sample I14 Shield C2	Control	Shield	I14	41919623	99.99	41919623	99.99	83839246
C_shield	Sample I14 Shield C3	Control	Shield	I14	27843409	99.98	27843409	99.98	55686818
C_shield	Sample I14 Shield C4	Control	Shield	I14	33375261	99.99	33375261	99.99	66750522
0.005mG_shield	Sample I14 Shield 5microG E2	0.005 mGy/h	Shield	I14	46883403	100	46883403	100	93766806
0.005mG_shield	Sample I14 Shield 5microG E3	0.005 mGy/h	Shield	I14	42202592	99.99	42202592	99.99	84405184
0.005mG_shield	Sample I14 Shield 5microG E4	0.005 mGy/h	Shield	I14	36126031	99.99	36126031	99.99	72252062
C_shield	Sample I30 Shield C1	Control	Shield	I30	35046856	100	35046856	100	70093712
C_shield	Sample I30 Shield C2	Control	Shield	I30	25019918	100	25019918	100	50039836
C_shield	Sample I30 Shield C3	Control	Shield	I30	20343277	99.99	20343277	99.99	40686554
C_shield	Sample I30 Shield C4	Control	Shield	I30	13612487	99.98	13612487	99.98	27224974
C_shield	Sample I30 Shield C5	Control	Shield	I30	18186186	99.98	18186186	99.98	36372372
C_shield	Sample I30 Shield C6	Control	Shield	I30	15469177	99.96	15469177	99.96	30938354
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E1	5 mGy/h	Shield	I30	30269082	99.99	30269082	99.99	60538164
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E2	5 mGy/h	Shield	I30	47958113	100	47958113	100	95916226
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E3	5 mGy/h	Shield	I30	33116945	100	33116945	100	66233890
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E4	5 mGy/h	Shield	I30	28100513	99.99	28100513	99.99	56201026
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E5	5 mGy/h	Shield	I30	62953248	99.99	62953248	99.99	125906496
5mG_shield	Sample I30 Shield 5mG E6	5 mGy/h	Shield	I30	51220637	100	51220637	100	102441274
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E1	50 mGy/h	Shield	I30	32802280	99.99	32802280	99.99	65604560
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E2	50 mGy/h	Shield	I30	33161546	100	33161546	100	66323092
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E3	50 mGy/h	Shield	I30	35523351	99.99	35523351	99.99	71046702
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E4	50 mGy/h	Shield	I30	33420103	99.99	33420103	99.99	66840206
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E5	50 mGy/h	Shield	I30	31696571	100	31696571	100	63393142
50mG_shield	Sample I30 Shield 50mG E6	50 mGy/h	Shield	I30	34730513	99.99	34730513	99.99	69461026
C_shield	Sample I32 Shield C1	Control	Shield	I32	44035193	99.99	44035193	99.99	88070386
C_shield	Sample I32 Shield C2	Control	Shield	I32	43294316	99.99	43294316	99.99	86588632
C_shield	Sample I32 Shield C3	Control	Shield	I32	29669120	100	29669120	100	59338240
C_shield	Sample I32 Shield C4	Control	Shield	I32	37313718	99.98	37313718	99.98	74627436
C_shield	Sample I32 Shield C5	Control	Shield	I32	34259375	99.98	34259375	99.98	68518750
C_shield	Sample I32 Shield C6	Control	Shield	I32	31187027	99.98	31187027	99.98	62374054
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E1	0.5 mGy/h	Shield	I32	32192140	99.99	32192140	99.99	64384280
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E2	0.5 mGy/h	Shield	I32	31747026	100	31747026	100	63494052
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E3	0.5 mGy/h	Shield	I32	44983613	100	44983613	100	89967226
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E4	0.5 mGy/h	Shield	I32	30661947	99.98	30661947	99.98	61323894
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E5	0.5 mGy/h	Shield	I32	30811317	99.98	30811317	99.98	61622634
0.5mG_shield	Sample I32 Shield 0.5mG E6	0.5 mGy/h	Shield	I32	19773480	99.99	19773480	99.99	39546960

IV.3. Principaux résultats et discussion de l'article scientifique

La première partie de ce travail a consisté à réaliser une étude transcriptomique au stade de développement shield et aux débits de doses suivants : 50 mGy/, 5 mGy/h, 0,5 mGy/h, 0,05 mGy/h et 0,005 mGy/h. Le premier résultat qui est ressorti de cette analyse est que le nombre de gènes significatifs selon les critères choisis augmente avec le débit de dose. Aucun gène différentiellement exprimé n'est en commun entre les cinq débits de doses. C'est entre les deux plus forts débits de doses que l'on retrouve le plus de gènes différentiellement exprimés en commun ce qui suggère que le profil d'expression génique est plus semblable à 50 mGy/h et 5 mGy/h qu'aux autres débits de doses. Les autres débits de doses présentent des changements plus subtils au niveau de l'expression des gènes. Le stade shield a été sélectionné pour cette étude en raison de sa diversité tissulaire limitée, néanmoins les trois feuillets embryonnaires sont présents et spécifiés au niveau moléculaire. Après exposition aux RI les gènes impliqués dans la morphogénèse sont impactés. Deux groupes semblent se dégager : un premier avec des gènes sur-exprimés à 50 et 5 mGy/h et dans une moindre mesure à 0,5, 0,05 et 0,005 mGy/h et un second groupe avec des gènes sous-exprimés. Ainsi, cette analyse a permis de mettre en évidence une modification de l'expression des gènes impliqués dans la morphogénèse après une exposition aux RI même à des débits de doses faibles. Une analyse d'enrichissement des voies impactées par une exposition aux RI a été effectuée à partir des données de transcriptomique. Le développement futur du SNC et des muscles est impacté aux débits de doses de 50 et 5 mGy/h. L'activité mitochondriale est impactée aux trois plus forts débits de doses. Une analyse des promoteurs des gènes différentiellement exprimés a été effectuée afin d'identifier les régulateurs transcriptionnels clés qui contrôle l'expression de ces gènes. L'analyse s'est concentrée sur les trois plus fort débits de doses 50 mGy/h, 5 mGy/h et 0,5 mGy/h. Les facteurs de transcription identifiés semblent être impliqués dans la neurogénèse, le développement musculaire et dans le métabolisme énergétique des mitochondries. Le premier article de ce manuscrit a mis en évidence un effet des RI sur la neurogénèse et le développement musculaire chez des embryons de 24 hpf à 120 hpf. Les résultats obtenus dans ce second article, suggèrent que les effets observés à partir de 24 hpf débutent avec des perturbations de la morphogénèse au cours du développement précoce.

La seconde partie de ce travail a consisté à réaliser une étude du méthylome au stade shield et aux deux débits de doses les plus élevés : 50 mGy/h et 5 mGy/h. Aucun changement au niveau du taux de méthylation global n'a été relevé aux deux débits de doses. Cependant, l'analyse différentielle du méthylome a permis de détecter à 50 mGy/h 7560 cytosines différentiellement méthylées et 8190 cytosines différentiellement méthylées à 5 mGy/h. L'analyse des îlots CpG a ensuite été réalisée, une hypométhylation et

une hyperméthylation ont été détectées aux deux débits de doses. Néanmoins, l'hypométhylation des îlots CpG semble être majoritaire aux deux débits de dose. Le même résultat est observé avec l'analyse des promoteurs. Comme une hypométhylation peut être associée avec une instabilité génomique *via* la réactivation d'éléments transposables, l'analyse de la mobilisation des transposons après exposition aux RI a été effectuée. Aucun changement du taux de méthylation n'a été détecté dans les transposons et rétrotransposons étudiés. Ce résultat suggère que les débits de doses utilisés ne sont pas suffisants pour causer une instabilité génomique. Les 5-méthyl-cytosines ont ensuite été regroupées en régions différentiellement méthylées (DMRs). 1208 et 1858 DMRs ont été détectés respectivement aux débits de doses de 50 mGy/h et 5 mGy/h. La majorité de ces DMRs sont hypométhylés et 60% sont différentiellement méthylés de façon concordante entre les deux débits de doses. Comme les DMRs localisés dans les promoteurs sont connus pour moduler l'expression des gènes, nous avons analysé la distribution des DMRs aux alentours des sites de démarrage de la transcription (TSS). Les DMRs sont enrichis au niveau des TSS aux deux débits de doses, la majorité de ces DMRs sont hypométhylés. Ainsi, ces analyses ont permis de montrer qu'une exposition à des débits de doses modérés à faibles peut réduire les taux de méthylation dans les régions promotrices avec un possible impact sur l'expression des gènes.

La troisième partie de ce travail a consisté à comparer l'étude transcriptomique et l'étude du méthylome à 50 mGy/h et 5mGy/h afin d'étudier l'influence de la méthylation de l'ADN sur l'expression des gènes. 600 DMRs hypométhylés à 50 ou 5 mGy/h localisés à moins de 500 pb d'un TSS ont été sélectionnés ainsi que l'expression du gène associé. L'analyse de ces données par clustering hiérarchique révèle deux groupes : le premier est composé de gènes sous-exprimés dans la condition contrôle et sur-exprimés dans les conditions exposés, le second groupe est composé de gènes sous-exprimés dans la condition contrôle et sur-exprimés dans les conditions exposés. Ces résultats montrent que les DMRs localisés dans les promoteurs altèrent l'expression des gènes. Néanmoins, établir un lien entre l'hypométhylation de l'ADN et la sur-expression d'un gène est difficile car d'autres facteurs influent sur l'état de la chromatine. Une analyse des voies de régulation associées aux DMRs a été réalisée. Un changement de méthylation dans les promoteurs de gènes qui sont impliquées dans le développement embryonnaire, le développement du SNC et le développement musculaire a été détecté. Les analyses de méthylation et de transcriptomique sont donc concordantes et pointent vers une altération des voies impliquées dans le développement du SNC et des muscles.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier les modes d'actions toxique et les effets des RI à des débits de doses faibles à modérés sur le développement du poisson zèbre. Pour répondre à cette problématique, une évaluation des effets d'une exposition aux RI lors du développement par une approche de biologie des systèmes a été mise en œuvre, des stades précoces de développement jusqu'aux stades larvaires.

