

**IRSN**INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

**Pertinence de la prise en compte des réponses  
épigénétiques chez des organismes chroniquement  
exposés à de faibles niveaux de substances radioactives**

**Kewin Gombeau**  
17 décembre 2015

ISRN/IRSN-2016/187  
Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides  
(PRP-ENV/SERIS/LECO)



# THESE

UNIVERSITE DE PROVENCE - AIX-MARSEILLE I

*Ecole doctorale*  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ED 251

*Pour l'obtention du diplôme de*  
**Docteur de l'Université de Provence Mention Sciences**

*Spécialité*  
**Environnement et Santé**

**Kewin GOMBEAU**

---

**Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez des organismes chroniquement exposés à de faibles niveaux de substances radioactives**

---

Thèse dirigée par Christelle ADAM-GUILLERMIN et Jean-Paul BOURDINEAUD

**Devant le jury d'examen composé de :**

---

Dr. Nele Horemans	Chercheur, SCK CEN, Belgique	Rapporteur
Dr. Patrice Gonzalez	Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux	Rapporteur
Dr. Karel De Schamphelaere	Chercheur, Université de Gand, Belgique	Examineur
Dr. Jean-Luc Ravanat	Chargé de Recherche, CEA, Grenoble	Examineur
Dr. Christelle Adam-Guillermin	Chercheur, IRSN, Cadarache	Directrice de thèse
Pr. Jean-Paul Bourdineaud	Professeur, Université Bordeaux1	Co-Directeur de thèse

---



## *Remerciements*

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Jacqueline Garnier-Laplace pour m'avoir accueilli à l'IRSN dans son service (SERIS) et pour avoir mis à disposition les moyens nécessaires au bon déroulement de ce doctorat. Merci à l'IRSN d'avoir financé ces recherches dans le cadre du projet européen COMET qui m'a permis de faire des rencontres très enrichissantes.

Christelle, je t'adresse tout ma gratitude, tu as su faire preuve d'une grande disponibilité pour moi. Tu as été présente lorsque j'ai eu besoin de tes conseils, de ta compréhension et de ton soutien. Nos discussions m'ont toujours grandement inspiré et donné la force d'avancer. Merci pour ton aide au cours des expérimentations. Une page se tourne alors qu'une nouvelle s'écrit !

Jean-Paul, tu as toujours été un modèle, un homme avec un immense savoir doté d'un cœur en or. Tu m'as accompagné depuis tout ce temps, tu m'as grandement inspiré et je te dois une part certaine de ma réussite actuelle. Une nouvelle aventure professionnelle s'ouvre à chacun de nous, et je te souhaite autant de plaisir, de joie et de bonheur dans la tienne que j'espère en obtenir dans la mienne !

Je tiens à remercier sincèrement Nele Horemans et Patrice Gonzalez pour avoir pris le temps d'examiner la qualité de ces travaux de recherche en tant que rapporteur de ce manuscrit, ainsi que Karel De Schamphelaere, Christelle Adam-Guillermin et Jean-Paul Bourdineaud pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Un grand merci à Sylvie Bonny et Alain Devaux pour les discussions très enrichissantes que nous avons eu autour de mon projet de recherche !

Je voudrais ensuite remercier Michael Weber ainsi que ses étudiants, Ambre et Ghislain, pour avoir pris le temps de me montrer de quelle manière réaliser une immunoprécipitation sur les fragments d'ADN méthylés.

Je remercie Uwe Strähle de m'avoir accueilli dans son équipe au Karlsruhe Institute of Technology afin de me permettre d'apprendre la technique de Stab Wound et d'immunohistomarquage, et cela notamment grâce à Sepand, Jan et Tanja.

Je remercie profondément Olivier Armant pour l'aide apportée dans le projet de séquençage d'ARNs ainsi que la grande disponibilité dont il a su faire preuve pour m'accompagner dans l'analyse et la compréhension de ces résultats. Avec ton arrivée au sein de l'institut, je suis sûr que tu apporteras une vision de grande qualité sur les travaux de notre équipe ! Je te souhaite énormément de réussite !!

Je tiens à remercier aussi chaleureusement qu'il soit possible Sandrine Pereira. Grâce à toi, mon insertion au sein de l'équipe et dans la thématique de mon sujet de recherche s'est parfaitement déroulée. Merci de m'avoir accompagné tout ce temps ! Tu as su faire preuve d'une grande implication dans mes travaux et m'a beaucoup appris tant sur le plan professionnel que sur le plan humain ! Je te souhaite énormément de réussite à l'avenir et une vie pleine de bonheur !!

J'adresse une immense gratitude à Jean-Luc Ravanat. Merci pour ton engagement dans ma thèse et ton point de vue scientifique d'une grande qualité. Merci pour toutes ces analyses que tu as réalisé en dépit des jalons qu'il n'était pas toujours évident de tenir !

Je tiens à remercier Nadine Micozzi pour ces discussions pleines de sens, sa joie et sa bonne humeur quotidienne ! J'ai passé de très bons moments en ta présence surtout au bâtiment 153 ☺!! Je te souhaite le meilleur pour la suite !!!

De manière générale, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous les membres de l'IRSN et notamment du SERIS, avec une mention pour l'équipe du LM2E qui m'a gentiment accueilli dans ses locaux pour mes expérimentations !

Merci à Laureline, Arnaud, Rodolphe, Fred A. et Christelle pour notre séjour à Barcelone qui fut extrêmement riche en émotions !

J'adresse mes remerciements à tous ceux avec qui les discussions, scientifiques ou non, ont toujours été enrichissantes, et particulièrement Cathy, Fred C., Fred A., Pierre, Magali D., Amine et Laurent.

Isabelle, Virginie et Magali, je vous remercie pour votre implication dans mes expérimentations, mais aussi pour ces moments partagés avec vous, et pour m'avoir apporté votre aide lorsque j'en avais besoin. Magali et Virginie, je vous remercie particulièrement pour les analyses MET et le temps que nous avons passé ensemble pour en extraire de très belles images !

Merci à toi Jean-Marc ! Nous avons noué plus de liens sur le tard mais ils n'en restent pas enrichissants ! Cela a été un plaisir de travailler avec toi dans le cadre du projet NEEDS, animé de discussions scientifiques extrêmement intéressantes, sans pondérations aucune 😊 ! Je suis persuadé qu'un jour nous parviendrons à trouver une explication valable justifiant 3 et 10 !!!!

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du GARM, à toi Jean-François, pour tes discours pleins de sens sur l'arrêt de la cigarette, qui sait, la petite graine plantée germera sûrement 😊 ! A toi Julien, merci pour ton aide et tes idées extrêmement judicieuses lorsqu'il me fallait bricoler !! A toi Nadine, merci pour ce que tu es, ta joie et ta bonne humeur sont des plus agréables au quotidien ! Face à l'adversité tu as su garder la tête haute et tu auras pour cela mon éternelle admiration. A toi Nicolas, j'ai appris à connaître l'homme et j'en suis profondément réjoui ! Je te souhaite un immense bonheur et une vie remplie de joie avec ta magnifique famille !!

J'adresse également mes remerciements aux PCRs, avec qui j'ai toujours eu un excellent contact professionnel ainsi que des échanges très intéressants ! Particulièrement, je remercie Guillaume qui a toujours su faire preuve d'une grande disponibilité et de ressources lorsqu'il me fallait son accord pour les préparatifs des expérimentations !

Pour son dévouement et son implication, je tiens à remercier très chaleureusement Claudine. Tu as toujours tout mis en œuvre pour que nous disposions du meilleur ! Tu nous as choyés de notre arrivée à ton départ, et nous avons toujours pu compter sur toi dans les moments délicats, et pour tout ça je souhaite te remercier !

Pour notre couple de docteurs, Ade et Ben, ce fut un réel plaisir de faire votre connaissance, je vous remercie de tout cœur pour votre soutien et pour tous ces moments partagé mes amis !

Adri, cela a été un grand plaisir de faire ta rencontre. Je te souhaite énormément de bonheur pour le futur avec Malika, c'est un bel avenir qui s'ouvre à vous !

Iris, nous avons passé d'excellents moments, des grosses marrades, que du bonheur !! Vivement que l'on se retrouve à Reims pour la soutenance d'Antoine 😊 ! Je te souhaite énormément de réussite à l'avenir, ce dont je ne doute pas au regard de la qualité et de la rigueur de tes travaux !

Pour toi Florence, une femme en or avec un cœur immense... Nous avons partagé énormément en trop peu de temps, mais nous avons au moins eu l'occasion de les partager ! Je te souhaite le meilleur à l'avenir et suis persuadé que tu trouveras du travail !

Pour toi Marie, j'imagine que ça n'a pas été facile de reprendre le flambeau mais tu t'en sors bien !! Si tu as un coup de mou, tu n'auras qu'à penser au pont d'a Vinon !

Pour Cécé et Agrid, nous voici à la fin d'un cycle... Cécé bon courage pour la suite de ta thèse ! Ne lâche rien même lorsque ce sera compliqué, on est de tout cœur avec toi !!! Agrid, bon courage pour la suite de ton post-doc ! Plein de bonheur et de réussite à vous deux !!

Pour Léa, Vanessa, Laure, Amine, Mira, Seb, Moustapha, Lucy, Morgan et Loïc, nous nous sommes connus sur le tard mais ce fut réellement un immense plaisir de partager ces moments avec vous !! Je ne vous souhaite que le meilleur pour la suite !!

Pour Toch et Flo, tout simplement, il y a tellement à dire, mais qu'est-ce que vous ne savez pas déjà... Merci pour tous ces moments mes amis. Merci pour votre soutien au cours de ces trois années qui resteront pour longtemps gravées dans ma mémoire!!

Pour Toch, je te remercie du plus profond de mon cœur, tu as toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments, mon camarade de bureau, nous avons vraiment partagé de bons moments. Je te souhaite énormément de bonheur avec Aurore, que je remercie également, vous êtes un couple magnifique qui m'inspire respect et admiration ! Que du bonheur pour vous mes amis !!!!

Pour Flo, merci pour ces moments, ces discussions qui nous ont soulagées. Tellement de bons moments de partage et de camaraderie qui resteront pour moi une excellente expérience. Merci à toi et à Marianne d'avoir été là lorsque le moral n'était pas au beau fixe ! Je vous souhaite énormément de bonheur et de joie !!!

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille, mes amis, et toutes les personnes que j'ai omis de citer, et qui m'ont apporté leur soutien au cours de ces trois années !







# Communications scientifiques

## Publications scientifiques

Gombeau, K., Pereira, S., Ravanat, J-L., Camilleri, V., Cavalie, I., Bourdineaud, J-P., Adam-Guillermin, C. *Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish*. Accepté dans *JER* en Janvier 2016.

Gombeau, K., Bourdineaud, J-P., Ravanat, J-L., Armant, O., Camilleri, V., Cavalie, I., Floriani, M., Adam-Guillermin, C. *Insights on epigenetic factors associated with the generational transfer of depleted uranium toxicity from exposed adult zebrafish to its progeny*. Article en cours de soumission dans *Aquatic Toxicology*.

Gombeau, K., Bourdineaud, J-P., Ravanat, J-L., Lengagne, T., Bonzom, J-M., Adam-Guillermin, C. *Genetic and epigenetic responses in the Japanese tree frog chronically exposed to Fukushima Daiichi NPP releases*. Article en cours de préparation.

## Autres valorisations écrites

Adam-Guillermin C., Gombeau K., Horemans N., Saenen E., Stark K., Oughton D., Dave Spurgeon, William Tyler, Emmanuel Lapied. Proposition of biomarkers of epigenetic changes for Arabidopsis, zebrafish, earthworms, frogs. MILESTONE MS41. 30/11/2014. Projet Européen COMET, Grant Agreement Number: Fission-2012-3.4.1-604974.

## Communications orales

Gombeau, K., Pereira, S., Ravanat, J-L., Camilleri, V., Cavalie, I., Bourdineau J-P., Adam-Guillermin, C. *Chronic depleted uranium exposure impacts DNA methylation in zebrafish*. "SETAC Europe 25<sup>ème</sup> meeting annuel", Barcelone, Espagne. Mai 2015

Gombeau, K. *Impacts d'une exposition chronique à l'uranium appauvri sur les profils de méthylation du poisson zèbre*. "22<sup>ème</sup> congrès de l'Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement", Cassis, France. Prix de la meilleure présentation. Avril 2015

Gombeau, K., Pereira, S., Bourdineaud, J-P., Adam-Guillermin, C. *Epigenetic modifications induced by a depleted uranium exposure in zebrafish*. (Poster corner). "International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER) 3<sup>ème</sup> meeting annuel", Barcelone, Espagne. Septembre 2014

Gombeau, K., Pereira, S., Adam-Guillermin, C. *Epigenetic modifications induced in zebrafish after a chronic exposure to radionuclides*. "COMET WP4 meeting", Oxford, Angleterre. Décembre 2014.

Adam-Guillermin C., Gombeau K., Horemans, N., Oughton, D., Spurgeon, D., Stark K., Gashchak, S., Yoschenko, V., Saenen E., Pereira, S., Nanba, K. Epigenetic changes induced in non-human organisms exposed to radionuclides : first results obtained in the COMET project. 6<sup>ème</sup> MELODI workshop “Integrating observational and experimental research”, Barcelona, 7-9 October 2014.

Adam-Guillermin C., Gombeau K., Horemans, N., Oughton, D., E. Lapied, Spurgeon, D., William Tyler, Stark K., Gashchak, S., Yoschenko, V., Saenen E., Pereira, S., Nanba, K. Results of the Initial Research Action of Working Package 4 of the COMET project on radioinduced epigenetic changes. Workshop STAR / COMET Oxford 10-12 December 2014.

Adam-Guillermin C., A. Sternalski, J-M Bonzom, C. Alonso-Alvarez, K. Gombeau, N. Beresford, T. Pöttinger, T. Lengagne, K. Beaugelin-Seiller, J. S. Matsui, S. Kasahara, K. Ueda and J. Garnier-Laplace. Estimation of radiation doses in birds and frogs from Fukushima area and associated impact. Conférence ICOBTE, 12-16 juillet 2015, Fukuoka, Japon.

Souidi M., Adam-Guillermin C., Gombeau K., Vincey M., Djebbara T., Phung S.. Radiotoxicologie des faibles doses et épigénétique. Séminaire de l’IRSN/SRBE, Fontenay-aux-Roses, 7 octobre 2015.

Gombeau K. Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez des organismes chroniquement exposés à de faibles niveaux de substances radioactives. Exposition en laboratoire à de l’uranium appauvri et sur le terrain à du radiocésium issu de l’accident de Fukushima Daiichi. Séminaire de l’IRSN/SRBE, Fontenay-aux-Roses, 19 novembre 2015.

## **Posters**

Gombeau, K., Pereira, S., Bourdineaud, J-P., Adam-Guillermin, C. *Epigenetic modifications induced by a depleted uranium exposure in zebrafish.* (Poster corner). “International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER) 3<sup>ème</sup> meeting annuel”, Barcelone, Espagne. Septembre 2014.

Barjhoux I., Camilleri V., Cavalié I., Pereira S., Darriau F., Beaugelin-Seiller K., Gombeau K., Alonzo F., Adam-Guillermin C. Changes in gene expression in brain, muscles, digestive tract and gonads of zebrafish exposed to dietary <sup>241</sup>Am. Meeting final du Réseau d’Excellence Européen STAR (Strategy for Allied Radioecology, Contract Number FISSION-2010-3.5.1-269672), Aix-en-Provence, 9-11 juin 2015.





---

---

# Liste des Figures

---

Figure 1. Devenir cellulaire en fonction de l'interaction des gènes avec l'environnement épigénétique de la cellule (Waddington 1957).....	35
Figure 2. Importance des facteurs inducteurs de la différenciation des cellules pluripotentes du système immunitaire et du statut épigénétique associé à ces transitions (Hochedlinger K. and Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency, 2009).....	37
Figure 3. a : Représentation schématique d'un nucléosome tirée de Levenson and Sweatt (2005). b : Structure cristallographique d'un nucléosome et de son interaction avec l'ADN. REF. 12 © (1997) Macmillan Magazines Ltd.....	39
Figure 4. Représentation de l'état de condensation de la chromatine en fonction de son activité transcriptionnelle (Lyon 1974). .....	40
Figure 5. Méthylation des cytosines en 5-méthylcytosines par l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 catalysée par une Dnmt, à partir de la molécule donneuse de méthyle : S- adénosylméthionine (SAM). (Attwood <i>et al.</i> 2002) .....	42
Figure 6. Représentation schématique de la régulation de l'expression des gènes par la méthylation des cytosines. La présence d'un groupement méthyle affecte la liaison d'un facteur de transcription et bloque ainsi la transcription. Des protéines telles que les MBPs, (e.g. MeCP2) peuvent également bloquer l'accès aux facteurs de transcription (Attwood <i>et al.</i> 2002) .....	43
Figure 7. Voies de déméthylation potentielles synthétisées par Branco et ses collaborateurs (2011). La 5-méthylcytosine (5mC) peut être éliminée de manière passive mais plusieurs voies actives sont proposées, avec parfois la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) comme intermédiaire. La désamination des 5mC ou des 5hmC entrainerait la formation de thymine (T) ou de 5-hydroxyméthyluracile (5hmU) sous l'action des désaminases de la famille AID/APOBEC. Les mésappariements ainsi induits seraient reconnus par les glycosylases (e.g. glycosylase de thymine de l'ADN (TDG) ou « methyl-CpG-binding protein domain 4 » (MBD4)) catalysant la production d'un site abasique. Ce dernier serait pris en charge par le système de réparation des bases excisées permettant l'insertion d'une cytosine native. ....	44
Figure 8. Biogenèse des miARNs telle que décrite par (Tollervey and Lunnyak 2012). Les transcrits primaires (pre-miRNAs) synthétisés par les ARN polymérases II ou III sont clivés par la RNase III (complexe DROSHA/DGCR8) générant des pré-miARN de 70 nucléotides. Ils sont exportés vers le cytoplasme par XPO5 où l'enzyme DICER est en charge de leur maturation. Les miARN matures comportent deux brins dont l'un interagit avec les protéines argonautes (AGO1-4) pour former le complexe RISC tandis que le second est responsable de l'appariement à la séquence cible. Cette	

interaction conduira soit à l'inhibition de la traduction, à la déanylation de l'ARN messager ou encore le clivage de ce dernier par l'activité « slicer » d'AGO2.....	46
Figure 9. Facteurs protéiques interagissant au niveau de la fourche de réplication selon Margueron and Reinberg (2010). Le complexe de maintenance mini-chromosome (MCM) est une hélicase qui va séparer les deux brins d'ADN. La synthèse du brin codant (en haut) se fait par l'ADN polymérase-ε qui interagit avec l'APNC ainsi que le facteur d'assemblage de la chromatine 1 (CAF1) afin de répliquer la séquence de 5' à 3' dans le sens de la lecture. En revanche, la synthèse du brin complémentaire se fait par étapes. En effet, l'ADN polymérase-δ synthétise également dans le sens 5' à 3', qui est cependant dans ce cas le sens inverse de lecture du fragment. Les fragments du brin complémentaire sont synthétisés grâce à la ligation d'amorces d'ARN, et liés entre eux par l'ADN ligase. ....	49
Figure 10. Photographie d'un poisson zèbre mâle et femelle.....	71
Figure 11. Cycle de vie du poisson zèbre .....	72
Figure 12. Photographie d'une grenouille arboricole Japonaise mâle .....	75
Figure 13. Observations des nucléoïdes durant le test des comètes. Echantillon contrôle à gauche, et endommagé à droite. ....	78
Figure 14. Dispositif de reproduction utilisé au cours de la seconde expérience. Dans chaque bac, les femelles et les mâles étaient séparés de part et d'autre des bacs par une cloison grillagée, qui devait être retirée afin de démarrer la reproduction. ....	90
Figure 15. Dispositif expérimental pour la première expérience. A gauche, les bacs témoins mâles et femelles. Au centre le dispositif de contrôle du pH, du renouvellement de l'eau et du maintien de la contamination. A droite les bacs contaminés à 20 et 2 µg.L <sup>-1</sup> .....	92
Figure 16. Dispositif expérimentale de la seconde expérience en système fermé. Le renouvellement de l'eau des bacs s'effectuait par le biais d'un aspirateur à eau. La contamination des bacs en uranium a été effectuée par ajout manuel. ....	92
Figure 17. Cartographie du niveau d'activité radiologique ambient dans la région de Fukushima. Positionnement des sites échantillonnés relativement au débit de dose ambient. ....	96
Figure 18. Scénarios d'exposition utilisés dans le logiciel EDEN en fonction de la biologie de la grenouille. ....	98
Figure 19. Représentation schématique du principe de la technique d'AFLP-MS. ....	105



---

---

# Liste des Tableaux

---

Tableau 1. Effets observés lors d'études réalisées au laboratoire chez le poisson zèbre exposé à différentes concentrations d'uranium. ....	65
Tableau 2. Classification phylogénétique du poisson zèbre .....	72
Tableau 3. Composition de l'eau synthétique utilisée dans les expériences (pH = 6,4 pCO <sub>2</sub> atm). ....	91
Tableau 4. Analyses biologiques réalisées au cours de la première expérience. ....	94
Tableau 5. Analyses biologiques réalisées sur les différents stades de développement de la descendance. ....	94
Tableau 6. Analyses biologiques réalisées sur la génération parentale de la seconde expérience. ....	95
Tableau 7. Séquences des amorces sens et anti-sens pour le long et court fragment obtenues chez <i>Hyla japonica</i> à l'aide du logiciel "Primer Blast " sur la base de la séquence de l'ADN mitochondrial référencée sous le numéro d'accèsion NC_010232.1. ....	101
Tableau 8. Séquences des adaptateurs et amorces utilisés dans la technique d'AFLP-MS .....	107



---

---

# Table des matières

---

Liste des Figures.....	15
Liste des Tableaux.....	17
Table des matières.....	19
Introduction générale .....	25
Chapitre 1. Généralités sur le domaine de l'épigénétique .....	31
1.    Emergence de l'épigénétique .....	35
2.    Les mécanismes épigénétiques majeurs .....	37
2.1. La modification des histones.....	39
2.2. La méthylation de l'ADN génomique.....	41
2.3. Les séquences d'ARN non codantes .....	44
3.    Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques..	47
3.1. Héritabilité des marques épigénétiques.....	47
3.2. Implication dans le développement.....	50
3.3. Les mécanismes épigénétiques en réponse au stress .....	52
3.4. Rôle dans la cancérogenèse .....	53
Chapitre 2. Objectifs et stratégies expérimentales du programme de recherche .....	57
1.    Les mécanismes épigénétiques dans le cadre de la radioécologie .....	61
2.    Contextes d'exposition aux substances radioactives .....	63
2.1. Premier contexte d'exposition .....	63
2.2. Deuxième cas d'exposition .....	67
3.    Description des modèles biologiques.....	71
3.1. Le poisson zèbre : modèle de laboratoire.....	71
3.2. La grenouille arboricole Japonaise <i>Hyla japonica</i> : modèle biologique <i>in situ</i> .....	74
4.    Paramètres biologiques étudiés.....	75
4.1. Bioaccumulation de l'uranium .....	76

4.2. Calcul du débit de dose.....	76
4.3. Génotoxicité.....	77
4.4. Etude de la méthylation de l'ADN génomique.....	79
4.5. Etude des ARN totaux de plus de 50pb par RNAseq .....	81
4.6. Ultrastructure des organes cibles.....	82
Chapitre 3. Matériel et méthodes .....	85
1. Expositions en laboratoire .....	89
1.1. Origine et maintenance des poissons zèbre au laboratoire .....	89
1.2. Obtention des œufs de <i>Danio rerio</i> .....	89
1.3. Procédures d'exposition .....	90
1.4. Dispositifs expérimentaux.....	91
1.5. Contrôle des paramètres expérimentaux.....	93
1.6. Prélèvement des échantillons biologiques .....	93
2. Exposition <i>in situ</i> .....	95
3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques .....	96
3.1. Mesure de la bioaccumulation.....	96
3.2. Mesure du débit de dose reçu par les organismes .....	97
3.3. Mesure de la génotoxicité .....	98
3.4. Analyse de la méthylation globale de l'ADN génomique.....	103
3.5. Analyse transcriptomique par RT-QPCR et RNAseq .....	108
3.6. Analyse histologique des dommages ultrastructuraux .....	110
4. Tests statistiques .....	111
Chapitre 4. Effets de concentrations environnementales d'uranium appauvri sur les profils de méthylation du poisson zèbre adulte mâle et femelle .....	115
1. Introduction .....	119
1.1. Sensibilité de la méthylation de l'ADN à l'uranium appauvri .....	119
1.2. Modifications au sein d'organes somatiques et reproducteur .....	120
2. Principales conclusions .....	161
2.1. Pertinence de la double approche AFLP-MS et HPLC-MS/MS .....	161
2.2. Effets de l'uranium sur les profils de méthylation .....	162
2.3. Accumulation de l'uranium et méthylation de l'ADN.....	163
2.4. Différences liées au sexe.....	164
Chapitre 5. Transfert générationnel des marques épigénétiques et impact sur la descendance .....	167
1. Introduction .....	171
1.1. Transmission des atteintes moléculaires.....	172
1.2. De l'échelle moléculaire à l'organisation tissulaire .....	172

2.	Principales conclusions .....	237
2.1.	Les profils de méthylation induits en réponse à l'exposition à l'uranium appauvri .....	237
2.2.	La réponse transcriptomique à l'exposition uranifère d'une génération à la suivante.....	238
2.3.	Exposition à l'uranium appauvri et dommages histologiques .....	239
2.4.	L'approche multi-biomarqueurs et le lien entre les générations.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Chapitre 6. Exposition aux <sup>137</sup> Cs <i>in situ</i> et effets associés sur la méthylation globale de l'ADN génomique et l'intégrité de l'ADN mitochondrial .....		
		243
1.	Introduction .....	247
1.1.	Sensibilité des profils de méthylation à l'exposition aux radionucléides .....	248
1.2.	L'apport moléculaire de l'analyse des lésions à l'ADN mitochondrial.....	249
2.	Principales conclusions .....	309
2.1.	Prédominance de l'exposition interne et pondération de l'activité radiologique .....	309
2.2.	Profils de méthylation radio-induits.....	309
2.3.	L'ADN mitochondrial témoigne des atteintes au matériel génétique.....	310
2.4.	Extrapolation des seuils de protection au regard de la réalité du terrain.....	311
Chapitre 7. Discussion générale et perspectives .....		
		315
1.	Synthèse des principales avancées scientifiques .....	319
1.1.	Pertinence de la double approche par AFLP-MS et HPLC-MS/MS .....	319
1.2.	Sensibilité des profils de méthylation aux faibles niveaux de substances radioactives .....	320
1.3.	Intérêts des études au laboratoire relativement au terrain .....	322
2.	Modes d'action hypothétiques des substances radioactives .....	324
2.1.	Variations des profils de méthylation au regard des propriétés génotoxiques des substances radioactives .....	324
2.2.	Les modifications épigénétiques dans la régulation de la réponse génique à l'exposition aux substances radioactives .....	325
3.	Perspectives de recherche .....	327
4.	En conclusion .....	330
Références bibliographiques.....		
		333
Annexes.....		
		347
1.	Résultats du test gamma-H2AX au cours de la première expérience d'exposition au laboratoire.....	349
2.	Résultats du test des comètes au cours de la seconde expérience d'exposition au laboratoire.....	350

3. Liste des amorces déterminées pour chaque gène étudié en RT-QPCR.....351
4. Résultats obtenus sur l'expression des gènes étudiés au cours de la seconde expérience 354

*« Dans quelques centaines d'années, il n'y aura plus sur cette terre que des  
lignées de mauvaises herbes, de mouches, de blattes et d'étourneaux se  
développant pour occuper un environnement modifié – surtout désertifié – dans le  
sillage d'une évolution humaine, culturellement inadaptée à l'environnement »*

*Terry L. Erwin, 1991*





---

---

# Introduction générale

---



## ***Introduction générale***

Les activités humaines, industrielles, agricoles et militaires, engendrent une dissémination de grandes quantités de polluants dans les écosystèmes pouvant à terme impacter les organismes qui y vivent. La compréhension des mécanismes d'action toxique des polluants environnementaux constitue une étape indispensable dans la caractérisation des effets biologiques induits par cette contamination anthropique.

Dans ce contexte s'est développée l'écotoxicologie, domaine d'étude visant à améliorer les connaissances sur le risque environnemental associé à l'augmentation des substances polluantes dans l'environnement, ainsi qu'à évaluer les effets à long terme sur les populations non-humaines exposées.

Parmi les contaminants environnementaux, on retrouve notamment les substances radioactives. Les éléments radioactifs existent à l'état naturel, cependant, l'activité anthropique peut parfois entraîner un enrichissement de cette radioactivité dont les conséquences à long terme sur les organismes exposés sont mal connues.

Ce projet de recherche s'intègre dans le cadre du projet européen COMET (« COordination and iMplementation of a pan-Europe instrumenT for radioecology », 7<sup>ième</sup> PCRD EURATOM) dont une des actions de recherche vise à évaluer l'importance des mécanismes épigénétiques dans la propagation des effets transgénérationnels chez les populations non-humaines exposées de façon chronique à de faibles niveaux d'éléments radioactifs.

Le domaine de l'épigénétique comprend les modifications chimiques survenant à la surface de l'ADN, n'impactant pas la séquence de cette molécule, et pouvant être transmises de manière héréditaire par mitose ou méiose (Hala *et al.* 2014). Ces modifications sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, et sont notamment reconnues pour leur rôle dans les facultés d'adaptation des organismes (Head J.A. *et al.* 2012). Parmi ces mécanismes, nous nous sommes focalisés sur la méthylation de l'ADN qui est le mécanisme qui a été le plus étudié et qui est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la régulation de l'expression des gènes (Bird 1992), la stabilité chromosomique (O'Hagan 2014) et le transfert de marques spécifiques au cours des générations (Angers *et al.* 2010)

Nous avons décidé d'étudier les mécanismes épigénétiques en réponse à l'exposition aux substances radioactives dans deux contextes d'expositions bien distincts, celui des

## **Introduction générale**

expositions à des substances radioactives naturelles (NORM) et des expositions post-accidentelles.

Le premier volet expérimental concerne les effets d'une exposition chronique au laboratoire à des concentrations environnementales d'uranium appauvri, un radioélément à la toxicité majoritairement chimique et similaire à celle des éléments trace métalliques, chez des poissons zèbre mâles et femelles. De cette manière, nous avons pu étudier les effets associés à la contamination des écosystèmes par l'uranium, pollution liée à l'activité industrielle d'extraction des roches uranifères. Cette dernière a été stoppée en 2001 en France, mais est toujours responsable de la contamination des écosystèmes aquatiques en uranium en raison de : (i) la présence de stériles (résidus rocheux générés suite à l'extraction pouvant contenir jusqu'à 100 grammes d'uranium par tonne) contenant de l'uranium pouvant être remobilisé lors d'épisodes pluvieux, (ii) ainsi qu'aux efforts de réhabilitation des anciens sites miniers, procédés incluant une inondation des sites, dont les eaux d'écoulements sont susceptibles de contaminer les hydrosystèmes avoisinants. Les études réalisées au sein de ce volet expérimental ont été menées chez le poisson zèbre *Danio rerio*, et nous ont permis à la fois de développer des techniques adaptées pour l'étude des profils de méthylation, ainsi que d'évaluer : (i) la sensibilité des organismes à de faibles niveaux d'exposition, (ii) l'importance du sexe dans la réponse observée et (iii) l'implication de ces marques dans le transfert de la toxicité de l'uranium appauvri d'une génération parentale exposée à une descendance non exposée.

Le second volet expérimental représente l'étude menée sur un modèle biologique vertébré terrestre exposé dans son habitat naturel aux retombées radioactives induites par l'accident nucléaire de la centrale de Fukushima Daiichi, au Japon. Ce contexte est radicalement différent du premier puisqu'il correspond à une exposition chronique *in situ* à des radionucléides artificiels dont la toxicité s'exprime majoritairement par leur activité radiologique. Dans ce volet, les études ont été réalisées sur la grenouille arboricole Japonaise *Hyla japonica*. Nous avons recherché à valider l'efficacité des méthodes développées au laboratoire pour l'étude des variations dans les profils de méthylation de l'ADN génomique chez ce modèle biologique au génome non séquencé, ainsi qu'à déterminer une éventuelle relation positive entre la dose radiologique absorbée et les effets observés.

## ***Introduction générale***

Ce document est organisé en sept chapitres. Le premier présente un état de l'art sur les mécanismes épigénétiques et leurs implications dans les fonctions biologiques. Le second chapitre présente les problématiques soulevées par ce projet de recherche ainsi que les objectifs et la démarche expérimentale axés sur la méthylation de l'ADN génomique. La troisième partie présente le matériel et les méthodes mises en œuvre pour répondre aux problèmes scientifiques. Le quatrième et le cinquième chapitre présentent les résultats obtenus lors des expositions à l'uranium appauvri chez le poisson zèbre, et sont présentés sous la forme d'articles scientifiques. Le sixième chapitre récapitule les données obtenues dans le cadre du second volet expérimental, résultats également compilés sous la forme d'un article scientifique. Enfin, le septième et dernier chapitre est une synthèse des résultats obtenus au cours de ces trois années de recherche qui est accompagnée des perspectives à explorer pour répondre aux questionnements laissés en suspens à la suite de ces travaux.



---

---

# **Chapitre 1. Généralités sur le domaine de l'épigénétique**

---





*Ce chapitre regroupe les données synthétisées à partir de la bibliographie scientifique sur le domaine de l'épigénétique replaçant ainsi les généralités, les composantes mécanistiques et leurs implications dans les processus biologiques.*



## 1. Emergence de l'épigénétique

La notion d'épigénétique a été évoquée pour la première fois en 1942 par Conrad Hal Waddington (Waddington 1942). Ce biologiste du développement, paléontologue et généticien s'intéressa aux fondements des systèmes biologiques et au rôle de l'épigénèse dans l'évolution. Il proposa le terme d'épigénotype afin d'expliquer le lien entre génotype et phénotype, et nomma cette nouvelle discipline l'épigénétique. Cette dernière s'intéresse aux mécanismes de développement induits par les gènes, expliquant l'apparition de différents types de cellules spécialisées au cours du développement embryonnaire. En 1957, il proposa dans son livre « *The strategy of genes* », la théorie selon laquelle le paysage épigénétique conditionnerait le devenir des cellules en agissant sur l'expression des gènes (Figure 1).