Évaluation des effets d'une exposition aux RI par une approche multi-échelle

La première partie de cette thèse s'est focalisée sur l'évaluation des effets d'une exposition aux RI sur le développement du poisson zèbre. Pour cela, des analyses ont été réalisées de l'échelle moléculaire à l'échelle phénotypique. L'analyse transcriptomique a mis en évidence un impact des RI sur la voie de l'AR, sur le développement du SNC et des muscles. Les patrons d'expression de facteurs de transcription clés du développement du SNC et des muscles sont en effet fortement impactés à 5 et 50 mGy/h et dans une moindre mesure à 0,5 mGy/h. Une analyse protéomique a permis de confirmer l'impact des RI sur la voie de l'AR et sur le développement du SNC et des muscles. Le marquage par hybridation d'ARN *in situ* a confirmé la modulation de l'expression des facteurs de transcription *her4.4* dans le SNC et de *myog* dans les muscles des embryons exposés aux RI. Au niveau tissulaire, un détachement des myofibrilles et une altération des jonctions neuro-musculaires ont été détectés chez les embryons exposés à 5 et 50 mGy/h. Les effets constatés aux échelles moléculaires, cellulaires et tissulaires ont été confirmés par une étude à l'échelle individuelle. Un tableau récapitulatif des résultats a été réalisé pour les résultats obtenus aux échelles cellulaire, tissulaire et individuelle (Tableau Ccl.1). Le comportement locomoteur des larves a été évalué et une diminution significative de la mobilité des larves a été détectée entre 0,5 mGy/h et 50mGy/h en situation de stress (Tableau Ccl.1). Ce résultat indique qu'une exposition aux RI pourrait altérer le comportement de fuite chez les larves de poisson zèbre. Ce test comportemental renforce les résultats obtenus aux différentes échelles biologiques, concernant l'atteinte du système neuro-musculaire. Néanmoins, l'absence d'effet significatif durant les phases où les larves ne sont pas soumises à une situation de stress suggère une prévalence de l'effet neurologique sur l'effet musculaire. De plus, les réseaux neuronaux présents dans la moelle épinière sont différents en fonction de la vitesse de nage [81], ce qui pourrait expliquer l'apparition d'effets uniquement lors de la phase de stress où les larves nagent plus rapidement. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont montré un effet des RI sur le SNC [13, 45, 54, 60, 112, 158], et élargissent le spectre des effets sur le SNC dans le cas des expositions à des débits de doses faibles à modérés de RI. Néanmoins, la piste musculaire ne peut pas être totalement exclue. En effet, notre étude utilisant des tests comportementaux ne permet pas de discriminer une cause musculaire ou neurologique.

Notre étude démontre que la voie de l'AR est aussi impactée par une exposition aux RI. Or, cette voie joue un rôle crucial lors du développement embryonnaire et elle est impliquée dans la neurogenèse et la somitogenèse [101, 157]. Le processus de neurogenèse débute à la fin de la gastrulation (9 hpf) et la somitogenèse commence au début de la segmentation (10 hpf). Néanmoins, cette étude ne permet pas de déterminer si la perturbation de la voie de l'AR est une cause ou une conséquence de la perturbation du

développement du SNC et des muscles.

Stade Débit de dose	24 hpf 0,5 mGy/h	24 hpf 5 mGy/h	24 hpf 50 mGy/h	48 hpf 0,5 mGy/h	48 hpf 5 mGy/h	48 hpf 50 mGy/h	72 hpf 0,5 mGy/h	72 hpf 5 mGy/h	72 hpf 50 mGy/h	96 hpf 0,5 mGy/h	96 hpf 5 mGy/h	96 hpf 50 mGy/h	120 hpf 0,5 mGy/h	120 hpf 5 mGy/h	120 hpf 50 mGy/h
Marquage γ-H2AX		Ø	↑		Ø	↑									
Microscopie électronique (dommages aux muscles)										Ø	↑	↑			
Fréquence cardiaque				↓	↑	↑									
Taille des larves				Ø	Ø	Ø									
Éclosion							Ø	Ø	Ø						
Survie	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Activité des embryons	Ø	↑	Ø												
Locomotion des larves (en phase de stress)													↓	↓	↓

Tableau Ccl.1. – Tableau récapitulatif des effets observés de l'échelle cellulaire à individuelle.

Étude multi-omics des effets d'une exposition aux RI au cours du développement précoce du poisson zèbre

La seconde partie de cette thèse s'est focalisée sur l'étude des effets des RI sur la méthylation de l'ADN au cours du développement précoce du poisson zèbre. Pour cela, une approche multi-omics avec l'étude du transcriptome et du méthylome a été mise en place. Une étude transcriptomique au stade shield à des débits de doses allant de 0,005 mGy/h à 50 mGy/h a été réalisée. Aux trois plus forts débits de doses, un effet modéré mais significatif sur la régulation du stress oxydatif et de l'activité mitochondriale a été montré. Un effet sur l'expression des gènes impliqués dans la morphogénèse a aussi été détecté à tous les débits de doses. Des réponses transcriptomiques différentes ont été observées entre les deux plus forts débits de doses 5 et 50 mGy/h et les débits de doses plus faibles (0,005, 0,05 et 0,5 mGy/h). Malgré ces réponses transcriptomiques différentes, les gènes impliqués dans le développement futur du SNC et des muscles sont impactés de 0,5 à 50 mGy/h. Cette étude a aussi montré que le taux de méthylation global n'est pas modifié après exposition aux RI à 5 et 50 mGy/h. De plus, aucun changement de méthylation n'est détecté au niveau des éléments transposables, ce qui semble indiquer une absence d'instabilité génomique suite à l'exposition aux RI dans nos conditions. Néanmoins, l'exposition aux RI induit une déméthylation au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans le développement, la neurogenèse et la myogenèse. Ce changement de méthylation au niveau des promoteurs est associé avec des changements au niveau de l'expression des gènes, et peut expliquer en partie les changements d'expression observés sur des gènes comme *twist1a* et *pax5*. La question de la cause de cette hypométhylation des promoteurs reste cependant ouverte. Une hypothèse d'une dérégulation de *dnmt3* reste envisageable malgré l'absence de dérégulation par RNAseq. En effet ces gènes sont hérités de manière maternelle [141] et peuvent compenser les effets transcriptionnels zygotique. Un suivi de l'activité des dnmt3 après exposition aux RI permettrait de déterminer le rôle potentiel des dnmt dans l'hypométhylation des promoteurs.

Effets des RI en fonction du débit de dose

Les études transcriptomiques réalisées dans les deux articles ont montré que les profils d'expression obtenus se classent en deux groupes avec d'un côté les deux plus forts débits de doses (5 et 50 mGy/h) et de l'autre les débits de doses plus faibles (0,005 mGy/h, 0,05 mGy/h et 0,5 mGy/h). En effet, nos deux études ont montré que les profils transcriptomiques à 5 et 50 mGy/h sont très similaires. Dans l'étude de Hurem, des embryons de poisson zèbre à 5,5 hpf ont été exposés aux RI à trois débits de doses : 0,54 mGy/h, 5,4 mGy/h et 10,9 mGy/h. Comme dans nos études, ce sont les deux débits de doses les plus forts qui partagent le plus de gènes différentiellement exprimés en commun [64]. Dans ce projet de thèse, les deux débits de doses les plus faibles (0,005 et 0,05 mGy/h) ont peu de gènes modulés par les RI. Néanmoins, un effet sur l'expression des gènes impliqués dans la morphogénèse a été relevé pour tous les débits de doses au stade shield. Des effets plus marqués sont observés à partir de 0,5 mGy/h. En effet, au niveau moléculaire un impact sur l'expression des gènes impliqués dans la voie de l'AR et dans le développement du SNC et des muscles a été montré. De plus, une diminution

de la mobilité des larves en phase de stress a été observée tout comme aux deux plus forts débits de doses. En revanche au niveau tissulaire, aucune atteinte aux muscles n'a été mise en évidence par observation au microscope électronique. Ces résultats suggèrent un impact des RI à partir de 0,5 mGy/h plus faible qu'à 5 et 50 mGy/h. Ils indiquent également que le seuil de débits de doses amenant à des effets significatifs sur le développement se situerait entre 0,5 et 5 mGy/h.

Dans le but de protéger les écosystèmes, la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) a déterminé des gammes de débits de doses pour lesquels des effets ayant des conséquences à l'échelle de la population sont susceptibles de survenir chez un groupe d'espèces donné. Pour les poissons d'eau douce, une diminution du succès reproducteur est susceptible d'être observée entre 0,04 et 0,4 mGy/h, des effets sur les jeunes poissons sont attendus entre 0,4 et 4 mGy/h, une augmentation de la morbidité peut être observée entre 4 et 40 mGy/h et au-dessus de 40 mGy/h une augmentation de la mortalité chez les embryons peut être observée [67]. Le débit de dose 0,5 mGy/h se situe dans la gamme des débits de doses pour lesquels des effets sont susceptibles d'être observés sur les stades embryonnaires et larvaires chez les poissons d'eau douce. Nos résultats élargissent le spectre des effets attendus entre 0,4 et 4 mGy/h sur le développement embryonnaire. L'UNSCEAR (« United Nations Scientific Commitee on the Effects of Atomic Radiation ») a aussi déterminé des valeurs seuil dans le cadre de la radioprotection humaine. Une limite en dessous de 6 mGy/h pour définir le domaine des faibles doses pour l'Homme a été établie [152]. Cette limite est basée sur des études de cohortes d'exposition aiguës, et des extrapolations ont été réalisées pour adapter cette limite aux expositions chroniques. Même si notre étude ne traite pas d'une exposition aux RI chez l'Homme, elle peut apporter des éléments de discussion pour cette valeur seuil, car le poisson zèbre est également un modèle utilisé en cancérologie. Les profils biologiques obtenus par RNA-seq pour les débits de doses de 0,5, 5 et 50 mGy/h montrent que les débits de doses de 5 et 50 mGy/h ont des profils plus similaires que les débits de doses de 0,5 et 5 mGy/h. Ce résultat questionne la proposition de l'UNSCEAR de définir le domaine des faibles doses à partir de 6 mGy/h. En effet, afin de mieux définir la valeur seuil des faibles débits de doses une meilleure caractérisation des réponses obtenues entre 0,5 mGy/h et 5 mGy/h est nécessaire.

Impact des RI sur le développement du SNC et des muscles au cours du développement du poisson zèbre

Les études transcriptomiques à des stades de développement précoce et tardif (après 24 hpf) ont permis de mettre en évidence un impact des RI sur le développement du SNC et des muscles pour des débits de doses allant de 0,5 mGy/h à 50 mGy/h.

Au cours de la gastrulation, le patron d'expression des gènes permet de mettre en place les territoires où vont se développer les différents organes. Ainsi, dans notre étude, dès le développement précoce, un impact des RI au niveau moléculaire a été détecté au niveau des gènes régulant la morphogénèse et au niveau des gènes impliqués dans le développement du SNC et des muscles. Bien que les processus de neurogenèse et de myogenèse ne soient pas encore actifs lors de la gastrulation, ce résultat pourrait indiquer un impact des RI sur la morphogénèse. Une étude d'irradiation aux rayons X

à 1 Gy sur des cellules souches humaines *in vitro* a montré une influence des RI sur les capacités de différenciation des cellules souches [99]. En effet, les RI impactent le niveau d'expression des régulateurs de la pluripotence chez ces cellules et altèrent la différenciation des cellules souches en endoderme.

Aux stades de développement plus tardifs, des effets au niveau moléculaire sont toujours observés et viennent s'y ajouter des effets aux niveaux cellulaire, tissulaire et individuel. Ainsi, la réponse transcriptionnelle aux RI observée au cours du développement précoce est un bon prédicteur des effets individuels visibles à plus long terme. Ce résultat présente un intérêt dans le cadre de l'évaluation du risque car il montre que les effets moléculaires observés à un stade précoce de développement sont des paramètres sensibles et précis permettant d'évaluer les effets plus tardifs observés au cours du développement et à des échelles biologiques supérieures.

Proposition d'un AOP des effets des RI sur le développement embryonnaire

Une dérégulation de la voie de l'AR a été mise en évidence avec la première étude. La voie de l'AR joue un rôle crucial lors du développement embryonnaire et elle est impliquée dans la neurogenèse et la somitogenèse [101, 157]. Au cours de cette même étude un effet des RI sur le développement du SNC et des muscles a été mis en évidence. Ces résultats pourraient suggérer un effet de la voie de l'AR sur le développement du SNC et des muscles. De plus, un AOP montrant qu'une perturbation de l'homéostasie de l'AR conduit à des effets sur le développement du tube neural a été développé [151].

La seconde étude réalisée sur un stade de développement plus précoce, montre aussi un impact des RI sur les voies moléculaires contrôlant le développement du SNC et des muscles. Néanmoins, nos résultats sur les voies de régulation ne montrent pas d'enrichissement significatif de la voie de régulation de l'AR. Une étude détaillée de l'expression des gènes impliqués dans cette voie montre que les gènes *crabp2b*, *cyp26a1*, *aldh1a2*, *rarga* et *rarab* sont sur-régulés (p-value ajustée < 0.05) à 5 mGy/h et 50 mGy/h. En revanche, tous ces gènes ne respectent pas notre critère de significativité pour le fold change (seul *crabp2b*, *cyp26a1*, *rarga* et *raldh1a2* ont un FC > 1.5), ce qui pourrait expliquer que la voie de l'AR ne soit pas détectée dans notre analyse. L'étude transcriptomique montre aussi un impact des RI sur d'autres voies de signalisation du développement comme BMP, Wnt et Notch. Or ces voies contrôlent également le développement embryonnaire. L'étude de Hurem dans laquelle des embryons de poisson zèbres sont exposés aux RI à un stade précoce de développement (5,5 hpf) montre un effet au niveau moléculaire sur la voie de l'AR et la voie de Notch aux débits de doses de 0,54 et 10,9 mGy/h [64]. L'étude de Hurem et nos études semblent donc s'accorder sur un impact des RI sur la voie de l'AR et sur les autres voies de signalisation du développement telles que la voie de Notch. Un impact sur ces voies de signalisation pourrait entrainer une altération de la morphogénèse, ce qui entrainerait par conséquent une perturbation du développement embryonnaire.

Le rétinol et le rétinal qui sont des précurseurs de l'AR proviennent de la vitamine A ou des bêta-carotènes. L'AR présent dans l'organisme provient exclusivement de l'alimentation et ne peut être synthétisé *de novo*. Une étude sur les mésanges charbonnières (*Parus major*) à Tchernobyl a montré une diminution des concentrations en caroténoïdes,

vitamines A et E qui sont des anti-oxydants dans la réserve des œufs avec une relation dose dépendante en fonction du niveau de radioactivité à proximité des nichoirs [111]. Cette diminution de la concentration en caroténoïdes, vitamines A et E est associée avec une ponte plus précoce et un succès d'éclosion plus faible que chez les oiseaux non exposés. Cette étude montre que les anti-oxydants normalement déposés dans l'œuf pour protéger les embryons sont utilisés par la mère pour sa survie dans un contexte d'exposition aux RI. Ce résultat est intéressant dans le cadre de notre étude, car la vitamine A et les bêta-carotènes sont des précurseurs de l'AR. De plus, les RI sont connus pour augmenter le stress oxydant chez les organismes exposés [145]. On pourrait donc faire l'hypothèse que la vitamine A et les bêta-carotènes normalement utilisés dans la voie de l'AR pour le développement embryonnaire, serait utilisés dans le cadre de la défense contre le stress oxydant à la suite de l'exposition des embryons aux RI. Dans l'étude transcriptomique à un stade précoce de développement, un effet des RI est détecté sur l'expression des gènes de défense contre le stress oxydant. Ce résultat semble indiquer un effet des RI sur le stress oxydant dans le cadre de notre étude. Néanmoins, d'autres analyses sont nécessaires afin de confirmer ou non cette hypothèse.

Ce travail de thèse, permet de proposer une base pour construire un modèle d'AOP de 0,5 à 50 mGy/h (Figure Ccl.1). Une exposition aux RI conduirait à un événement moléculaire initiateur (MIE) qui n'a pas été identifié dans cette étude mais qui pourrait être une augmentation du stress oxydatif. Ce MIE pourrait aussi être une augmentation des cassures doubles brins car ceci a été observé à 50 mGy/h à 24 hpf et 48 hpf dans notre étude. Néanmoins ces cassures n'ont pas été observées à 5 mGy/h et dans la bibliographie aucun lien entre les dommages à l'ADN et la dérégulation de la voie de l'AR n'a été démontré. Des analyses complémentaires sur le stress oxydatif et les dommages à l'ADN sont nécessaires afin d'identifier ce MIE. Ce MIE conduirait à une hypométhylation des promoteurs des gènes impliqués dans le développement embryonnaire. Ce qui induirait une modification de l'expression des gènes impliqués dans la morphogénèse. Cette modification de l'expression des gènes de la morphogénèse conduirait à une dérégulation de la voie de l'AR qui serait donc un événement clé de l'impact des RI sur le développement embryonnaire. Cette dérégulation de la voie de l'AR conduirait à des effets moléculaire, cellulaire et tissulaire sur le développement du SNC et des muscles. Les effets neuro-musculaires observés entraineraient des effets comportementaux.

Des études ont montré que les polluants environnementaux peuvent aussi interférer avec le métabolisme de l'AR. En effet, les métaux lourds connus comme inducteurs de stress oxydatif [155] induisent une diminution des taux de rétinoïdes chez les truites vivant dans des lacs contaminés [122]. Une étude chez le poisson zèbre a aussi montré une diminution des taux de rétinoïdes chez des poissons zèbres adultes contaminés avec du cuivre qui est un métal lourd ou avec du benzo[a]pyrène un polluant de l'air [3]. Ces études montrent que la voie de l'acide rétinoïque est sensible aux composés inducteurs de stress oxydant, ce qui en fait un marqueur intéressant à étudier dans le cadre d'une exposition aux RI. Néanmoins, la sensibilité de cette voie au stress oxydant indique que ce marqueur sera impacté par de nombreux agents chimiques ou physiques.

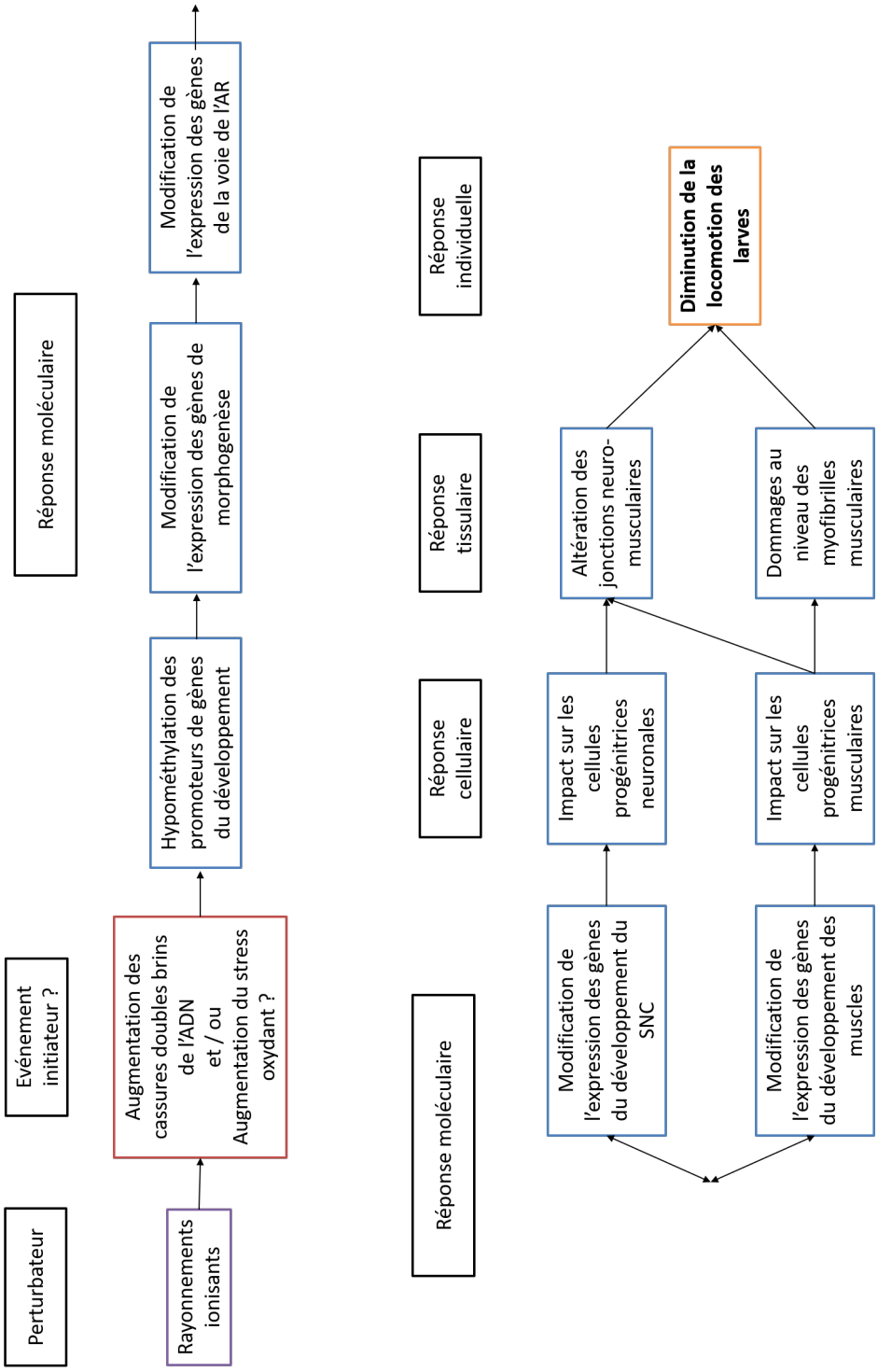


FIGURE Ccl.1. – Proposition d'un AOP pour des débits de doses entre 0,5 mGy/h et 50 mGy/h. L'évènement moléculaire initiateur reste à déterminer. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de développer et confirmer cette proposition d'AOP.