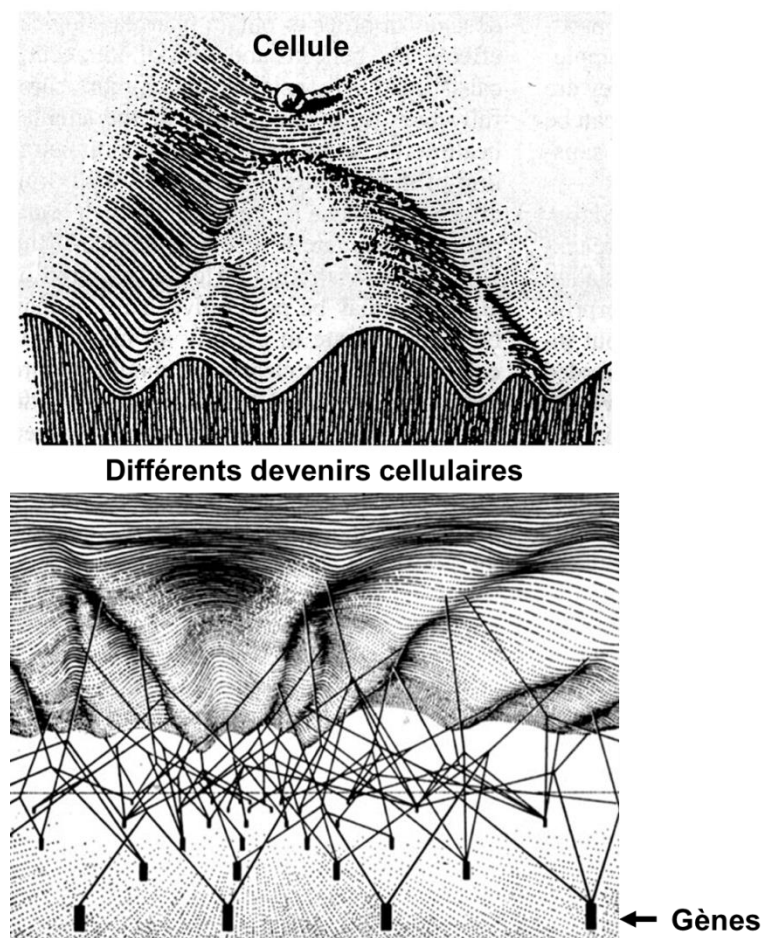


Figure 1. Devenir cellulaire en fonction de l'interaction des gènes avec l'environnement épigénétique de la cellule (Waddington 1957)

## Chapitre 1. 1. Emergence de l'épigénétique

Une autre avancée majeure fut permise grâce aux travaux de Jacob et Monod (Jacob and Monod 1961), qui expliquèrent le fonctionnement de l'opéron *Lac* chez les bactéries, appuyant la théorie de l'existence de mécanismes de contrôle de l'expression des gènes tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. A la suite de ces travaux, Waddington (1966) proposa l'existence de gènes structuraux et de gènes régulateurs, ainsi que l'apparition de signaux régulateurs modifiant l'expression de ces gènes, expliquant l'apparition des différents types cellulaires au cours du développement embryonnaire.

Avec l'émergence de la culture cellulaire, il fut établi l'existence d'une hérabilité, ainsi que la présence de gènes dit de « ménage » à l'expression constitutive, en comparaison à des gènes dit « spécialisés » répondant à des « stimuli » et déterminant le devenir fonctionnel des cellules. L'existence de l'hérabilité fut mise en évidence par l'observation des cellules filles issues de la division de cellules mères spécialisées. Effectivement, ces cellules filles possédaient les mêmes caractéristiques que les cellules mères, sans transition par un état de pluripotence.

La découverte de la méthylation de l'ADN fut une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes responsables de la régulation de l'expression des gènes et des mécanismes d'hérabilité. Durant la même année, Holliday (1975) et Riggs (1975) postulèrent indépendamment que la méthylation de l'ADN pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression d'un gène, et que ces modifications chimiques de l'ADN pourraient être transmises de manière héréditaire, sous réserve de la reconnaissance des régions hémiméthylées lors de la division cellulaire et d'une méthylation *de novo* reproduisant les hémimotifs sur le brin néosynthétisé. L'hypothèse de régulation de l'expression de certains gènes par la méthylation de l'ADN fut étayée par les travaux menés par Jones et ses collaborateurs sur la 5-azacytidine (Flatau *et al.* 1984; Taylor *et al.* 1984). Ce composé chimique est un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, qui entraîna sur des cellules traitées des modifications d'expression de gènes, permettant d'associer la méthylation de l'ADN à un état inactif de l'expression de la chromatine.

Holliday proposa une nouvelle définition de l'épigénétique comme étant « l'étude des mécanismes spatio-temporels contrôlant l'activité des gènes au cours du développement d'un organisme » (Holliday 1990). Il y ajouta en 1994 la notion d'hérabilité, définissant alors

## Chapitre 1. 1. Emergence de l'épigénétique

l'épigénétique comme « l'étude du changement de l'expression des gènes dans des organismes dont les cellules sont différenciées, ainsi que l'héritabilité mitotique des profils d'expression des gènes » (Holliday 1994). Russo (1996) définit de manière plus précise l'épigénétique comme étant « l'étude des changements héréditaires mitotiques et/ou méiotiques affectant la fonction d'un gène et ne se justifiant pas par des changements de séquences de l'ADN. »

Plus récemment, Hochedlinger et Plath (2009) revisitèrent la vision du paysage épigénétique proposé par Waddington en l'appliquant à la reprogrammation épigénétique associée à la pluripotence dans des cellules immunitaires différenciées. Dans ces travaux, les auteurs démontrèrent l'importance de nombreux facteurs de pluripotence et de transcription dans les processus de différenciation des cellules pluripotentes en cellules spécialisées, ainsi que la réversibilité de cette différenciation (Figure 2).

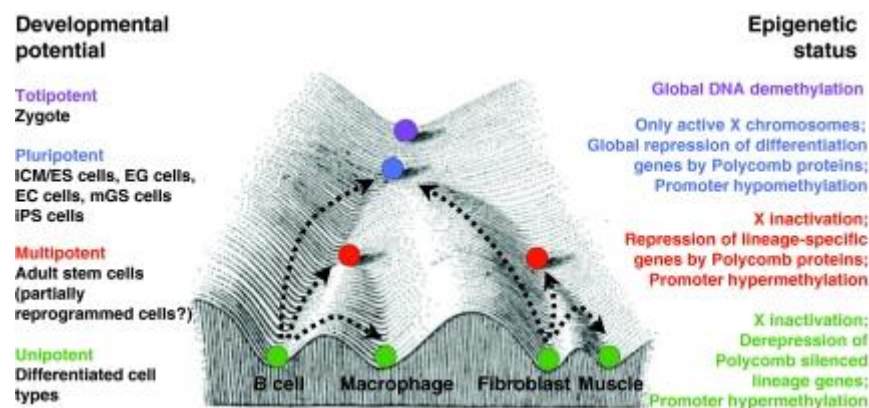


Figure 2. Importance des facteurs inducteurs de la différenciation des cellules pluripotentes du système immunitaire et du statut épigénétique associé à ces transitions (Hochedlinger K. and Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency, 2009).

## 2. Les mécanismes épigénétiques majeurs

Le domaine de l'épigénétique englobe les modifications chimiques survenant à la surface de l'ADN, n'impactant pas la séquence de cette molécule, et pouvant être transmises de manière héréditaire par mitose ou méiose. Parmi ces modifications, il en existe trois

## **Chapitre 1. 1. Emergence de l'épigénétique**

grands types qui sont : la modification chimique des histones, la méthylation des cytosines lorsqu'elles sont suivies d'une guanine, ainsi que les séquences d'ARN non codantes.

## 2.1. La modification des histones

Les histones sont des protéines nucléaires s'associant en octamère, autour desquelles s'enroule la molécule d'ADN sur 146 paires de bases (pb), formant ainsi les unités de base de la chromatine appelées « nucléosomes ». Un nucléosome comporte une paire de chacune des histones suivantes : H2A, H2B, H3, H4 (Figure 3), et est stabilisé par une neuvième histone (H1) refermant le nucléosome. L'état de condensation de l'ADN est variable (Figure 4), allant de l'état compacté d'hétérochromatine (associé à la répression de l'expression des gènes compris dans ces régions) à l'état relâché d'euchromatine (associé à l'expression des gènes). Les variations d'état de condensation de l'ADN nécessitent l'interaction de nombreux facteurs protéiques impliqués dans la régulation de la condensation de la chromatine, la régulation de la transcription, la réparation ainsi que la réplication de l'ADN.

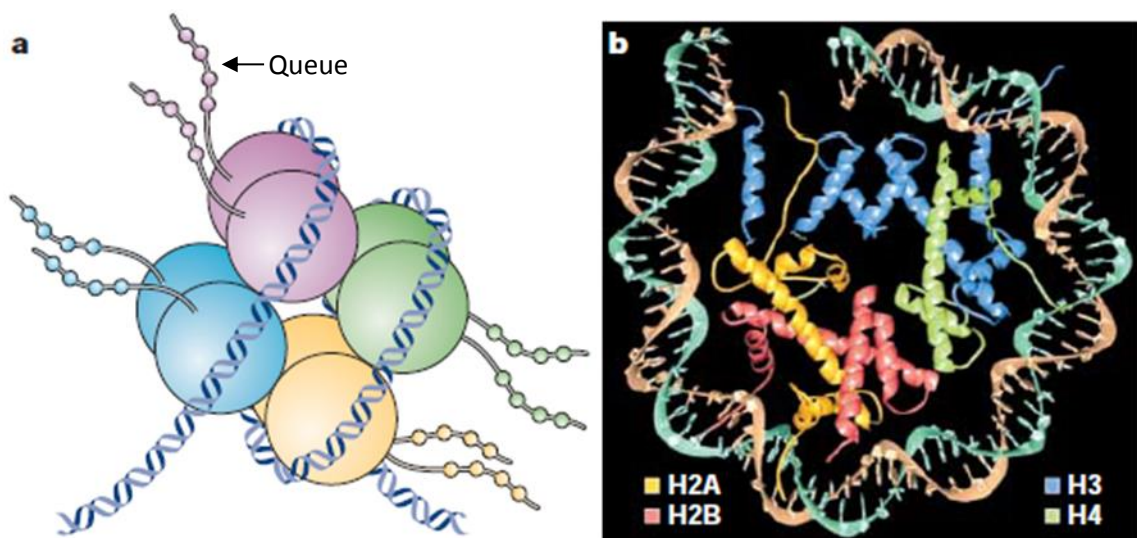


Figure 3. a : Représentation schématique d'un nucléosome tirée de Levenson and Sweatt (2005). b : Structure cristallographique d'un nucléosome et de son interaction avec l'ADN. REF. 12 © (1997) Macmillan Magazines Ltd.

Les modifications épigénétiques impliquant les histones surviennent sur l'extrémité N-terminale qui constitue la queue de ces dernières. On retrouve parmi ces modifications l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation ou encore la sumoylation (Bannister and Kouzarides 2011). Ces modifications impactent de façon différentielle la charge des histones, la stabilité du nucléosome (interaction protéine/protéine), ou encore

les interactions histone-ADN, modifiant la mobilité des nucléosomes le long de l'ADN (Cosgrove *et al.* 2004).

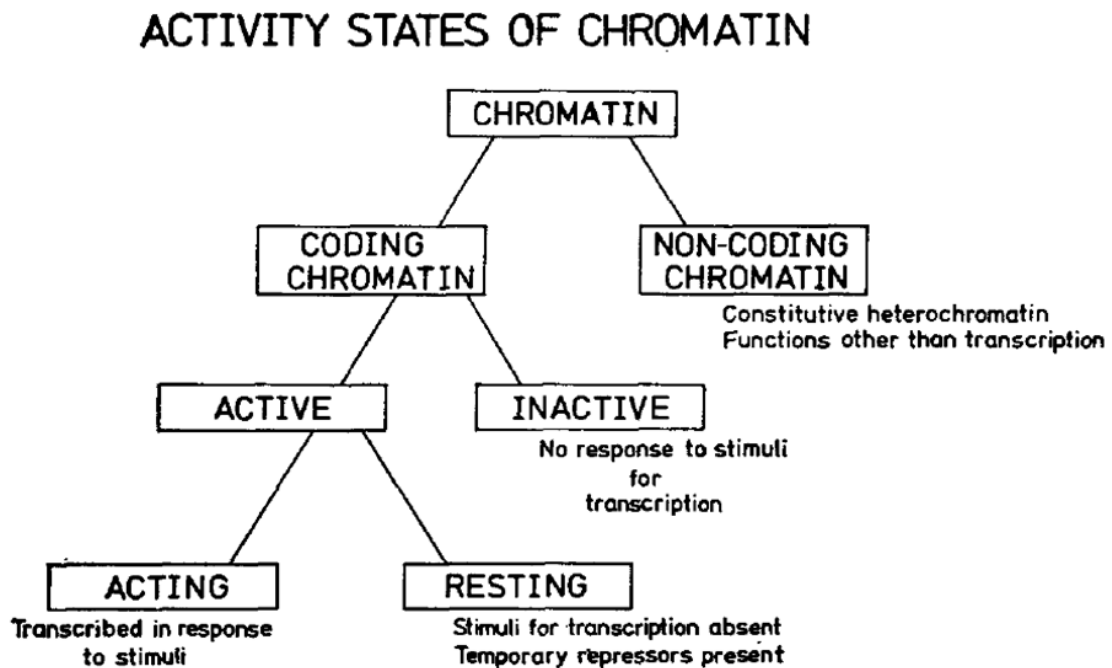


Figure 4. Représentation de l'état de condensation de la chromatine en fonction de son activité transcriptionnelle (Lyon 1974).

Au sein d'une histone, la nature et le degré des modifications apportées (e.g. la mono-, di- ou triméthylation) ont différentes propriétés (Pfluger and Wagner 2007). De plus, certaines de ces marques peuvent interagir entre elles, soit de manière antagoniste soit de manière synergique (Lee *et al.* 2010). Les différentes modifications des histones et leurs interactions constituent le « code histone », déterminant l'état transcriptionnel d'un locus.

La combinaison de modifications d'histones modifie ainsi l'accessibilité de l'ADN, la stabilité des nucléosomes ou encore le point de liaison d'autres facteurs chromatinien, pouvant ainsi induire une répression ou une activation de l'expression des gènes (Pfluger and Wagner 2007). Parmi ces marques, certaines sont labiles et transitoires, tandis que d'autres peuvent être transmises par mitose (Roudier *et al.* 2009). En dernier lieu, du fait de leur faible taux de renouvellement au sein des nucléosomes, il est établi que les dimères d'histones H3 et H4, relativement aux H2A et H2B, sont porteuses des marques épigénétiques fonctionnelles (Kimura and Cook 2001).

En plus des quatre histones conventionnelles, on retrouve des variants d'histones, qui sont incorporés à l'ADN en dehors de la phase de réplication de l'ADN (Mizuguchi *et al.*



2004; Park *et al.* 2005). Ils diffèrent dans la composition de la queue (MacroH2A), dans le domaine histone-fold (H2ABdb), ou encore par quelques résidus (H3.3) (Li *et al.* 2007). La présence de ces variants dans les nucléosomes impacte la structure de la chromatine de plusieurs manières : par la modification du statut transcriptionnel, par l'inactivation d'un des deux chromosomes X, ou encore par la signalisation de dommages à l'ADN (Li *et al.* 2007).

## 2.2. La méthylation de l'ADN génomique

### *2.2.1. Le processus de méthylation*

La méthylation de l'ADN génomique est un mécanisme reconnu pour son importance dans la régulation de l'expression des gènes (Razin and Riggs 1980). Cette modification épigénétique est catalysée par les méthyltransférases de l'ADN (DNMTs). Ces enzymes vont fixer un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) sur le cinquième carbone des cytosines lorsqu'elles se trouvent suivies d'une guanine (configuration CpG) à partir d'une molécule donneuse de méthyle, la S-adénosylméthionine (Figure 5).

L'ADN est méthylé selon deux voies distinctes appelées méthylation « *de novo* » et de « maintenance ». La méthylation *de novo* survient au niveau des séquences ne portant pas de cytosines méthylées. La méthylation s'effectue sur de nouveaux résidus cytosine et cela en dehors de la phase de réplication, donnant lieu à de nouveaux profils de méthylation. La méthylation de maintenance, quant à elle, permet le maintien des profils de méthylation déjà existants lors des processus de réplication de l'ADN. Effectivement, chaque cellule fille comporte un brin parental d'ADN hémiméthylé à partir duquel les motifs de méthylation seront reportés sur le brin néo-synthétisé, action guidée par la méthylation présente sur le brin d'ADN parental (Zhang *et al.* 2010).

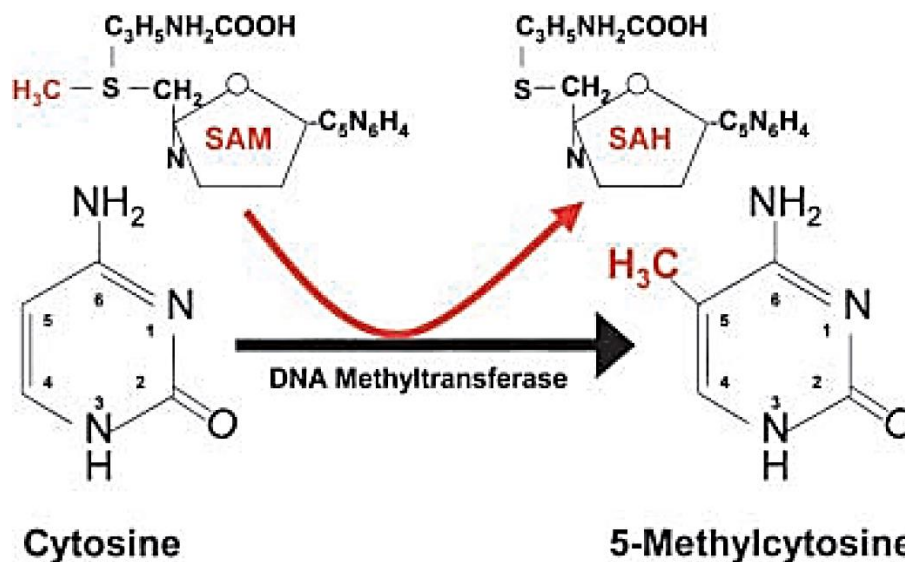
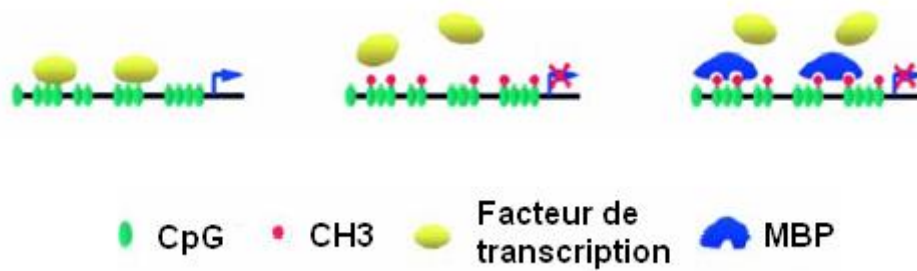


Figure 5. Méthylation des cytosines en 5-méthylcytosines par l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 catalysée par une Dnmt, à partir de la molécule donneuse de méthyle : S-adenosylméthionine (SAM). (Attwood *et al.* 2002)

La méthylation a de nombreuses fonctions essentielles dans une cellule eucaryote. Elle joue un rôle important dans la stabilité chromosomique ainsi que la structure de la chromatine (Robertson 2002). On lui connaît également la capacité d'inactivation d'éléments répétés, de séquences virales ainsi que de transposons présents dans l'ADN (Herman and Baylin 2003). Une autre fonction importante réside dans la régulation transcriptionnelle *via* l'interaction avec plusieurs protéines par le biais de mécanismes impliquant plusieurs protéines (Figure 6), (Attwood *et al.* 2002). La présence des groupements méthyles affecte directement la liaison des facteurs de transcription sur l'ADN. D'autres protéines peuvent se lier aux groupements méthyles, en particulier celles appartenant à la famille des protéines aux domaines de liaison des sites CpG méthylés (MBP). Ces dernières peuvent être recrutées aux sites méthylés et former des complexes protéiques fortement inhibiteurs (Robertson and Jones 2000). De plus, ces protéines sont capables de se lier sur un seul dinucléotide CpG méthylé pour induire une répression de la transcription (Nan and Bird 2001).



**Figure 6. Représentation schématique de la régulation de l'expression des gènes par la méthylation des cytosines. La présence d'un groupement méthyle affecte la liaison d'un facteur de transcription et bloque ainsi la transcription. Des protéines telles que les MBPs, (e.g. MeCP2) peuvent également bloquer l'accès aux facteurs de transcription (Attwood *et al.* 2002)**

### 2.2.2. Les voies de la déméthylation

Si la méthylation de l'ADN est un mécanisme de régulation transcriptionnelle dans le sens de la répression, la déméthylation de l'ADN est invariablement son opposé permettant notamment de recouvrer un statut transcriptionnel actif. Les mécanismes de déméthylation de l'ADN sont nombreux et organisés selon deux modes d'action : passif et actif (Branco *et al.* 2011). La première catégorie, dite de déméthylation passive de l'ADN, correspond à un déficit en molécules donneuses de groupements méthyles. Effectivement, dans cette configuration, les profils de méthylation ne peuvent être reproduits que partiellement lors des divisions cellulaires, et chaque division s'accompagne dans les cellules filles d'une perte progressive des marques de méthylation. A l'inverse, la déméthylation active est régie par l'activité d'une ou plusieurs enzymes qui sont regroupées en trois grandes familles (Figure 7) :

- La famille TET (« ten-eleven-translocation »), responsable de l'hydroxylation initiale des 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosines, suivies par des multiples oxydations et d'un retour à une forme de cytosine native.

- La famille AID/APOBEC regroupant des désaminases qui vont convertir les cytosines en uracile générant des mésappariements.

- La famille des glycolases qui vont reconnaître les mésappariements et générer des sites abasiques. Ces sites seront réparés par le mécanisme d'excision des bases (BER), insérant une base cytosine native.

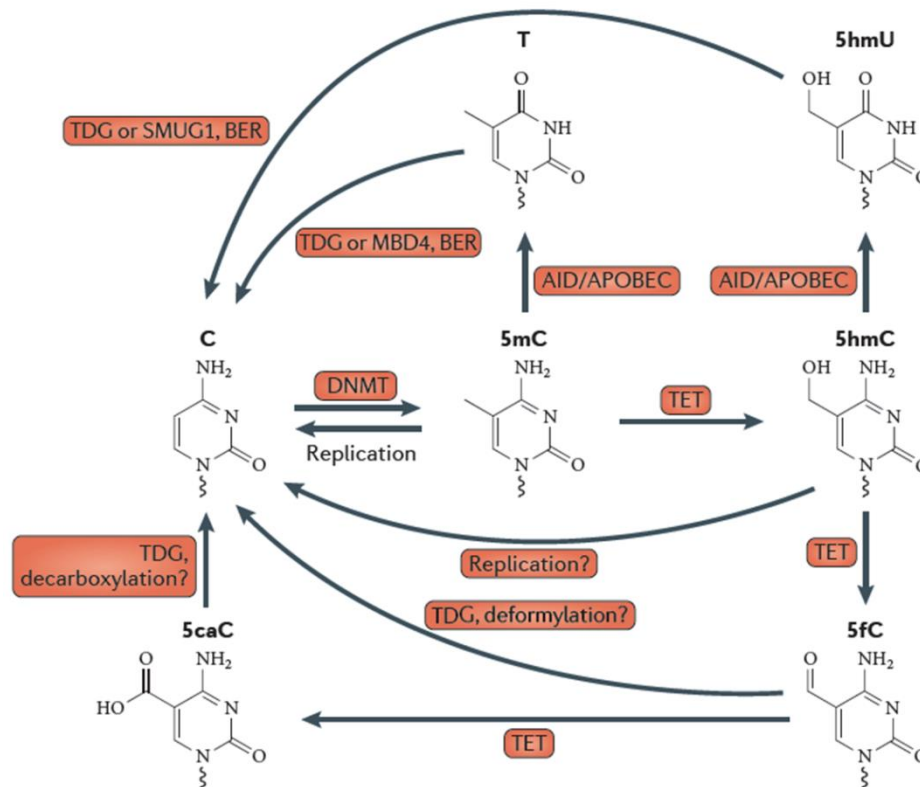


Figure 7. Voies de déméthylation potentielles synthétisées par Branco et ses collaborateurs (2011). La 5-méthylcytosine (5mC) peut être éliminée de manière passive mais plusieurs voies actives sont proposées, avec parfois la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) comme intermédiaire. La désamination des 5mC ou des 5hmC entraînerait la formation de thymine (T) ou de 5-hydroxyméthyluracile (5hmU) sous l'action des désaminases de la famille AID/APOBEC. Les mésappariements ainsi induits seraient reconnus par les glycosylases (e.g. glycosylase de thymine de l'ADN (TDG) ou « methyl-CpG-binding protein domain 4 » (MBD4)) catalysant la production d'un site abasique. Ce dernier serait pris en charge par le système de réparation des bases excisées permettant l'insertion d'une cytosine native.

### 2.3. Les séquences d'ARN non codantes

Les ARN non codants (ARNnc) sont des séquences transcrites à partir de l'ADN génomique mais ne codant pour aucune protéine. Ils sont classés en quatre grandes catégories que sont les microARNs (miARNs), les longs ARNs non codants (lncARNs), les ARNs interagissant avec la protéine Piwi (ARNpi) et les longs ARNs non codants intergéniques (LincARNs). Ces séquences jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires tels que le développement, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Mattick and Makunin 2005; Wang and Chang 2011; Zhang *et al.* 2012).

## Chapitre 1. 2. Les mécanismes épigénétiques majeurs

Les miARNs ont fait l'objet de nombreuses études. Ils jouent notamment un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Ambros 2004). Ces courtes séquences de 22 nucléotides s'intègrent au sein du complexe RISC (« RNA induced silencing complex ») et vont s'apparier par complémentarité avec les séquences 5'-UTR (« untranslated region ») des ARNs messagers. Cette association conduit soit à la dégradation des ARNs messagers soit à l'inhibition de leur traduction en protéines tel que cela est décrit dans la Figure 8.

Ces miARNs participent également de manière active aux mécanismes épigénétiques par la régulation de l'expression des gènes codant pour les DNMTs (Garzon *et al.* 2009; Braconi *et al.* 2010) ainsi que pour les histones déacétylases (Noonan *et al.* 2009). De plus, les miARNs cibleraient préférentiellement les régions promotrices non méthylées suggérant une complémentarité avec le mécanisme de méthylation de l'ADN dans l'inhibition de l'expression des gènes (Su *et al.* 2011).

Les lncARNs jouent également un rôle important dans les mécanismes de régulation transcriptionnelle. Ces longues séquences d'au moins 200 nucléotides sont, pour leur part, peu conservées et leurs mécanismes d'action sont encore peu connus (Wang and Chang 2011). Ils interagissent notamment au niveau de la synthèse protéique ainsi que de la maturation et du transport des ARNs (Bernstein and Allis 2005; Whitehead *et al.* 2009). Les lncARNs sont exprimés de façon tissu-spécifique et sont impliqués dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire (Dinger *et al.* 2008), l'inactivation du chromosome X (Pontier and Gribnau 2011) et l'établissement de l'empreinte génomique parentale (Wang and Chang 2011).

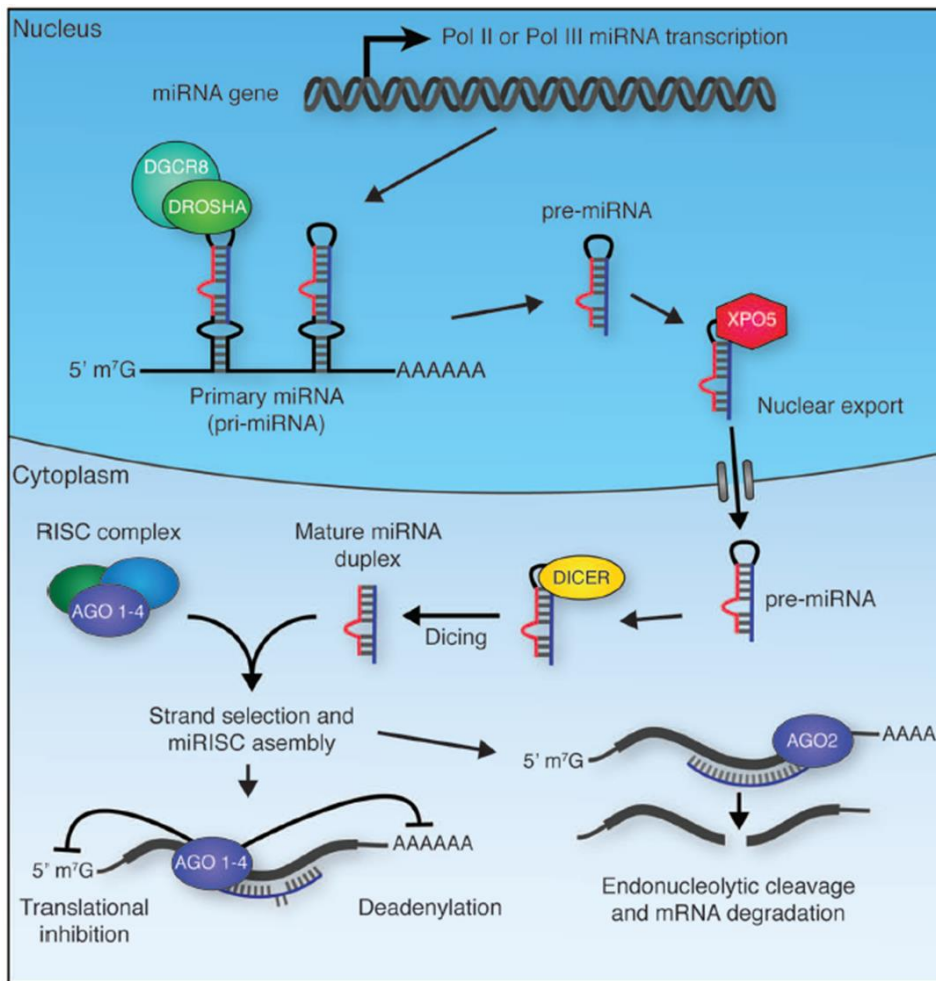


Figure 8. Biogenèse des miARNs telle que décrite par (Tollervey and Lunnyak 2012). Les transcrits primaires (pre-miRNAs) synthétisés par les ARN polymérase II ou III sont clivés par la RNase III (complexe DROSHA/DGCR8) générant des pré-miARN de 70 nucléotides. Ils sont exportés vers le cytoplasme par XPO5 où l'enzyme DICER est en charge de leur maturation. Les miARN matures comportent deux brins dont l'un interagit avec les protéines argonautes (AGO1-4) pour former le complexe RISC tandis que le second est responsable de l'appariement à la séquence cible. Cette interaction conduira soit à l'inhibition de la traduction, à la dénylation de l'ARN messager ou encore le clivage de ce dernier par l'activité « slicer » d'AGO2.

### **3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques**

#### 3.1. Héritabilité des marques épigénétiques

Une des caractéristiques des marques épigénétiques telles qu'elles furent décrites par Russo (1996), réside dans leur capacité à être transmises à la descendance. Leur transmission peut s'effectuer à deux échelles, la première correspond au transfert lors des divisions cellulaires somatiques durant la mitose, et la seconde au transfert d'un individu à un autre, lors de la reproduction et de la fusion des gamètes mâle et femelle issus de la méiose.

##### *3.1.1. Le transfert de cellule à cellule : le cas de la mitose*

Lors de la division cellulaire, les marques épigénétiques présentes chez la cellule mère peuvent être transmises aux filles par différents procédés. La transmission des marques de méthylation sur les brins synthétisés est un mécanisme semi-conservatif basé sur la répllication des marques de méthylation du brin copié au nouveau brin (Gruenbaum *et al.* 1982). Lors de la répllication de l'ADN, l'ADN polymérase est assistée par l'antigène de prolifération du noyau cellulaire (PCNA) (Moldovan *et al.* 2007) (Figure 9). Le PCNA va permettre de maintenir le brin copié et celui en cours de synthèse joints, et serait également impliqué dans la reproduction des marques épigénétiques sur le brin néosynthétisé (Zhang *et al.* 2000). Une hypothèse probable impliquerait l'enzyme DNMT1 (en raison de son affinité pour l'ADN hémiméthylé (Hermann *et al.* 2004)), qui entrerait en interaction avec le PCNA pour reproduire les profils de cytosines méthylées sur le brin synthétisé (Chuang *et al.* 1997). Cependant, plusieurs autres facteurs protéiques joueraient un rôle important dans ce processus, tel que la protéine NP95 chez les mammifères, dont l'affinité pour les sites double-brin hémiméthylés (Hashimoto *et al.* 2008) entrainerait le recrutement de l'enzyme DNMT1 sur les sites de répllication, enzyme qui procéderait par la suite à la reproduction des marques de méthylation sur le nouveau brin (Sharif *et al.* 2007).

### Chapitre 1.3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

Les marques présentes sur les histones sont également transmissibles. Durant la réplication de l'ADN, les nucléosomes de la cellule mère sont désassemblés. Pour assurer une héritabilité mitotique de ces marques, les histones parentales sont transmises aux nucléosomes des nouveaux ADNs synthétisés (Groth *et al.* 2007). Lors de cette étape, les dimères H3 et H4 de la cellule mère s'incorporent aux deux ADNs des futures cellules filles en s'associant à des dimères d'histones H3 et H4 venant d'être synthétisés, pour former des tétramères (Groth *et al.* 2007)). Dans ce processus, de nombreuses protéines jouent un rôle important (Figure 9). On retrouve notamment le facteur d'assemblage de la chromatine 1 (CAF1), une protéine chaperonne du dimère H3.1 et H4, qui est recruté au niveau du site de réplication de l'ADN par le biais de son interaction avec l'APNC ainsi que plusieurs autres facteurs modificateurs des histones (Shibahara and Stillman 1999; Zhang *et al.* 2000). Ce tétramère d'histones H3-H4 sera ensuite complété par deux dimères d'histones H2A et H2B pour former un nucléosome.

Les mécanismes impliquant la transmission d'ARNs au cours de la division cellulaire sont à ce jour encore très peu connus. Chez la souris, deux types d'ARN ont été identifiés : un premier de petite taille accumulé durant la mitose, et un second type dont les fragments d'une taille variable s'accumule durant la phase G1. Cependant, la fonction de ces ARNs est encore mal connue (Lu and Gilbert 2007).