Perspectives de recherche

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une perturbation de la voie de l'AR suite à une exposition aux RI. Cette voie est indispensable pour le développement du SNC et des muscles [102, 100] et une modification de la concentration en vitamine A peut entrainer à long terme des défauts de développement et de comportement [101, 157]. Un projet d'étude métabolomique ciblée est actuellement en préparation afin de mesurer les taux de rétinol et de rétinal qui sont des précurseurs de l'AR ainsi que les taux d'AR, chez des larves de 96 hpf à 5 mGy/h et 50 mGy/h. De plus, il serait intéressant d'effectuer des expériences de supplémentation en AR, et de mesurer les effets de cette supplémentation sur le stress oxydant dans le cadre d'une exposition aux RI. Comme expliqué précédemment, les résultats obtenus aux débits de doses de 0,5 mGy/h et 5 mGy/h montrent qu'une meilleure caractérisation des réponses moléculaires et cellulaires obtenues entre ces deux débits de doses est nécessaire afin d'affiner les seuils proposés dans le cadre de la radioprotection. Cette étude est prévue pour un sujet de thèse qui débutera en octobre 2020.

Au stade précoce shield, les analyses transcriptomiques ont été réalisées à 5 débits de doses de 0,005 mGy/h à 50 mGy/h. Un projet est actuellement en discussion en collaboration avec l'université de Lyon afin d'analyser nos données de transcriptomique et de modéliser une courbe dose-réponse. L'outil est disponible sous forme de package R pour les données de types microarray et est en cours de développement pour les données de métabolomique et de RNA-seq. Ce type d'étude serait intéressant dans le cadre de la radioprotection. En effet, une courbe dose réponse permettrait d'aider à l'incorporation des données moléculaires dans les études d'évaluation du risque.

Ce projet de thèse, nous a conduit à formuler l'hypothèse d'un impact des RI sur la morphogénèse au cours du développement précoce. Afin de vérifier cette hypothèse, des hybridations d'ARN *in situ* de gènes dont le patron d'expression est spécifique à chaque feuillet embryonnaire, devront être réalisées.

Au cours de ce projet de thèse, différents paramètres individuels ont été étudiés en plus du comportement : la survie, l'éclosion et la taille des larves. Aucun effet n'a été observé pour ces différents paramètres. Il serait intéressant de réaliser une irradiation plus longue aux débits de doses les plus forts afin d'étudier si une exposition plus longue a un impact sur ces différents paramètres. De plus, il serait intéressant d'effectuer d'autres tests comportementaux comme le test de stimuli tactile qui consiste à réaliser un stimuli tactile au niveau de la queue des larves et d'étudier leur réponse de fuite [24]. Ce test permettrait de compléter les résultats obtenus en apportant des informations sur les neurones sensoriels et les interneurones de la moelle épinière.

Au cours de ce projet de thèse, la méthylation de l'ADN a été étudiée par séquençage bisulfite. Nous nous sommes concentrés sur la méthylation de l'ADN localisée au niveau des promoteurs des gènes. Il serait intéressant d'exploiter notre jeu de données afin d'étudier la méthylation de l'ADN localisée dans le corps des gènes. Ce type de méthylation dans le corps du gène stimule la phase d'élongation au cours de la transcription et a aussi un impact sur le processus d'épissage alternatif [76].

Néanmoins, l'analyse des résultats de l'étude du méthylome s'est révélée longue et complexe. De plus, il est difficile d'établir un lien direct entre un changement du patron de la méthylation du promoteur d'un gène et un effet direct sur l'expression de ce gène. En effet, d'autres modifications épigénétiques interviennent dans ces processus complexe comme les modifications post-transcriptionnelles des histones ou la compaction de la

chromatine. Afin de compléter notre étude des modifications épigénétiques après une exposition aux RI et lors du développement du poisson zèbre, il serait intéressant d'étudier la compaction de l'ADN par ATAC-Seq (« Assay for Transposase-Accessible Chromatine with high throughput sequencing ») et les modifications post-traductionnelles des histones par ChIP-Seq (« Chromatin immunoprecipitation-sequencing »). En effet, cette technique est plus facilement corrélable avec un changement au niveau de l'expression des gènes [1].

L'étude transcriptomique aux stades précoces de développement, indique un effet des RI sur le métabolisme des mitochondries. Dans la littérature, des études ont montré un effet des RI sur les mitochondries [78]. De plus, les mitochondries sont à l'origine de la production de radicaux libres [19]. La régulation du stress oxydant et la méthylation de l'ADN partagent la molécule S-adénosylméthionine (SAM) dans leurs voies biologiques. En effet, le stress oxydant peut être réduit dans les cellules par la synthèse du glutathion, une puissante molécule anti-oxydante [32]. Le substrat limitant de la biosynthèse du glutathion est la cystéine qui est elle-même synthétisée à partir de la méthionine *via* la transsulfuration [98]. Pendant la synthèse du glutathion, la méthionine est convertie en cystéine par des réactions impliquant la molécule SAM. Cette molécule SAM est également le substrat utilisé par les enzymes DNMT pour méthyler l'ADN. Ainsi, une compétition entre la méthylation de l'ADN et la synthèse du glutathion peut se produire en cas de biodisponibilité limitée de la molécule SAM [28]. Ainsi, le statut redox dans la cellule a une influence sur l'utilisation de la molécule SAM et peut avoir un impact sur la méthylation de l'ADN [94]. En cas d'exposition prolongée au stress oxydatif, comme avec l'exposition aux RI, le stock de glutathion peut être épuisé [28] pour protéger les cellules contre le stress oxydatif ce qui peut entraîner une altération de la méthylation de l'ADN [83, 113, 95]. Néanmoins, un tel scénario conduirait à une hypométhylation globale massive de l'ADN du génome, ce qui n'est pas observé dans nos données, mais pourrait être observé pour une dose plus élevée de RI [77, 126, 109, 87]. Une étude des mitochondries dans le cadre d'une exposition chronique à de faibles débits de dose de RI devrait être réalisée. En effet, des études à des doses fortes semblent montrer le rôle central des mitochondries dans les effets observés à la suite de l'exposition aux RI [164, 148].

Enfin, ces travaux de thèse ont permis d'étudier les effets des RI à différentes échelles biologiques : de la molécule à l'individu. Il serait intéressant d'étudier un niveau supérieur d'organisation biologique tel que la population. En effet, on peut supposer un impact des effets locomoteurs observés sur la survie et la reproduction en milieu naturel. Des modèles mathématiques modélisant les effets d'un polluant sur une population [11, 103] ont été développés. Ces modèles pourraient être utilisés dans le cadre des effets des RI sur le poisson zèbre.

Références bibliographiques

[1] Amanda M. Ackermann, Zhiping Wang, Jonathan Schug, Ali Naji, and Klaus H. Kaestner. Integration of ATAC-seq and RNA-seq identifies human alpha cell and beta cell signature genes. *Molecular Metabolism*, 5(3) :233–244, mar 2016. ISSN 22128778. doi : 10.1016/j.molmet.2016.01.002.

[2] Christelle Adam-Guillermin, Sandrine Pereira, Claire Della-Vedova, Tom Hinton, and Jacqueline Garnier-Laplace. Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*, volume 220, pages 67–103. 2012. doi : 10.1007/978-1-4614-3414-6_3. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610297http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3414-6{_}3`.

[3] Derek Alsop, Scott Brown, and Glen Van Der Kraak. The effects of copper and benzo[a]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 82 (4) :281–295, may 2007. ISSN 0166445X. doi : 10.1016/j.aquatox.2007.03.001.

[4] ANDRA. Mesure de la radioactivité. URL `https://www.andra.fr/les-dechets-radioactifs/la-radioactivite/mesures-de-la-radioactivite`.

[5] Gerald T. Ankley, Richard S. Bennett, Russell J. Erickson, Dale J. Hoff, Michael W. Hornung, Rodney D. Johnson, David R. Mount, John W. Nichols, Christine L. Russom, Patricia K. Schmieder, Jose A. Serrrano, Joseph E. Tietge, and Daniel L. Villeneuve. Adverse outcome pathways : A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3) :730–741, 2010. ISSN 15528618. doi : 10.1002/etc.34.

[6] D. J.P. Barker and C. Osmond. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *The Lancet*, 327(8489) :1077–1081, 1986. ISSN 01406736. doi : 10.1016/S0140-6736(86)91340-1.

[7] Ram Basnet, Daniela Zizioli, Somrat Taweedet, Dario Finazzi, and Maurizio Memo. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, 7 (1) :23, 2019. ISSN 2227-9059. doi : 10.3390/biomedicines7010023.

[8] Tuncay Baubec and Dirk Schübeler. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 25(1) :85–92, 2014. ISSN 18790380. doi : 10.1016/j.gde.2013.11.015.

[9] Shelley L Berger, Tony Kouzarides, Ramin Shiekhattar, and Ali Shilatifard. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, 23(7) :781–3, apr 2009. ISSN 1549-5477. doi : 10.1101/gad.1787609. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339683http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3959995`.

[10] Autumn J. Bernal, Dana C. Dolinoy, Dale Huang, David A. Skaar, Caren Weinhouse, and Randy L. Jirtle. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants. *FASEB Journal*, 27(2) :665–671, 2013. ISSN 15306860. doi : 10.1096/fj.12-220350.

[11] Elise Billoir, Alexandre R.R. Péry, and Sandrine Charles. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of Daphnia magna : A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, 203(3-4) :204–214, 2007. ISSN 03043800. doi : 10.1016/j.ecolmodel.2006.11.021.

[12] Adrian Bird. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16 : 6–21, 2002. ISSN 0890-9369. doi : 10.1101/gad.947102.6.

[13] Catherine L. Bladen, Wai K. Lam, William S. Dynan, and David J. Kozlowski. DNA damage response and Ku80 function in the vertebrate embryo. *Nucleic Acids Research*, 33(9) :3002–3010, 2005. ISSN 03051048. doi : 10.1093/nar/gki613.

[14] Cedric Blanpain. Importance de la voie de signalization Wnt/β-caténine dans l'identité, l'activation et la différenciation des cellules souches épidermiques. *Medecine/Sciences*, 23(1) :34–36, 2007. ISSN 07670974. doi : 10.1051/medsci/200723134.

[15] M Brand, C P Heisenberg, Y J Jiang, D Beuchle, K Lun, M Furutani-Seiki, M Granato, P Haffter, M Hammerschmidt, D A Kane, R N Kelsh, M C Mullins, J Odenthal, F J van Eeden, and C Nüsslein-Volhard. Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, 123 :179–90, 1996. ISSN 0950-1991. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007239`.

[16] Christel Brou and Frédérique Logeat. Endocytose et voie de signalisation notch. *Medecine/Sciences*, 22(8-9) :685–688, 2006. ISSN 19585381. doi : 10.1051/medsci/20062289685.

[17] Edna Brustein, Louis Saint-Amant, Robert R. Buss, Mabel Chong, Jonathan R. McDearmid, and Pierre Drapeau. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. In *Journal of Physiology Paris*, 2003. ISBN 0928-4257. doi : 10.1016/j.jphysparis.2003.10.009.

[18] Sandeep Burma, Benjamin P. Chen, Michael Murphy, Akihiro Kurimasa, and David J. Chen. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45) :42462–42467, 2001. ISSN 00219258. doi : 10.1074/jbc.C100466200.

[19] Enrique Cadenas and Kelvin J.A. Davies. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4) :222–230, aug 2000. ISSN 08915849. doi : 10.1016/S0891-5849(00)00317-8.

[20] Albert F. Candia, Tetsuro Watabe, Stephanie H. B. Hawley, Darya Onichtchouk, Ying Zhang, Rik Derynck, Christof Niehrs, and Ken W. Y. Cho. Cellular interpretation of multiple TGF-b signals : intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development*, 122(8) :2359–2366, aug 1997. ISSN 09501991. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756281`.

[21] Pierre François Cartron, Romain Pacaud, and Gilles Salbert. Méthylation/déméthylation de l'ADN et expression du génome. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(473) :37–48, 2015. ISSN 17730368. doi : 10.1016/S1773-035X(15)30158-1.

[22] Lara Carvalho and Carl Philipp Heisenberg. The yolk syncytial layer in early zebrafish development. *Trends in Cell Biology*, 20(10) :586–592, 2010. ISSN 09628924. doi : 10.1016/j.tcb.2010.06.009. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.06.009`.

[23] Eunnara Cho, Ashley Allemang, Marc Audebert, Vinita Chauhan, Stephen Dertinger, Giel Hendriks, Mirjam Luijten, Francesco Marchett, Sheroy Minocherhomji, Stefan Pfuhler, Daniel J. Roberts, Kristina Trenz, and Carole L. Yauk. Aopwiki, 2019. URL `https://aopwiki.org/aops/296`.

[24] Ruth M. Colwill and Robbert Creton. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1) :63–73, feb 2011. ISSN 03341763. doi : 10.1515/RNS.2011.008.

[25] Rory B. Conolly, Gerald T. Ankley, WanYun Cheng, Michael L. Mayo, David H. Miller, Edward J. Perkins, Daniel L. Villeneuve, and Karen H. Watanabe. Quantitative Adverse Outcome Pathways and Their Application to Predictive Toxicology. *Environmental Science & Technology*, 51(8) :4661–4672, apr 2017. ISSN 0013-936X. doi : 10.1021/acs.est.6b06230. URL `https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.6b06230`.

[26] J. Cooke and E. C. Zeeman. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 58(2) :455–476, 1976. ISSN 10958541. doi : 10.1016/S0022-5193(76)80131-2.

[27] Michael S. Cosgrove and Cynthia Wolberger. How does the histone code work ? *Biochemistry and Cell Biology*, 83(4) :468–476, 2005. ISSN 08298211. doi : 10.1139/o05-137.

[28] Anthony R. Cyr and Frederick E. Domann. The redox basis of epigenetic modifications : From mechanisms to functional consequences. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(2) :551–589, 2011. ISSN 15577716. doi : 10.1089/ars.2010.3492.

[29] E. M. De Robertis, J. Larraín, M. Oelgeschläger, and O. Wessely. The establishment of spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Reviews Genetics*, 1(3) :171–181, dec 2000. ISSN 1471-0056. doi : 10.1038/35042039. URL `http://www.nature.com/articles/35042039`.

[30] M. H. Depledge and M. C. Fossi. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3(3) :161–172, sep 1994. ISSN 09639292. doi : 10.1007/BF00117081.

[31] Omar Desouky, Nan Ding, and Guangming Zhou. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2) :247–254, 2015. ISSN 1687-8507. doi : 10.1016/j.jrras.2015.03.003. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003`.

[32] Giuliano Di Pietro, Luiz Alexandre V. Magno, and Fabrício Rios-Santos. Glutathione S-transferases : An overview in cancer research. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 6(2) :153–170, 2010. ISSN 17425255. doi : 10.1517/17425250903427980.

[33] Dana C. Dolinoy. The agouti mouse model : An epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutrition Reviews*, 66 (SUPPL.1) :7–11, 2008. ISSN 00296643. doi : 10.1111/j.1753-4887.2008.00056.x.

[34] Jiamu Du, Lianna M. Johnson, Steven E. Jacobsen, and Dinshaw J. Patel. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Journal of Clinical Psychiatry*, 78(8) :e933–e939, 2015. ISSN 01606689. doi : 10.4088/JCP.16m11152.

[35] Reuven Dukas. Evolutionary biology of animal cognition. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35 :347–374, 2004. ISSN 00664162. doi : 10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130152.

[36] Raymond E. Engeszer, Larissa B. Patterson, Andrew A. Rao, and David M. Parichy. Zebrafish in The Wild : A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish*, 4(1) :21–40, 2007. ISSN 1545-8547. doi : 10.1089/zeb.2006.9997.

[37] Ensembl. Ensembl genome browser 98. URL `http://www.ensembl.org/index.html`.

[38] Mehrnaz Fatemi, Andrea Hermann, Shriharsa Pradhan, and Albert Jeltsch. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology*, 309(5) :1189–1199, 2001. ISSN 00222836. doi : 10.1006/jmbi.2001.4709.

[39] Mehrnaz Fatemi, Andrea Hermann, Humaira Gowher, and Albert Jeltsch. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry*, 269(20) :4981–4984, oct 2002. ISSN 00142956. doi : 10.1046/j.1432-1033.2002.03198.x. URL `http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2002.03198.x`.

[40] Christopher Faulk and Dana C. Dolinoy. Timing is everything : The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, 6(7) :791–797, 2011. ISSN 15592308. doi : 10.4161/epi.6.7.16209.

[41] Alain Favier. Le stress oxydant : Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique. *Actualite Chimique*, (11-12) :108–115, 2003. ISSN 01519093.

[42] Suhua Feng, Steven E. Jacobsen, and Wolf Reik. Epigenetic reprogramming in plant and animal development, oct 2010. ISSN 00368075.

[43] Aquarium fish paradise. Zebra Danio - Danio rerio | Aquarium Fish Paradise – Adelaide SA. URL `https://www.aquariumfishparadise.com.au/zebra-danio/`.

[44] Maryam Fouladi, Elizabeth Gilger, Mehmet Kocak, Dana Wallace, Gray Buchanan, Cara Reeves, Nicole Robbins, Thomas Merchant, Larry E. Kun, Raja Khan, Amar Gajjar, and Raymond Mulhern. Intellectual and functional outcome of children 3 years old or younger who have CNS malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 23(28) :7152–7160, 2005. ISSN 0732183X. doi : 10.1200/JCO.2005.01.214.

[45] Jennifer L. Freeman, Gregory J. Weber, Samuel M. Peterson, and Linda H. Nie. 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. *Frontiers in Genetics*, 5(AUG) : 1–11, 2014. ISSN 16648021. doi : 10.3389/fgene.2014.00268.

[46] Lucile Fressigné and Martin J. Simard. La biogenèse des ARN courts non codants chez les animaux. *Medecine/Sciences*, 34(2) :137–144, 2018. ISSN 19585381. doi : 10.1051/medsci/20183402011.

[47] François Fuks. DNA methylation and histone modifications : Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(5 SPEC. ISS.) :490–495, 2005. ISSN 0959437X. doi : 10.1016/j.gde.2005.08.002.

[48] Maximilian Fürthauer, Christine Thisse, and Bernard Thisse. A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development*, 124(21) : 4253–4264, 1997. ISSN 09501991.

[49] S. Fushiki. In utero exposure to low-doses of ionizing radiation decelerates neuronal migration in the developing rat brain. *International Journal of Radiation Biology*, 70(1) :53–60, jan 1996. ISSN 0955-3002. doi : 10.1080/095530096145328. URL `http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/095530096145328`.

[50] B. Gagnaire, I. Cavalié, S. Pereira, M. Floriani, N. Dubourg, V. Camilleri, and C. Adam-Guillermin. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. *Aquatic Toxicology*, 169 :69–78, 2015. ISSN 18791514. doi : 10.1016/j.aquatox.2015.10.005. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.005`.

[51] J Garnier-Laplace, C Della-Vedova, P Andersson, D Copplestone, C Cailes, N A Beresford, B J Howard, P Howe, and P Whitehouse. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *Journal of Radiological Protection*, 30(2) :215–233, jun 2010. ISSN 0952-4746. doi : 10.1088/0952-4746/30/2/S02. URL `http://stacks.iop.org/0952-4746/30/i=2/a=S02?key=crossref.17a978dcc629ee0105cf4eaa0ae64ac2`.

[52] J Garric and S Morin. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux & Territoires*, 1(1) :12–17, 2010. ISSN 2109-3016. doi : 10.14758/SET-REVUE.2010.1.03.

[53] Sergey P. Gaschak, Yulia A. Maklyuk, Andrey M. Maksimenko, Mikhail D. Bondarkov, G. Timothy Jannik, and Eduardo B. Farfán. Radiation ecology issues associated with murine rodents and shrews in the Chernobyl Exclusion Zone. *Health Physics*, 101(4) :416–430, oct 2011. ISSN 00179078. doi : 10.1097/HP.0b013e31821e123f.

[54] Geoffrey A. Geiger, Sharon E. Parker, Andrew P. Beothy, Jennifer A. Tucker, Mary C. Mullins, and Gary D. Kao. Zebrafish as a "biosensor"? Effects of ionizing radiation and amifostine on embryonic viability and development. *Cancer Research*, 66(16) :8172–8181, 2006. ISSN 00085472. doi : 10.1158/0008-5472.CAN-06-0466.

[55] B. Geldmacher-Voss. A 90 rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development*, 130(16) :3767–3780, 2003. ISSN 0950-1991. doi : 10.1242/dev.00603.