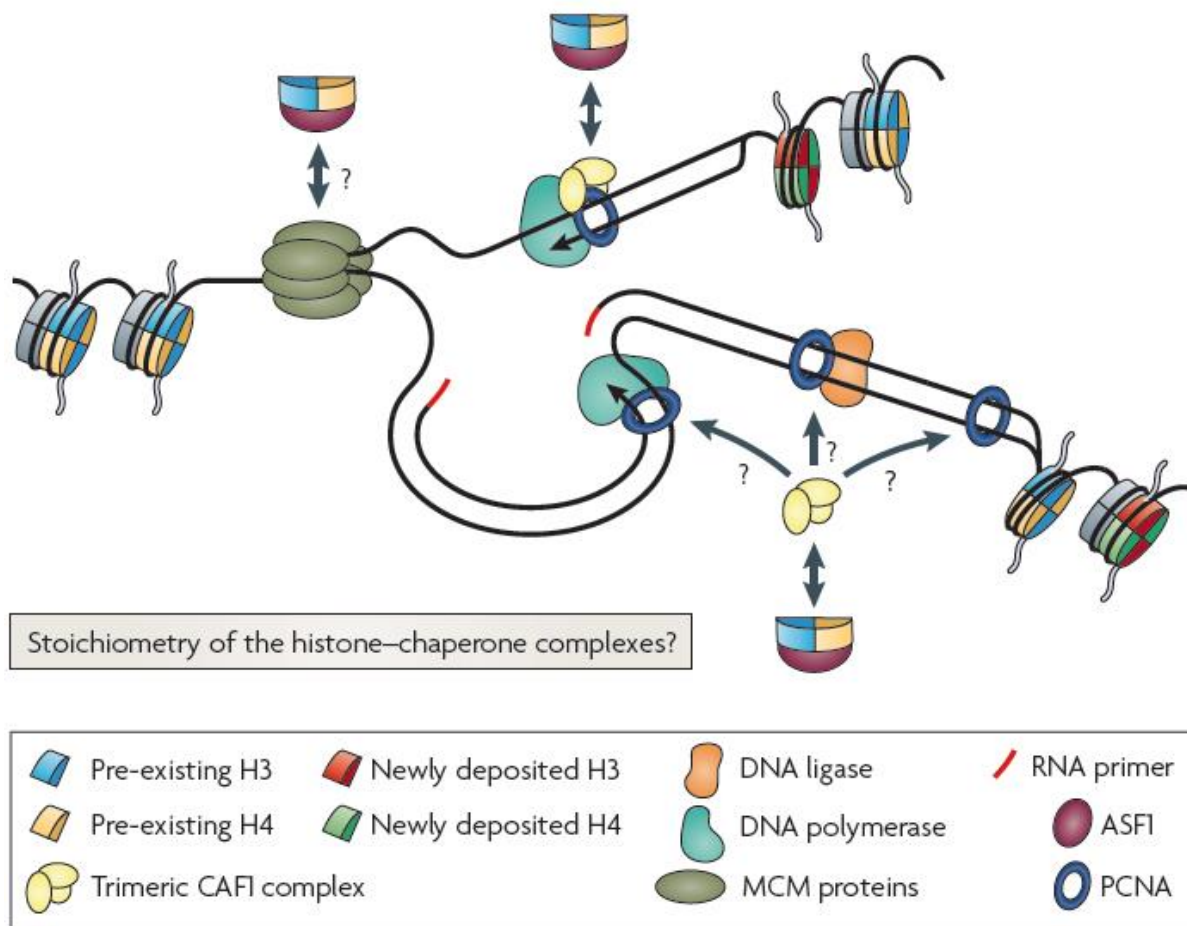


Figure 9. Facteurs protéiques interagissant au niveau de la fourche de réplication selon Margueron and Reinberg (2010). Le complexe de maintenance mini-chromosome (MCM) est une hélicase qui va séparer les deux brins d'ADN. La synthèse du brin codant (en haut) se fait par l'ADN polymérase-ε qui interagit avec l'APNC ainsi que le facteur d'assemblage de la chromatine 1 (CAF1) afin de répliquer la séquence de 5' à 3' dans le sens de la lecture. En revanche, la synthèse du brin complémentaire se fait par étapes. En effet, l'ADN polymérase-δ synthétise également dans le sens 5' à 3', qui est cependant dans ce cas le sens inverse de lecture du fragment. Les fragments du brin complémentaire sont synthétisés grâce à la ligation d'amorces d'ARN, et liés entre eux par l'ADN ligase.

### 3.1.2. Héritabilité transgénérationnelle

L'héritabilité des marques épigénétiques de la génération parentale à la descendance s'inscrit dans un contexte particulier.

En effet, suite à la fusion des deux gamètes, l'ADN des deux parents subit une déméthylation massive accompagnée de modifications des marques présentes sur les histones (Hackett and Surani 2013). Cependant, chez le poisson zèbre par exemple, il existe des mécanismes protégeant les profils de méthylation présents sur l'ADN paternel alors que l'ADN maternel subit les vagues de déméthylation intensive et de méthylation *de novo* (Jiang

### Chapitre 1.3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

*et al.* 2013; Potok *et al.* 2013). Ce phénomène est important puisque la reprogrammation des marques épigénétiques permet aux cellules souches embryonnaires d'acquérir la totipotence nécessaire à la production des différentes lignées cellulaires au cours du développement (Jablonka and Lamb 1998). Un autre mécanisme de transmission héréditaire des marques de méthylation concerne l'empreinte parentale. Ce phénomène a été mis en évidence chez la souris, où certains gènes sont exprimés chez la progéniture de façon dite monoallélique, c'est-à-dire que seul un des allèles (maternel ou paternel) a un statut transcriptionnel actif (Bartolomei *et al.* 1993). Cependant, pour le cas des gènes soumis à l'empreinte parentale, la transmission de ces marques ne s'effectue que d'une génération à la suivante puisqu'elles sont effacées et remplacées par de nouvelles au cours de la gamétogenèse (Gregg *et al.* 2010).

Corrélativement, certaines marques présentes sur les histones peuvent être transmises à la descendance mais les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus. Chez des souris mâles au régime alimentaire faible en protéines, une diminution des marques répressives de méthylation H3K27me3 a été mesurée à certains locus de l'ADN des gamètes (Carone *et al.* 2010). Cependant, la succession des événements conduisant à cette transmission est encore peu connue. Il semblerait que le statut d'expression de gènes dans les gamètes mâles étant régulé par certaines marques sur les histones, peut être transmis à la descendance (Ng and Gurdon 2008; Rechtsteiner *et al.* 2010) et même corrélé au niveau d'expression au stade adulte (Arico *et al.* 2011).

Les ARNs non codants sembleraient également jouer un rôle dans le transfert générationnel et notamment dans le maintien de la répression de l'expression de certaines parties du génome telles que les transposons chez la souris (Castel and Martienssen 2013). Effectivement, les piARN (associés à des protéines argonautes de la famille PIWI) ont un rôle important dans la lignée germinale mâle où ils permettent le maintien de la méthylation de transposons dans la descendance (Watanabe *et al.* 2011). Cependant, chez les vertébrés, la caractérisation du transfert d'information par le biais des ARN non codants reste encore à explorer.

### 3.2. Implication dans le développement

### Chapitre 1.3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

Au cours du développement embryonnaire, la capacité des cellules souches à engendrer différentes lignées cellulaires diminue. Ce phénomène est induit par la répression de l'expression de nombreux gènes, ces cellules passant de totipotentes (stade morula), à pluripotentes (cellule souche embryonnaire), puis multipotentes (cellule souche fœtale et adulte) jusqu'à l'omnipotence (cellule précurseur d'une lignée cellulaire) (Tollervey and Lunyak 2012). Au cours de ce processus, les gènes au statut transcriptionnel actif dans les premiers stades de cellule souche sont réprimés au profit de sous-groupes de gènes spécifiques au type cellulaire donné. Cette spécialisation au cours du développement se réalise sous l'action conjointe de nombreux facteurs de transcription, ainsi que des acteurs épigénétiques (Li 2002).

Une des caractéristiques des cellules souches embryonnaires observée par Meshorer et ses collaborateurs (2006) réside dans l'état de compaction de la chromatine. En effet, dans ces cellules, la chromatine est très lâche, et peu de marques associées à l'état d'hétérochromatine sont présentes (e.g. tri-méthylation de la lysine en position 9 de l'histone H3 (H3K9me3)). Cet état de chromatine ouverte confère aux cellules souches un statut transcriptionnel globalement actif, et contribuerait à la plasticité développementale, ou pluripotence, de ces cellules (Rasmussen 2003). Au cours de la différenciation cellulaire, une réorganisation globale de la chromatine prend place, la spécialisation s'accompagnant d'une augmentation de la fraction d'hétérochromatine au sein de la molécule d'ADN (Meshorer *et al.* 2006). Cette réorganisation chromatinienne s'accompagne également de profondes modifications des profils de méthylation. Durant les premières divisions cellulaires s'opère une perte rapide des marques de méthylation de l'ADN, perte supposée être induite par les modes d'actions actifs (cf. Figure 7, (Rai *et al.* 2008; Popp *et al.* 2010)). De ce fait, en raison de la levée de répression, les gènes essentiels au développement des cellules souches embryonnaires (e.g. *Nanog* et *Oct3/4*) se retrouvent de nouveau actifs (Yamanaka 2009). Ceci est notamment justifié par le niveau d'expression élevé de *Tet1*, qui est corrélé au niveau élevé des formes de cytosines 5-hmC et d'expression de gènes (e.g. *Esrrb*, *Prdm14*, *Dppa3*, *Klf2*, *Tcl1* et *Zfp42*) impliqués dans la pluripotence (Ficz *et al.* 2011). En revanche, au cours de la spécialisation de ces cellules, une nette diminution de l'abondance des enzymes de la famille TET a été observée par Ficz et ses collaborateurs (2011). Ceci est accompagné d'une augmentation du niveau de méthylation dans les régions

### **Chapitre 1.3.** Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

promotrices régulant l'expression des gènes de la pluripotence, phénomène qui serait directement associé à la transition de pluri- à omnipotence.

Aux variations conjointes de modifications des histones et des marques de méthylation s'ajoute la participation active des ARN non codants. Marson et ses collaborateurs (2008) ont mis en évidence l'association des facteurs régulateurs de la pluripotence (e.g. OCT3/4, SOX2 et NANOG) avec les régions promotrices de nombreux miARNs régulant ainsi leur expression. De plus, l'expression de nombreux miARNs appartenant aux familles miR-290 ou encore Let-7, sont impliqués dans le devenir des cellules souches embryonnaires. Notamment, les miARNs appartenant à la famille miR-290 sont impliqués dans le maintien des capacités de pluripotence des cellules souches embryonnaires. Ils contrôlent notamment l'expression des facteurs répresseurs du cycle cellulaire des cellules embryonnaires tels que CDKN1A, RBL2 et LASTS2 (Wang *et al.* 2008). A l'opposé, les membres de la famille Let-7 ont une action antagoniste. Ces miRNAs sont impliqués dans la répression de la synthèse des protéines C-MYC, SALL4 et LIN24, induisant une perte de maintien de l'état de cellule souche embryonnaire, perte concomitante à la différenciation de ces cellules (Melton *et al.* 2010).

### 3.3. Les mécanismes épigénétiques en réponse au stress

Pour un organisme donné, les changements apparaissant au sein de l'environnement dans lequel il évolue peuvent constituer une source de stress. Si le stress est transitoire, des mécanismes d'acclimatation s'instaurent conférant à l'organisme une certaine plasticité phénotypique permettant de faire face à cette perturbation jusqu'à ce qu'elle se dissipe. En revanche, si l'environnement est modifié de façon permanente, l'organisme devra y faire face de manière persistante, et se mettront alors en place d'autres mécanismes dits d'adaptation, qui contrairement à ceux d'acclimatation, sont des modifications permanentes des traits phénotypiques. Ces deux types de modifications peuvent être associés dans certains cas à des variations des marques épigénétiques, pouvant même être transmises sur plusieurs générations permettant ainsi l'adaptation des organismes aux perturbations environnementales.

Une étude menée par Anway et ses collaborateurs (2005) a mis en évidence l'effet de l'exposition à des perturbateurs endocriniens chez des rates gestantes. L'exposition de la

### Chapitre 1.3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

descendance au vinchlozine durant la période gestationnelle de différenciation sexuelle induit une diminution de la fertilité et la production de spermatozoïdes chez les mâles. Ces effets ont pu être associés à des modifications des marques de méthylation dans l'ADN génomique des gamètes mâles qui ont pu être transmises aux trois générations suivantes. Dans la même lignée, d'autres polluants environnementaux tels que le bisphénol A (BpA) (Manikkam *et al.* 2013), le kérosène (Tracey *et al.* 2013) ou le dichlorodiphényltrichloroethane (DDT) (Skinner *et al.* 2013) ont montré chez le modèle rongeur leur potentiel perturbateur des marques épigénétiques. Les effets délétères ont pu être observés sur plusieurs générations et sont associés à des perturbations des profils de méthylation dans les régions promotrices de nombreux gènes.

Une autre étude menée chez le rat, indique que le comportement maternel vis-à-vis de sa portée (attentionné ou distant) induit chez la progéniture adulte, différents phénotypes de réponse au stress et à l'anxiété (Francis *et al.* 1999). Weaver et ses collaborateurs ont montré que ces phénotypes sont induits par des variations dans les profils de méthylation et d'acétylation des histones dans la région promotrice du gène *Nr3c1* (Weaver *et al.* 2004), ainsi qu'un niveau d'expression de ce gène perturbé (Weaver *et al.* 2006). En effet, ce gène encode pour le récepteur aux glucocorticoïdes, qui est faiblement exprimé dans la descendance délaissée par la mère, en raison de marques épigénétiques stables à l'âge adulte, ainsi que des phénotypes comportementaux altérés.

Ces études témoignent de l'importance de l'interaction entre un organisme et son environnement (*largo sensu*). Les marques épigénétiques jouent un rôle important dans l'empreinte de cette interaction sur l'organisme, pouvant même altérer le phénotype sur plusieurs générations.

#### 3.4. Rôle dans la cancérogenèse

Les aberrations de méthylation de l'ADN sont des événements importants dans le développement de pathologies cancéreuses. Dans le processus de cancérogenèse, on retrouve principalement deux types d'aberrations : (i) l'hyperméthylation des régions promotrices régulant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, (ii) l'hypométhylation du génome conduisant à l'instabilité génétique et/ou à l'expression d'oncogènes.

### Chapitre 1.3. Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

En effet, dans une revue écrite Jones (2003), il y est décrit l'importance de la méthylation dans les gènes suppresseurs de tumeurs, et notamment pour les gènes *p14*, *p15* et *p16* qui contiennent de nombreux îlots CpG dans leurs régions promotrices ainsi que dans leurs premiers exons. Par exemple, dans le cas des tumeurs du colon, le niveau de méthylation du promoteur et des premiers exons des gènes *p14* et *p16* est très élevé (Burri *et al.* 2001). En revanche, dans le cas d'une leucémie, le promoteur du gène *p16* n'est jamais méthylé alors que le gène *p15* l'est (Gonzalez-Zulueta *et al.* 1995).

L'hypométhylation globale du génome survient notamment au niveau des séquences répétées, entraînant une instabilité génomique par les processus de réarrangements chromosomiques (Eden *et al.* 2003), ainsi que des rétrotransposons, qui sont activés et se transposent dans différentes régions du génome augmentant son instabilité (Howard *et al.* 2008). Ce phénomène d'hypométhylation globale survient notamment dans le syndrome ICF (« *Immunodeficiency, Centromeric region instability and Facial anomalies* ») qui est induit par une mutation dans le gène *dnmt3b* rendant l'enzyme non fonctionnelle, ceci étant lié à une hypométhylation du génome et une instabilité chromosomique (Ehrlich 2003).

Des modifications des histones sont aussi impliquées dans la survenue de nombreux cancers. Parmi ces modifications, on dénote notamment la perte d'acétylation sur la lysine 16 de l'histone 4 ainsi que la triméthylation sur la lysine 20 de cette même histone (Fraga *et al.* 2005). La perte d'acétylation, associée à la répression de l'expression de gènes, est induite par l'activité des histones déacétylases, enzymes souvent surexprimées dans de nombreux cancers (Halkidou *et al.* 2004; Song *et al.* 2005). A ces variations s'ajoute également l'apparition de marques aberrantes de méthylation sur les lysines 9 et 27 de l'histone H3 (Nguyen *et al.* 2002). Ces marques sont associées dans de nombreux cancers, à des niveaux importants d'enzymes transférant les groupements méthyles sur les histones (Kondo *et al.* 2007).

De nombreuses études mettent également en évidence le rôle des miARNs dans la cancérogenèse. Les miARN peuvent agir en tant que suppresseurs de tumeur ou en tant qu'oncogènes selon le gène dont ils régulent l'expression. Par exemple, les micros ARN *mir15* et *16* régulant l'expression du gène *BCL2* (un gène anti-apoptotique), sont réprimés dans le cas d'une leucémie lymphocytaire chronique, et le micro-ARN *let-7*, qui régule

**Chapitre 1.3.** Importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation des fonctions biologiques

l'expression de l'oncogène *RAS*, est réprimé dans le cancer du poumon (Kluiver *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007).

Pour ces raisons, les facteurs épigénétiques, et notamment la méthylation de l'ADN, sont devenus des cibles potentielles pour les thérapies anticancéreuses.





---

---

## **Chapitre 2. Objectifs et stratégies expérimentales du programme de recherche**

---



*Ce chapitre présente les objectifs de recherche associés aux mécanismes épigénétiques dans le contexte de la radioécologie, ainsi que les choix effectués concernant les substances radioactives, les modèles biologiques et les paramètres biologiques étudiés.*



## 1. Les mécanismes épigénétiques dans le cadre de la radioécologie

Ces travaux de recherche s'intègrent dans le cadre du projet européen COMET (« COordination and iMplementation of a pan-Europe instrument for radioecology », 7<sup>ième</sup> PCRD EURATOM) dont l'une des actions de recherche vise à développer des outils et biomarqueurs sensibles à l'exposition chronique à de faibles niveaux d'éléments radioactifs. Dans ce cadre, ce projet est axé plus particulièrement sur la méthylation de l'ADN et sur les processus biologiques associés à ces modifications épigénétiques. Deux études menées sur le site de Tchernobyl ont mis en évidence chez *Pinus sylvestris* et *Arabidopsis thaliana* l'apparition de réponses épigénétiques (méthylation de l'ADN) suite à l'exposition aux substances radioactives (Kovalchuk *et al.* 2003; Kovalchuk *et al.* 2004). Toutefois, aucune donnée n'est disponible pour les animaux et notamment les vertébrés, dans un tel contexte d'exposition.

Comme cela a été présenté au cours du premier chapitre, les mécanismes épigénétiques sont des modifications transitoires ou pérennes de l'expression de l'ADN. La mise en place de ces modifications se fait rapidement suite à l'apparition d'un stress dans l'environnement, pouvant ainsi conférer à l'organisme étudié une adaptation au stress, et peuvent également être transmises au fil des générations.

Ainsi, évaluer les effets des faibles niveaux de substances radioactives sur les mécanismes épigénétiques chez des modèles vertébrés permettra: (i) d'amener de précieuses données sur l'utilisation des marqueurs épigénétiques en tant que biomarqueurs d'exposition aux substances radioactives, (ii) de mettre en évidence des liens entre ces modifications épigénétiques et l'adaptation des organismes aux stress environnementaux ainsi qu'avec (iii) les possibles effets de ces expositions au cours des générations.

Compte-tenu du manque de connaissance sur l'épigénétique dans le domaine de la radioécologie, ce projet de thèse a été axé sur l'étude de ces mécanismes en réponse à l'exposition aux substances radioactives dans deux contextes d'expositions. Ces deux contextes d'exposition sont bien distincts, mais cependant, ils sont représentatifs de la majorité des problématiques d'expositions chroniques en radioécologie.

## **Chapitre 2. 1. Les mécanismes épigénétiques dans le cadre de la radioécologie**

Nous pourrions alors déterminer l'importance des mécanismes épigénétiques dans les réponses biologiques des organismes à l'exposition à de faibles niveaux de substances radioactives, et évaluer l'importance de ces réponses au cours des générations.

## 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

### 2.1. Premier contexte d'exposition

#### 2.1.1. *Exposition liée à l'exploitation minière uranifère*

L'uranium est un radioélément appartenant à la famille des actinides. C'est un radioélément dit primordial puisqu'il est présent dans la croûte terrestre, et ce depuis la formation de la Terre. Cet élément radioactif est notamment un émetteur alpha à faible niveau d'activité qui participe, avec les autres radioéléments primordiaux, au rayonnement tellurique.

Un des facteurs principaux de la contamination uranifère des écosystèmes est lié à l'exploitation des mines d'uranium pour son utilisation dans le cycle du combustible nucléaire. En France, les activités d'extraction de l'uranium des roches uranifères ont été stoppées en 2001, cependant, la contamination des hydrosystèmes perdure. Cela est notamment dû à deux raisons : (i) les résidus de roche générés lors de l'extraction, appelés stériles, ont été entreposés à même le sol et peuvent contenir jusqu'à 100 grammes d'uranium par tonne qui peuvent être remobilisés lors d'épisodes pluvieux, et *in fine*, contaminer les écosystèmes en aval de ces eaux d'écoulements, (ii) l'effort de réhabilitation des anciens sites miniers, qui ont été inondés pour faciliter le traitement chimique des résidus radioactifs, dont les eaux d'écoulement peuvent à terme atteindre et contaminer les hydrosystèmes avoisinants. Dans ce contexte général, en France, certains cours d'eau sous l'influence de ces rejets miniers peuvent présenter des concentrations de plusieurs dizaines de microgrammes d'uranium par litre (Herlory *et al.* 2013; Gagnaire *et al.* 2015).

#### 2.1.2. *Effets biologiques connus chez le poisson zèbre*

De nombreuses données ont été acquises chez le poisson zèbre lors d'expositions à de faibles concentrations en uranium par voie directe. Un inventaire des effets observés est

## **Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives**

présenté dans le Tableau 1. Effets observés lors d'études réalisées au laboratoire chez le poisson zèbre exposé à différentes concentrations d'uranium.

Il ressort de la synthèse de ces études un impact significatif de l'exposition sur différents niveaux biologiques. Les données histologiques témoignent d'une altération de la structure des tissus tels que les gonades, le cerveau et les organes sensoriels. La toxicité de cette exposition s'exprime également sur la fonction reproductrice avec un retard à l'éclosion, une diminution de la croissance et de la survie de la descendance aux plus fortes concentrations ( $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Egalement, les analyses de génotoxicité ont permis de mettre en évidence des dommages à l'ADN génomique des cellules sanguines et germinales. A l'échelle moléculaire, de nombreuses activités protéiques sont perturbées et notamment au niveau du système cholinergique, de la lutte contre le stress oxydant ou de la respiration mitochondriale. Enfin, la réponse à la contamination a également pu être observée par l'étude de l'expression de nombreux gènes, perturbée dans plusieurs tissus (cerveau, muscle, foie, etc...).



## Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

**Tableau 1. Effets observés lors d'études réalisées au laboratoire chez le poisson zèbre exposé à différentes concentrations d'uranium.**

Etude	Concentration U	Temps d'exposition	Organe étudié	Effets observés
Barillet <i>et al.</i> (2005)	20, 100, 500 µg.L <sup>-1</sup>	12 h, 36 h, 72 h, 5 j, 10 j et 20 j	Cerveau	Génotoxicité
Barillet <i>et al.</i> (2005)	100 µg.L <sup>-1</sup>	20 j	Cerveau	Neurotoxicité (Activité AChE) et perturbation de l'activité des enzymes du stress oxydant
Bourrachot <i>et al.</i> (2008)	20, 50, 100, 150, 250, et 500 µg.L <sup>-1</sup>	Stade œufs (durant 15 j)	Embryon et Larve	Toxicité développementale (retard éclosion, croissance et mortalité)
Lerebours <i>et al.</i> (2009)	23 et 130 µg.L <sup>-1</sup>	3, 10, 21, 28 j et 8 j eau claire	Cerveau	Impacts transcriptomiques (e.g. gènes du stress oxydant, réparation ADN)
Barillet <i>et al.</i> (2010)	100 µg.L <sup>-1</sup>	20 jours	Gonades	Impacts histologiques (Spermatozoïdes)
Lerebours <i>et al.</i> (2010a)	15 et 100 µg.L <sup>-1</sup>	3 et 10 j	Cerveau (Bulbe olfactif)	Impacts transcriptomiques et histologiques
Lerebours <i>et al.</i> (2010b)	30 et 100 µg.L <sup>-1</sup>	10 et 28 j	Cerveau	Impact histologiques et sur la respiration mitochondriale (sur les niveaux protéiques et d'expression de gènes)
Barillet <i>et al.</i> (2011)	20, 100, 500 µg.L <sup>-1</sup>	12 h, 36h, 3 j, 5 j, 10 j	Cerveau	Génotoxicité, neurotoxicité (Activité AChE) et perturbation de l'activité des enzymes du stress oxydant
Faucher <i>et al.</i> (2012)	250 µg.L <sup>-1</sup>	10 j expo, 23 j eau claire	Organes sensoriels (cerveau, rosette olfactives, neuromastes)	Impacts histologiques
Bourrachot <i>et al.</i> (2014)	20 et 250 µg.L <sup>-1</sup>	20 j	Gonades et descendance	Génotoxicité, impacts histologiques et toxicité sur la reproduction et le développement de la descendance

## Chapitre 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

### 2.1.3. Objectifs de recherche

Afin d'étudier les réponses épigénétiques pouvant survenir dans ce premier contexte d'exposition chronique aux substances radioactives, nous avons décidé d'utiliser l'uranium appauvri. C'est un sous-produit de l'industrie du nucléaire dont le mélange isotopique présente une proportion des isotopes  $^{234}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$  plus faible, par conséquent une activité radiologique inférieure à celle du mélange isotopique naturel. Sa toxicité est majoritairement chimique, et ne pourra être délivrée qu'après son internalisation dans les organismes exposés (exposition dite interne). Ce volet expérimental comprend des expériences en laboratoire sur le poisson zèbre (*Danio rerio*) exposé à différentes concentrations dissoutes d'uranium appauvri étant représentatives de concentrations mesurées dans l'environnement

Des études en laboratoire ont été mises en œuvre afin de répondre à plusieurs questions de recherche : (i) déterminer la cinétique d'apparition des réponses épigénétiques à différentes concentrations en uranium appauvri, (ii) définir l'importance du sexe des poissons dans la nature des réponses observées, (iii) étudier le transfert générationnel de ces marques en lien avec la toxicité de l'uranium appauvri.

Lors de ce premier volet expérimental, les techniques d'étude des réponses épigénétiques sur un modèle biologique au génome séquencé (le poisson zèbre) ont été mises au point, permettant ainsi de les appliquer dans le cadre du second volet expérimental.

### 2.1.4. Choix des concentrations d'exposition en laboratoire

L'étude des effets de l'exposition à l'uranium appauvri a été réalisée en deux étapes, chacune représentant une expérience visant à répondre à des questions scientifiques complémentaires.

La première expérience avait pour but de déterminer si : (i) une exposition chronique à deux faibles concentrations en uranium appauvri pouvait modifier les profils de méthylation,

## Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

(ii) la réponse épigénétique pouvait être dépendante du sexe, (iii) l'impact sur les marques épigénétiques pouvait varier selon la fonction physiologique de l'organe étudié.

Pour cela, nous avons exposé des poissons zèbre adultes à deux concentrations d'uranium appauvri qui nous permettent d'une part : (i) de mimer en laboratoire une exposition chronique à des concentrations pertinentes d'un point de vue radioécologique, et d'autre part, (ii) de se placer à un niveau d'exposition relativement faible auquel les mécanismes épigénétiques sont rapidement activés.

Les concentrations reflètent une réalité écologique puisque la première concentration de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  est comprise dans la fourchette du bruit de fond géochimique en Europe qui est de 0,2 à  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Garnier-Laplace *et al.* 2001), alors que la concentration de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  est une concentration que l'on peut retrouver dans les cours d'eau ou lacs soumis à des rejets d'anciens sites miniers (Herlory *et al.* 2013; Gagnaire *et al.* 2015).

Cette première expérience nous a permis de déterminer la pertinence de l'étude des profils de méthylation de l'ADN génomique en réponse à la contamination chronique à deux concentrations environnementales d'uranium appauvri, une étude de faisabilité puisque nous ne savions pas si une telle exposition pouvait être à même de susciter une réponse épigénétique, ni si les temps d'exposition, les organes étudiés et des outils moléculaires employés étaient adaptés à la détection de cette réponse.

Après avoir répondu au premier objectif, nous avons donc décidé d'étudier le transfert générationnel de ces marques épigénétiques chez une descendance issue de parents exposés relativement à une descendance de parents témoins. Effectivement, ayant observé des variations dans les gonades, nous pouvions supposer une possible transmission de ces marques à la descendance.

Ainsi, après avoir identifié le plus de réponses épigénétiques pour la concentration d'exposition de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ , nous avons décidé de réaliser une seconde expérience d'exposition de poisson zèbre adulte afin de pouvoir : (i) corroborer les résultats de la première expérience, (ii) étudier le transfert générationnel des marques épigénétiques.

### 2.2. Deuxième cas d'exposition

## Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

### 2.2.1. *Exposition aux radiations ionisantes dans un contexte post-accidentel*

A la radioactivité naturelle décrite dans le paragraphe précédent, s'ajoute l'enrichissement par les activités anthropiques. On retrouve notamment dans ce contexte un enrichissement en radionucléides, éléments radioactifs artificiels générés par les activités industrielles humaines, et notamment en lien avec le cycle du combustible nucléaire. Les sources d'enrichissement sont nombreuses (e.g. l'armement militaire, le fonctionnement des centrales électriques, la gestion et le traitement des déchets radioactifs, le secteur du médical, etc...) mais les rejets les plus importants sont ceux survenus suite à des accidents nucléaires. Lors de l'accident de Tchernobyl (1986), l'émission de radioactivité a été estimée entre  $9,4$  à  $12,4 \times 10^{18}$  Bq (Yablokov *et al.* 2009), et pour l'accident de Fukushima (2011), l'activité engendrée par l'émission de césium seul a été estimée à  $1.5 \times 10^{16}$  Bq (NERH 2011).

Parmi les radionucléides émis, de nombreux ont une courte durée de vie (e.g. isotope de l'iode) et ne sont radioactifs que durant une certaine période (6 à 12 mois) durant laquelle les organismes sont exposés à de hauts niveaux de radioactivité, soit par voie externe (rayonnement gamma) soit par voie interne (ingestion/inhalation des substances radioactives et exposition aux rayonnements alpha, beta et gamma), engendrant des effets importants en terme de mortalité et de tératogénicité. Par la suite, les expositions sont à des niveaux plus faibles, et à long terme, l'exposition est dite chronique, avec des effets plus diversifiés sur les populations non-humaines.

Dans le contexte post-accidentel de la centrale nucléaire de Fukushima Daiichi, le radionucléide contribuant majoritairement à la dose chronique est l'isotope 137 du césium ( $^{137}\text{Cs}$ ). C'est un émetteur majoritairement beta mais possédant également une activité gamma, permettant de détecter sa présence par spectrométrie gamma.

### 2.2.2. *Effets biologiques connus*

Suite aux accidents nucléaires, les organismes non-humains exposés à la radioactivité sont fortement impactés. Un grand nombre d'études ont été menées sur le site de Tchernobyl suite à l'accident survenu en 1986, dont certaines sont compilées dans deux

## Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

revues de la littérature parues 20 années après l'accident (Møller and Mousseau 2006; Geras'kin *et al.* 2008).

De nombreux effets ont pu être observés sur plusieurs espèces d'animaux, tels que les amphibiens, les poissons, les mammifères ou encore les oiseaux, avec particulièrement des impacts au niveau du matériel génétique. On dénote notamment lors d'expositions *in situ* une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques (Savchenko 1995; Eliseyeva *et al.* 1996; Pomerantseva *et al.* 1997; Ryabokon and Goncharova 2006), de mutations (Sugg *et al.* 1996; Baker *et al.* 1999; Wickliffe *et al.* 2002), et d'adduits à l'ADN (Ellegren *et al.* 1997; Bonisoli-Alquati *et al.* 2010).

Concernant le contexte de l'accident de Fukushima, peu d'études sont présentes dans la littérature, la majorité ayant été réalisée sur un papillon endémique (*Zizeeria maha*) (Hiyama *et al.* 2012; Hiyama *et al.* 2013; Iwata *et al.* 2013; Nohara *et al.* 2014; Taira *et al.* 2014; Hiyama *et al.* 2015). Ces auteurs ont mis en évidence un impact de cette exposition sur le taux de malformations observé chez des papillons prélevés *in situ*. Quelques études ont également été réalisées par Mousseau, Møller, et leurs collaborateurs (Bonisoli-Alquati *et al.* 2015; Møller *et al.* 2015a; Møller *et al.* 2015b) qui ont souligné une corrélation entre la diminution de l'abondance de différentes espèces d'oiseaux dans les zones contaminées et l'augmentation de la dose ambiante. De plus, cette corrélation est plus importante sur le site de Fukushima que sur celui de Tchernobyl.

Cependant, au sein de ces études, il y a une grande hétérogénéité dans le mode d'évaluation de l'exposition aux radionucléides. En effet, la majorité de ces études ne prennent en compte que le débit de dose radiologique ambiant mesuré dans l'interprétation des effets biologiques observés, entraînant un biais dans l'estimation de la dose radiologique totale absorbée par les organismes, et de la relation dose-effet. Egalement, en raison de la récence de l'accident survenu à Fukushima, il en ressort un manque de données à l'échelle moléculaire sur les individus exposés de manière chronique.

### 2.2.3. Objectifs de recherche

## Chapitre 2. 2. Contextes d'exposition aux substances radioactives

A l'heure actuelle, très peu de données précises sur les niveaux d'accumulation des radionucléides et les dommages individuels à l'échelle moléculaire sont disponibles suite à des expositions chroniques à de faibles niveaux de radioactivité. Dans le cadre de ce projet de thèse, ce second volet expérimental vise donc à : (i) valider les outils développés en laboratoire pour l'étude des mécanismes épigénétiques dans un contexte d'exposition aux substances radioactives réel, (ii) étudier les réponses épigénétiques chez un modèle biologique exposé dans son habitat naturel de manière chronique à de faibles niveaux d'activité radiologique.