[56] Sarah Gibb, Miguel Maroto, and J. Kim Dale. The segmentation clock mechanism moves up a notch. *Trends in Cell Biology*, 20(10) :593–600, 2010. ISSN 09628924. doi : 10.1016/j.tcb.2010.07.001. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.07.001`.

[57] Mary Grace Goll, Finn Kirpekar, Keith A. Maggert, Jeffrey A. Yoder, Chih Lin Hsieh, Xiaoyu Zhang, Kent G. Golic, Steven E. Jacobsen, and Timothy H. Bestor. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759) :395–398, 2006. ISSN 00368075. doi : 10.1126/science.1120976.

[58] Humaira Gowher, Kirsten Liebert, Andrea Hermann, Guoliang Xu, and Albert Jeltsch. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14) :13341–13348, 2005. ISSN 00219258. doi : 10.1074/jbc.M413412200.

[59] C. N. Hales and D. J.P. Barker. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus : the thrifty phenotype hypothesis. *International Journal of Epidemiology*, 42(5) : 1215–1222, 1992. ISSN 03005771. doi : 10.1093/ije/dyt133.

[60] Shin Ichi Hayama, Moe Tsuchiya, Kazuhiko Ochiai, Sachie Nakiri, Setsuko Nakanishi, Naomi Ishii, Takuya Kato, Aki Tanaka, Fumiharu Konno, Yoshi Kawamoto, and Toshinori Omi. Small head size and delayed body weight growth in wild Japanese monkey fetuses after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. *Scientific Reports*, 7(1) :4–10, 2017. ISSN 20452322. doi : 10.1038/s41598-017-03866-8.

[61] Bastiaan T. Heijmans, Elmar W. Tobi, Aryeh D. Stein, Hein Putter, Gerard J. Blauw, Ezra S. Susser, P. Eline Slagboom, and L. H. Lumey. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44) : 17046–17049, 2008. ISSN 00278424. doi : 10.1073/pnas.0806560105.

[62] R Holliday and J. Pugh. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173) :226–232, 1975. ISSN 0036-8075. doi : 10.1126/science.1111098.

[63] Kerstin Howe, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews, Stuart McLaren, Ian Sealy, Mario Caccamo, and Carol Churcher. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446) :498–503, 2013. ISSN 00280836. doi : 10.1038/nature12111.

[64] Selma Hurem, Leonardo Martín Martín, Dag Anders Brede, Eystein Skjerve, Rasoul Nourizadeh-Lillabadi, Ole Christian Lind, Terje Christensen, Vidar Berg, Hans Christian Teien, Brit Salbu, Deborah Helen Oughton, Peter Aleström, and Jan Ludvig Lyche. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression. *PLoS ONE*, 12(6) :1–24, 2017. ISSN 19326203. doi : 10.1371/journal.pone.0179259.

[65] Imogen A. Hurley, Jean Luc Scemama, and Victoria E. Prince. Consequences of Hoxb1 duplication in teleost fish. *Evolution and Development*, 9(6) :540–554, 2007. ISSN 1520541X. doi : 10.1111/j.1525-142X.2007.00195.x.

[66] ICPR. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Technical report, 1991. URL `http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRPPublication60`.

[67] ICRP. *Annals o f the ICRP (126)*, volume 44. 2015. ISBN 9781473939509.

[68] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire. Fukushima Daiichi en 2014, 2014. URL `https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations{_}nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/fukushima-2014/Pages/fukushima-daiichi-en-2014-sommaire.aspx{#}.XYj0L2Y6-70`.

[69] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire. Exposition de la population française aux rayonnements ionisants en 2015, 2016. URL `https://www.irsn.fr/FR/expertise/rapports{_}expertise/radioprotection-homme/Pages/Exposition-population-francaise-rayonnements-ionisants-2015.aspx{#}.XYjvvmY6-70`.

[70] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire. La radioactivité et ses effets, 2017. URL `https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/rayonnements-ionisants-effets-radioprotection-sante/effets-rayonnements-ionisants/Pages/sommaire.aspx{#}.Xk1AGkrjJPY`.

[71] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire. Tchernobyl en 2016, 2018. 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{#}.XYjz6mY6-71`.

[72] R. B. Jarvis and J. F. Knowles. 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(1-2) : 63–69, 2003. ISSN 13835718. doi : 10.1016/S1383-5718(03)00182-7.

[73] Awadhesh N. Jha. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3) :207–221, 2008. ISSN 02678357. doi : 10.1093/mutage/gen014.

[74] Lan Jiang, Jing Zhang, Jing Jing Wang, Lu Wang, Li Zhang, Guoqiang Li, Xiaodan Yang, Xin Ma, Xin Sun, Jun Cai, Jun Zhang, Xingxu Huang, Miao Yu, Xuegeng Wang, Feng Liu, Chung I. Wu, Chuan He, Bo Zhang, Weimin Ci, and Jiang Liu.

Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153(4) :773–784, 2013. ISSN 00928674. doi : 10.1016/j.cell.2013.04.041. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.041`.

[75] P. A. Jones and M. L. Gonzalgo. Altered DNA methylation and genome instability : A new pathway to cancer ? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6) :2103–2105, 1997. ISSN 00278424. doi : 10.1073/pnas.94.6.2103.

[76] Peter A. Jones. Functions of DNA methylation : Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7) :484–492, 2012. ISSN 14710056. doi : 10.1038/nrg3230. URL `http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230`.

[77] John F Kalinich, George N Catravas, and Stephen L Snyder. The Effect of gamma Radiation on DNA Methylation. *Radiation Research*, 197 :185–197, 1989.

[78] Winnie Wai Ying Kam and Richard B. Banati. Effects of ionizing radiation on mitochondria, dec 2013. ISSN 08915849.

[79] Jorke H. Kamstra, Peter Aleström, Jan M. Kooter, and Juliette Legler. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21) :16262–16276, 2015. ISSN 16147499. doi : 10.1007/s11356-014-3466-7.

[80] Jorke H. Kamstra, Selma Hurem, Leonardo Martin Martin, Leif C. Lindeman, Juliette Legler, Deborah Oughton, Brit Salbu, Dag Anders Brede, Jan Ludvig Lyche, and Peter Aleström. Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. *Scientific Reports*, 8(1) :1–13, 2018. ISSN 20452322. doi : 10.1038/s41598-018-33817-w.

[81] Ole Kiehn. Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion, apr 2016. ISSN 14710048.

[82] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics*, 203 : 253–310, 1995.

[83] Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura, and Chanchai Boonla. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochemistry and Function*, 33(6) : 375–384, 2015. ISSN 10990844. doi : 10.1002/cbf.3124.

[84] David Kokel and Randall T. Peterson. Using the Zebrafish Photomotor Response for Psychotropic Drug Screening. In *Methods in Cell Biology*, volume 105, pages 517–524. Academic Press Inc., 2011. doi : 10.1016/B978-0-12-381320-6.00022-9. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951545http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3635141`.

[85] Mariko Kondo. Bone morphogenetic proteins in the early development of zebrafish. *FEBS Journal*, 274(12) :2960–2967, 2007. ISSN 1742464X. doi : 10.1111/j.1742-4658.2007.05838.x.

[86] M. Korwin-Kossakowski. Fish hatching strategies : A review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(1) :225–240, 2012. ISSN 09603166. doi : 10.1007/s11160-011-9233-7.

[87] Olga Kovalchuk, Paula Burke, Jill Besplug, Mark Slovack, Jody Filkowski, and Igor Pogribny. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 548(1-2) :75–84, apr 2004. ISSN 0027-5107. doi : 10.1016/J.MRFMMM.2003.12.016. URL `https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704000247`.

[88] Dharmendra Kumar and Thomas Paul Asir Devasagayam. Role of Radioprotectors in the Inhibition of DNA Damage and Modulation of DNA Repair After Exposure to Gamma-Radiation. *Selected Topics in DNA Repair*, (September), 2011. doi : 10.5772/24214.

[89] Satomi Kuramochi-Miyagawa, Toshiaki Watanabe, Kengo Gotoh, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Masahito Ikawa, Noriko Asada, Kanako Kojima, Yuka Yamaguchi, Takashi W. Ijiri, Kenichiro Hata, En Li, Yoichi Matsuda, Tohru Kimura, Masaru Okabe, Yoshiyuki Sakaki, Hiroyuki Sasaki, and Toru Nakano. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes and Development*, 22(7) :908–917, 2008. ISSN 08909369. doi : 10.1101/gad.1640708.

[90] Maria Jesús Latasa, Elsa Cisneros, and Jose María Frade. Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 53(7) : 895–908, 2009. ISSN 02146282. doi : 10.1387/ijdb.082721ml.

[91] Louise Laurent, Eleanor Wong, Guoliang Li, Tien Huynh, Aristotelis Tsirigos, Chin Thing Ong, Hwee Meng Low, Ken Wing Kin Sung, Isidore Rigoutsos, Jeanne Loring, and Chia Lin Wei. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Research*, 20(3) :320–331, 2010. ISSN 10889051. doi : 10.1101/gr.101907.109.

[92] Sophie Le Caër. Water Radiolysis : Influence of Oxide Surfaces on H2 Production under Ionizing Radiation. *Water*, 3(1) :235–253, 2011. doi : 10.3390/w3010235.

[93] D. Delacroix ; J.-P. Guerre ; P. Leblanc. *Guide pratique Radionucléides & Radioprotection*. 2006. ISBN 2868838642.

[94] Duk Hee Lee, David R. Jacobs, and Miquel Porta. Hypothesis : A unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. *Environmental Health Perspectives*, 117(12) :1799–1802, 2009. ISSN 00916765. doi : 10.1289/ehp.0900741.

[95] Khingkan Lertratanangkoon, Chun J. Wu, Niramol Savaraj, and Mary L. Thomas. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. *Cancer Letters*, 120(2) : 149–156, 1997. ISSN 03043835. doi : 10.1016/S0304-3835(97)00300-5.

[96] Annick Lesne. Systems biology : The multiscale organization of living systems. *Medecine/Sciences*, 25(6-7) :585–587, 2009. ISSN 0767-0974. doi : 10.1051/medsci/2009256-7585.

[97] Ryan Lister, Mattia Pelizzola, Robert H. Dowen, R. David Hawkins, Gary Hon, Julian Tonti-Filippini, Joseph R. Nery, Leonard Lee, Zhen Ye, Que Minh Ngo, Lee Edsall, Jessica Antosiewicz-Bourget, Ron Stewart, Victor Ruotti, A. Harvey Millar, James A. Thomson, Bing Ren, and Joseph R. Ecker. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271) : 315–322, 2009. ISSN 00280836. doi : 10.1038/nature08514. URL `http://dx.doi.org/10.1038/nature08514`.