Pour cela, les études ont été réalisées sur des échantillons de muscles prélevés sur des grenouilles arboricoles Japonaises (*Hyla japonica*) lors d'une campagne d'étude des effets des émissions radioactives survenues lors de l'accident nucléaire de Fukushima. Cette campagne est intégrée dans le cadre du projet COMET ainsi que dans le cadre du projet NEEDS *Hyla japonica*, projet qui s'intéresse à l'impact de l'exposition sur les traits sexuels secondaires et les aspects biochimiques associés, chez la rainette arboricole.

Parmi les sites de prélèvements, quatre ont été retenus (1 témoin et 3 contaminés de manière croissante) et 10 individus par site ayant reçu un débit de dose homogène ont été sélectionnés afin d'étudier la relation dose/réponse.

### 3. Description des modèles biologiques

#### 3.1. Le poisson zèbre : modèle de laboratoire

##### 3.1.1. *Biologie et écologie*

Le poisson zèbre *Danio rerio* (Figure 10), est un vertébré aquatique considéré comme modèle biologique de référence pour les études en écotoxicologie d'eau douce et recommandé par de nombreuses normes internationales (ISO 1996a, 1996b, 1996c; OCDE 2004a, 2004b, 2004c).



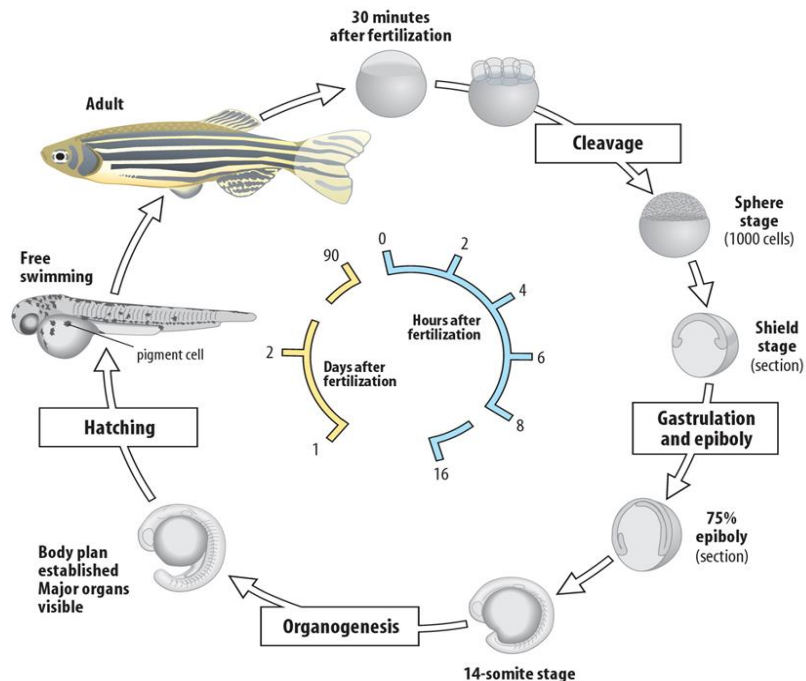
Figure 10. Photographie d'un poisson zèbre mâle et femelle.

Il appartient à la plus grande des familles de poissons d'eau douce, les cyprinidés (Tableau 2). L'habitat naturel du poisson zèbre se situe au niveau des bassins hydrofluviaux du Gange et du Brahmapoutre situés au nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Népal. Le poisson zèbre vit dans des eaux de visibilité réduite, à faible courant ou stagnantes souvent proches des rizières. Les poissons occuperaient toute la colonne d'eau. Ce poisson omnivore se nourrit principalement de zooplancton, d'insectes et d'algues.

Tableau 2. Classification phylogénétique du poisson zèbre

<b>Super-classe</b>	Ostéichtyens	<b>Classe</b>	Actinoptérygiens
<b>Sous-classe</b>	Néoptérygiens	<b>Infra-classe</b>	Téléostéens
<b>Superordre</b>	Ostariophysiens	<b>Ordre</b>	Cypriniformes
<b>Superfamille</b>	Cyprinoidés	<b>Famille</b>	Cyprinidés
<b>Genre</b>	<i>Danio</i>	<b>Espèce</b>	<i>rerio</i>

Au laboratoire, l'élevage de cette espèce est relativement aisé. Il possède de nombreuses caractéristiques appuyant son utilisation à des fins expérimentales : son cycle de vie est court (adulte à partir de 3 mois dans les conditions optimales, Figure 11), il est de petite taille (cela facilite la maintenance en aquarium), il a une croissance rapide, la maturité sexuelle est acquise rapidement permettant les études sur plusieurs générations, le développement des œufs est externe (espèce ovipare), enfin, la translucidité des œufs et larves facilite les études sur les composés tératogènes. Ces critères font du poisson zèbre le modèle biologique le plus adapté à notre projet de recherche.



Source : [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_03/devo\\_03.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html)

Figure 11. Cycle de vie du poisson zèbre



## Chapitre 2. 3. Description des modèles biologiques

Cet organisme ayant fait l'objet de nombreuses études dans plusieurs domaines de recherche, de nombreux outils sont à notre disposition pour étudier les réponses biologiques à l'échelle moléculaire.

### 3.1.2. *Organes étudiés*

Trois organes ont été sélectionnés : le cerveau, les yeux et les gonades. Les deux premiers organes sont des organes somatiques qui sont impliqués dans de grandes fonctions biologiques, le troisième étant celui impliqué dans la reproduction.

Les yeux, organes de la vision, sont exposés au milieu externe, et peuvent donc subir d'importants dommages liés à l'exposition directe. Ils sont reliés par le nerf optique au cerveau qui intègre les informations captées par les photorécepteurs permettant à l'organisme d'évoluer dans son environnement. Etudier les réponses biologiques au niveau de cet organe nous permet de déterminer si l'exposition à l'uranium appauvri peut impacter la vision des organismes, allant de l'analyse des dommages histologiques aux modifications des profils de méthylation.

Le cerveau est un organe somatique crucial. Il est impliqué dans la régulation de la majorité des fonctions biologiques, telles que l'olfaction, la vision, la locomotion ou encore l'hormonologie. De nombreuses études menées au laboratoire ont montré la sensibilité de cet organe à l'exposition uranifère. Dans ce tissu, on dénote une accumulation faible de l'uranium, cependant, les effets biologiques associés à ces expositions sont importants. Effectivement, il a déjà été mis en évidence que l'expression de nombreux gènes ainsi que les fonctions de nombreuses protéines sont perturbées dans cet organe suite à l'exposition à de faibles concentrations en uranium appauvri (cf. Tableau 1).

Concernant les gonades, le tissu reproducteur joue un rôle majeur dans la transmission héréditaire du code génétique, mais aussi des marques épigénétiques, et notamment des profils de méthylation, qui peuvent être impliqués dans la propagation d'effets individuels à l'échelle d'une population. Chez le poisson zèbre, de nombreuses altérations du tissu reproducteur ont déjà été signalées suite à une exposition à l'uranium appauvri. Ainsi, établir la présence de modifications dans les profils de méthylation de l'ADN génomique des gonades permettrait d'envisager la transmission de ces variations à la descendance.

## Chapitre 2. 3. Description des modèles biologiques

Finalement, pour évaluer le transfert des marques épigénétiques d'une génération à l'autre, elles ont été étudiées dans la descendance de parents témoins ou exposés. Pour cela, la descendance a été échantillonnée à 7 stades de développement différents : post-fécondation (PF), 3,5 heures post-fécondation (hpf), 6 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf et 96 hpf. Le premier stade de développement constitue le stade œuf, suite à la fusion des deux gamètes. Le stade 3,5 hpf est un stade critique dans le développement, puisqu'il correspond à la transition dite de la mère au zygote. Effectivement, avant ce stade, le statut transcriptionnel du génome du zygote est inactif, et la synthèse protéique s'effectue à partir des ARNs messagers fournis par la mère. Ce n'est qu'après cette transition que le zygote commencera à synthétiser ses propres ARNs. Enfin, les cinq autres temps de prélèvement correspondent à des stades de référence dans l'étude du développement du poisson zèbre.

### 3.2. La grenouille arboricole Japonaise *Hyla japonica* : modèle biologique *in situ*

#### *3.2.1. Biologie et écologie*

La grenouille arboricole Japonaise, *Hyla japonica*, est un amphibien anoure (Figure 12). Elle présente un mode vie aquatique et terrestre, elle se trouve donc en permanence à l'interface eau/sédiment/sol. De plus, au printemps, la reproduction s'effectue en milieu aquatique, les adultes, puis les œufs et les têtards sont donc exposés aux contaminants présents dans l'eau et les sédiments des rizières.

Le reste de l'année, les adultes séjournent en milieu forestier, en contact étroit avec la litière et le sol, allant jusqu'à s'enfouir l'hiver dans les premiers centimètres du sol forestier. Comme de nombreux anoures, *H. japonica* a une peau très perméable qui favorise les échanges des gaz, de l'eau et des ions avec son environnement. En contrepartie, cette peau perméable rend les amphibiens vulnérables à de nombreux contaminants.

Cet organisme présente de nombreux atouts au regard des objectifs du projet. En effet, concernant la zone continentale, où la contamination a été la plus importante, l'occupation des sols est dominée en milieu montagnard par des forêts et en fond de vallée, par des rizières, qui sont deux habitats particulièrement recherchés par *Hyla japonica*.

## Chapitre 2. 3. Description des modèles biologiques

Cet organisme hiberne en s'enfouissant dans les premiers centimètres du sol, où sont majoritairement présents les radionucléides ayant été relargués lors de l'accident.

Cette espèce est largement répandue sur le territoire Japonais, est particulièrement abondante, non protégée et aisément capturable au moment de la reproduction. De plus les organismes se déplacent très peu en dehors du site de capture, facilitant ainsi le calcul du débit de dose absorbée par les organismes.



Figure 12. Photographie d'une grenouille arboricole Japonaise mâle

### 3.2.2. *Organes étudiés*

Lors de ce volet expérimental, les études moléculaires ont été menées sur le muscle tibial en raison de la grande quantité de matériel biologique disponible, permettant ainsi l'analyse de plusieurs paramètres biologiques par échantillon.

Au cours de cette campagne sur le terrain, seuls les mâles ont été échantillonnés car leur chant en période de reproduction permet de les localiser de nuit, à la différence des femelles.

## 4. Paramètres biologiques étudiés

## Chapitre 2. 4. Paramètres biologiques étudiés

Les paramètres biologiques décrits par la suite ont été choisis pour : (i) relier les effets observés à une quantité de substance radioactive internalisée et (ii) intégrer des approches à l'échelle moléculaire et macroscopique afin de pouvoir relier les effets depuis la molécule d'ADN jusqu'à la structure histologique des tissus d'intérêt.

### 4.1. Bioaccumulation de l'uranium

La bioaccumulation de l'uranium a été mesurée dans les organes étudiés, ainsi que dans le chorion et l'embryon des descendants, afin de pouvoir déterminer un lien possible entre les quantités mesurées et les effets observés. Les mesures ont été réalisées à différents temps de prélèvement et dans différents organes afin de pouvoir analyser les variations temporelles de l'accumulation de l'uranium relativement au rôle physiologique de l'organe cible.

### 4.2. Calcul du débit de dose

La combinaison de la mesure du niveau d'activité des radionucléides (exprimés en Bq par unité de masse) dans les échantillons prélevés (e.g. la carcasse des grenouilles, dans les prélèvements d'eau, de sol et de sédiment) avec l'utilisation du coefficient de conversion de dose (DCC, exprimé en  $\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  par Bq par unité de masse) a permis d'estimer la dose totale pondérée absorbée par chaque grenouille échantillonnée. Les DCCs ont été calculés pour l'exposition interne et externe à l'aide du logiciel EDEN v3. Ces calculs sont fonction de la forme et de la composition élémentaire d'une grenouille ainsi que des sources environnementales de rayonnements ionisants (ici, l'eau, le sol et les sédiments), pour un nombre donné de radionucléides (ici,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{110\text{m}}\text{Ag}$ ). De cette manière, nous avons pu obtenir pour chaque grenouille échantillonnée le débit de dose interne, externe et total absorbée par individu, la dose mesurée ayant été pondérée en relation avec la nature d'émission beta du  $^{137}\text{Cs}$ .

Ainsi, nous pourrions déterminer s'il existe une relation entre l'apparition des effets à l'échelle moléculaire et la dose totale pondérée absorbée par les organismes.

### 4.3. Génotoxicité

L'analyse des dommages à l'ADN permet de déterminer le potentiel génotoxique d'un contaminant. Le niveau d'intégrité du code génétique, conjointement avec l'efficacité des mécanismes de réparation, conditionnent le devenir cellulaire. Effectivement, l'apparition d'importants dommages à la molécule d'ADN peut être synonyme d'une altération des fonctions cellulaires. Ces dommages peuvent être réparés, mais s'ils ne le sont pas correctement, ils peuvent induire l'apparition de mutations et même mener à la mort cellulaire.

Afin d'étudier le potentiel génotoxique des substances radioactives auxquelles ont été exposés les modèles biologiques, plusieurs techniques ont été utilisées : le test gamma H2AX et le test des comètes chez le poisson zèbre, ainsi que l'analyse des dommages à l'ADN mitochondrial chez la grenouille arboricole Japonaise.

#### 4.3.1. *Mesure de la phosphorylation des histones H2AX*

Le test gamma-H2AX correspond à l'analyse des histones H2AX phosphorylées (Joubert 2008). La phosphorylation de l'histone H2AX survient lors de cassures double-brin à l'ADN, et permet de signaler l'apparition de ce type d'adduit afin qu'il soit pris en charge par la machinerie de réparation cellulaire. Cette technique est un immunohistomarquage des histones H2AX phosphorylées, permettant le décompte du nombre de cellules positives au test. Ce test a été réalisé sur des populations de cellules extraites de la rate des poissons. Le point fort de cette analyse est qu'elle permet d'étudier le nombre de cassures double-brin directement à l'échelle cellulaire, mais une des contraintes de cette analyse est qu'elle ne peut s'effectuer que sur tissus frais.

#### 4.3.2. *Mesure des dommages à l'ADN des cellules sanguines par l'essai des comètes*

Le test des comètes permet d'appréhender les lésions primaires de l'ADN (cassures simple- et double-brin, ainsi que les sites alcali-labiles) par une technique d'électrophorèse

## Chapitre 2. 4. Paramètres biologiques étudiés

sur gel. C'est une approche dite semi-quantitative fournissant un pourcentage d'altération à l'ADN. Ce test s'applique sur des cellules isolées étant incluses dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscope. Pour le cas des larves, une préparation est nécessaire, étape décrite par (Kosmehl *et al.* 2006). Après une étape de lyse, le matériel extranucléaire est entièrement dégradé, et il ne reste que la molécule d'ADN qui se retrouve sous la forme de nucléoïdes. L'appellation de ce test vient de la nature des résultats observés en cas de dommages à la molécule d'ADN. En effet, la migration de la molécule d'ADN s'effectue sous l'influence d'un champ électrique. Les molécules d'ADN qui sont endommagées vont migrer sous la forme d'une comète (Figure 13), avec dans la queue de la comète les fragments altérés, alors qu'une molécule intacte migrera d'un seul tenant. Ce phénomène est lié à l'état de condensation des nucléoïdes (plus relâchés lorsque l'ADN porte des lésions et compactes lorsque la molécule est intègre) et permet ainsi d'appréhender de manière semi-quantitative les atteintes génotoxiques en fournissant un pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes. Ce test a été effectué sur les cellules sanguines vivantes prélevées chez les poissons au cours de la dissection.

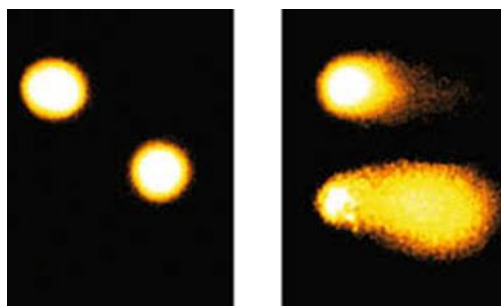


Figure 13. Observations des nucléoïdes durant le test des comètes. Echantillon contrôle à gauche, et endommagé à droite.

### 4.3.3. *Mesure des dommages à l'ADN mitochondrial par PCR quantitative*

Comme cela a été précisé précédemment, le test gamma H2AX et le test des comètes ne se réalisent que sur cellules vivantes. De ce fait, un test permettant d'analyser les dommages à l'ADN mitochondrial a été développé chez la grenouille arboricole Japonaise. Chez ce modèle amphibien, seule la séquence de l'ADN mitochondrial est connue. Nous avons donc décidé d'adapter une technique développée sur plusieurs modèles biologiques (Hunter *et al.* 2010) pour quantifier les dommages à l'ADN mitochondrial. Cette méthode est

## Chapitre 2. 4. Paramètres biologiques étudiés

basée sur l'amplification de deux fragments de l'ADN mitochondrial, un long mesurant 10,7 kilobases (kpb), et un court (compris dans la séquence du long) mesurant 200 pb. La technique consiste à réaliser des PCRs pour amplifier soit le long soit le court fragment. Ensuite, l'ajout d'un agent intercalant permet de mesurer la fluorescence, qui est relative au niveau de production des produits de PCR. Si les longs fragments sont endommagés, l'intensité de fluorescence va diminuer puisque les produits de PCR seront de faible taille, et que peu de molécules intercalantes s'y seront logées. En revanche, si l'intégrité est bonne, l'intensité de fluorescence sera identique chez les organismes témoins ou exposés. En faisant le rapport des intensités de fluorescence obtenues pour le long fragment, sur celles obtenues pour le court fragment, il est possible d'obtenir un ratio du nombre de lésions qui est directement relatif à l'intégrité du long fragment et donc de l'ADN mitochondrial. Cette technique permet donc de déterminer le nombre de lésions à l'ADN mitochondrial des individus, et de pouvoir rapporter ce niveau d'intégrité directement à la dose totale pondérée reçue par ces derniers.

### 4.4. Etude de la méthylation de l'ADN génomique

Dans le cadre de l'étude des réponses épigénétiques, nous avons décidé de nous focaliser sur le niveau de méthylation de l'ADN génomique. Comme cela a été présenté dans le premier chapitre, la méthylation de l'ADN génomique est un marqueur sensible de réponse aux stress environnementaux. Ce marqueur épigénétique est celui qui a été le plus étudié, et de ce fait, de nombreuses techniques ont été développées. Deux techniques ont été sélectionnées, techniques parfaitement appropriées à ces problématiques et aux contraintes associées, la majeure étant l'indisponibilité d'un génome séquencé chez le modèle biologique *Hyla japonica*.

Pour faire face à cette contrainte, les techniques employées ne nécessitent pas de connaître la séquence du génome d'une part, et fournissent d'autre part des informations complémentaires sur le statut de méthylation de l'ADN génomique (Alonso *et al.* 2015).

## Chapitre 2. 4. Paramètres biologiques étudiés

### 4.4.1. Variations au niveau du site de coupure de l'enzyme *HpaII* : l'AFLP-MS

La première technique employée pour l'étude de la méthylation est l'AFLP-MS (« *Amplified Fragment Length Polymorphism – Methylation Specific* »). C'est une approche basée sur la différence de sensibilité de deux isoschizomères (enzyme partageant le même site de coupure), *MspI* et *HpaII*, à la méthylation de leur site de coupure (5'-CCGG-3'). Effectivement, lorsque la cytosine interne du site de coupure est méthylée, l'activité de coupure de l'enzyme *HpaII* est inhibée alors que celle de *MspI* reste identique. En revanche, l'activité de cette dernière est inhibée lorsque la méthylation ne survient que sur la cytosine externe, phénomène restant toutefois rare (Fulnecek and Kovarik 2014). La fréquence du site de coupure de ces deux isoschizomères étant importante, il est nécessaire de normaliser cette activité de coupure relativement à celle d'une enzyme pour laquelle la fréquence d'apparition du site de coupure dans l'ADN génomique est moins importante. Pour cela, l'ADN génomique est donc co-digéré par *MspI* ou *HpaII* conjointement à *EcoRI*. Par la suite, différentes étapes (ligation d'adaptateurs aux sites de coupures enzymatiques, PCR pré-sélectives puis sélectives, migrations électrophorétiques sur capillaires) permettent d'obtenir un nombre de fragments en fonction de la co-digestion *MspI/EcoRI* ou *HpaII/EcoRI* témoignant de la variation du niveau de méthylation au site de coupure des deux isoschizomères.

Cette approche est relativement spécifique puisqu'elle s'intéresse au niveau de méthylation d'une succession particulière de bases de l'ADN. En revanche, elle ne permet pas de définir l'impact des variations des profils de méthylation sur l'expression des gènes, puisque les séquences impactées ne peuvent pas être identifiées.

### 4.4.2. Variations à l'échelle globale du génome : HPLC-MS/MS

La seconde technique est l'HPLC-MS/MS (« *High Pressure Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry* »). C'est l'approche la plus globale et exhaustive possible pour appréhender la variation du niveau de cytosines méthylées à l'échelle du génome. Effectivement, l'ADN génomique subit une suite de digestions enzymatiques visant à libérer



## Chapitre 2. 4. Paramètres biologiques étudiés

chacun des acides nucléiques composant la molécule d'ADN. Suite à cette digestion complète, les nucléosides subissent une migration sous haute pression au sein d'une colonne de chromatographie et sont récupérés en fonction de leur temps de migration. Les modifications chimiques impactant le temps de migration, il est donc possible de séparer les formes de cytosine natives (dC), méthylées (5-mdC) et hydroxyméthylées (5-hmdC). Enfin, ces éluas sont analysés par spectrométrie de masse qui permet de déterminer, en fonction de la masse moléculaire et de la charge ionique des composés, la proportion des différentes espèces chimiques dans les fractions éluées. Cette technique permet de déterminer directement le niveau de cytosines méthylées à l'échelle du génome, mais ne permet pas de définir les séquences qui sont impactées par ces variations.

### 4.5. Etude des ARN totaux de plus de 50pb par RNAseq

L'analyse transcriptomique au sein d'un organe constitue une approche puissante dans la caractérisation des voies moléculaires impactées suite à l'exposition à un stress. Cette étude a été réalisée suite à l'exposition à l'uranium appauvri chez le poisson zèbre, dans les gonades des femelles et aux stades PF et 96 hpf. Cet outil n'a pas pu être appliqué au contexte de Fukushima en raison d'un manque de données moléculaires sur le modèle biologique.

L'approche par le séquençage d'ARN totaux permet de fournir une image du statut transcriptionnel lors du prélèvement des échantillons. Ainsi, il sera possible de déterminer l'impact sur les grandes fonctions biologiques étant associées aux gènes dérégulés, suite à l'exposition à l'uranium appauvri. L'information fournie par l'analyse du statut transcriptionnel au stade PF correspond au pool d'ARNs fourni par la mère à la descendance. Comme expliqué précédemment, ce pool est capital puisque le zygote ne commence la synthèse de ses propres ARNs messagers qu'à partir du stade 3,5 hpf. En revanche, l'information au stade larvaire à 96 hpf correspond au statut transcriptionnel actif du génome de la descendance. Ainsi, obtenir cette information permettra d'évaluer le risque associé à l'exposition parentale sur les premiers stades de développement ainsi que sur un stade avancé de développement larvaire.

#### 4.6. Ultrastructure des organes cibles

Parallèlement à ces études, nous avons également étudié l'organisation histologique des tissus d'intérêt suite aux expériences au laboratoire. Effectivement, ce niveau d'intégration pourrait permettre de relier les atteintes moléculaires liées à la toxicité de l'uranium à des modifications structurales des tissus. Cette analyse n'a pas été réalisée chez la grenouille en raison de la nécessité de conditionnement des tissus frais.





---

---

## **Chapitre 3. Matériel et méthodes**

---



*Ce chapitre regroupe les protocoles d'exposition en laboratoire, de prélèvements in situ, ainsi que ceux employés pour réaliser les analyses sur les différents paramètres biologiques.*





## 1. Expositions en laboratoire

### 1.1. Origine et maintenance des poissons zèbre au laboratoire

Pour chacune des expériences, des poissons zèbre de souche AB âgés de trois mois ont été achetés auprès d'un élevage agréé : l'UMS AMAGEN (Gif-Sur-Yvette, France). A leur arrivée, les poissons ont été maintenus durant 2 à 3 semaines dans une eau correspondant à un mélange en proportion égale d'eau osmosée et d'eau du réseau, mélange aéré au minimum durant 48h pour éliminer un maximum de chlore. La température a été maintenue à  $28 \pm 1$  °C, la photopériode fixée à 12/12h et une densité maximale ne dépassant pas deux poissons par litre. L'oxygénation de l'eau a été maintenue avec des dispositifs de bullage reliés à des pompes à air. Les poissons étaient nourris à hauteur de 5% de leur masse deux fois par jour (paillettes commerciales mélangées à des daphnies séchées). L'eau des aquariums était filtrée à l'aide d'une pompe (charbon actif + trois filtres mousses), et la moitié du volume des bacs renouvelé une fois par semaine. Les fèces et surplus de nourriture présents au fond des bacs ont été aspirés tous les jours.

### 1.2. Obtention des œufs de Danio rerio

Pour l'obtention des œufs, six poissons mâles et six poissons femelles ont été placés dans des aquariums dédiés à cet effet la veille de la ponte. Dans ces aquariums, ils étaient séparés par une plaque de plexiglass perforée, permettant la circulation de l'eau entre les deux compartiments. Le jour de la reproduction, le déclenchement de la lumière induit une stimulation du comportement de fraie, et les plaques ont été retirées afin que les géniteurs soient en contact. Les œufs ont été collectés dans des boîtes en plastique recouvertes d'un fin grillage qui se situaient au fond des aquariums. Le contrôle du déclenchement de la reproduction par mise en contact des géniteurs a permis d'obtenir les œufs aux stades de développement voulus. Quinze minutes après le déclenchement de la ponte, les œufs ont été collectés pour assurer les prélèvements au stade post-fécondation (PF), puis, les œufs excédentaires ont été nettoyés dans une solution d'eau stérile contenant  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  de sels

### Chapitre 3. 1. Expositions au laboratoire

« Instant Ocean® » et une faible quantité de bleu de méthylène. Après nettoyage, les œufs ont été placés dans des boîtes de 25 puits, contenant dans chaque logette 3 mL d'eau stérile contenant  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  de sels « Instant Ocean® ». Les boîtes ont été placées dans un incubateur à 28 °C, et chacun des prélèvements qui ont suivi ont été réalisés en disposant les boîtes sur des plaques chauffantes réglées à 28 °C pour éviter les variations de température. Le système de reproduction employé est présenté en

Figure 14.



**Figure 14. Dispositif de reproduction utilisé au cours de la seconde expérience. Dans chaque bac, les femelles et les mâles étaient séparés de part et d'autre des bacs par une cloison grillagée, qui devait être retirée afin de démarrer la reproduction.**

## 1.3. Procédures d'exposition

### 1.1.1. *Acclimatation des organismes au système expérimental*

Avant chaque expérience, les poissons ont été acclimatés durant 3 semaines à l'eau artificielle utilisée pour la phase d'exposition à l'uranium. Les mâles et les femelles ont été maintenus dans des bacs séparés afin de limiter la perte d'énergie et les modifications

### Chapitre 3. 1. Expositions au laboratoire

physiologiques liées à la reproduction. La composition de l'eau artificielle est donnée dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Composition de l'eau synthétique utilisée dans les expériences (pH = 6,4 pCO<sub>2</sub> atm).**

Espèces	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )
Ca <sup>2+</sup>	8,7
Mg <sup>2+</sup>	1,4
Na <sup>+</sup>	5,1
K <sup>+</sup>	1
Cl <sup>-</sup>	13,4
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12,5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	9,2
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0,45

Cette eau a été choisie car sa composition est un bon compromis entre les besoins physiologiques des organismes et une composition chimique assurant une biodisponibilité maximale de l'uranium. Cette composition a été établie à l'aide du logiciel JCHESS, permettant de modéliser la spéciation de l'uranium sur la base des équilibres thermodynamiques, avec un pH fixé à 6,4 (Denison 2004).

#### 1.1.2. Contamination à l'uranium appauvri

La solution mère utilisée pour les expériences a été préparée à partir de sels de nitrate d'uranyle hexahydraté (UO<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, Sigma, France) à une concentration finale de 0,8 g U.L<sup>-1</sup>. L'uranium utilisé est de l'uranium appauvri à 0,2% en <sup>235</sup>U. La solution mère a été acidifiée à 2% avec de l'acide nitrique 70%, puis stockée à 4°C pendant les expériences.

## 1.4. Dispositifs expérimentaux

#### 1.1.3. Expérience 1

Au cours de la première expérience, nous avons utilisé un système ouvert permettant un renouvellement continu de l'eau par le biais de pompes péristaltiques. Chaque pompe était connectée à une nourrice de 300 L, soit témoin, soit contaminée à hauteur de 2 µg.L<sup>-1</sup> ou 20 µg.L<sup>-1</sup> d'uranium appauvri, afin d'alimenter les bacs mâles et femelles de chaque

### Chapitre 3. 1. Expositions au laboratoire

condition d'exposition. Le dispositif expérimental pour cette première expérience est présenté en

Figure 15.



**Figure 15. Dispositif expérimental pour la première expérience. A gauche, les bacs témoins mâles et femelles. Au centre le dispositif de contrôle du pH, du renouvellement de l'eau et du maintien de la contamination. A droite les bacs contaminés à 20 et 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .**

#### 1.1.4. *Expérience 2*

Lors de la seconde expérience, nous avons utilisé un système fermé pour des raisons de contraintes réglementaires liées aux locaux. Les changements d'eau ont été effectués quotidiennement à hauteur de 50 % du volume des bacs, avec ajout manuel d'uranium après chaque renouvellement d'eau. Le dispositif expérimental est présenté en Figure 16.



**Figure 16. Dispositif expérimental de la seconde expérience en système fermé. Le renouvellement de l'eau des bacs s'effectue par le biais d'un aspirateur à eau. La contamination des bacs en uranium a été effectuée par ajout manuel.**

## 1.5. Contrôle des paramètres expérimentaux

### 1.1.5. *Suivi du pH*

Le pH a été maintenu à  $6,4 \pm 0,1$  par l'utilisation de pHstats (Consort R301, Illkirch, Belgium), permettant de contrôler en continu le pH dans les bacs par le biais d'une sonde pH. Cette dernière a été re-calibrée une fois par semaine, et se déclenchait l'ajout d'acide nitrique au besoin par le biais d'une pompe péristaltique reliée à une solution mère faiblement concentrée (0.001 M d' $\text{HNO}_3$  69%). Le suivi de la température a également été réalisé deux fois par jour.

### 1.1.6. *Suivi de la contamination*

Au cours des expériences, le suivi de la contamination a été effectué par quantification de l'uranium dissous dans l'eau. Pour cela, les échantillons d'eau ont été filtrés avec des filtres en polyéthersulfone hydrophile de maille 45  $\mu\text{m}$ . Les échantillons filtrés ont été acidifiés à hauteur de 2% avec de l'acide nitrique 69%. Pour les échantillons de la condition 20  $\mu\text{g U.L}^{-1}$ , l'analyse a été effectuée par spectrométrie d'émission atomique à source plasma à couplage inductif (ICP-AES; Optima 4300 DV, Perkin Elmer, limite de quantification : 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), et pour ceux de la condition 2  $\mu\text{g U.L}^{-1}$  et témoin, par spectrométrie de masse à couplage plasma inductif (ICP-MS, 7500Cx spectrometer, Agilent Technologies, Tokyo, Japon, limite de quantification : 0,11  $\text{ng.L}^{-1}$ ).

## 1.6. Prélèvement des échantillons biologiques

Dans chacune des deux expériences, le sacrifice des poissons adultes a été réalisé par immersion dans un bain d'eau glacée à 0 °C. Le choc thermique généré entraîne une crise cardiaque chez les organismes puis leur mort dans les secondes qui suivent. Ce protocole de mise à mort a été accepté par le Comité d'éthique IRSN n°81.

### Chapitre 3. 1. Expositions au laboratoire

#### 1.1.7. *Expérience 1*

Les paramètres biologiques étudiés au cours de la première expérience sont présentés dans le Tableau 4. Nous avons fixé deux temps de prélèvements : 7 et 24 jours, représentant un temps précoce d'exposition et un temps plus tardif afin d'évaluer la cinétique d'apparition des réponses biologiques. Après 7 jours, 10 poissons ont été prélevés dans chaque bac, 5 pour les analyses de bioaccumulation et 5 autres pour les analyses de méthylation de l'ADN (les organes cibles ayant été séparés en deux parts égales pour chacune des deux techniques d'analyses). Cinq rates ont également été prélevées pour l'évaluation des cassures double-brin par le test gamma-H2AX. En revanche, en raison de problèmes dans la conservation des échantillons, les yeux n'ont pas pu être analysés à ce temps de prélèvement. De la même manière, après 24 jours d'exposition, 10 poissons ont été prélevés dans chaque bac afin de réaliser les mêmes analyses.

**Tableau 4. Analyses biologiques réalisées au cours de la première expérience.**

Analyses biologiques	7 jours			24 jours			
	Organes cibles			Organes cibles			
	Cerveau	Gonades	Rate	Cerveau	Gonades	Yeux	Rate
Bioaccumulation	✓	✓		✓	✓	✓	
γH2AX			✓				✓
AFLP-MS	✓	✓		✓	✓	✓	
HPLC-MS/MS	✓	✓		✓	✓	✓	

#### 1.1.8. *Expérience 2*

Après 6 jours d'exposition, les poissons mâles et femelles des conditions témoins et exposés ont été placés une demi-journée en eau claire afin de suivre la reproduction.

Les prélèvements réalisés sur la descendance sont récapitulés dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Analyses biologiques réalisées sur les différents stades de développement de la descendance.**

Paramètres biologiques	Stades de développements						
	PF	3,5 hpf	6 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Bioaccumulation	✓						✓
Test des comètes							
AFLP-MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
HPLC-MS/MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Séquençage d'ARN	✓						✓
MET (Analyses histologiques)							✓

### Chapitre 3. 1. Expositions au laboratoire

Après la phase de reproduction, les poissons adultes ont été replacés dans leurs bacs d'exposition jusqu'à atteindre une durée totale de 10 jours d'exposition, puis ont été sacrifiés pour le prélèvement des organes cibles. Cinq poissons ont été dédiés à la mesure de la bioaccumulation et de la méthylation de l'ADN (une moitié de chaque organe par analyse) afin de pouvoir corrélérer le niveau d'accumulation de l'uranium aux variations des niveaux de méthylation. Cinq autres poissons ont été prélevés pour le séquençage des ARNs. Le test des comètes a été réalisé à partir des échantillons de sang prélevés sur ces dix individus, ainsi que sur dix larves âgées de 96 heures. Enfin, trois poissons ont été dédiés aux analyses histologiques. Les prélèvements réalisés au cours de cette expérience sont récapitulés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Analyses biologiques réalisées sur la génération parentale de la seconde expérience.

Paramètres biologiques	Organes cibles				
	Cerveau	Gonades	Yeux	Sang	
Bioaccumulation	✓	✓	✓		
Test des comètes				✓	
AFLP-MS	✓	✓	✓		
HPLC-MS/MS	✓	✓	✓		
Séquençage d'ARN	✓	✓			
MET (Analyses histologiques)	✓	✓	✓		

## 2. Exposition *in situ*

Pour notre étude, nous avons décidé de nous concentrer sur quatre des six sites échantillonnés. Parmi ces sites (Figure 17), le site témoin est nommé « C2 », et les sites « R1, R2 et R3 » correspondent aux sites contaminés. Sur la Figure 17, il est également indiqué le débit de dose ambiant mesuré par l'échelle d'intensité de couleur, ainsi que le débit de dose total pondéré moyen reçu par les grenouilles de chaque site.

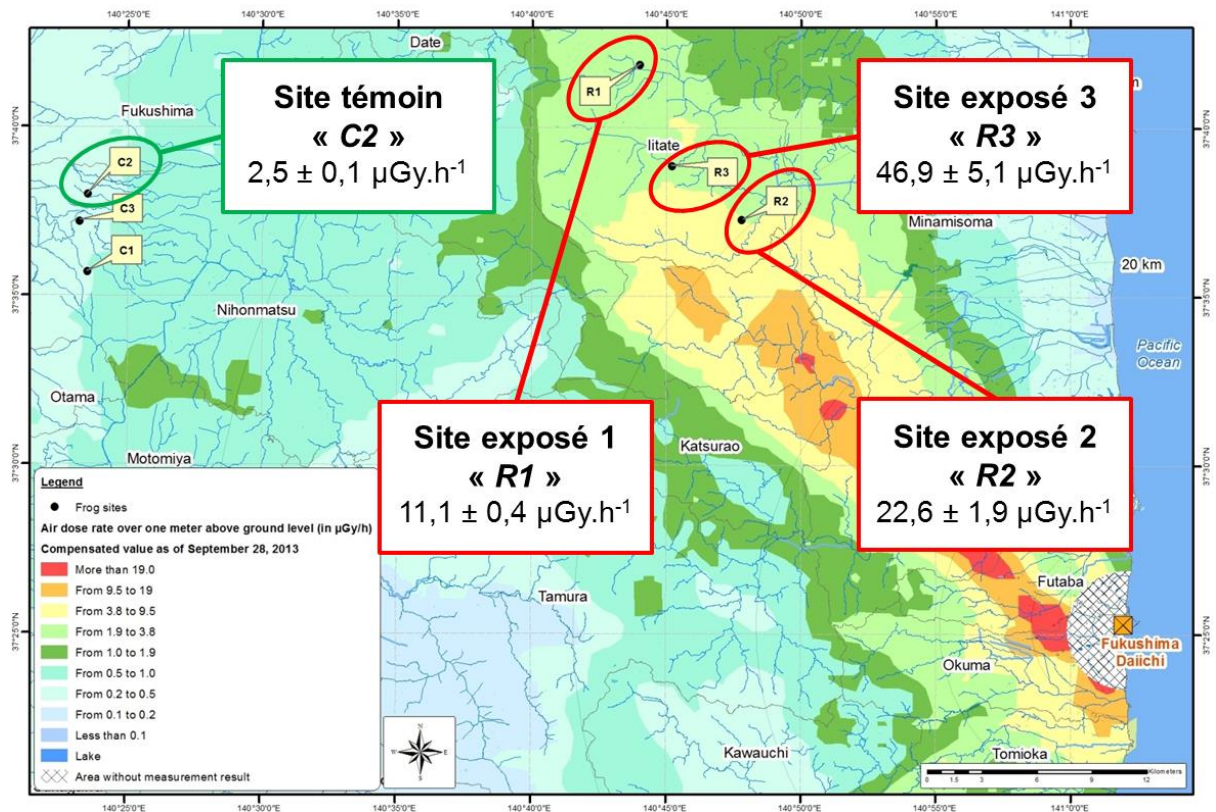


Figure 17. Cartographie du niveau d'activité radiologique ambiant dans la région de Fukushima. Positionnement des sites échantillonnés relativement au débit de dose ambiant.

### 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

#### 3.1. Mesure de la bioaccumulation

Après prélèvement, les organes ont été disposés dans des microcoupelles (préalablement séchées 48 h dans une étuve à 50 °C puis pesées avec une microbalance (Sartorius SE2, Germany)). Les microcoupelles chargées ont été placées à l'étuve à 50 °C durant au moins 48 h, puis pesées de nouveau. La différence de poids avec et sans organe correspond à la masse sèche des tissus.

Les organes sont ensuite chimiquement digérés dans des tubes en polypropylène placés dans un bain de sable à 100 °C. Dans un premier temps, avec 1 mL d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  69%), jusqu'à évaporation complète de l'acide, puis avec 3 mL d' $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, de nouveau jusqu'à évaporation complète. Une fois le cycle de digestion terminé, les



### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

minéralisats sont dilués dans une solution d'eau acidifiée à hauteur de 2% (HNO<sub>3</sub> 70%), et l'uranium est dosé par ICP-MS.

#### 3.2. Mesure du débit de dose reçu par les organismes

La dose absorbée, qui est la quantité afférente d'énergie déposée dans l'organisme, n'est accessible que par le calcul, en considérant toutes les voies possibles d'exposition de l'animal. Ce calcul fait appel à la détermination du DCC (coefficient de conversion de dose), permettant de convertir l'activité d'un radionucléide donné dans un milieu d'exposition (exprimée en Bq/ unité de masse ou de volume) en dose/débit de dose (exprimée en Gy et en Gy/ unité de temps). Les DCCs résultent du processus physique de transport de l'énergie au sein de la matière, ils sont donc conditionnés par les données géométriques de la scène d'exposition et la composition biochimique des milieux traversés.

L'IRSN possède pour ces calculs un outil dédié, le logiciel EDEN, dont la mise en œuvre conduit à déterminer simplement les DCCs pour toute condition d'exposition définie par l'utilisateur. Ainsi, l'utilisation des données relatives à la biologie des grenouilles prélevées (morphologie, composition tissulaire, cycle de vie) en combinaison avec une description de leurs conditions d'exposition externes (nature, géométrie et composition biogéochimique des milieux d'intérêt) permet de déterminer précisément les DCCs à appliquer. En raison de la nature d'émetteur beta du <sup>137</sup>Cs, un facteur de pondération d'une valeur de trois, est appliqué pour prendre en compte la plus grande dangerosité de ces rayonnements. La connaissance des niveaux d'activité des radionucléides mesurés dans les différents habitats des grenouilles (eau, sédiment, sol forestier) ainsi que dans l'animal lui-même ont permis de déterminer en fonction de ses habitudes et de sa physiologie, le débit de dose total reçu selon différents scénarios d'exposition (Figure 18).

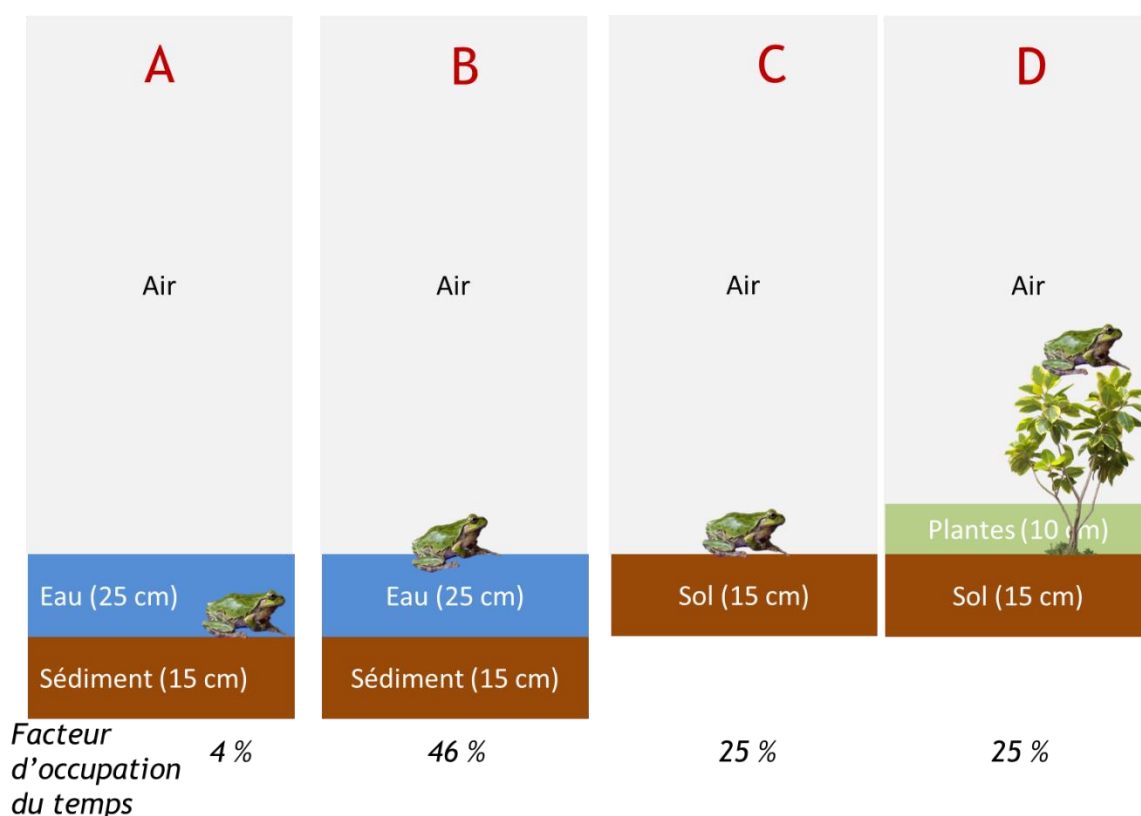


Figure 18. Scénarios d'exposition utilisés dans le logiciel EDEN en fonction de la biologie de la grenouille.

### 3.3. Mesure de la génotoxicité

#### 3.3.1. *Test gamma-H2AX*

Le test gamma-H2AX permet de visualiser sur lame de verre des cellules positives au test. Celui-ci consiste au marquage immunologique de l'histone H2AX phosphorylée. Cette phosphorylation est un mécanisme cellulaire de signalisation de cassures double-brin à la molécule d'ADN. Ainsi, l'évolution du nombre de cellules positives au test permet de déterminer le potentiel génotoxique d'un composé.

Le protocole est le suivant : les rates prélevées sur les poissons ont été broyées mécaniquement sur un filtre en nylon de maille 40 µM. Les cellules extraites de la rate ont été fixées dans un tube eppendorf 1.5 mL avec 4 % de PAF et 2 % de sucrose durant 15 minutes, puis centrifugées à 500 g pendant 2 min. Le culot de cellules a été lavé à 2 reprises

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

avec 500 µl de tampon PBS 1 X, chaque lavage faisant suite à une centrifugation à 500 g pendant 2 minutes pour culoter les cellules et éliminer le surnageant.

L'étape suivante correspond au marquage immunologique qui est une incubation de 1 h à 37 °C dans une solution de PBS 1 X contenant 2 % BSA ainsi que l'anticorps primaire anti-anti-pH2AXser139 (reconnaissant spécifiquement la sérine phosphorylée en position 139 se trouvant dans la queue de l'histone H2AX) à une concentration 1:800 (soit 1 µl d'anticorps dans 799 µl de PBS1 X/BSA 2 %). Cette étape est suivie de deux lavages avec 500 µl de PBS 1X, chaque lavage se terminant par une centrifugation à 500 g pendant 2 min.

Le marquage avec l'anticorps-secondaire a été effectué sur les échantillons qui sont incubés durant 45 min à 37 °C dans du PBS 1 X avec ce dernier à une concentration de 1:100. Cette étape est suivie de deux lavages avec 500 µl de PBS 1 X avec entre chaque lavage, une centrifugation à 500 g pendant 2 min avec élimination du surnageant.

Les cellules sont ensuite étalées sur lame puis traitées avec du Vectashield™ permettant le marquage des noyaux au DAPI, un intercalant de l'ADN permettant de visualiser les noyaux en bleu. Le marquage des foci gamma-H2AX est visualisé en vert. Comme les noyaux étaient trop petits pour que l'on puisse compter le nombre de foci H2AX (qui correspond au nombre de cassures double-brin de l'ADN), nous avons compté le nombre de cellules positives au marquage H2AX et donc présentant des cassures double-brin de l'ADN. Les résultats obtenus sont présentés en annexe 1.

#### 3.3.2. *Test des comètes*

Le test des comètes s'effectue sur cellules sanguines isolées incluses dans un gel d'agarose déposé sur lame de microscope. Dans un premier temps, la viabilité des cellules est vérifiée par un test classique d'exclusion au bleu de Trypan en considérant qu'un échantillon n'est valable pour l'étude que si au moins 80 % des cellules sont vivantes, en estimant la concentration cellulaire sur cellule de Malassez. Un volume de suspension cellulaire, contenant au maximum  $1,35 \cdot 10^6$  cellules/ml est ensuite prélevé pour l'analyse.

Le test des comètes a été réalisé en conditions alcalines (pH basique permettant de prendre en compte les sites abasiques) selon la procédure de Singh *et al.* (1988), avec quelques modifications. Un volume de suspension cellulaire est mélangé à de l'agarose LMP

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

(low melting point) à 1% (m/v dans un tampon PBS à 0,1 X) maintenu à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  sur une lame de verre pré-coatée avec de l'agarose NMP (normal melting point) à 0,8% (m/v dans un tampon PBS). L'étalement est réalisé par dépôt délicat d'une lamelle de verre sur ce mélange agarose-suspension cellulaire. La polymérisation de ce mélange est faite sur un plateau métallique déposé sur un lit de glace à  $4^\circ\text{C}$ . La lamelle est enlevée après 5 minutes et une troisième couche d'agarose à 0,5% LMP (m/v dans un tampon PBS), couche protectrice en cas de chute des lames, est déposée, puis polymérisée selon le même protocole. Les lames sont ensuite immergées dans un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, pH 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO) pendant une heure à l'obscurité, pour protéger l'ADN des rayonnements lumineux. Les fortes concentrations en sels et détergents permettent de lyser les membranes plasmiques et nucléaires, et de dénaturer les histones liées à l'ADN. Après récupération des lames, celles-ci sont séchées et transférées dans une cuve électrophorétique contenant un tampon alcalin fraîchement préparé (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) pour permettre le déroulement de l'ADN, pendant 40 minutes. La migration des fragments a lieu sous l'influence d'un champ électrique (20 V, 200 mA) pendant 24 minutes. Après cette étape, les lames sont égouttées, puis recouvertes d'un tampon de neutralisation à deux reprises (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) pendant 5 minutes. Cette étape rend l'ADN bicaténaire, permettant ainsi l'intercalation de bromure d'éthidium (50  $\mu\text{l}$ ) pour le marquage de l'ADN. Si l'observation des lames n'est pas faite le jour même, celles-ci sont déshydratées pendant 10 minutes dans l'éthanol absolu puis conservées à l'abri.

L'observation des lames est réalisée à un grossissement  $\times 400$  avec un microscope en épifluorescence (Nikon Eclipse E600), équipé d'un filtre d'excitation de 515-560 nm et d'un filtre barrière de 590 nm. Le microscope est couplé à une caméra vidéo QImaging Retiga 1300R connectée à un système d'analyse d'images (Comet Assay IV (Perspective Instrument)). Les résultats obtenus sont présentés en annexe 2.

#### 3.3.3. *Mesure des dommages à l'ADN mitochondrial par PCR quantitative*

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

La méthode utilisée a été décrite par Santos *et al.* (2006) puis reprise et adaptée à plusieurs espèces par Hunter *et al.* (2010), cependant, quelques modifications y ont été apportées.

Le principe de la méthode consiste à étudier le niveau de dommages à l'ADN mitochondrial par le biais de PCRs et d'une détection des produits de PCRs par fluorescence. Au cours de notre étude, les PCRs ont permis l'amplification de deux types de fragments, un long fragment de 10 712 pb et un court de 180 pb qui est inclus dans la séquence du long. Les séquences des amorces ont été déterminées en utilisant le logiciel « *Primer-BLAST* » et sont présentées dans le Tableau 7. Deux conditions sont primordiales pour la réalisation des réactions de PCR : (i) démarrer les réactions avec une quantité initiale d'ADN matriciel fixe, (ii) déterminer le nombre de cycles pour que les PCRs se terminent en phase exponentielle (quantité d'ADN doublée à chaque cycle). Une fois que ces conditions sont réunies, les analyses peuvent se poursuivre.

**Tableau 7. Séquences des amorces sens et anti-sens pour le long et court fragment obtenues chez *Hyla japonica* à l'aide du logiciel "Primer Blast " sur la base de la séquence de l'ADN mitochondrial référencée sous le numéro d'accèsion NC\_010232.1.**

Amorce	Séquence (5' – 3')
<i>MiLF amorce sens</i>	ACCCACATCGCCAGGGAAGTACG
<i>MiLF amorce anti-sens</i>	AGTCATCAGGCGGCGACAAGGG
<i>MiSF amorce sens</i>	CCTCAATGCAGCAGCCCCTT
<i>MiSF amorce anti-sens</i>	ATTAGGGACCCGGCGATGCT

Les produits de PCR sont dilués dans de l'eau stérile, puis incubés avec un agent intercalant : le PicoGreen (New England Biolabs), qui va permettre, grâce à sa réactivité à certaines longueurs d'ondes, la détermination du niveau de production des fragments d'intérêt. Simultanément, une courbe étalon est établie à partir de dilution croissante d'une solution d'ADN de concentration connue ( $\lambda$ -*HindIII*). Cette courbe étalon permet deux choses : (i) d'une part connaître la concentration en ADN dans chaque réaction de PCR, (ii) de vérifier, à partir d'un contrôle 50 % (quantité initiale d'ADN divisée par deux), que les

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

réactions de PCRs ont bien été arrêtées en phase exponentielle (l'intensité de fluorescence du témoin 50 % doit être comprise entre 40 et 60 % de l'intensité du témoin 100 %).

Les protocoles employés pour amplifier le long fragment mitochondrial (MiLF) et le court fragment mitochondrial (MiSF) sont les suivants :

MiLF : - 15 ng sont utilisés en tant que quantité initiale (7,5 ng pour le témoin 50 %)

- 1 µL de l'amorce sens à 5 µM
- 1 µL de l'amorce anti-sens à 5 µM
- 12,5 µL de « *LongAmp™ Taq 2X Master Mix* » (New England Biolabs)
- Une quantité d'eau stérile permettant d'atteindre un volume final de 25 µL

Les paramètres fixés pour les réactions de PCR MiLF sont les suivants : 3 minutes à 94 °C, 20 cycles (15 secondes à 94 °C, 45 secondes à 68 °C, 10 min à 65 °C) et une étape finale d'élongation à 65 °C durant 10 minutes.

MiSF : - 50 ng sont utilisés en tant que quantité initiale (25 ng pour le témoin 50%)

- 1 µL de l'amorce sens à 5 µM
- 1 µL de l'amorce anti-sens à 5 µM
- 1 µL de mix de dNTP à 10 mM (Promega)
- 1 µL de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM (Promega)
- 0,5 µL « *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase* » (Promega)
- 5 µL de tampon « *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase* » 5 X (Promega)
- Une quantité d'eau stérile permettant d'atteindre un volume final de 25 µL

Les paramètres fixés pour les réactions de PCR MiSF sont les suivants : 2 minutes à 94 °C, 28 cycles (30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 55,2 °C, 1 min à 72 °C).

Une fois les réactions de PCR terminées, une dilution au 10<sup>ième</sup> est appliquée avant l'analyse en dupliqua de la fluorescence. Pour ces mesures, 5 µL de la dilution au 10<sup>ième</sup> sont disposés dans les puits de la plaque permettant la mesure de fluorescence (Microplaque Microfluor® 2 noire, VWR), puis, à ces 5 µL d'échantillon sont ajoutés 95 µL d'eau stérile. La même procédure est effectuée pour les échantillons constituant la gamme étalon d'ADN (0,

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

12,5, 25, 50, 100 et 200 ng.L<sup>-1</sup> de fragments  $\lambda$ -*HindIII*). Une fois les échantillons dilués dans la plaque de mesure de fluorescence, 100  $\mu$ L d'une solution de PicoGreen (5  $\mu$ L de la solution mère diluée dans 1 mL d'eau stérile) sont ajoutés dans chaque puits, et les mixes sont incubés durant 10 minutes.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre à microplaque (« *Infinite® M1000 PRO* », Tecan). L'excitation a été réalisée à 480 nm avec une bande passante de 5 nm, et l'émission mesurée à 526 nm avec une bande passante de 10 nm.

## 3.4. Analyse de la méthylation globale de l'ADN génomique

### 3.4.1. *Extraction de l'ADN génomique*

Les extractions d'ADN des tissus ont été réalisées avec le kit Qiagen « *DNeasy Blood & Tissue Kit* » conformément au protocole du fournisseur.

Les concentrations en ADN sont ensuite déterminées par spectrophotométrie en utilisant le NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) avec le logiciel NanoDrop 2000/2000c. Pour cela, 1  $\mu$ L de l'échantillon est déposé sur la cellule de détection pour quantification.

### 3.4.2. *Méthylation au site de coupure de l'endonucléase HpaII*

Le protocole utilisé (Figure 19) pour la quantification du niveau de méthylation au site de coupure de l'enzyme *HpaII* a été adapté à partir de ceux décrits par Vos (1995) et Xu (2000) auxquels nous avons apporté quelques modifications. Les séquences d'adaptateurs et d'amorces sont fournies dans le Tableau 8.

Etape 1 : 250 ng sont co-digérés soit par le couple d'enzymes *EcoRI/MspI* soit par le couple *EcoRI/HpaII* durant 18 heures à 37 °C. Le mix réactionnel contient 5 unités de chacune des enzymes (Promega, France), du tampon d'activité B (Promega) à la concentration finale de 1 X, et une quantité suffisante d'eau stérile contenant de la BSA 1 % pour atteindre un volume final de 25  $\mu$ L. Après la digestion, les enzymes ont été inactivées par une incubation à 65 °C durant 10 minutes.

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

Etape 2 : Les échantillons digérés sont traités par une ligation de 18 heures à 18 °C, afin de pouvoir fixer aux sites de coupures des enzymes *EcoRI* et *MspI/HpaII* les adaptateurs nécessaires aux étapes de PCR suivantes. A chaque réaction de digestion sont ajoutés 25 µL de mix de ligation contenant l'adaptateur *EcoRI* à la concentration de 5 pM, l'adaptateur *MspI/HpaII* à la concentration de 50 pM, 1 unité enzymatique de T4 DNA-ligase (Promega), le tampon d'activité de la T4 DNA-ligase pour une concentration finale de 1 X, et une quantité suffisante d'eau stérile pour atteindre 25 µL.

Etape 3 : Les échantillons sont dilués par un facteur 4 dans de l'eau stérile, puis 5 µL sont prélevés pour être utilisés comme matrice d'ADN pour les PCRs pré-sélectives où seuls les brins portant de part et d'autre les adaptateurs correspondants aux sites de coupure des enzymes *EcoRI* et *MspI/HpaII* seront amplifiés (amorce sens complémentaire de la séquence adaptateur anti-sens *EcoRI* et du résidu du site de coupure enzymatique ; amorce anti-sens complémentaire à la séquence adaptateur sens *MspI/HpaII* et du résidu du site de coupure enzymatique). Aux 5 µL d'échantillon sont ajoutés 15 µL d'un mix contenant 30 ng de l'amorce pré-sélective sens *EcoRI*, 30 ng de l'amorce pré-sélective anti-sens *MspI/HpaII*, 0,4 unité enzymatique de GoTaq G2 FlexiDNA polymérase (Promega), le tampon d'activité enzymatique pour une concentration finale de 1 X, du MgCl<sub>2</sub> à la concentration finale de 1,25 mM, des dNTPs à la concentration finale de 0,5 mM, et de l'eau stérile pour atteindre le volume final de 20 µL. Les paramètres de la PCR pré-sélective sont les suivants : 35 cycles avec les étapes 94 °C durant 30 s, 56 °C durant 1 min et 72 °C durant 1 min.



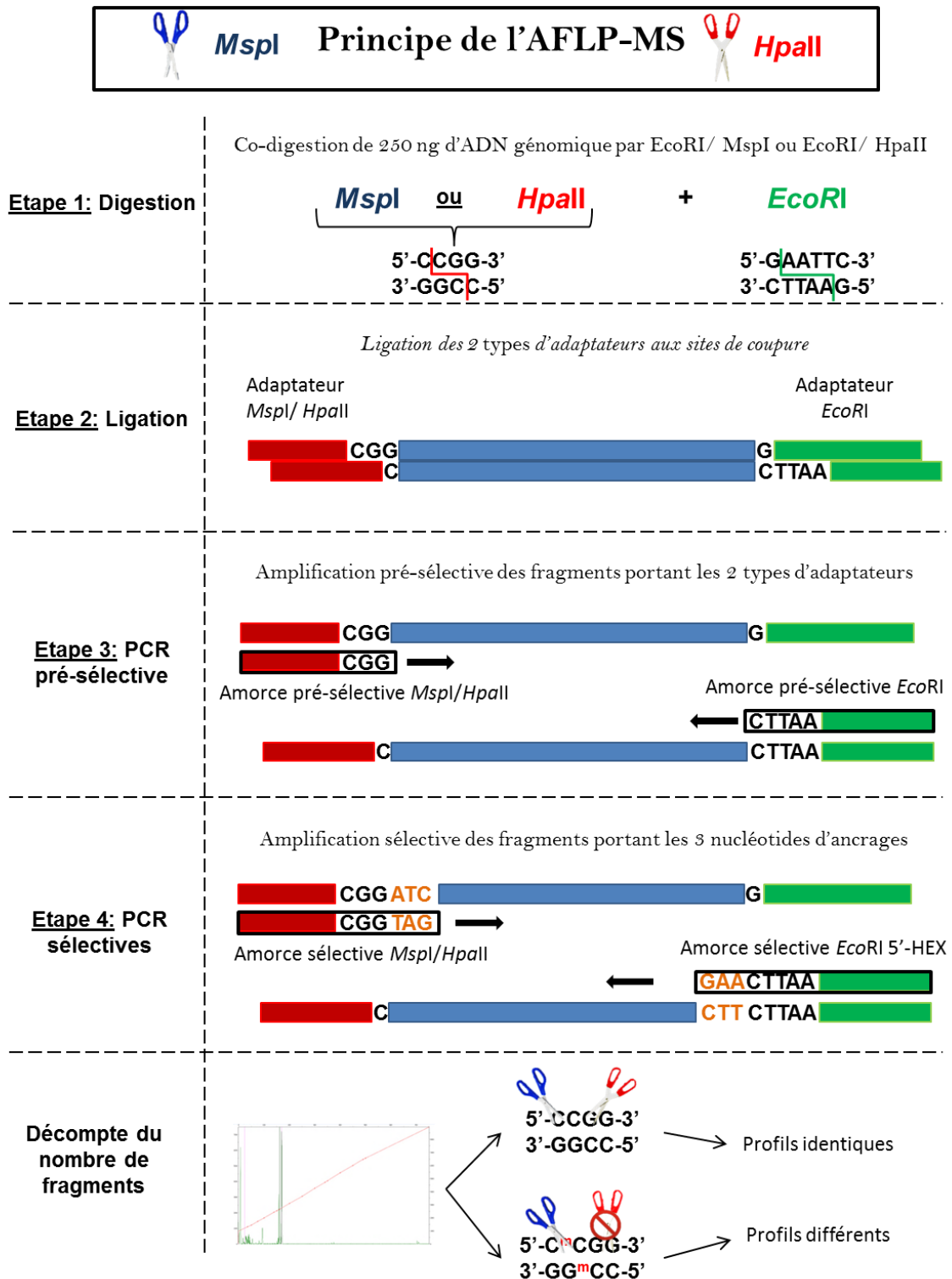


Figure 19. Représentation schématique du principe de la technique d'AFLP-MS.

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

Etape 4 : Les échantillons sont dilués d'un facteur 1,25 par ajout de 5  $\mu\text{L}$  d'eau stérile et 5  $\mu\text{L}$  sont utilisés en tant qu'ADN matrice pour les PCRs sélectives. Le mix réactionnel contient les mêmes composants que dans les PCRs pré-sélectives, hormis pour les amorces. Dans cette étape, les amorces utilisées correspondent à celles des PCRs pré-sélectives contenant en plus 3 nucléotides d'ancrage en position 3' (AAG ou AAC pour l'amorce *EcoRI* également marquée par le chromophore HEX en 5', et TAG ou TAC pour l'amorce *MspI/HpaII*). Ainsi, chaque réaction comporte 5 ng d'amorce sens *EcoRI*-HEX-AAG/AAC et 30 ng pour d'amorces *MspI/HpaII*-TAG/TAC. Ces nucléotides d'ancrage permettent d'amplifier des sous-groupes de fragments au sein de la totalité des fragments amplifiés dans la PCR pré-sélective, afin de faciliter l'étude du nombre de fragments présents selon le type de digestion subit par l'échantillon. Ainsi, les amplifications spécifiques ont été réalisées selon trois conditions qui sont identifiées par l'association des nucléotides d'ancrage dans les couples d'amorce : AAG-TAG, AAG-TAC, AAC-TAG. Les paramètres de la PCR sont également modifiés, avec les 12 premiers cycles aux étapes suivantes : 94 °C durant 30 s, 65 °C (– 0.7 °C/cycle) durant 1 min et 72 °C durant 1 min, suivis de 23 cycles à 94 °C durant 30 s, 56 °C durant 1 min puis 72 °C durant 1 min.

Pour finir, les PCRs sélectives sont envoyées à une plateforme de séquençage qui réalise des migrations électrophorétiques sur un séquenceur (ABI 3130xl, Sanger). Les chromatogrammes reçus sont analysés avec le logiciel Peak Scanner Software v1.0 (ABI), afin de compter le nombre de fragments présents dans chaque co-digestion. Suite au décompte, nous obtenons pour chaque échantillon le nombre de fragments obtenus avec la digestion *EcoRI/HpaII* ( $N_{HpaII}$ ) ainsi que celui obtenu pour la digestion *EcoRI/MspI* ( $N_{MspI}$ ). Le pourcentage de méthylation au site de coupure est donc obtenu en utilisant la formule suivante :  $(1 - [N_{HpaII}/N_{MspI}]) \times 100$ .

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

**Tableau 8. Séquences des adaptateurs et amorces utilisés dans la technique d'AFLP-MS**

Nomenclature	Séquence
Adaptateur sens <i>EcoR</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
Adaptateur anti-sens <i>EcoR</i> I	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
Adaptateur sens <i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
Adaptateur anti-sens <i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
Primer pre-sélectif <i>EcoR</i> I	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
Primer pre-sélectif <i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II	5'-GATGAGTCTAGAACGG-3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II-TAG	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II-TAC	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAC-3'

#### 3.4.3. Méthylation à l'échelle du génome entier : HPLC-MS/MS

L'analyse de la méthylation globale de l'ADN par la technique d'HPLC-MS/MS a été réalisée à partir d'1 µg d'ADN par échantillon selon la méthode suivante.

Les échantillons sont digérés durant 2 heures à 37 °C par 5 unités enzymatiques de nuclease P1 (Sigma) ainsi que 0,004 unité enzymatique de phosphodiesterase II (Sigma). Suite à cela, les échantillons ont subi une seconde digestion enzymatique durant 2 heures à 37 °C avec 0,003 unité enzymatique de phosphodiesterase I (Sigma) et 5 unités enzymatiques d'alcaline phosphatase (Roche Diagnostic, Allemagne).

Une fois les digestions enzymatiques terminées, les enzymes sont neutralisées par l'ajout de 10 µL d'acide chlorhydrique à 0,1 M, puis les échantillons sont centrifugés durant 5 min à 5000 g avant l'analyse par HPLC-MS/MS.

Les nucléosides générés durant la phase de digestion sont entraînés dans une colonne de chromatographie liquide (de modèle « *Uptisphere 3 µm (150 x 2 mm i.d.) octadecyl silyl silica gel column* » (Interchim, France)), grâce à un solvant constitué d'un gradient linéaire d'acétonitrile (allant de 0 à 20 %) dilué dans du formiate d'ammonium, à une concentration de 2 mM, durant 20 minutes avec un débit de 200 µL.min<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, les nucléosides d'intérêts : dC, 5-mdC et 5-hmdC sont élués respectivement après 7,6, 11,4, et 8,1 min.

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

Les éluas sont ensuite envoyés vers un module d'ionisation par électronébuliseur permettant la nébulisation des solutions, et *in fine* la libération des ions présents dans la phase liquide vers la phase gazeuse. Ces ions sont ensuite dirigés vers un dispositif de spectrométrie de masse qui permet la détection des différentes molécules ionisées en fonction de l'évolution de leur rapport masse atomique ( $m$ )/charge ionique ( $z$ ).

Dans notre étude, il est appliqué une ionisation positive qui est suivie d'une détection de la transition du rapport  $m/z$  pour nos nucléosides d'intérêt avant et après ionisation. Grâce au mode de suivi multiple des réactions de transition, il est possible de détecter simultanément plusieurs éléments. Ainsi, pour la dC, 5-mdC et la 5-hmdC, les transitions  $m/z$  sont respectivement  $228 \rightarrow 112$ ,  $242 \rightarrow 126$ , et  $258 \rightarrow 142$ . Les spectres de masse sont obtenus avec un électronébuliseur de modèle « TSQ Quantum Ultra electrospray ionization tandem mass spectrometer » (Thermo Fisher Scientific Inc.), et grâce à un standard externe, les masses peuvent être converties en abondance des différentes formes de cytosines.

Enfin, l'abondance de cytosines méthylées est exprimée par le pourcentage de 5-mdC relativement aux formes dC, et l'abondance des formes hydroxyméthylées par le pourcentage de 5-hmdC relativement aux formes 5-mC.