[98] Shelly C. Lu. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2) :42–59, 2009. ISSN 00982997. doi : 10.1016/j.mam.2008.05.005. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005`.

[99] Sabine Luft, Onetsine Arrizabalaga, Ireen Kulish, Elena Nasonova, Marco Durante, Sylvia Ritter, and Insa S. Schroeder. Ionizing Radiation Alters Human Embryonic Stem Cell Properties and Differentiation Capacity by Diminishing the Expression of Activin Receptors. *Stem Cells and Development*, 26(5) :341–352, mar 2017. ISSN 15578534. doi : 10.1089/scd.2016.0277. URL `https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2016.0277`.

[100] Malcolm Maden. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11) :843–853, 2002. ISSN 14710048. doi : 10.1038/nrn963.

[101] Malcolm Maden. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10) :755–765, 2007. ISSN 1471003X. doi : 10.1038/nrn2212.

[102] Julie Marill, Nadia Idres, Claude Capron, Eric Nguyen, and Guy Chabot. Retinoic Acid Metabolism and Mechanism of Action : A Review. *Current Drug Metabolism*, 4(1) :1–10, mar 2005. ISSN 13892002. doi : 10.2174/1389200033336900.

[103] Benjamin T. Martin, Tjalling Jager, Roger M. Nisbet, Thomas G. Preuss, Monika Hammers-Wirtz, and Volker Grimm. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations : A generic approach based on Dynamic Energy Budget theory and individual-based modeling. *Ecotoxicology*, 22(3) :574–583, 2013. ISSN 09639292. doi : 10.1007/s10646-013-1049-x.

[104] Ève Lyne Mathieu, Mohamed Belhocine, Lan T.M. Dao, Denis Puthier, and Salvatore Spicuglia. Rôle des longs ARN non codants dans le développement normal et pathologique. *Medecine/Sciences*, 30(8-9) :790–796, 2014. ISSN 19585381. doi : 10.1051/medsci/20143008018.

[105] Alicia Mayeuf and Frédéric Relaix. La voie Notch : Du développement à la régé nération du muscle squelettique. *Medecine/Sciences*, 27(5) :521–526, 2011. ISSN 07670974. doi : 10.1051/medsci/2011275018.

[106] Patrick O. McGowan, Matthew Suderman, Aya Sasaki, Tony C.T. Huang, Michael Hallett, Michael J. Meaney, and Moshe Szyf. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS ONE*, 6(2), 2011. ISSN 19326203. doi : 10.1371/journal.pone.0014739.

[107] Axel Meyer and Manfred Schartl. Gene and genome duplications in vertebrates : The one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6) :699–704, 1999. ISSN 09550674. doi : 10.1016/S0955-0674(99)00039-3.

[108] A. A. Mhanni and R. A. McGowan. Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Development Genes and Evolution*, 214(8) :412–417, 2004. ISSN 0949944X. doi : 10.1007/s00427-004-0418-0.

[109] Isabelle R. Miousse, Kristy R. Kutanzi, and Igor Koturbash. Effects of ionizing radiation on DNA methylation : from experimental biology to clinical applications, may 2017. ISSN 13623095.

[110] Cecilia B. Moens and Victoria E. Prince. Constructing the hindbrain : Insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 224(1) :1–17, 2002. ISSN 10588388. doi : 10.1002/dvdy.10086.

[111] Anders Pape Møller, Filis Karadas, and Timothy A. Mousseau. Antioxidants in eggs of great tits Parus major from Chernobyl and hatching success. *Journal of Comparative Physiology B : Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(6) :735–743, aug 2008. ISSN 01741578. doi : 10.1007/s00360-008-0262-z.

[112] Anders Pape Møller, Andea Bonisoli-Alquati, Geir Rudolfsen, and Timothy A. Mousseau. Chernobyl birds have smaller brains. *PLoS ONE*, 6(2), 2011. ISSN 19326203. doi : 10.1371/journal.pone.0016862.

[113] Megan M. Niedzwiecki, Megan N. Hall, Xinhua Liu, Julie Oka, Kristin N. Harper, Vesna Slavkovich, Vesna Ilievski, Diane Levy, Alexander van Geen, Jacob L. Mey, Shafiul Alam, Abu B. Siddique, Faruque Parvez, Joseph H. Graziano, and Mary V. Gamble. Blood glutathione redox status and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults. *Epigenetics*, 8(7) :730–738, jul 2013. ISSN 15592308. doi : 10.4161/epi.25012. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803688http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3781192`.

[114] Masataka Nikaido, Masazumi Tada, Takashi Saji, and Naoto Ueno. Conservation of BMP signaling in zebrafish mesoderm patterning. *Mechanisms of Development*, 61(1-2) :75–88, 1997. ISSN 09254773. doi : 10.1016/S0925-4773(96)00625-9.

[115] Andrew C. Oates, Luis G. Morelli, and Saúl Ares. Patterning embryos with oscillations : Structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development*, 139(4) :625–639, 2012. ISSN 09501991. doi : 10.1242/dev.063735.

[116] OECD. Test No. 236 : OECD Guidelines for the ttesting of the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Technical report, 2013. URL `http://biotecnologiebt.com/guide/OECD{_}227.pdf`.

[117] Isabel Olivera-Martinez and Kate G. Storey. Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development*, 134(11) :2125–2135, 2007. ISSN 09501991. doi : 10.1242/dev.000216.

[118] Roseline Yemisi Olobatoke and Manny Mathuthu. Radionuclide exposure in animals and the public health implications. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(4) :381–388, 2015. ISSN 13036181. doi : 10.3906/vet-1502-85.

[119] Steen K.T. Ooi, Chen Qiu, Emily Bernstein, Keqin Li, Da Jia, Zhe Yang, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Shau Ping Lin, C. David Allis, Xiaodong Cheng, and Timothy H. Bestor. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154) :714–717, 2007. ISSN 14764687. doi : 10.1038/nature05987.

[120] Junji Otani, Toshiyuki Nankumo, Kyohei Arita, Susumu Inamoto, Mariko Ariyoshi, and Masahiro Shirakawa. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Reports*, 10(11) :1235–1241, 2009. ISSN 1469221X. doi : 10.1038/embor.2009.218. URL `http://dx.doi.org/10.1038/embor.2009.218`.

[121] D. M. Parichy. Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*, 97(3) : 200–210, 2006. ISSN 0018067X. doi : 10.1038/sj.hdy.6800867.

[122] J. F. Payne, D. C. Malins, S. Gunselman, A. Rahimtula, and P. A. Yeats. DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings. In *Marine Environmental Research*, volume 46, pages 289–294. Elsevier, jul 1998. doi : 10.1016/S0141-1136(98)00011-7.

[123] Sandrine Pereira, Stéphanie Bourrachot, Isabelle Cavalie, Delphine Plaire, Morgan Dutilleul, Rodolphe Gilbin, and Christelle Adam-Guillermin. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12) :2831–2837, 2011. ISSN 07307268. doi : 10.1002/etc.695.

[124] Philippe Rekacewicz. L'empreinte de Tchernobyl, 2000. URL `https://www.monde-diplomatique.fr/cartes/europetcherno2000`.

[125] Igor Pogribny, Joe Raiche, Mark Slovack, and Olga Kovalchuk. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320 (4) :1253–1261, 2004. ISSN 0006291X. doi : 10.1016/j.bbrc.2004.06.081.

[126] Igor Pogribny, Igor Koturbash, Volodymyr Tryndyak, Darryl Hudson, Sandie M.L. Stevenson, Olga Sedelnikova, William Bonner, and Olga Kovalchuk. Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus. *Molecular Cancer Research*, 3(10) :553–561, oct 2005. ISSN 15417786. doi : 10.1158/1541-7786.MCR-05-0074.

[127] Christian Popp, Wendy Dean, Suhua Feng, Cokus2 Shawn J., Simon Andrews, Matteo Pellegrini, Steven E. Jacobsen, and Wolf Reik. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by Aid deficiency. *Nature*, 463(7284) :1101–1105, 2010. doi : 10.1038/nature08829.Genome-wide.

[128] Anna Portela and Manel Esteller. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10) :1057–1068, 2010. ISSN 10870156. doi : 10.1038/nbt.1685. URL `http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1685`.

[129] Magdalena E. Potok, David A. Nix, Timothy J. Parnell, and Bradley R. Cairns. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*, 153(4) :759–772, 2013. ISSN 00928674. doi : 10.1016/j.cell.2013.04.030. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.030`.

[130] M. K. Praveen Kumar, S. K. Shyama, Shamim Kashif, S. K. Dubey, D'costa Avelyno, B. H. Sonaye, B. Kadam Samit, and R. C. Chaubey. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142(March) :95–101, 2017. ISSN 10902414. doi : 10.1016/j.ecoenv.2017.03.054.

[131] A. Real, S. Sundell-Bergman, J. F. Knowles, D. S. Woodhead, and I. Zinger. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals : Relevant data for environmental radiation protection. *Journal of Radiological Protection*, 24(4 A), 2004. ISSN 09524746. doi : 10.1088/0952-4746/24/4A/008.

[132] Julie A. Reisz, Nidhi Bansal, Jiang Qian, Weiling Zhao, and Cristina M. Furdui. Effects of ionizing radiation on biological molecules - mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(2) :260–292, 2014. ISSN 15577716. doi : 10.1089/ars.2013.5489.

[133] Tatiana P. Resende, Raquel P. Andrade, and Isabel Palmeirim. Timing embryo segmentation : Dynamics and regulatory mechanisms of the vertebrate segmentation clock. *BioMed Research International*, 2014, 2014. ISSN 23146141. doi : 10.1155/2014/718683.

[134] Muriel Rhinn and Pascal Dollé. Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5) :843–858, 2012. ISSN 09501991. doi : 10.1242/dev.065938.

[135] Radoslaw Rola, Jacob Raber, Angela Rizk, Shinji Otsuka, Scott R. Vandenberg, Duncan R. Morhardt, and John R. Fike. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Experimental Neurology*, 188(2) :316–330, 2004. ISSN 00144886. doi : 10.1016/j.expneurol.2004.05.005.

[136] Tania L. Roth, Phillip R. Zoladz, J. David Sweatt, and David M. Diamond. Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 45(7) : 919–926, 2011. ISSN 00223956. doi : 10.1016/j.jpsychires.2011.01.013. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.01.013`.

[137] Giusi Russo, Rosaria Landi, Antonio Pezone, Annalisa Morano, Candida Zuchegna, Antonella Romano, Mark T. Muller, Max E. Gottesman, Antonio Porcellini, and Enrico V. Avvedimento. DNA damage and Repair Modify DNA methylation and Chromatin Domain of the Targeted Locus : Mechanism of allele methylation polymorphism. *Scientific Reports*, 6(April) :1–14, 2016. ISSN 20452322. doi : 10.1038/srep33222. URL `http://dx.doi.org/10.1038/srep33222`.