## 3.5. Analyse transcriptomique par RT-QPCR et RNAseq

### 3.5.1. *Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc*

Les ARNs ont été extraits à partir d'organes entiers. Suite au prélèvement, les organes sont congelés à sec dans l'azote liquide et stockés au congélateur à  $-80\text{ °C}$  jusqu'à extraction la semaine suivante. Les extractions ont été réalisées à l'aide du kit « *Absolutely RNA Miniprep Kit, 50 preps* » (Agilent Technologies, Les Ulis, France) conformément aux instructions du fournisseur.

Suite aux extractions, les ARNs ont été dosés au NanoDrop 2000, et 100 ng ont été utilisés comme matrice initiale pour la synthèse des ADNc. Cette synthèse a été réalisée avec le kit « *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* » (Agilent) en accord avec les instructions du fournisseur.

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

#### 3.5.2. Etude de l'expression des gènes par RT-QPCR

Pour chaque gène d'intérêt, un couple d'amorces spécifiques a été déterminé à l'aide du logiciel « *Primer-BLAST* » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les couples d'amorces ainsi que les numéros d'accèsion en lien sont donnés en annexe 3.

Les réactions de PCR en temps réels ont été réalisées dans un Mx3000p (Agilent) en utilisant le kit « *Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR* » (Agilent) conformément aux indications du fournisseur. Chaque réaction de 12 µL contenait 1 µL d'ADNc, 6 µL 2X SYBER Green Mix, 1,2 µL mix des deux amorces à 2 µM, 0,2 µL de sonde interne (solution mère fournie dans le kit et diluée au 500<sup>ième</sup>) et 3,6 µL d'eau stérile.

Les paramètres pour la RT-QPCR comportent une première étape de dénaturation à 95 °C durant 15 minutes, suivie de 40 cycles de PCR (95 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 30 sec). A chaque fin de cycle, le niveau de fluorescence (correspondant à l'incorporation du SyberGreen, agent intercalent de l'ADN fluorescent, dans les fragments synthétisés) est mesuré. Les moments de sortie (Ct, pour Cycle threshold) de chaque gène sont obtenus lorsque la synthèse des fragments passe en phase exponentielle.

Le gène de référence choisi est celui de l'actine car la mesure de son niveau d'expression était stable au sein des différentes conditions expérimentales. Ainsi, l'expression de chaque gène a été normalisée relativement à l'expression du gène de l'actine et calculée par la méthode  $2^{\Delta Ct}$ . Pour chaque niveau d'expression génique, la valeur moyenne ainsi que l'écart-type ont été déterminés ( $n = 5$ ). Les facteurs d'induction de chaque gène ont été obtenus en effectuant le rapport entre le niveau d'expression moyen du gène d'intérêt d'une condition d'exposition et le niveau d'expression moyen de ce gène pour la condition témoin. Les résultats sont fournis en annexe 4.

La spécificité des réactions a été déterminée par la courbe de dissociation des produits de PCR. Ces courbes sont obtenues en suivant le niveau de fluorescence pendant l'élévation de température progressive des produits de PCR de 60 °C à 95 °C.

#### 3.5.3. Etude du statut transcriptomique par RNAseq

### Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

L'intégrité de l'ARN total a été testée sur une puce Agilent ARN nanochip et aucune dégradation n'a été constatée. Un  $\mu\text{g}$  d'ARN total par échantillon a été utilisé pour la synthèse des bibliothèques de séquençage grâce au kit TruSeq mRNA kit v2 (Illumina), en respectant les spécifications indiquées dans le manuel d'utilisation. La taille et la concentration des bibliothèques ont été contrôlées sur une puce Agilent DNA 1000 et les concentrations ajustées à 8pM.

Après multiplexage des différentes bibliothèques, le séquençage a été réalisé sur un appareil HiSeq1500 (Illumina) grâce au kit SBS v3 (Illumina) en mode "paired end" pour produire 1.5 milliard de séquences d'une longueur de 50 nucléotides. Le "base calling" ainsi que le contrôle qualité des séquences ont été réalisés grâce au logiciel CASAVA v1.8.1 (Illumina). Les séquences ont été alignées sur le génome du poisson zèbre (zv9) par l'algorithme tophat version 2.0.11 avec les options `-r 180 --mate-std-dev 80 --b2-sensitive --no-novel-juncs -a 5 -p 5 --library-type fr-unstranded` et en utilisant les jonctions exons-exons cataloguées par Ensembl (release 75). L'expression des gènes ainsi que leur normalisation ont été estimés grâce aux logiciels HTSeq version 0.5.3p3 et DESeq2.

### 3.6. Analyse histologique des dommages ultrastructuraux

Les dommages à l'échelle tissulaire ont été recherchés dans le cerveau, les yeux et les gonades des poissons zèbre mâles et femelles après 10 jours d'exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri.

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique qui permet de visualiser la structure des organes grâce à une source de rayonnement émettant des électrons. Cela permet d'obtenir une résolution bien plus fine qu'en microscopie optique (0,2 nm vs 0,2  $\mu\text{m}$ ). Au contact de la préparation, les électrons incidents (provenant de la source) sont soit arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif éliminant les électrons déviés, la formation de l'image se fait à partir des électrons arrêtés (zones sombres) et des électrons transmis (zones claires). Le microscope utilisé (Tecnai 12 G2 Biotwin ; FEI, Eindhoven, Pays-Bas) possède une résolution de 0,2 nm, une tension d'accélération maximale de 120 kV et un grossissement possible de 390 à 300 000 fois. Une

### **Chapitre 3. 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques**

sonde EDX est également couplée au microscope permettant l'analyse chimique élémentaire de l'échantillon. Par interaction des échantillons avec les électrons incidents, des photons X sont émis et l'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes dont ils sont issus. L'analyse chimique par EDX consiste en une détection de ces photons en utilisant un détecteur solide Si-Li (diode en silicium dopée en lithium).

Pour la préparation des tissus, les organes ont été plongés immédiatement après dissection dans un tampon (solution à 2,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate maintenu à 4 °C) assurant une fixation chimique de la matière. Les échantillons y sont conservés pendant 24 h à 4 °C.

La seconde étape a consisté à effectuer un marquage des tissus à l'osmium pour obtenir un meilleur contraste lors des observations. Pour cela, l'échantillon a subi plusieurs rinçages de tampon cacodylate et est plongé 1 heure dans une solution d'acide osmique. Ensuite, les tissus sont déshydratés par des bains successifs d'alcool éthylique. Enfin l'échantillon est imprégné par un monomère (Epon 812) qui va polymériser à 60 °C et former un bloc de résine (quelques mm) au sein duquel est inclus l'organe. Des coupes ultrafines (de 80 à 110 nm) peuvent alors être réalisées grâce à un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

Des observations au microscope optique ont tout d'abord été réalisées (épaisseur 500 nm) afin de cibler les tissus à observer en MET. Pour les observations en imagerie au MET, des coupes d'une épaisseur de 80 nm ont été déposées sur des grilles de cuivres. Pour les analyses chimiques par la sonde EDX des coupes d'une épaisseur de 110 nm sont alors utilisées.

## **4. Tests statistiques**

Les données obtenues ont été analysées à l'aide de différents tests statistiques. Dans un premier temps, nous avons recherché l'existence d'une interaction entre la variable « sexe » et « niveau d'exposition », par l'utilisation du test d'ANOVA à deux facteurs, et une

### **Chapitre 3.** 3. Protocole d'analyse des paramètres biologiques

interaction a été trouvée dans chacune des deux expériences. De ce fait, tous les résultats obtenus au cours de cette thèse ont été traités de la même manière.

Pour cela, nous avons utilisé le test ANOVA à un facteur. En premier lieu, la normalité (test de Shapiro) et l'homoscédasticité (test de Levene) des résidus de l'ANOVA ont été vérifiées. Lorsque ces deux hypothèses ont été validées, nous avons réalisé un test post-hoc de Tukey, sinon, l'ANOVA et le test de Tukey ont été remplacés par les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis suivi de Wilcoxon.

Egalement, afin de tester les liens de corrélation entre quantité de substance radioactive et effets observés à l'échelle individuelle, nous avons réalisés des matrices de corrélation de Pearson.

Pour chacun des tests statistiques, le seuil d'erreur  $\alpha$  a été fixé à 5%.







---

---

## **Chapitre 4. Effets de concentrations environnementales d'uranium appauvri sur les profils de méthylation du poisson zèbre adulte mâle et femelle**

---



*Dans ce chapitre, nous allons aborder les résultats obtenus au cours de la première expérience d'exposition au laboratoire de poissons zèbre à l'uranium appauvri. Ce chapitre se compose d'une introduction en français qui rappelle les hypothèses scientifiques explorées ainsi que les moyens scientifiques déployés pour répondre à cette problématique, l'article scientifique en anglais ayant fait suite à cette expérience, et une troisième partie rédigée en français faisant état des principales conclusions émanant de ces travaux. Ce chapitre est basé sur l'article « Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish » accepté dans *Journal of Environmental Radioactivity* en Janvier 2016.*



## 1. Introduction

Les modifications épigénétiques sont des mécanismes connus pour répondre à la contamination métallique (Fragou *et al.* 2011). Parmi ces modifications, la méthylation de l'ADN est le mécanisme ayant été le plus étudié, car il est notamment impliqué dans la régulation de l'expression des gènes (Bird 1992). Du point de vue écotoxicologique, les modifications des profils de méthylation sont importantes car elles pourraient à la fois être liées à la mise en place rapide de réponses biologiques pour faire face à la contamination (Rando and Verstrepen 2007), ainsi qu'être impliquées dans la transmission d'effets au cours des générations (Angers *et al.* 2010).

De nombreuses données ont été acquises au laboratoire chez le poisson zèbre suite à une exposition chronique à l'uranium appauvri, et cela notamment concernant la perturbation de profils transcriptomiques dans différents organes de poissons exposés à de faibles concentrations (Lerebours *et al.* 2009; Lerebours *et al.* 2010a).

Cette étude vise à évaluer les possibles impacts d'une exposition chronique à l'uranium appauvri à des concentrations environnementales sur les profils de méthylation de l'ADN génomique chez le poisson zèbre. Le suivi de la méthylation de l'ADN a été effectué après 7 et 24 jours, chez des organismes mâles et femelles exposés à différentes concentrations d'uranium. Les différents axes de recherches étaient les suivants :

### 1.1. Sensibilité de la méthylation de l'ADN à l'uranium appauvri

Dans un premier temps, il nous a fallu déterminer si l'exposition à des concentrations environnementales d'uranium appauvri pouvait entraîner des modifications dans les profils de méthylation de l'ADN génomique du poisson zèbre. Pour cela nous avons donc décidé d'exposer des poissons zèbre adultes à 2 et 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri.

La méthylation de l'ADN étant un biomarqueur reconnu pour répondre rapidement à la contamination (Angers *et al.* 2010), nous avons décidé de fixer un premier temps de prélèvement à 7 jours afin de pouvoir évaluer la rapidité avec laquelle ces profils peuvent être modifiés. Egalement, nous avons choisi un temps plus tardif, 24 jours d'exposition, qui

## Chapitre 4. 1 Introduction

permet de simuler une exposition chronique, ainsi que de vérifier l'évolution des profils de méthylation relativement au temps précoce.

Dans le cadre de l'évaluation de l'impact de l'uranium appauvri sur les profils de méthylation de l'ADN génomique, les techniques de l'AFLP-MS et de l'HPLC-MS/MS sont complémentaires et fournissent une approche adaptée, avec une mesure soit au niveau d'une séquence spécifique de l'ADN (site de coupure de l'enzyme *HpaII*) soit à l'échelle du génome entier.

### 1.2. Modifications au sein d'organes somatiques et reproducteur

Pour notre étude, nous avons décidé de prendre en compte la possible influence du sexe, et pour cela, des poissons zèbre adultes mâles et femelles ont été exposés séparément aux deux concentrations d'uranium. Etant donné que la méthylation de l'ADN est impliquée dans la transmission d'effets au cours des générations (Angers *et al.* 2010), cette approche sur les deux sexes apparaît comme tout à fait pertinente.

En écotoxicologie, peu d'études s'intéressent à l'effet du sexe si ce n'est dans un contexte d'exposition à des perturbateurs endocriniens. Ainsi, l'étude de la méthylation de l'ADN chez les mâles et femelles permettra d'évaluer : (i) la réponse à l'échelle individuelle en fonction du sexe, notamment par les analyses réalisées sur les organes somatiques, (ii) d'envisager un possible impact sur les générations issues de parents exposés (Lange and Schneider 2010), par l'analyse des tissus reproducteurs.







# Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish

*Kewin Gombeau<sup>1,§</sup>, Sandrine Pereira<sup>2, §</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>3,4</sup>, Virginie Camilleri<sup>1</sup>, Isabelle Cavalie<sup>1</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>5</sup> and Christelle Adam-Guillermin<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France

<sup>2</sup> Neolys Diagnostics, Centre Léon Bérard, Bât Cheney A, 69008 LYON, France

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, INAC-SCIB, 38000 Grenoble, France

<sup>4</sup> CEA, INAC-SCIB Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, 38000 Grenoble, France

<sup>5</sup> Université de Bordeaux, CNRS, UMR 5805, EPOC, 33400 Talence, France

<sup>§</sup> These two authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Christelle Adam-Guillermin, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, France, +334 42199401, christelle.adam-guillermin@irsn.fr



## Abstract

We examined the effects of chronic exposure to different concentrations (2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) of environmentally relevant waterborne depleted uranium (DU) on the DNA methylation patterns both at *HpaII* restriction sites (5'-CCGG-3') and across the whole genome in the zebrafish brain, gonads, and eyes. We first identified sex-dependent differences in the methylation level of *HpaII* sites after exposure. In males, these effects were present as early as 7 days after exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, and were even more pronounced in the brain, gonads, and eyes after 24 days. However, in females, hypomethylation was only observed in the gonads after exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days. Sex-specific effects of DU were also apparent at the whole-genome level, because in males, exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days resulted in cytosine hypermethylation in the brain and eyes and hypomethylation in the gonads. In contrast, in females, hypermethylation was observed in the brain after exposure to both concentrations of DU for 7 days. Based on our current knowledge of uranium toxicity, several hypotheses are proposed to explain these findings, including the involvement of oxidative stress, alteration of demethylation enzymes and the calcium signaling pathway.

This study reports, for the first time, the sex- and tissue-specific epigenetic changes that occur in a nonhuman organism after exposure to environmentally relevant concentrations of uranium, which could induce transgenerational epigenetic effects.

## Keywords

Zebrafish, Depleted uranium, DNA methylation, Sex dependent



## 1. Introduction

Anthropogenic activities increase the levels of environmental pollutants, raising concerns about the risks associated with the exposure of human and nonhuman populations to these pollutants. The importance of genetic factors in the biological disorders and pathologies observed after chronic exposure to pollutants is well established. However, recent work has highlighted the role of the chemical modification of DNA and its associated proteins, collectively called “epigenetic” (i.e., “around genes”) mechanisms, in biological disorders. Epigenetics is defined as “the study of the changes in gene expression that occur in organisms with differentiated cells, and the mitotic inheritance of given patterns of gene expression...which [are] not based on changes in DNA sequence” (Holliday 1994). It includes the study of three types of modification: DNA methylation (occurring primarily on cytosine when followed by guanine, the CpG configuration), histone tail modifications (acetylation, ubiquitination, phosphorylation, or methylation), and noncoding RNA molecules.

DNA methylation is one of the most frequently studied epigenetic mechanisms, playing a key role in the regulation of gene expression (Bird 1992), and it is highly disturbed in cancer cells. The loss of DNA methylation in the promoters of oncogenes was one of the first epigenetic changes identified in human cancer (Feinberg and Vogelstein 1983). Epigenetic changes have also been linked to neurodegenerative diseases (Garza-Manero *et al.* 2014). Importantly for ecotoxicology, the modification of DNA methylation patterns may be propagated across generations, with transgenerational effects (Angers *et al.* 2010). Moreover, unlike modifications in the DNA sequence, DNA methylation may occur rapidly in response to environmental changes and may therefore be a way that an organism copes with environmental stress on a very short time scale (Rando and Verstrepen 2007).

Within this general framework, the present study focuses on uranium (U), an actinide naturally present in the environment, whose concentrations in the geosphere are expected to increase with the growing world nuclear energy capacity (IAEA 2012). It is widely used in many industries (nuclear power plants, weapons, airplanes, etc.) and is also present in agricultural products, such as phosphate fertilizers, thus increasing its presence and distribution in all environmental compartments. Uranium is found naturally in the

environment, in surface and ground waters at concentrations ranging from 0.01 to 12 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Salonen 1994; WHO 2012).

The effects of depleted uranium (DU) have predominantly been studied in freshwater organisms chronically exposed to environmentally relevant concentrations of it. Several studies of the zebrafish have been conducted, highlighting the various biological disorders caused by DU, such as reproductive and developmental toxicity (Bourrachot *et al.* 2014), histological changes (Barillet *et al.* 2010), neurotoxicity (Barillet *et al.* 2011; Faucher *et al.* 2012), genotoxicity (Barillet *et al.* 2011), and the disruption of transcriptional processes (Lerebours *et al.* 2009; Lerebours *et al.* 2010a). However, there are few data on the possible roles of uranium on epigenetic changes. To our knowledge, the only published data describing the epigenetic changes induced by uranium exposure deal with mice surgically implanted with DU pellets (Miller *et al.* 2009), and an epidemiological study of a cohort of uranium mine workers (Su *et al.* 2006 ).

The aim of this study was to establish whether chronic exposure to environmentally relevant concentrations of DU modifies DNA methylation in the zebrafish, and the possible influence of sex on this phenomenon. Two environmental concentrations of DU were tested, 2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , the lowest being close to the European natural geochemical background in surface water, which ranges from 0.02 to 6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and the highest being found in the vicinity of uranium mining areas (Garnier–Laplace *et al.* 2001).

DNA methylation was examined in the brain, gonads, and eyes of the fish. The two somatic organs were chosen because they are involved in important biological functions and are linked with effects manifesting at the level of the individual organism, whereas changes in gonadal tissues might exert transgenerational effects, affecting the progeny of the exposed fish. DNA methylation was determined at the genome-wide level using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) (Ravanat *et al.* 2002) and at specific cleavage sites with methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism (MS-AFLP) (Xu *et al.* 2000).

## **2. Materials and methods**



## 2.1 Experimental procedures

Adult zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were purchased from a French supplier (Gis Amagen, Gif-sur-Yvette, France). Fifty males ( $0.24 \pm 0.07$  g wet weight [w.w.]),  $3.00 \pm 0.21$  cm) and females ( $0.33 \pm 0.07$  g w.w.,  $3.15 \pm 0.29$  cm) were placed separately in 30 L tanks to avoid any interference by reproductive processes, with synthetic soft water ( $\text{CaCl}_2[2\text{H}_2\text{O}]$   $42.49 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2[6\text{H}_2\text{O}]$   $19.30 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4[7\text{H}_2\text{O}]$   $24.65 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $0.78 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $11.33 \text{ mg L}^{-1}$ , and  $\text{NaNO}_3$   $26.35 \text{ mg L}^{-1}$ ), oxygenated by bubbling with air. This type of water was chosen to optimize the bioavailability of DU (Denison 2004). The fish were acclimated to the synthetic water for 3 weeks, and then exposed to DU for 24 days. A water renewal system involving peristaltic pumps was used to change 50% of the total water volume in each tank automatically daily. The fish were fed daily with standard fish pellets (5% of body mass per fish per day; Tetramin™, Melle, Germany). The temperature was set at  $28 \pm 1$  °C, and the pH at  $6.5 \pm 0.1$  with HCl using peristaltic pumps controlled by automated pH regulators (Consort R301, Illkirch, Belgium). The pH and water composition were chosen to ensure a good balance between the maximal bioavailability of DU and the optimal physiological conditions of the zebrafish. During acclimation and exposure, the stocking density was  $1.7 \text{ fish L}^{-1}$  and the light cycle consisted of 12/12 h (day/night).

The fish were divided into three different groups: a control group (no added DU), and two groups exposed to either 2 or  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma, Lezennes, France). The dissolved DU concentrations were monitored using filtered and acidified water samples, which were analyzed several times a day. To ensure that the contamination pressure in each tank was as close as possible to the nominal concentration, the peristaltic pump system distributed DU from a stock solution at the concentration required in the contaminated tanks. The values measured throughout the exposure phase are given in the supplementary data (Table S1).

At each sampling time, five fish were taken from each tank and dissected. The brains, gonads, and eyes were cut into two parts to allow MS-AFLP and HPLC-MS/MS analyses comparison on the same fish. Given the small size of the zebrafish organs, DNA methylation and uranium accumulation could not be measured on the same individuals.

During the experiment, no differences in fish length or weight were observed between DU exposure conditions or sampling times. All procedures used in this experiment were approved by the Animal User and Ethical Committee at the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (Comité d'éthique IRSN n°81).

## 2.2 Uranium quantification

After exposure for 7 or 24 days, 3–5 fish were taken from each tank to measure the bioaccumulation of DU in the target organs. The tissues were dried at 50 °C for 48 h and the dry weight [d.w.] was measured with a microbalance (Sartorius SE2, Göttingen, Germany). The tissues were chemically digested for 3 h at 100 °C with 70% HNO<sub>3</sub>, followed by 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> until complete solubilization. The solutions of the digested organs were then evaporated to dryness. The samples were acidified with 2% (v/v) HNO<sub>3</sub> 69% (trace-metal-analysis grade) and quantified with inductively coupled plasma MS using a 7500Cx spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a detection limit of 0.11 ng L<sup>-1</sup>. The corresponding raw concentration data are given in Table S2. The same technique was used to measure uranium in water samples.

## 2.3 Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted with the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol.

## 2.4 Measurement of DNA methylation using MS-AFLP

This method is based on the digestion of genomic DNA with the restriction enzymes *EcoRI/MspI* and *EcoRI/HpaII*. Both *MspI* and *HpaII* share the same cleavage site 5'-CCGG-3', but *HpaII* cleavage activity is inhibited when the inner cytosine of the cleavage site is methylated (Fulnecek and Kovarik 2014). MS-AFLP was performed as described in the literature (Xu *et al.* 2000), with minor modifications. Briefly, two sets of double digestion reactions containing 5 U of both *EcoRI* and *MspI* or 5 U of both *EcoRI* and *HpaII* were simultaneously incubated overnight at 37 °C using 250 ng of genomic DNA, and then denatured at 65 °C for 10 min. An overnight ligation step was then conducted on each

reaction at 18 °C using 1 U of T4 DNA ligase, 5 pmol of the *EcoRI* adaptor, and 50 pmol of the *MspI/HpaII* adaptors. The ligated fragments were amplified with a preselective PCR using the following parameters: (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 35 cycles. The reaction mixture was diluted by a factor of 1.25, and 5 µL of this preselective PCR product was used as the template DNA for the three types of selective PCR, with specific sets of primers (Table S3). Each selective PCR contained 5 ng and 30 ng of the *EcoRI* (5'-HEX labeled) and *MspI/HpaII* primers, respectively, and was performed with the following parameters: (94 °C for 30 s, 65 °C (– 0.7 °C/cycle) for 1 min, 72 °C for 1 min) × 12 cycles, followed by (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 23 cycles. The migration of the PCR products of the selective amplification was monitored on an ABI 3730 DNA Analyzer (Sanger sequencer) with the internal size marker, ROX 500 (Plateforme Génome-Transcriptome de Bordeaux, France). The results were analyzed with the Peak Scanner™ Software v1.0 (ABI). For each sample, we noted the number of fragments in each digest and under each type of selective amplification, and calculated the demethylation ratio as the number of fragments ( $N$ ) obtained in the codigestion with *EcoRI* and *HpaII* ( $N_{HpaII}$ ) divided by the number obtained with *EcoRI* and *MspI* ( $N_{MspI}$ ). The methylation ratio was calculated with the following formula:  $(1 - [N_{HpaII}/N_{MspI}]) \times 100$ . All the adapter and primer sequences were provided by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and are shown in Table S3. The enzymes were provided by Promega (Charbonnières-les-Bains, France). The results presented in Figure 1 are the average methylation levels at the *HpaII* cleavage site obtained under the three selective PCR conditions (the corresponding raw data are given in Tables S4–S6).

### 2.5 Genome-wide DNA methylation measured with HPLC–MS/MS

The 2'-deoxycytosine (dC), 5-methyl-2'-deoxycytosine (5-mdC), and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytosine (5-hmdC) nucleosides were detected and quantified with MS in the positive ionization mode using the so-called multiple reaction monitoring mode (mrm) with transitions  $m/z = 228 \rightarrow m/z = 112$ ,  $m/z = 242 \rightarrow m/z = 126$ , and  $m/z = 258 \rightarrow m/z = 142$ , respectively (Pereira *et al.* 2014). These measurements were made with a TSQ Quantum Ultra electrospray ionization tandem mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The conditions for DNA digestion were similar to those described previously (Ravanat *et al.*

2002). Briefly, the DNA samples were digested for 2 h at 37 °C with 5 U of nuclease P1 (Sigma Co., St Louis, MO, USA) together with 0.004 U of phosphodiesterase II (Sigma Co.). The samples were then treated with 0.003 U of phosphodiesterase I (Sigma Co.) and 5 U of alkaline phosphatase (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) for 2 h at 37 °C. The enzymes were neutralized by the addition of 10 µL of 0.1 M HCl and the samples were centrifuged for 5 min at 5000 × g before their analysis with HPLC–MS/MS. The hydrolyzed nucleosides were separated with HPLC using a linear gradient of acetonitrile in 2 mM ammonium formate, from 0% to 20% in 20 min, using an Uptisphere 3 µm (150 × 2 mm i.d.) octadecyl silyl silica gel column from Interchim (Montluçon, France) at a flow rate of 200 µL min<sup>-1</sup>. Under these conditions, dC, 5-mdC, and 5-hmdC were eluted at 7.6, 11.4, and 8.1 min, respectively. The eluates were quantified with external calibration and the results were expressed as the percentage of 5-mdC relative to dC, and the percentage of 5-hmdC relative to 5-mdC. The raw data corresponding to these results are presented in Table S7.

## 2.6 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using 3–5 biological replicates per condition. Because two-way analysis of variance (ANOVA) revealed an interaction between the two factors considered, DU treatment and sex, one-way ANOVA of the data was used to assess the effect of each factor separately. The software R (3.0.2 version) was used for all statistical analyses. Before the statistical analyses, the normality and homogeneity of the variance were tested using the Shapiro–Wilks test and Levene test ( $\alpha = 0.05$ ), respectively. If normality and homoscedasticity were confirmed, one-way ANOVA was performed, followed by Tukey's test. Otherwise, ANOVA was replaced with the Kruskal–Wallis test, followed by the Mann–Whitney test ( $\alpha = 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1 DU accumulation in target organs

DU accumulation was monitored in the studied organs throughout the experiment, the measure of log<sub>10</sub> individual uranium concentration are presented in Figure 1, and the median

and min-max value observed in each DU treatment are presented in Table 1. A dose-dependent accumulation of DU was observed in the brains and gonads of both sexes after 7 days of exposure (no data were recorded for the eyes at that sampling point) (Table 1A). However, after exposure for 24 days, this general expected pattern suffered exceptions. Between 7 and 24 days of exposure to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU, a significant 18-fold reduction was observed in the male brains (from 2.10 to  $0.12 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight; Table 1A and B). In the male eyes after exposure for 24 days, similar median concentrations were observed for both DU treatments ( $0.24$  and  $0.52 \mu\text{g g}^{-1}$  d.w. after exposure to 2 and  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU, respectively; Table 1B). The male gonads accumulated far more DU than the eyes or brains. After exposure to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days, the male gonads accumulated 78- and 18-fold more DU than the brain and eyes, respectively ( $9.33$ ,  $0.12$ , and  $0.52 \mu\text{g g}^{-1}$  d.w. in the gonads, brains, and eyes, respectively; Table 1B). The female gonads and eyes accumulated similar amounts of DU and six-fold more than the brain after exposure for 24 days to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU ( $3.74$ ,  $4.11$ , and  $0.65 \mu\text{g g}^{-1}$  d.w. in the gonads, brains and eyes, respectively; Table 1B).

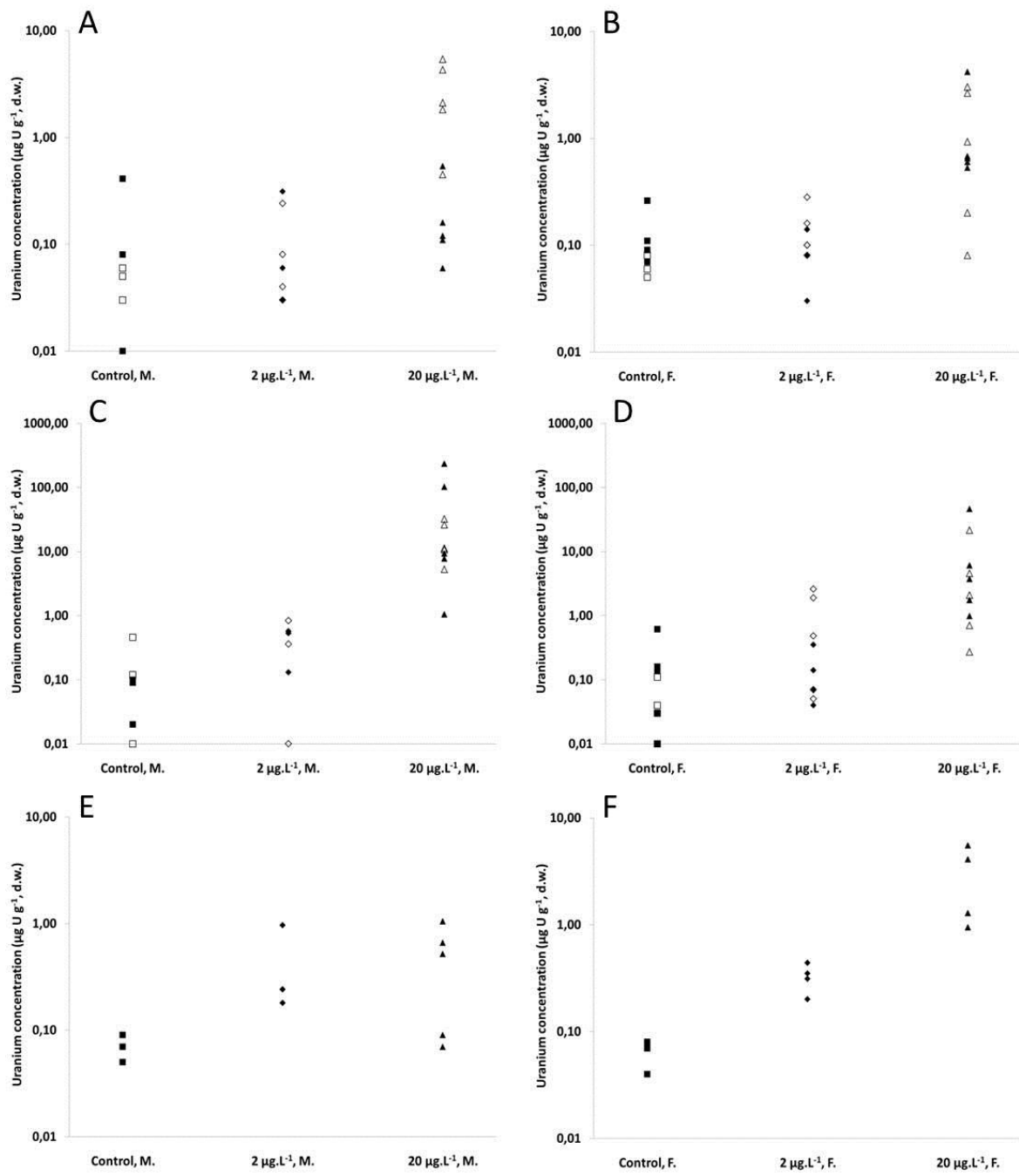
**Table 1.** Uranium bioaccumulation in fish organs during the experiment. A: After exposure for 7 days; B: after exposure for 24 days. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3-5$ ). \*Significantly different from the control ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ). <sup>□</sup>Significantly different from the opposite sex ( $^{\square}p < 0.05$ ). <sup>§</sup>Significantly different from the data after exposure for 7 days ( $p = 0.01587$ ). Bold values indicate significantly different from the data after exposure for 7 days ( $p = 0.01587$ ). NA = No data available at that sampling time.