[138] V N Sarvaiya, K A Sadariya, M P Rana, and A M Thaker. Zebrafish as model organism for drug discovery and toxicity testing : A review. *Veterinary Clinical Science*, 2(3) :31–38, 2014. URL `http://etheses.whiterose.ac.uk/323/`.

[139] L Saúde, K Woolley, P Martin, W Driever, and D L Stemple. Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. *Development (Cambridge, England)*, 127(16) :3407–17, 2000. ISSN 0950-1991. URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903167`.

[140] Alexander F. Schier and William S. Talbot. Molecular Genetics of Axis Formation in Zebrafish. *Annual Review of Genetics*, 39(1) :561–613, 2005. ISSN 0066-4197. doi : 10.1146/annurev.genet.37.110801.143752.

[141] Nobuyoshi Shimoda, Kimi Yamakoshi, Akimitsu Miyake, and Hiroyuki Takeda. Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene. *Developmental Dynamics*, 233(4) :1509–1516, aug 2005. ISSN 10588388. doi : 10.1002/dvdy.20455. URL `http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.20455`.

[142] Sébastien A. Smallwood and Gavin Kelsey. De novo DNA methylation : A germ cell perspective. *Trends in Genetics*, 28(1) :33–42, 2012. ISSN 01689525. doi : 10.1016/j.tig.2011.09.004. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004`.

[143] You Song and Knut Erik Tollefsen. Aopwiki, 2018. URL `https://aopwiki.org/aops/216`.

[144] Rowena Spence, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. *Biological Reviews*, 83(1) : 13–34, 2008. ISSN 14647931. doi : 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

[145] Douglas R. Spitz, Edouard I. Azzam, Jian Jian Li, and David Gius. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation : A unifying concept in stress response biology, aug 2004. ISSN 01677659.

[146] Julie St-Pierre, Marie France Hivert, Patrice Perron, Paul Poirier, Simon Pierre Guay, Diane Brisson, and Luigi Bouchard. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics*, 7(10) :1125–1132, 2012. ISSN 15592308. doi : 10.4161/epi.21855.

[147] Marie Strömqvist, Nigel Tooke, and Björn Brunström. DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (Danio rerio)-Sex and tissue differences and effects of 17α-ethinylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology*, 98(3) :275–281, 2010. ISSN 0166445X. doi : 10.1016/j.aquatox.2010.02.023.

[148] Irena Szumiel. Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability : The pivotal role of mitochondria, jan 2015. ISSN 13623095.

[149] Bernard Thisse and Christine Thisse. Établissement Des Axes Embryonnaires Au Cours Du Développement Du Poisson Zèbre. *Medecine/Sciences*, 18(2) :193–204, 2002. ISSN 07670974. doi : http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2002182193.

[150] Bernard Thisse, Christopher V. E. Wright, and Christine Thisse. Activin- and Nodal-related factors control antero–posterior patterning of the zebrafish embryo. *Nature*, 403(6768) :425–428, jan 2000. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/35000200. URL `http://www.nature.com/articles/35000200`.

[151] Elisa C.M. Tonk, Jeroen L.A. Pennings, and Aldert H. Piersma. An adverse outcome pathway framework for neural tube and axial defects mediated by modulation of retinoic acid homeostasis. *Reproductive Toxicology*, 55 : 104–113, 2015. ISSN 18731708. doi : 10.1016/j.reprotox.2014.10.008. URL `http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.008`.

[152] United Nations Scientific Comitee on the Effects of Atomic Radiation. UNSCEAR 2012 Report Report to the General Assembly. Technical report, 2015.

[153] UNSCEAR. Annex : Effects of radiation on the environment. Technical report, 1996.

[154] UNSCEAR. Sources and Effects of Ionising Radiation. Technical report, 1996. URL `http://www.unscear.org/docs/publications/1996/UNSCEAR{_}1996{_}Report.pdf`.

[155] M. Valko, H. Morris, and M. Cronin. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10) :1161–1208, apr 2005. ISSN 09298673. doi : 10.2174/0929867053764635.

[156] Raquel Vaz, Wolfgang Hofmeister, and Anna Lindstrand. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders : Limitations and benefits of current tools and techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 2019. ISSN 14220067. doi : 10.3390/ijms20061296.

[157] Julien Vermot and Olivier Pourquié. Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature*, 435(7039) :215–220, may 2005. ISSN 00280836. doi : 10.1038/nature03488.

[158] Tine Verreet, Janaki Raman Rangarajan, Roel Quintens, Mieke Verslegers, Adrian C. Lo, Kristof Govaerts, Mieke Neefs, Liselotte Leysen, Sarah Baatout, Frederik Maes, Uwe Himmelreich, Rudi D'Hooge, Lieve Moons, and Mohammed A. Benotmane. Persistent Impact of In utero Irradiation on Mouse Brain Structure and Function Characterized by MR Imaging and Behavioral Analysis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10(May) :1–18, 2016. ISSN 1662-5153. doi : 10.3389/fnbeh.2016.00083. URL `http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2016.00083/abstract`.

[159] Doris Voelker, Christoph Vess, Michaela Tillmann, Roland Nagel, Georg W. Otto, Robert Geisler, Kristin Schirmer, and Stefan Scholz. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 81(4) :355–364, mar 2007. ISSN 0166445X. doi : 10.1016/j.aquatox.2006.12.013.

[160] Jennifer R. Weidman, Dana C. Dolinoy, Susan K. Murphy, and Randy L. Jirtle. Cancer susceptibility : Epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer Journal*, 13(1) :9–16, 2007. ISSN 15289117. doi : 10.1097/PPO.0b013e31803c71f2.

[161] J. J.L. Wong, N. J. Hawkins, and R. L. Ward. Colorectal cancer : A model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*, 56(1) :140–148, 2007. ISSN 00175749. doi : 10.1136/gut.2005.088799.

[162] E. Yin, D. O. Nelson, M. A. Coleman, L. E. Peterson, and A. J. Wyrobek. Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 79(10) :759–775, 2003. ISSN 09553002. doi : 10.1080/09553000310001610961.

[163] Naohiro Yoshida and Jota Kanda. Tracking the Fukushima radionuclides. *Science*, 336(6085) :1115–1116, 2012. ISSN 10959203. doi : 10.1126/science.1219493.

[164] Takako Yoshida, Shinji Goto, Miho Kawakatsu, Yoshishige Urata, and Tao Sheng Li. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free Radical Research*, 46(2) :147–153, feb 2012. ISSN 10715762. doi : 10.3109/10715762.2011.645207.

[165] Nadia Zennouche. *Le test des cometes : validation et etude de sa sensibilite et specificite in vitro et in vivo*. PhD thesis, 2005.

Annexes

A. Les principaux stades de développement de l'embryon de poisson zèbre

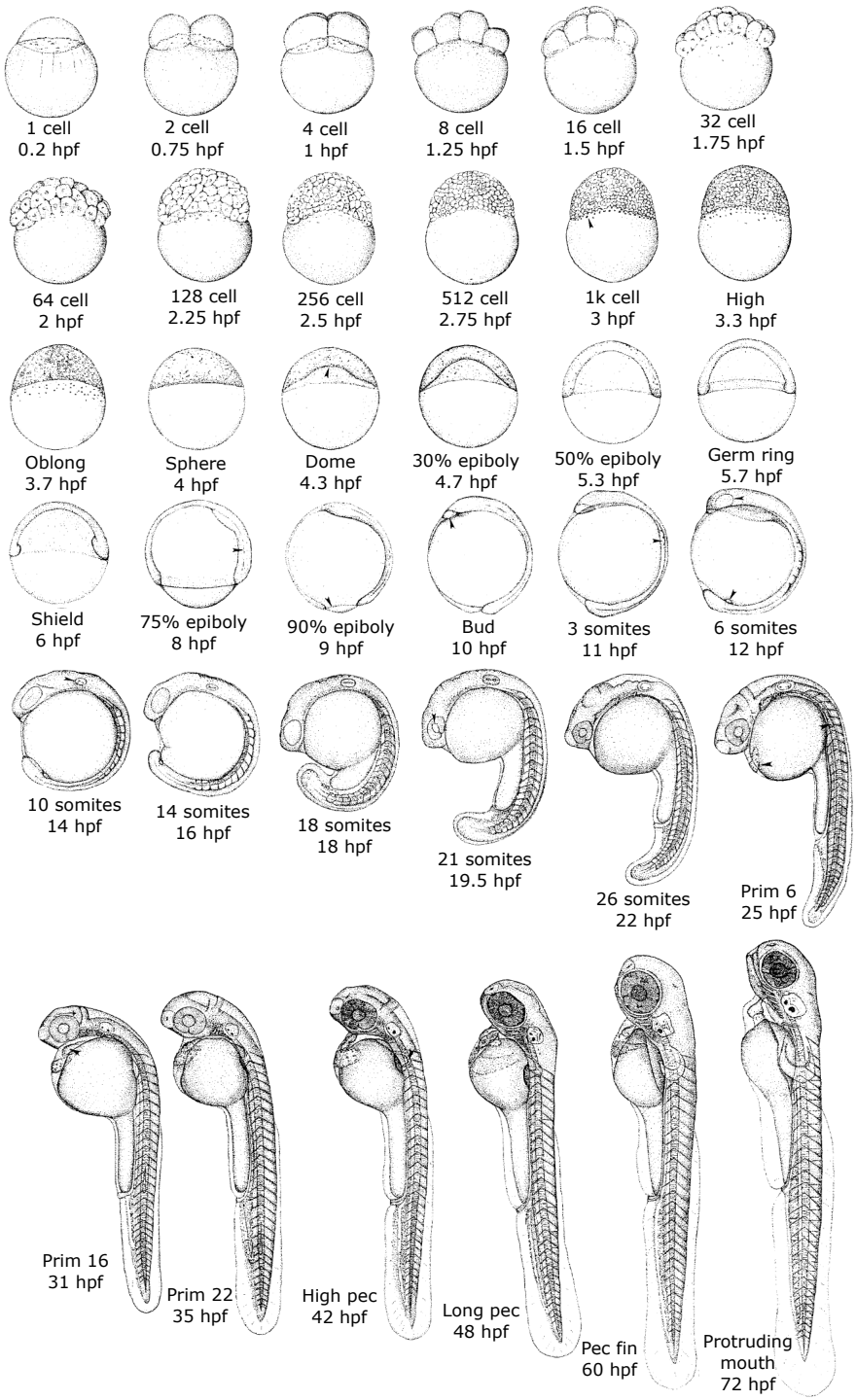


FIGURE A.1. – Source : d'après [82]