A. Uranium bioaccumulation data after exposure for 7 days

DU treatment	Brain				Gonads				Eyes			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
Control	0.05	0.03 – 0.06	0.07	0.05 – 0.08	0.01	0.00 – 0.46	0.03	0.01 – 0.11	NA		NA	
2 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.04	0.00 – 0.24	0.10	0.08 – 0.28 *	0.01	0.00 – 0.83	0.48	0.05 – 2.58 *	NA		NA	
20 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.10	0.45 – 5.40 **	0.93	0.81 – 3.01 *	11.2	5.29 – 32.3 **	2.08	0.27 – 21.4 **	NA		NA	

B. Uranium bioaccumulation data after exposure for 24 days

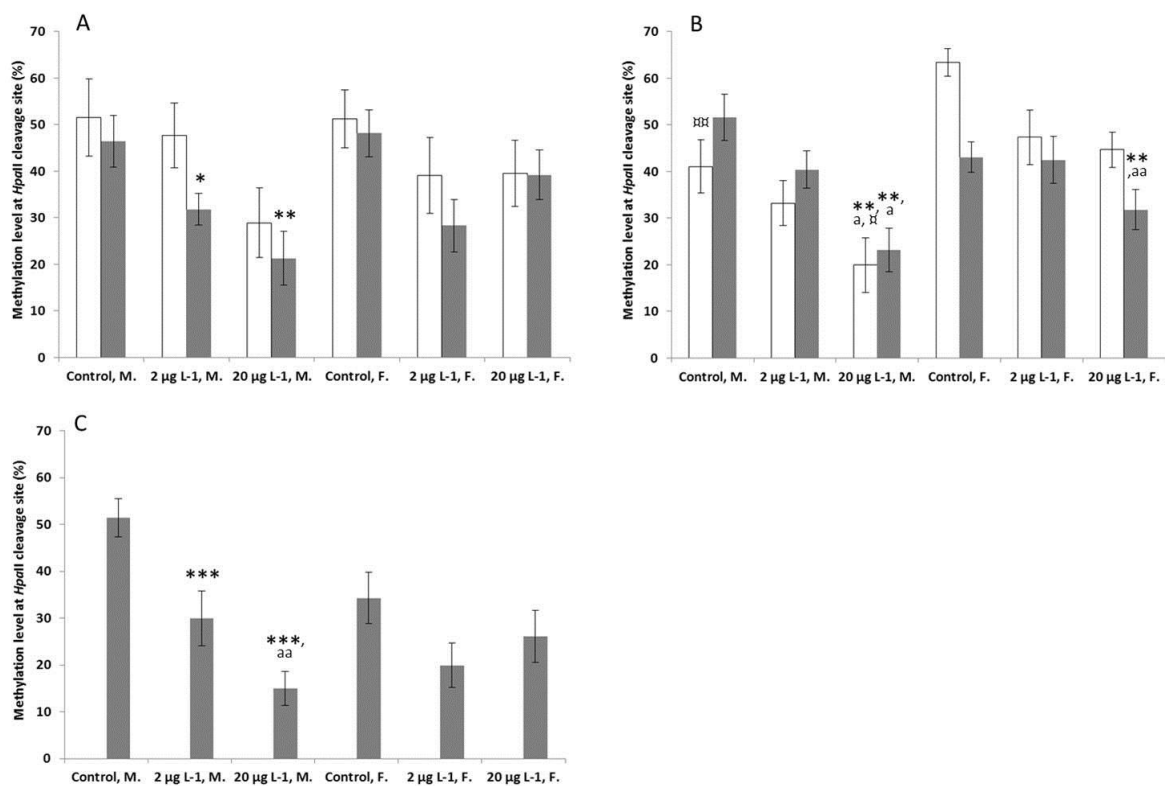
DU treatment	Brain				Gonads				Eyes			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
Control	0.01	0.00 – 0.41	0.09	0.07 – 0.26	0.02	0.00 – 0.10	0.14	0.01 – 0.61	0.07	0.05 – 0.09	0.07	0.00 – 0.08
2 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.06	0.03 – 0.31	0.11	0.03 – 0.14	0.53	0.13 – 0.57 *	0.11	0.04 – 0.35	0.24	0.18 – 0.96 *	0.33	0.20 – 0.44 *
20 $\mu\text{g L}^{-1}$	<b>0.12</b>	<b>0.06 – 0.54<sup>□, §</sup></b>	0.65	0.53 – 4.20 **	9.33	1.05 – 234 *	3.74	0.99 – 46.3 *	0.52	0.07 – 1.05 <sup>□</sup>	4.11	0.95 – 48.7 *



**Figure 1.** Individual uranium concentrations measured through the experiment ( $\log_{10}$ ,  $n = 3-5$ ) in the brain (A, B), gonads (C, D), and eyes (E, F) of males (A, C, E) and females (B, D, F). Empty symbols represent values measured after exposure for 7 days and full symbols after exposure for 24 days. M = male, F = female. It evidenced the high variability observed in uranium accumulation following chronic exposure to low and environmentally relevant concentrations.

### 3.2 DU exposure induced hypomethylation patterns at *HpaII* cleavage sites

The data collected on the methylation levels at the *HpaII* cleavage site are presented in Figure 2. The levels measured in the brain (Figure 2A) after 7 days (white bars) indicate a trend to hypomethylation after exposure to DU, particularly in males exposed to the highest DU concentration. After exposure for 24 days, the hypomethylation became significant in the exposed males compared with that in the controls, with 32% and 54% reductions in the methylation levels in males exposed to 2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, respectively. No significant effects of DU were observed in the female brain.



**Figure 2.** Percentage of methylation at *HpaII* cleavage sites assessed with MS-AFLP (means  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ) in the brain (A), gonads (B), and eyes (C). White bars represent data collected after exposure for 7 days and gray bars after exposure for 24 days. M = male, F = female. \*Significantly different from the control group (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). <sup>♂</sup>Significantly different from the opposite sex under the same conditions (<sup>♂</sup> $p < 0.05$ ; <sup>♂♂</sup> $p < 0.01$ ). <sup>a</sup>Significantly different from fish treated with 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>aa</sup> $p < 0.01$ ).



The impact of DU was observed in the male gonads after exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, with a significant two-fold reduction in the methylation level compared with that in the control male gonads, on both days 7 and 24 (Figure 2B). In the female gonads, the impact of DU was observed after exposure for 24 days to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, with a significant 26% reduction in the methylation level compared with that of the control female gonads (Figure 2B).

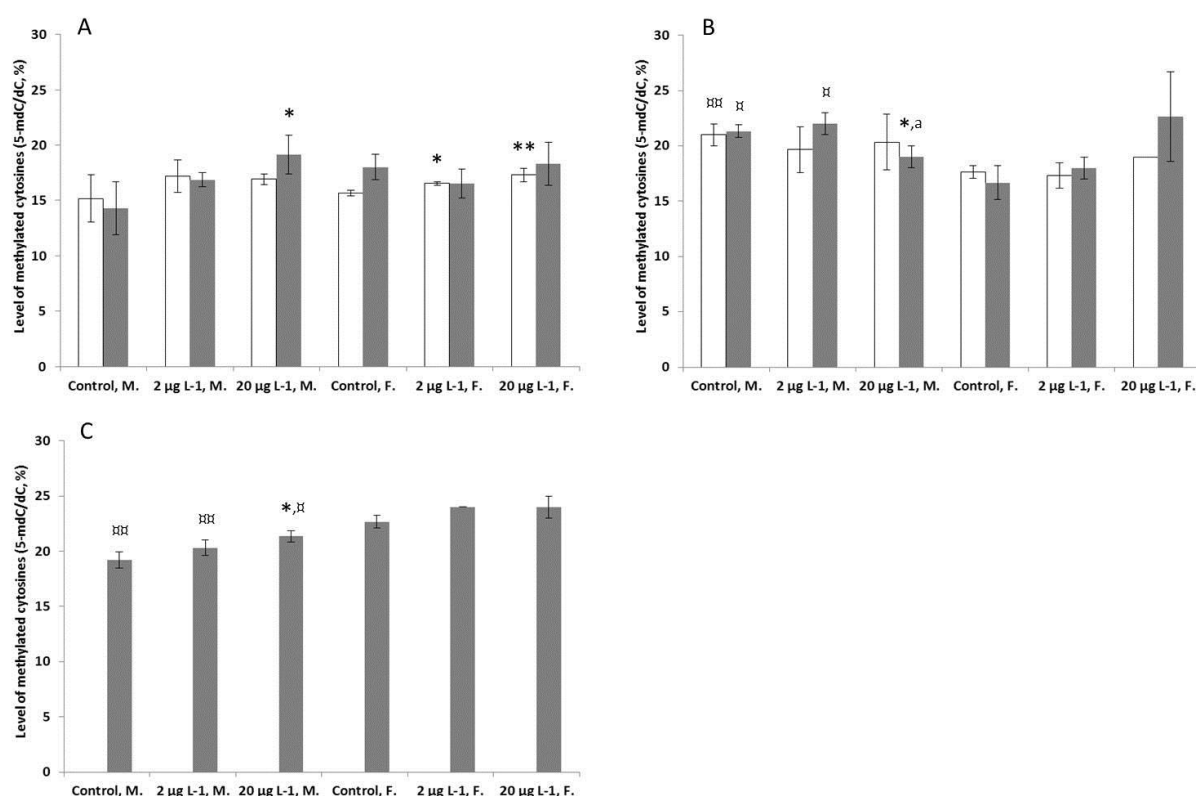
The data obtained for the eyes (Figure 2C) revealed significant dose-dependent hypomethylation in the males exposed to both DU concentrations compared with that in the controls (42% and 71% in the males exposed to 2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, respectively). DU-induced hypomethylation was also significantly (50%) greater in the males exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU than in the males exposed to 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU. No significant effects of DU were observed in the female eyes.

### *3.3 DU induced organ-specific cytosine methylation, assessed with HPLC–MS/MS*

We also examined the total amounts of methylated cytosine (Figure 3) and hydroxymethylated cytosine (Table S7) in the brains, gonads, and eyes of the DU-exposed fish. The levels of methylated cytosine measured in the female brain (Figure 3A) on day 7 (white bars) showed an early and significant impact of DU exposure at both concentrations. The exposed females presented a level of methylated cytosine significantly higher than that in the controls, and this increased at the higher DU concentration (from 15.7% in controls to 16.5% and 17.3% in brains of females exposed to 2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, respectively). However, these early effects were not detected 17 days later. Significant effects were only observed after exposure for 24 days (gray bars) in the males exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU (from 14.3% in the controls to 19.1% in the brains of males exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU).

In the gonads (Figure 3B), a significant sex-dependent difference was observed between the male and female controls. The control males displayed a significantly higher level of methylated cytosine than the control females (21.3% and 16.7%, respectively), accompanied by a significantly lower genome-wide level of hydroxymethylated cytosine (five-fold lower; Table S7). The effects of DU were observed in the male gonads after exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days, and the level of methylated cytosine was significantly lower than that in the control (19% and 21.3%, respectively). No significant effects of DU were observed in the female gonads.

The levels of methylated cytosine measured in the eyes (Figure 3C) showed a sex-specific difference. The control males displayed significantly lower levels of methylated cytosine than the control females (19.2% and 22.7%, respectively). The effects of DU were observed in the male eyes after exposure to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days, with significantly higher levels of methylated cytosine than the control (21.4% and 19.2%, respectively). No significant effects of DU were observed in the female eyes.



**Figure 3.** Level of 5-mdC relative to dC (in %) assessed with HPLC–MS/MS (means  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) in the brain (A), gonads (B), and eyes (C). White bars represent data collected after exposure for 7 days and gray bars after exposure for 24 days. M = male, F = female. \*Significantly different from the control group ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ). <sup>†</sup>Significantly different from the opposite sex under the same conditions (<sup>†</sup> $p < 0.05$ ; <sup>††</sup> $p < 0.01$ ). <sup>†††</sup>Significantly different from fish treated with 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU ( $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

### 4.1 Genome-wide cytosine methylation and MS-AFLP

The HPLC–MS/MS method is recommended for the quantification of genome-wide cytosine methylation because it provides a global assessment, accuracy, and reproducibility (Fraga and Esteller 2002; Lisanti *et al.* 2013). With this method, we demonstrated that DU exposure affected the total genome-wide cytosine methylation, particularly in males exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> DU for 24 days. Global increases in methylated cytosine were detected in the brains and eyes, but a reduction in the gonads of males exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> DU. HPLC has already been used to assess DNA methylation in earthworms sampled from metalloids-contaminated soils (Santoyo *et al.* 2011), and that study suggested that DNA hypomethylation is associated with metalloid detoxification through biomethylation. Using a different method (enzyme-linked immunosorbent assay) measuring also cytosine methylation level, a concentration-related increase in the methylated cytosine content of the genome was also detected in the somatic organs of the European eel contaminated with environmentally relevant concentrations of cadmium (0.4 and 4 µg L<sup>-1</sup>) (Pierron *et al.* 2014). Concerning the measurement of the 5-hmdC/5-mdC ratio (data presented in Table S7), only one DU-induced variation was observed in the gonads from males exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> for 24 days, with a significant increase as compared to controls (1.87 versus 0.43%). This oxidized form of methyl cytosine is related to the regulation of gene expression (Tollervey and Lunyak 2012). Indeed, in active DNA demethylation, hydroxymethylated cytosine is a transient form generated within the process of methyl cytosine replacement by the native form.

The MS-AFLP method does not require a sequenced reference genome and is useful for assessing the cytosine methylation status at a large number of loci randomly distributed throughout the genome (Alonso *et al.* 2015). Therefore, this is the method most widely used in ecological epigenetics (Schrey *et al.* 2013). After exposure for 24 days, DU triggered the hypomethylation of the *HpaII* cleavage sites in the male brain and eyes, whereas no significant effects were observed in the female brain or eyes. However, after the same period of exposure, a significant reduction in the methylation levels at *HpaII* cleavage sites was detected in the gonads of both male and female fish exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> DU. The decrease measured in somatic organs is in keeping with the trend towards the hypomethylation of the brain genomic DNA observed on polar bears chronically contaminated by methylmercury *via* food consumption (Pilsner *et al.* 2010). Other studies also highlighted significant impacts of ionizing radiation in mice chronically or acutely

irradiated, leading to significant DNA hypomethylation (Kovalchuk *et al.* 2004; Pogribny *et al.* 2004; Raiche *et al.* 2004).

In the present study, we demonstrated the effectiveness of both MS-AFLP and HPLC–MS/MS in assessing the effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of DU on the methylation patterns in DNA. It should be noted that the principles of these methods are fundamentally different. The first method is based on the assessment of methylation at an enzymatic cleavage site in the DNA (5'-CCGG-3') under selective amplification conditions, thus evaluating only a subset of the entire set of methylation sites. In contrast, the second method allows the measurement of total cytosine methylation at the genome level. In this context, combining MS-AFLP and HPLC–MS/MS to assess DNA methylation gives complementary information, as already described (Alonso *et al.* 2015). In our study, despite the differences observed with the two methods, the same conclusion can be drawn in both cases: chronic exposure of the adult zebrafish to DU affects the methylation patterns of its DNA, particularly in males exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> DU. Even if these methods cannot identify the specific sequences in the genome that are targeted by these modifications, they can be used to infer the possible effects of the methylation changes induced by chronic exposure to environmentally relevant concentrations of pollutants.

#### 4.2 Uranium-induced epigenetic modifications

In this study, we have demonstrated for the first time that environmental concentrations of DU induce epigenetic modifications in fish. To our knowledge, only two studies in the literature highlight the effects of uranium exposure on DNA methylation patterns. The first study focused on the level of methylation in the promoters of two genes *p16<sup>INK4a</sup>* (a tumor suppressor gene inhibiting cyclin-dependent kinase 4 and 6 activity involved in lung cancer) and *O<sup>6</sup>-MGMT* (a gene encoding a DNA repair enzyme protecting from effects induced by alkylating agents) in the sputum of uranium mine workers after chronic occupational exposure (Su *et al.* 2006 ). The cohort of exposed workers showed aberrant hypermethylation of both promoters, depending on the level of radon exposure. In the second study, the authors investigated the effects of DU pellets surgically implanted into mouse muscle (Miller *et al.* 2009). Significant DU-induced hypomethylation was detected in

the mouse splenic cells after exposure. Although these two studies are far from ecotoxicological concerns, they are the only studies to examine the effects of uranium exposure on DNA methylation.

The results presented in this study are consistent with those of previous studies, which stated that epigenetic changes are mechanisms implemented by the cell under environmental stress (Hala *et al.* 2014), including exposure to heavy metals (Fragou *et al.* 2011). Because epigenetics is still a new field in ecotoxicology, it is unclear how genomic DNA methylation can be modified by chronic exposure to environmental concentrations of DU. Three main mechanistic pathways have been proposed for environmentally induced epigenetic reprogramming (Gabory *et al.* 2009): (1) interaction with the epigenetic machinery, for example by affecting the methionine cycle or methyltransferase activity; (2) binding to nuclear receptors, leading to the activation or repression of various epigenetic factors; and (3) the activation of membrane receptor-signaling cascades, affecting DNA epigenetic marks.

Given the chemical properties of uranium, the first pathway can be excluded because uranium is not known to have an affinity for methyl groups, but rather for phosphate and carbonyl groups (Van Horn and Huang 2006; Basset *et al.* 2008; Dedieu *et al.* 2009). However, the deleterious effects of exposure to heavy metals on DNA methyltransferase activities have been demonstrated (Takiguchi *et al.* 2003; Huang *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2008), and might be a possible way to explain uranium effects on DNA methylation patterns. Because we have no knowledge of the specific nuclear receptors for uranium, it is difficult to consider the relevance of the second pathway to uranium-induced epigenetic changes. However, because the substitution of calcium by the uranyl cation has been detected in proteins (Pible *et al.* 2010; Pardoux *et al.* 2012), the third pathway is possibly involved.  $\text{Ca}^{2+}$  is a second messenger in numerous membrane-receptor signaling cascades and changes in intracellular calcium concentrations caused by DU could disrupt these signaling cascades.

In addition to these pathways, another important mechanism has been proposed by Franco *et al.* (2008), involving oxidative stress, which is consistent with the prooxidant properties of uranium since this actinide can disrupt oxygen consumption within the mitochondrial respiratory chain (Lerebours *et al.* 2010b).

#### 4.3 DNA methylation and uranium accumulation

It must be noted that there was a high variability in the accumulation of uranium (Table S2, Figure 1). This phenomenon has already been observed and is typical of actinide uptake, and particularly uranium (Lobel *et al.* 1991; Barillet *et al.* 2005; Barillet *et al.* 2007; Lerebours *et al.* 2009; Lerebours *et al.* 2010a; Lerebours *et al.* 2010b; Augustine *et al.* 2012; Bourrachot *et al.* 2014). Despite the fact that these studies were performed under the same experimental conditions, the authors observed the same range of variability (Table S8), whatever the exposure duration or the number of biological replicates used (from 3 to 10).

The DNA methylation patterns observed with both analytical methods do not reflect the DU accumulation in organs measured at an instant *t*. It is possible that under these conditions of chronic exposure to low concentrations of DU, the dynamics of uranium accumulation may be influenced by excretion mechanisms, for example detoxification mechanism *via* the ABC transporter activity, which was involved in DU detoxification in clams (Tran *et al.* 2005). For instance, the uranium concentrations measured in the brains of males exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU decreased sharply between 7 and 24 days, from 2.10 to 0.12  $\mu\text{g U g}^{-1}$  d.w., a level similar to that in the control fish (Table 1). However, despite this decrease, a trend was observed for a higher change of DNA methylation in this organ with increasing DU concentration in the water and the exposure duration. Thus, the DNA methylation patterns would reflect the transient DU accumulation in tissues which could result from adaptive capabilities of animals, ruling internalization and excretion processes, as discussed by McGeer *et al.* (2003) for other biological responses. These hypotheses would corroborate one of the concepts of epigenetics stating that marks such as DNA methylation and histone modification integrate life-long history of environmental stress exposure (Head J.A. *et al.* 2012; Hala *et al.* 2014).

Finally, it must be stressed that the provisional predicted no-effect concentration (PNEC) determined for uranium (0.3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; INERIS (2008)) in aquatic systems is based on the level of uranium contamination in the water, and not on the uranium burden in the body. Thus, the issues of uranium uptake through biological membranes, toxicokinetics and toxicodynamics still require investigation.

#### 4.4 Sex-related methylation patterns

The changes in the DNA methylation patterns detected after chronic exposure to DU were greater in males than in females. After fish were exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU for 24 days, MS-AFLP and HPLC–MS/MS indicated that the DNA methylation in males was significantly affected in all the organs studied. However, the effects of DU on the DNA methylation patterns were less pronounced in females treated under the same conditions, with one only significant effect detected, in the gonads with MS-AFLP. Sex-specific effects on DNA methylation patterns have also been observed in polar bears (Pilsner *et al.* 2010). In males, a trend towards hypomethylation of the brain genomic DNA was observed, which correlated with the accumulated mercury levels in this organ, whereas no effects were observed in the female bears. These differences between sexes were also observed in mice exposed to ionizing radiation (Kovalchuk *et al.* 2004; Pogribny *et al.* 2004; Raiche *et al.* 2004). In those studies, genome-wide DNA hypomethylation was observed to occur predominantly and persistently in irradiated males. These results are consistent with our observations, highlighting the greater genome-wide variations in methylated cytosine in the male genomic DNA than in the female DNA after exposure to DU. One hypothesis is that the sex-specific differences observed during our experiment involve the endocrine system. For example, in mammals such as the rat and mouse, growth hormone secretion is pulsatile in males but continuous in females, inducing different methylation patterns in the sequences that regulate the expression of some genes in the liver (Gabory *et al.* 2009). Therefore, sex hormones play an important role in general methylation patterns, which might explain the sex-related differences observed in our study, although the mechanistic pathways require further investigation.

## 5. Conclusions

The results presented in this study provide new insight into the effects of environmental concentrations of DU on DNA methylation in chronically exposed organisms. In particular, significant sex- and tissue-specific effects were detected in the DNA methylation patterns in zebrafish following chronic exposure to environmentally relevant concentrations of DU. However, the underlying mechanisms associated with the genome-wide changes in cytosine methylation are still poorly understood. These results require further investigation to identify the targeted sequences and determine the biological

functions affected. Because cytosine methylation was affected in the gonads, it will be important to study the possible transmission of DU-induced methylation patterns to the offspring of exposed fish.

### **Acknowledgments**

The authors thank A. Le Guernic for help with the statistical analysis and R. This project was supported by the European project COMET (7<sup>th</sup> PCRD EURATOM, contract number: Fission-2012-3.4.1-604794) and the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety.



## References

- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Medrano, M., Herrera, C.M., 2015. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Mol Ecol Resour* 6, doi: 10.1111/1755-0998.12426. [Epub ahead of print].
- Angers, B., Castonguay, E., Massicotte, R., 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular ecology* 19, 1283-1295.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Kooijman, S.A., 2012. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat Toxicol* 119, 9-26.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ. Pollut.* 159, 495-502.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 497-505.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*. First experimental results. *Radioprotection. Radioprotection Suppl* 1, vol 40, 175-181.
- Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., Adam-Guillermin, C., 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquat. Toxicol.* 100, 295-302.
- Basset, C., Dedieu, A., Guerin, P., Quemeneur, E., Meyer, D., Vidaud, C., 2008. Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *J Chromatogr A* 1185, 233-240.
- Bird, A.P., 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70, 5-8.
- Bourrachot, S., Brion, F., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalie, I., Palluel, O., Adam-Guillermin, C., 2014. Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 154, 1-11.
- Dedieu, A., Berenguer, F., Basset, C., Prat, O., Quemeneur, E., Pible, O., Vidaud, C., 2009. Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 5365-5376.
- Denison, F., 2004. Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. In. Université de Provence Aix Marseille I.
- Faucher, K., Floriani, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2012. Uranium-induced sensory alterations in the zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 124-125, 94-105.

- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 47-54.
- Fraga, M.F., Esteller, M., 2002. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33, 636-649.
- Fragou, D., Fragou, A., Kouidou, S., Njau, S., Kovatsi, L., 2011. Epigenetic mechanisms in metal toxicity. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 343-352.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G., Panayiotidis, M.I., 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 266, 6-11.
- Fulnecek, J., Kovarik, A., 2014. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics* 15, 2.
- Gabory, A., Attig, L., Junien, C., 2009. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Molecular and cellular endocrinology* 304, 8-18.
- Gabory, A., Attig, L., Junien, C., 2011. Developmental programming and epigenetics. *The American journal of clinical nutrition* 94, 1943S-1952S.
- Garnier-Laplace, J., Colle, C., Morello, M., 2001. Natural Uranium and the environment. [http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium\\_UK.pdf](http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium_UK.pdf).
- Garza-Manero, S., Pichardo-Casas, I., Arias, C., Vaca, L., Zepeda, A., 2014. Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain. Res.* 10, 80-93.
- Hala, D., Huggett, D.B., Burggren, W.W., 2014. Environmental stressors and the epigenome. *Drug Discovery Today: Technol.* 12, e3-e8.
- Head J.A., Dolinoy D.C., Basu, N., 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environ Toxicol Chem* 31, 221-227.
- Holliday, R., 1994. Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15, 453-457.
- Huang, D., Zhang, Y., Qi, Y., Chen, C., Ji, W., 2008. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicology letters* 179, 43-47.
- IAEA, O.N.a., 2012. *Uranium 2011: Resources, Production and Demand*; ISBN 978-92-64-17803-8. <http://www.oecd-nea.org/ndd/pubs/2012/7059-uranium-2011.pdf>.
- INERIS, 2008. Uranium. Toxicological and environmental data sheets of chemicals. <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/cas/7440-61-1>.
- Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L., Wu, L., 2008. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology* 244, 49-55.

Kovalchuk, O., Burke, P., Besplug, J., Slovack, M., Filkowski, J., I., P., 2004. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat Res* 548, 75-84.

Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brethes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2010b. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquat Toxicol* 100, 66-74.

Lerebours, A., Bourdineaud, J.-P., Van Der Ven, K., Vandenbrouck, T., Gonzalez, P., Camilleri, V., Floriani, M., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2010a. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain; transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environ. Sci. Technol* 44, 1438-1443.

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

Lisanti, S., Omar, W.A., Tomaszewski, B., De Prins, S., Jacobs, G., Koppen, G., Mathers, J.C., Langie, S.A., 2013. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One* 8.

Lobel, P.B., Longerich, H.P., Jackson, S.E., Belkhole, S.P., 1991. A major factor contributing to the high degree of unexplained variability of some elements concentrations in biological tissue: 27 elements in 5 organs of the mussel *Mytilus* as a model. *Arch Environ Contam Toxicol* 21, 118-125.

McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaff, J.M., DeForest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J., Green, A., 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* 22, 1017-1037.

Miller, A.C., Stewart, M., Rivas, R., 2009. DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie* 91, 1328-1330.

Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Guilloureau, L., Adriano, J.M., Berthomieu, C., 2012. Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS One* 7, e41922.

Pereira, S., Malard, V., Ravanat, J.L., Davin, A.H., Armengaud, J., Foray, N., Adam-Guillermin, C., 2014. Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. *PLoS One* 9, e92974.

Pible, O., Vidaud, C., Plantevin, S., Pellequer, J.L., Quemeneur, E., 2010. Predicting the disruption by  $UO_2(2+)$  of a protein-ligand interaction. *Protein Sci* 19, 2219-2230.

- Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 797-803.
- Pilsner, J.R., Lazarus, A.L., Nam, D.H., Letcher, R.J., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N., 2010. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains *via* the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Mol. Ecol.* 19, 307-314.
- Pogribny, I., Raiche, J., Slovack, M., Kovalchuk, O., 2004. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1253-1261.
- Raiche, J., Rodriguez-Juarez, R., Pogribny, I., Kovalchuk, O., 2004. Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 39-47.
- Rando, O.J., Verstrepen, K.J., 2007. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128, 655-668.
- Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J., 2002. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 23, 1911-1918.
- Salonen, L., 1994. <sup>238</sup>U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *IAHS* 222, 71-148.
- Santoyo, M.M., Flores, C.R., Torres, A.L., Wrobel, K., 2011. Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. *Environ Pollut* 159, 2387-2392.
- Schrey, A.W., Alvarez, M., Foust, C.M., Kilvitis, H.J., Lee, J.D., Liebl, A.L., Martin, L.B., Richards, C.L., Robertson, M., 2013. Ecological Epigenetics: Beyond MS-AFLP. *Integr Comp Biol* 53, 340-350.
- Su, S., Jin, Y., Zhang, W., Yang, L., Shen, Y., Cao, Y., Tong, J., 2006. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine. *Occupational Health* 48.
- Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., Waalkes, M.P., 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental cell research* 286, 355-365.
- Tollervey, J.R., Lunyak, V.V., 2012. Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 7, 823-840.
- Tran, D., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J., 2005. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environ Toxicol Chem* 24, 2278-2284.

Van Horn, J.D., Huang, H., 2006. Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coordination Chemistry Reviews* 250 765-775.

WHO, 2012. *Uranium in Drinking-water*. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO/SDE/WSH/03.04/118/Rev/1.

Xu, M., Li, X., Korban, S., 2000. AFLP-Based detection of DNA Methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 361-368.



## Supplementary material

**Table S1.** Nominal and measured concentrations of dissolved uranium in the water throughout the experiment.

**Table S2.** Individual data for uranium accumulation through the experiment.

**Table S3.** Adapters and primer sequences used in MS-AFLP

**Table S4.** MS-AFLP methylation levels in brain after 7 and 24 days of DU exposure.

**Table S5.** MS-AFLP methylation levels in gonads after 7 and 24 days of DU exposure.

**Table S6.** MS-AFLP methylation levels in eyes after 24 days of U exposure.

**Table S7.** HPLC-MS/MS data measured in the brain, gonads and eyes after 7 and 24 days of DU exposure.

**Table S8.** Summary of studies led on zebrafish exposed to DU waterborne concentrations, and related U accumulation values measured in target organs.

Table S1. Nominal and measured concentrations of dissolved uranium in the water throughout the experiment. Results are given as mean value  $\pm$  standard deviation ( $n = 29$  and  $62$  for  $7$  and  $24$  d of exposure, respectively).

Experimental conditions		Nominal values	Measured values	
			7 d	24 d
Control Males	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	< LD	< LD
Control Females	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	< LD	< LD
2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Males	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2	$1.4 \pm 0.6$	$2.3 \pm 1.0$
2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Females	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2	$1.7 \pm 0.8$	$2.2 \pm 1.0$
20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Males	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20	$16.6 \pm 12.7$	$17.3 \pm 9.2$
20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Females	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20	$15.4 \pm 10.0$	$16.9 \pm 7.8$



Table S2. Individual data for uranium accumulation through the experiment ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight). ND means No Data available.

A. Uranium bioaccumulation data after 7 days exposure

Nominal U concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Brain		Gonads	
	Male	Female	Male	Female
0	0.05	0.08	0.00	0.03
	0.06	0.08	0.01	0.01
	0.03	0.06	0.00	0.04
	0.05	0.05	0.12	0.11
	0.03	ND	0.46	0.03
2	0.24	0.10	0.36	2.58
	0.04	0.10	0.83	0.05
	0.03	0.28	0.00	0.07
	0.00	0.08	0.00	1.88
	0.08	0.16	0.01	0.48
20	2.10	0.93	32.26	4.56
	4.29	0.08	25.95	0.70
	5.40	0.20	10.67	0.27
	0.45	3.01	11.17	21.43
	1.82	2.64	5.29	2.08

B. Uranium bioaccumulation data after 24 days exposure

Nominal U concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Brain		Gonads		Eyes	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	0.08	0.09	0.00	0.03	0.05	0.08
	0.41	0.07	0.02	0.14	0.09	0.04
	0.01	0.26	0.00	0.16	0.07	0.07
	0.00	0.09	0.09	0.61	0.05	0.07
	0.00	0.11	0.10	0.01	0.07	0.00
2	0.06	0.03	0.13	0.35	0.96	0.35
	0.03	0.14	0.57	0.14	0.18	0.20
	0.31	0.14	0.53	0.04	0.24	0.31
	ND	0.08	ND	0.07	ND	0.44
	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	0.11	0.53	234	0.99	0.07	1.29
	0.54	0.60	7.77	3.74	1.05	4.11
	0.16	0.65	1.05	6.09	0.52	0.95
	0.12	4.20	9.33	46.3	0.66	5.54
	0.06	0.68	103	1.75	0.09	48.7

Table S3. Adapters and primer sequences used in MS-AFLP

---

<i>EcoR</i> I adapter F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoR</i> I adapter R	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II adapter F	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II adapter R	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
<i>EcoR</i> I pre-selective primer	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II pre-selective primer	5'-GATGAGTCTAGAACGG-3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAG primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG- 3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAC primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC- 3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II + TAG primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG- 3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II + TAC primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAC- 3'

---

Table S4. MS-AFLP methylation levels in brain after 7 and 24 days of DU exposure. Results (Mean  $\pm$  SD) were obtained from 5 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as  $n$  total = 15. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100. \* Significant difference as compared to controls from the same sex (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

		D 7																	
		Control				Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$				Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$									
		Male		Female		Male		Female		Male		Female							
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.39	$\pm$	0.23	0.41	$\pm$	0.18	0.40	$\pm$	0.15	0.68	$\pm$	0.31	0.66	$\pm$	0.32	0.45	$\pm$	0.16
Methylation level (%)		60.9	$\pm$	22.9	51.3	$\pm$	11.9	60.1	$\pm$	15.2	31.6	$\pm$	30.6	33.6	$\pm$	32.5	54.8	$\pm$	15.6
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>																			
Ratio		0.33	$\pm$	0.09	0.39	$\pm$	0.14	0.44	$\pm$	0.18	0.47	$\pm$	0.16	0.77	$\pm$	0.19	0.62	$\pm$	0.27
Methylation level (%)		67.5	$\pm$	9.22	61.2	$\pm$	14.1	56.1	$\pm$	18.1	53.5	$\pm$	15.6	25.0	$\pm$	19.7	37.6	$\pm$	27.1
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.60	$\pm$	0.19	0.67	$\pm$	0.09	0.73	$\pm$	0.12	0.57	$\pm$	0.18	0.70	$\pm$	0.17	0.74	$\pm$	0.10
Methylation level (%)		39.5	$\pm$	19.3	33.1	$\pm$	9.2	26.9	$\pm$	12.2	42.9	$\pm$	17.9	29.9	$\pm$	17.2	26.1	$\pm$	10.2
<b>Total</b>																			
Ratio		0.45	$\pm$	0.21	0.49	$\pm$	0.13	0.52	$\pm$	0.21	0.58	$\pm$	0.23	0.71	$\pm$	0.23	0.60	$\pm$	0.21
Methylation level (%)		55.2	$\pm$	21.2	51.2	$\pm$	18.7	47.7	$\pm$	20.9	41.9	$\pm$	22.9	28.9	$\pm$	22.6	39.5	$\pm$	21.4
		D 24																	
		Control				Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$				Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$									
		Male		Female		Male		Female		Male		Female							
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.52	$\pm$	0.06	0.43	$\pm$	0.15	0.81	$\pm$	0.05	0.67	$\pm$	0.23	0.83	$\pm$	0.24	0.50	$\pm$	0.14
Methylation level (%)		48.4	$\pm$	9.01	56.5	$\pm$	14.7	18.5	$\pm$	5.29	33.4	$\pm$	23.3	16.7	$\pm$	23.6	50.0	$\pm$	13.6
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>																			
Ratio		0.56	$\pm$	0.08	0.59	$\pm$	0.28	0.68	$\pm$	0.14	0.69	$\pm$	0.21	0.82	$\pm$	0.25	0.62	$\pm$	0.25
Methylation level (%)		43.6	$\pm$	10.1	41.2	$\pm$	27.9	32.0	$\pm$	13.9	30.7	$\pm$	21.3	18.0	$\pm$	24.9	37.9	$\pm$	24.9
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.53	$\pm$	0.10	0.53	$\pm$	0.14	0.58	$\pm$	0.02	0.79	$\pm$	0.23	0.71	$\pm$	0.22	0.68	$\pm$	0.14
Methylation level (%)		47.2	$\pm$	11.8	46.8	$\pm$	14.1	42.14	$\pm$	2.48	20.8	$\pm$	23.4	29.1	$\pm$	21.7	32.0	$\pm$	13.9
<b>Total</b>																			
Ratio		0.54	$\pm$	0.05	0.52	$\pm$	0.20	0.68	$\pm$	0.13	0.72	$\pm$	0.22	0.79	$\pm$	0.22	0.61	$\pm$	0.19
Methylation level (%)		46.4	$\pm$	5.21	48.2	$\pm$	19.6	31.77	$\pm$	12.8 *	28.3	$\pm$	21.7	21.2	$\pm$	22.4 **	39.2	$\pm$	18.7

Table S5. MS-AFLP methylation levels in gonads after 7 and 24 days of DU exposure. Results (Mean  $\pm$  SD) were obtained from 5 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as  $n$  total = 15. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100. \* Significant difference as compared to controls from the same sex (\*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.01). <sup>a</sup> Significantly different from the opposite sex (<sup>a</sup>  $p$  < 0.05; <sup>ab</sup>  $p$  < 0.01). <sup>a</sup> Significant difference compared to 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  condition ( $p$  < 0.05).

		D 7																	
		Control						Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$						Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$					
		Male			Female			Male			Female			Male			Female		
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.62	$\pm$	0.35	0.32	$\pm$	0.06	0.58	$\pm$	0.20	0.39	$\pm$	0.20	0.70	$\pm$	0.29	0.55	$\pm$	0.22
Methylation level (%)		38.2	$\pm$	34.6	67.9	$\pm$	6.45	42.5	$\pm$	19.7	60.7	$\pm$	19.9	30.5	$\pm$	29.9	45.2	$\pm$	22.3
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>																			
Ratio		0.55	$\pm$	0.19	0.42	$\pm$	0.15	0.65	$\pm$	0.20	0.49	$\pm$	0.23	0.77	$\pm$	0.23	0.59	$\pm$	0.13
Methylation level (%)		45.2	$\pm$	19.3	58.4	$\pm$	15.1	35.2	$\pm$	20.1	51.4	$\pm$	23.2	23.0	$\pm$	22.8	41.3	$\pm$	12.9
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.60	$\pm$	0.12	0.36	$\pm$	0.12	0.78	$\pm$	0.12	0.70	$\pm$	0.15	0.94	$\pm$	0.09	0.52	$\pm$	0.08
Methylation level (%)		39.8	$\pm$	11.5	63.8	$\pm$	11.8	21.9	$\pm$	11.9	29.9	$\pm$	15.0	6.19	$\pm$	8.52	47.6	$\pm$	8.20
<b>Total</b>																			
Ratio		0.59	$\pm$	0.22	0.37	$\pm$	0.12	0.67	$\pm$	0.19	0.53	$\pm$	0.23	0.80	$\pm$	0.23	0.55	$\pm$	0.15
Methylation level (%)		41.1	$\pm$	22.3	63.4	$\pm$	11.6	33.2	$\pm$	18.6	47.4	$\pm$	22.6	19.9	$\pm$	22.8	44.7	$\pm$	14.7
		D 24																	
		Control						Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$						Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$					
		Male			Female			Male			Female			Male			Female		
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.40	$\pm$	0.15	0.48	$\pm$	0.11	0.51	$\pm$	0.13	0.53	$\pm$	0.21	0.82	$\pm$	0.21	0.61	$\pm$	0.13
Methylation level (%)		51.3	$\pm$	9.84	51.9	$\pm$	11.1	49.1	$\pm$	13.1	35.1	$\pm$	9.33	17.7	$\pm$	21.2	39.4	$\pm$	12.8
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>																			
Ratio		0.61	$\pm$	0.24	0.60	$\pm$	0.09	0.60	$\pm$	0.16	0.54	$\pm$	0.08	0.74	$\pm$	0.16	0.82	$\pm$	0.18
Methylation level (%)		51.6	$\pm$	11.4	40.0	$\pm$	9.13	40.2	$\pm$	16.1	45.7	$\pm$	7.74	24.3	$\pm$	16.9	17.6	$\pm$	18.2
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>																			
Ratio		0.44	$\pm$	0.14	0.63	$\pm$	0.14	0.68	$\pm$	0.14	0.64	$\pm$	0.24	0.74	$\pm$	0.19	0.62	$\pm$	0.10
Methylation level (%)		55.9	$\pm$	14.4	37.3	$\pm$	13.7	31.9	$\pm$	14.3	35.9	$\pm$	23.6	25.9	$\pm$	18.9	38.3	$\pm$	9.58
<b>Total</b>																			
Ratio		0.48	$\pm$	0.19	0.57	$\pm$	0.12	0.60	$\pm$	0.16	0.58	$\pm$	0.19	0.77	$\pm$	0.18	0.68	$\pm$	0.17
Methylation level (%)		51.6	$\pm$	19.4	43.1	$\pm$	12.5	40.4	$\pm$	15.2	42.5	$\pm$	18.7	23.2	$\pm$	18.1	31.8	$\pm$	16.6

Table S6. MS-AFLP methylation levels in eyes after 24 days of U exposure. Results (Mean  $\pm$  SD) were obtained from 5 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as  $n$  total = 15. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100. \* Significant difference as compared to controls from the same sex (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). <sup>#</sup> Significantly different from the opposite sex ( $p = 0.03093$ ).

		D 7																			
		Control						Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$						Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$							
		Male			Female			Male			Female			Male			Female				
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>																					
Ratio		0.47	$\pm$	0.12	0.59	$\pm$	0.22	0.89	$\pm$	0.10	0.91	$\pm$	0.13	0.95	$\pm$	0.11	0.86	$\pm$	0.20		
Methylation level (%)		52.6	$\pm$	12.1	40.5	$\pm$	22.2	10.7	$\pm$	9.83	9.05	$\pm$	13.1	5.00	$\pm$	11.2	14.3	$\pm$	20.2		
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>																					
Ratio		0.56	$\pm$	0.18	0.77	$\pm$	0.22	0.65	$\pm$	0.25	0.75	$\pm$	0.16	0.86	$\pm$	0.13	0.73	$\pm$	0.28		
Methylation level (%)		44.0	$\pm$	17.9	23.3	$\pm$	22.1	35.2	$\pm$	25.1	24.9	$\pm$	16.2	14.0	$\pm$	12.9	27.1	$\pm$	28.3		
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>																					
Ratio		0.42	$\pm$	0.16	0.61	$\pm$	0.19	0.56	$\pm$	0.18	0.74	$\pm$	0.23	0.74	$\pm$	0.10	0.63	$\pm$	0.08		
Methylation level (%)		57.9	$\pm$	16.4	39.0	$\pm$	19.3	43.9	$\pm$	18.0	25.9	$\pm$	23.1	25.9	$\pm$	10.3	37.1	$\pm$	8.3		
<b>Total</b>																					
Ratio		0.42	$\pm$	0.16	0.66	$\pm$	0.21	0.70	$\pm$	0.23	0.80	$\pm$	0.18	0.85	$\pm$	0.14	0.74	$\pm$	0.21		
Methylation level (%)		51.5	$\pm$	15.6	34.3	$\pm$	21.2	29.9	$\pm$	22.7	***	19.9	$\pm$	18.4	14.9	$\pm$	13.9	*** <sup>#</sup>	26.1	$\pm$	21.4

Table S7. HPLC-MS/MS data measured in the brain, gonads and eyes after 7 and 24 days of DU exposure. Results (Mean  $\pm$  SD) were obtained from 3 replicates per condition. 5-mdC/dC ratio corresponds to the percentage of methylated cytosines as compared to total cytosines. The 5-hmdC/5-mdC ratio represents the percentage of hydroxymethylated cytosines compared to methylated cytosines. \* Significant difference as compared to controls from the same sex (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). <sup>♂</sup> Significantly different from the opposite sex (<sup>♂</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>♂♂</sup>  $p < 0.01$ ). <sup>♂</sup> Significantly different from the males exposed to 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (<sup>♂</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>♂♂</sup>  $p < 0.01$ ).

	D 7											
	Control				Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$				Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
<b>Brain</b>												
5-mdC/dC (%)	15.2	$\pm$ 2.13	15.7	$\pm$ 0.27	17.2	$\pm$ 1.49	16.5	$\pm$ 0.16 *	16.9	$\pm$ 0.50	17.3	$\pm$ 0.62 **
5-hmdC/5-mdC (%)	2.14	$\pm$ 0.86	1.84	$\pm$ 0.57	2.18	$\pm$ 0.76	2.56	$\pm$ 1.19	1.32	$\pm$ 0.58	2.03	$\pm$ 0.59
<b>Gonads</b>												
5-mdC/dC (%)	21.0	$\pm$ 1.00 <sup>♂</sup>	17.7	$\pm$ 0.58	19.7	$\pm$ 2.08	17.3	$\pm$ 1.15	20.3	$\pm$ 2.52	19.0	$\pm$ 0.00
5-hmdC/5-mdC (%)	0.60	$\pm$ 0.26 <sup>♂♂</sup>	2.87	$\pm$ 0.21	1.57	$\pm$ 0.80	3.03	$\pm$ 0.50	2.00	$\pm$ 1.54	3.10	$\pm$ 0.17
<b>D 24</b>												
	Control				Condition 2 $\mu\text{g L}^{-1}$				Condition 20 $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
<b>Brain</b>												
5-mdC/dC (%)	14.3	$\pm$ 2.42	18.0	$\pm$ 1.15	16.9	$\pm$ 0.64	16.5	$\pm$ 1.32	19.1	$\pm$ 1.77 *	18.3	$\pm$ 1.92
5-hmdC/5-mdC (%)	1.79	$\pm$ 0.75	2.95	$\pm$ 0.82	2.05	$\pm$ 0.74	2.82	$\pm$ 1.25	3.24	$\pm$ 1.82	1.98	$\pm$ 0.78
<b>Gonads</b>												
5-mdC/dC (%)	21.3	$\pm$ 0.88 <sup>♂</sup>	16.7	$\pm$ 1.53	22.0	$\pm$ 1.00 <sup>♂</sup>	18.0	$\pm$ 1.00	19.0	$\pm$ 1.00 <sup>♂♂</sup>	22.7	$\pm$ 4.04
5-hmdC/5-mdC (%)	0.43	$\pm$ 0.32	1.43	$\pm$ 0.58	0.63	$\pm$ 0.29	2.27	$\pm$ 1.35	1.87	$\pm$ 0.32 <sup>♂♂♂</sup>	1.57	$\pm$ 1.10
<b>Eyes</b>												
5-mdC/dC (%)	19.2	$\pm$ 0.75 <sup>♂♂</sup>	22.7	$\pm$ 0.58	20.3	$\pm$ 0.70 <sup>♂♂</sup>	24.0	$\pm$ 0.00	21.4	$\pm$ 0.51 <sup>♂♂</sup>	24.0	$\pm$ 1.00
5-hmdC/5-mdC (%)	6.57	$\pm$ 3.06	4.80	$\pm$ 0.72	9.10	$\pm$ 4.45	4.40	$\pm$ 0.17	8.37	$\pm$ 1.40 <sup>♂</sup>	4.83	$\pm$ 0.57

**Table S8.** Summary of studies led on zebrafish exposed to DU waterborne concentrations, and related U accumulation values measured in target organs.

Reference	[DU] <sup>a</sup> water ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Organ	Exposure (day)	Sexe	Number of samples	U accumulation (mean $\pm$ SD, $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
Barillet <i>et al.</i> , 2005	20	Whole body	10d	Both	10	1.70 $\pm$ 1.70			
			20d			28.6 $\pm$ 21.3			
	100		10d			19.6 $\pm$ 12.9			
			20d			43.1 $\pm$ 30.1			
Barillet <i>et al.</i> , 2007	100	Whole body	10d 20d	Both	10	8.22 $\pm$ 3.99 22.1 $\pm$ 33.4			
Lerebours <i>et al.</i> , 2009	23	Brain	10d	Both	5	0.018 $\pm$ 0.014			
			21d			0.049 $\pm$ 0.022			
	130		10d			0.082 $\pm$ 0.045			
			21d			0.160 $\pm$ 0.057			
Lerebours <i>et al.</i> , 2010a	15	Brain	3d	Male	5	0.170 $\pm$ 0.213			
			10d			0.186 $\pm$ 0.088			
	100		3d			0.829 $\pm$ 0.734			
			10d			0.634 $\pm$ 0.206			
Lerebours <i>et al.</i> , 2010b	30	Brain	10d	Male	5	0.155 $\pm$ 0.149			
			28d			0.393 $\pm$ 0.407			
	100		10d			2.79 $\pm$ 1.40			
			28d			0.82 $\pm$ 0.60			
Bourrachot <i>et al.</i> , 2014	20	Whole body	20d	Male	3	38.5 $\pm$ 54.8			
		Gonads				9	9.80 $\pm$ 17.9		
		Whole body		Female	3	10.8 $\pm$ 2.66			
		Gonads				9	5.32 $\pm$ 4.08		
		Whole body				3	130.5 $\pm$ 126.6		
	250	Gonads	20d	Male	9	61.5 $\pm$ 70.4			
		Whole body				Female	3	128 $\pm$ 47.7	
		Gonads		9	128 $\pm$ 221				
		Gombeau <i>et al.</i> , (present study)		20	Brain			7d	Male
						24d	0.20 $\pm$ 0.09		
7d	Female		1.37 $\pm$ 0.61						
24d			1.33 $\pm$ 0.72						
Gonads	7d		Male		17.1 $\pm$ 5.12				
	24d				71.1 $\pm$ 44.9				
	7d	Female	5.81 $\pm$ 3.98						
24d	11.8 $\pm$ 8.68								
Gombeau <i>et al.</i> , (unpublished data)	20	Brain	10d	Male	5	1.55 $\pm$ 1.11			
				Female		1.33 $\pm$ 0.49			
				Gonads		Male	0.92 $\pm$ 0.40		
Female	2.31 $\pm$ 1.52								





## 2. Principales conclusions

Cette première expérience visait à déterminer le potentiel perturbateur d'une exposition chronique à de faibles concentrations en uranium appauvri sur les profils de méthylation de l'ADN génomique de poissons zèbre mâles et femelles. Les résultats obtenus ont permis d'éclaircir plusieurs points à ce sujet :

### 2.1. Pertinence de la double approche AFLP-MS et HPLC-MS/MS

Les données acquises au cours de l'expérience ont permis de mettre en évidence un impact de l'exposition chronique à l'uranium appauvri sur les profils de méthylation.

Les données acquises en AFLP-MS témoignent d'une hypométhylation du site de coupure de l'enzyme *HpaII*, qui a pu être détectée chez les mâles dès 7 jours d'exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Au second temps de prélèvement, la quasi-totalité des effets ont été observés chez les mâles exposés, hormis dans les gonades des poissons exposés à la plus forte concentration, où une hypométhylation significative a été observée chez les deux sexes.

Concernant les résultats des analyses par HPLC-MS/MS, ils ont permis de déceler dès 7 jours d'exposition une augmentation significative du niveau de cytosines méthylées chez les femelles exposées. En revanche, au second temps de prélèvement, seuls les mâles exposés à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri ont présenté des variations significatives, et cela dans les trois organes de l'étude, avec une hyperméthylation dans le cerveau et les yeux ainsi qu'une hypométhylation dans les gonades.

A ce jour, cette étude est la seule à témoigner d'impacts de concentrations environnementales en uranium appauvri sur les profils de méthylation de l'ADN génomique de vertébrés aquatiques. En revanche, de manière plus large, concernant les effets des éléments trace métalliques à des concentrations environnementales sur la méthylation de l'ADN, nos résultats sont en lien avec ceux présents dans la littérature (Pilsner *et al.* 2010; Pierron *et al.* 2014).

Les résultats obtenus par la double approche : site de restriction enzymatique / variations à l'échelle globale du génome est tout à fait concluante. Combiner les deux permet d'obtenir des informations complémentaires, comme cela a déjà été démontré

(Alonso *et al.* 2015). En effet, que ce soit par HPLC-MS ou AFLP-MS, l'impact de l'exposition uranifère est patent notamment à la plus forte concentration. De plus, en dépit du fait que les variations du niveau de méthylation ne puissent être associées à des régions bien précises du génome, l'utilisation de ces deux techniques semble appropriée pour la prospection d'effets de contaminants à des concentrations environnementales sur les profils de méthylation de l'ADN.

## 2.2. Effets de l'uranium sur les profils de méthylation

Les résultats de cette étude sont les premiers à mettre en évidence l'impact d'une exposition chronique à l'uranium appauvri à des concentrations environnementales sur les profils de méthylation de l'ADN génomique chez le poisson zèbre. Ces résultats corroborent les hypothèses présentes dans la littérature concernant l'apparition de réponses épigénétiques lors d'exposition à un stress environnemental (Hala *et al.* 2014) et plus particulièrement dans le cadre d'une exposition chronique aux éléments trace métalliques (Fragou *et al.* 2011).

Les mécanismes responsables de l'action de l'uranium sur la variation des profils de méthylation restent inconnus. Cependant, quelques modes d'actions hypothétiques des polluants ont été avancés (Gabory *et al.* 2011) tels que : (i) l'impact direct sur les facteurs épigénétiques et notamment les enzymes responsables de la mise en place des mécanismes épigénétiques (e.g. les méthyltransférases de l'ADN), (ii) la fixation à des récepteurs nucléaires induisant l'activation/répression de l'expression de gènes (iii) l'activation de voies de signalisation cellulaire par la fixation à des récepteurs membranaires.

Concernant l'impact sur les facteurs épigénétiques, de tels effets ont déjà été mis en évidence lors d'exposition à des éléments trace métalliques (Takiguchi *et al.* 2003; Huang *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2008) et pourraient-être un des mécanismes mis en jeux. Aucune donnée n'est disponible quant à l'efficacité de l'uranium à se lier à des récepteurs nucléaires, cependant cette hypothèse ne peut pas être écartée. Enfin, la troisième hypothèse est peut-être celle pouvant être la plus alimentée en arguments. En effet, le calcium est un messager secondaire dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Hors, la substitution de cet ion par l'ion uranyle a déjà été mise en évidence au sein de

protéines (Pible *et al.* 2010; Pardoux *et al.* 2012). De plus, des études ont montré que l'uranium induisait une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du niveau cellulaire de calcium (Lerebours 2009; Lerebours *et al.* 2010a). Ainsi, il se pourrait que cette hypothèse soit impliquée dans les modes d'action de l'uranium appauvri sur les profils de méthylation.

### 2.3. Accumulation de l'uranium et méthylation de l'ADN

L'analyse des effets observés sur les profils de méthylation de l'ADN ne semble pas être directement en lien avec les données d'accumulation mesurées à un instant t. Une hypothèse expliquant ce constat implique la nature des expositions. Lors d'expositions chroniques à de faibles concentrations en uranium appauvri, la dynamique d'accumulation de l'uranium semble être affectée par des mécanismes d'excrétion, tel que cela a déjà été observé (Tran *et al.* 2005). Cette hypothèse est notamment corroborée par les données observées dans le cerveau des mâles exposés à la plus forte concentration d'uranium. Une tendance accrue aux variations des niveaux de méthylation entre le premier et le deuxième temps de prélèvement a été observée dans cet organe, et cela en dépit d'une diminution significative de la quantité d'uranium accumulée.

Au regard de cette hypothèse, deux points doivent être pris en compte : (i) il existe une grande variabilité interindividuelle dans les quantités d'uranium accumulées, phénomène caractéristique des actinides (Lobel *et al.* 1991) et maintes fois observé pour l'uranium (Barillet *et al.* 2005; Barillet *et al.* 2007; Lerebours 2009; Lerebours *et al.* 2010a; Lerebours *et al.* 2010b; Augustine *et al.* 2012; Bourrachot *et al.* 2014), (ii) les données d'accumulation et de méthylation n'ont pas été mesurées sur les mêmes individus car nous souhaitons nous assurer d'avoir assez d'ADN pour les analyses moléculaires.

Il faudrait effectuer les deux mesures directement sur les mêmes individus afin de pouvoir déterminer la présence ou non d'une corrélation entre quantité accumulée et niveau de méthylation. Cependant, une hypothèse peut tout de même être évoquée à ce sujet. La base de la réflexion autour de la quantité de polluant accumulée et des effets biologiques observés est dérivée du paradigme de la toxicologie énonçant dans les grandes lignes que « les expositions à des quantités croissantes de polluants sont associées à des

niveaux d'accumulation croissants induisant des effets biologiques plus importants ». Cependant, dans le contexte de l'écotoxicologie, les niveaux d'expositions sont faibles, et il ne semble pas aberrant de rappeler qu'à ces niveaux, les organismes sont capables de mettre en place des réponses biologiques permettant de lutter de manière efficace contre cette toxicité, telles que les mécanismes d'excrétion, comme cela a déjà été discuté par McGeer et ses collaborateurs (2003). Pour appuyer cette hypothèse, une étude menée sur la brème et le poisson-chat en par Jeffree *et al.* (2014) a même mis en évidence une corrélation négative entre concentration accrue de métaux dissous dans le site contaminé, et accumulation dans les tissus des poissons, relativement aux sites témoins. Ainsi, la diminution de la quantité d'uranium mesurée entre les deux temps de prélèvements est cohérente avec la mise en place de possibles réponses biologiques. Il reste cependant à déterminer la raison de la persistance des effets sur les niveaux de méthylation de l'ADN.

Cette persistance peut être expliquée par un des concepts de l'épigénétique qui énonce que « les marques épigénétique impriment l'histoire d'exposition aux stress environnementaux tout au long de la vie d'un organisme » (Head J.A. *et al.* 2012; Hala *et al.* 2014). Ainsi, les effets observés sur les profils de méthylation de l'ADN seraient liés à l'accumulation transitoire d'uranium dans ces tissus, et seraient le reflet des effets associés à une pression de contamination croissante et constante, puisque les effets les plus importants ont été observés dans la plus forte concentration d'exposition.

### 2.4. Différences liées au sexe

Au cours de l'expérience, nous avons pu voir que les effets ont été observés majoritairement chez les mâles, et cela après une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri durant 24 jours.

Ce phénomène a également été observé dans la littérature chez l'ours polaire après une exposition chronique au mercure par voie trophique (Pilsner *et al.* 2010) ainsi que chez la souris après une exposition aux radiations ionisantes (Kovalchuk *et al.* 2004). Ces différences pourraient être expliquées par la spécificité du système hormonal relativement au sexe considéré. Effectivement, des régulations spécifiques des marques de méthylation dans la région promotrice de certains gènes ont été observées en fonction du sexe et de la

#### **Chapitre 4. 2 Principales conclusions**

sécrétion hormonale chez le rat et la souris (Gabory *et al.* 2009). Cependant cette hypothèse reste encore à vérifier chez le poisson zèbre.

A ce stade, il est compliqué de déterminer les réels mécanismes sous-jacents à ces différences observées entre mâles et femelles. En effet, très peu d'études s'intéressent à l'effet sexe hormis dans un contexte d'exposition aux perturbateurs endocriniens. Cependant, ces travaux fournissent des données supplémentaires qui viennent enrichir la littérature et apporter de nouvelles hypothèses.



---

---

# **Chapitre 5. Transfert générationnel des marques épigénétiques et impact sur la descendance**

---





*Dans ce chapitre, nous allons aborder les résultats obtenus au cours de la seconde expérience d'exposition au laboratoire de poissons zèbre à l'uranium appauvri. Ce chapitre se compose d'une introduction en français qui rappelle les hypothèses scientifiques explorées ainsi que les moyens scientifiques déployés pour répondre à cette problématique, l'article scientifique en anglais ayant fait suite à cette expérience, et une troisième partie rédigée en français faisant état des principales conclusions émanant de ces travaux. Ce chapitre est basé sur l'article « Insights on epigenetic factors associated with the generational transfer of depleted uranium toxicity from exposed adult zebrafish to its progeny » en cours de soumission dans Aquatic Toxicology, dont l'Appendice B relatif aux données de séquençage d'ARNs est disponible dans un fichier fourni séparément au document de thèse.*



## 1. Introduction

L'implication des marques épigénétiques dans les mécanismes d'héritabilité mitotique et méiotique est un fait établi (Hackett and Surani 2013; Jiang *et al.* 2013; Potok *et al.* 2013), et plus particulièrement *via* la méthylation de l'ADN.

Chez le modèle de souris « Agouti », le régime alimentaire maternel peut impacter le niveau de méthylation de la séquence d'un transposon se trouvant en amont de la région promotrice du gène *agouti*, entraînant une modification de l'expression du gène. Ce profil d'expression est transmis à la descendance, et peut impliquer chez cette dernière une modification de la couleur du pelage ainsi qu'une prédisposition au diabète, à l'obésité et au cancer (Dolinoy 2008).

Egalement, toujours chez le modèle rongeur, l'exposition parentale à des perturbateurs endocriniens tels que le bisphénol A (Manikkam *et al.* 2013) ou le dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT) (Skinner *et al.* 2013), induit des modifications dans les profils de méthylation qui sont associées à l'apparition d'anomalies et de maladies, notamment dans les organes reproducteurs des générations de descendants.

La modification des marques de méthylation au cours des générations a également été observée suite à une exposition au zinc chez le modèle invertébré aquatique *Daphnia magna* (Vandegheuchte *et al.* 2009b). Dans cette étude, les auteurs ont exposé une génération F0 de daphnies à 388  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de zinc, et ont observé des variations du niveau de méthylation de l'ADN dans la génération F1 de descendants non exposés.

Notre première expérience nous a permis de mettre en évidence des variations du niveau de méthylation de l'ADN génomique suite à une exposition chronique à l'uranium appauvri, notamment à hauteur de 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , et cela, suite à un temps court d'exposition. Le tissu reproducteur étant impacté, il est possible que ces modifications puissent être transmises et maintenues dans une descendance non exposée. Ainsi, nous avons décidé d'étudier le niveau de méthylation de l'ADN génomique chez la descendance de poissons zèbre ayant été exposés durant 6 jours à 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri, ainsi que le statut transcriptomique et les dommages histologiques afin de pouvoir établir un lien entre les modifications à l'échelle moléculaire et les possibles impacts sur l'organisation tissulaire.

### 1.1. Transmission des atteintes moléculaires

Afin d'étudier l'impact d'une exposition parentale à l'uranium appauvri sur les profils de méthylation de l'ADN génomique de la descendance, nous avons décidé d'exposer des poissons zèbre adultes durant 6 jours, de les placer en eau claire pour qu'ils se reproduisent et que nous puissions obtenir la génération de descendants, puis de replacer les adultes en eau contaminée pour atteindre une durée totale de 10 jours d'exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Les profils de méthylation de l'ADN génomique ont été étudiés en utilisant les techniques d'AFLP-MS et d'HPLC-MS/MS sur 7 stades de développement de la descendance (post-fertilisation (PF), 3,5 heures post-fertilisation (hpf), 6 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf et 96 hpf) ainsi que dans les yeux, le cerveau et les gonades des poissons adultes.

Des études menées au laboratoire chez le poisson zèbre ont permis de mettre en évidence une perturbation de l'expression de nombreux gènes d'intérêt dans plusieurs organes cibles (Lerebours 2009; Lerebours *et al.* 2010a) suite à l'exposition à de faibles concentrations en uranium appauvri. Ainsi, afin d'approfondir notre étude au niveau moléculaire, nous avons décidé de réaliser une analyse du statut transcriptomique par séquençage d'ARN, à la fois dans les gonades des poissons zèbre femelles ainsi qu'au stade précoce (PF) et tardif (96 hpf) de la descendance. Nous avons décidé de nous focaliser sur les gonades des femelles chez les organismes adultes car les œufs contiennent un pool d'ARNs cédés par la mère, qui sert de matrice à la synthèse protéique dans la descendance jusqu'au stade 3,5 hpf où le génome du zygote est activé (Aanes *et al.* 2011). Nous pourrions déterminer l'impact de l'exposition parentale à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri sur les profils de méthylation dans la génération de descendants non exposés, ainsi que sur les informations transcriptomiques transmises de la mère à la descendance.

### 1.2. De l'échelle moléculaire à l'organisation tissulaire

L'exposition à de faibles concentrations en uranium appauvri a permis de mettre en évidence de nombreuses perturbations à l'échelle moléculaire tel que cela a déjà été présenté (Lerebours *et al.* 2009; Lerebours *et al.* 2010a), mais également de mettre en évidence un impact patent sur l'organisation tissulaire suite à des analyses histologiques. En effet, de précédentes études menées au laboratoire ont mis en évidence une atteinte de

## Chapitre 5. 1. Introduction

l'ultrastructure de nombreux organes tels que les branchies, le muscle, les gonades (Barillet *et al.* 2010) ainsi que les bulbes olfactifs (Lerebours *et al.* 2010a).

De ce fait, nous avons décidé d'ajouter l'analyse des dommages histologiques à notre étude afin de pouvoir à la fois amener des informations inédites relativement aux impacts d'une exposition parentale sur l'ultrastructure des tissus de leur descendance, ainsi qu'au niveau des réponses transcriptomiques et des profils de méthylation de l'ADN génomique.



The transfer of depleted uranium from exposed adult zebrafish to eggs  
causes DNA hypermethylation and histopathological alterations in  
embryos, along with modified patterns of gene expression at the egg  
and larvae stages

*Kewin Gombeau<sup>a,1</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>b</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>c, d</sup>, Olivier Armant<sup>e,2</sup>,  
Virginie Camilleri<sup>a</sup>, Isabelle Cavalie<sup>a</sup>, Magali Floriani<sup>a</sup> and Christelle Adam-Guillermin<sup>a,\*</sup>*

<sup>a</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France.

e-mail: [kewin.gombeau@gmail.com](mailto:kewin.gombeau@gmail.com); [virginie.camilleri@irsn.fr](mailto:virginie.camilleri@irsn.fr); [isabelle.cavalie@irsn.fr](mailto:isabelle.cavalie@irsn.fr); [magali.floriani@irsn.fr](mailto:magali.floriani@irsn.fr); [christelle.adam-guillermin@irsn.fr](mailto:christelle.adam-guillermin@irsn.fr);

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, CNRS, UMR 5805, EPOC, 33400 Talence, France

e-mail: [jean-paul.bourdineaud@u-bordeaux.fr](mailto:jean-paul.bourdineaud@u-bordeaux.fr);

<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, INAC-SCIB, 38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> CEA, INAC-SCIB Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, 38000 Grenoble, France  
e-mail: [jean-luc.ravanat@cea.fr](mailto:jean-luc.ravanat@cea.fr);

<sup>e</sup> Institute of Toxicology and Genetics (ITG), Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

e-mail: [olivier.armant@irsn.fr](mailto:olivier.armant@irsn.fr);

\*Corresponding author

Phone: + 33442199401      e-mail: [christelle.adam-guillermin@irsn.fr](mailto:christelle.adam-guillermin@irsn.fr);

Present address: <sup>1</sup> 32 avenue des Certes, Appartement 1, Audenge 33980, France

<sup>2</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France





## ABSTRACT

Adult zebrafish were exposed to  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  of depleted uranium (DU) for six days before mating. Post-fertilization (PF) eggs accumulated 7-times more DU than control PF eggs, but 96 hour post-fertilization (hpf) larvae had already eliminated it, presenting a level of DU identical to that of control larvae. A significant 2-fold increase in the global level of DNA methylation was observed in embryos as soon as 24 hpf and was still maintained at the 96 hpf stage, despite the fact that DU had already been depurated at the later stage. The RNA sequencing pointed out an impact of the parental exposure on the total RNAs transmitted from the mother to eggs. In the eyes of adult fish exposed for 10 days to DU, alterations of photoreceptor cells and of the axon-axon junctions between photoreceptors were observed. Alterations of actin and myosin filaments organization were observed in skeletal muscles of 96 hpf larvae, at a stage where the maternally transmitted DU had already been excreted. These data reveals the extreme sensitivity of zebrafish embryos to DU transmitted through the ovocyte by exposed females.

**Keywords:** Zebrafish offspring – Depleted Uranium – DNA methylation – RNA sequencing



## 1. INTRODUCTION

The effects of pollutant exposure over generations are of a great interest to understand the propagation of individual effects at the population scale. This transfer might be assumed by genetic alterations in the DNA sequence (Dubrova *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2002), or mechanisms that do not alter the DNA sequence but its expression. The involvement of the last mechanisms, grouped into the category of so-called epigenetic modifications, has been the subject of several reviews (Heard and Martienssen, 2014; Szyf, 2015).

Epigenetics, as described by Holliday (Holliday, 1994), is “the study of the changes in gene expression that occur in organisms with differentiated cells, and the mitotic inheritance of given patterns of gene expression...which [are] not based on changes in DNA sequence”. It concerns three types of modification: DNA methylation (occurring primarily on cytosine when followed by guanine, the CpG configuration), histone tail modifications (acetylation, ubiquitination, phosphorylation, or methylation), and noncoding RNA molecules. Among these mechanisms, DNA methylation has been the most studied. It plays an important role in the regulation of gene expression, as well as in the mitotic and meiotic inheritance of a given pattern of gene expression (Bird, 1992; Russo *et al.*, 1996).

Several studies led on rodents highlighted the importance of DNA methylation in the appearance of altered phenotypes following parental exposure to endocrine disruptors (Manikkam *et al.*, 2013; Skinner *et al.*, 2013). Abnormalities, diseases, as obesity, testis and ovary diseases, and epimutations have been observed in sperm in the F1 generation of rats exposed as fetus, and F3 non-exposed generation following chronic exposure of gestating F0 females to endocrine disruptors. Altered DNA methylation patterns were also observed in the crustacean *Daphnia magna* after chronic maternal exposure to zinc (Zn). The maternally-exposed F1 generation presented a slight significant decrease of the total 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) content; however, this decrease was not present in the non-exposed F2 generation (Vandegheuchte *et al.*, 2009b).

Within the context of heritable biological modifications associated with parental pollutant exposure history, this study focuses on uranium (U), an actinide naturally present in the environment at concentrations in surface and ground waters ranging from 0.01 to 12 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Salonen, 1994; WHO, 2012). This radioelement is widely used in many industrial domains (nuclear power plants, weapons, airplanes, etc.) and is also present in agricultural products, such as phosphate fertilizers (Barišić *et al.*, 1992), thus increasing its presence and distribution in all environmental compartments. Moreover, uranium concentrations in the

geosphere are expected to increase with the growing world nuclear energy capacity (IAEA, 2012).

The effects of chronic parental depleted uranium (DU) exposure in the vertebrate aquatic model zebrafish *Danio rerio* have partially been investigated (Bourrachot *et al.*, 2014). Indeed, after 20 days of parental exposure to 20 and 250  $\mu\text{g DU.L}^{-1}$ , mortality was observed in the progeny from exposed fish. This toxicity was accompanied by a significant transfer of uranium in eggs laid by exposed females. In addition, after 24 days of exposure to 20  $\mu\text{g DU.L}^{-1}$ , DNA hypomethylation at the level of *HpaII* sites and hypermethylation at the level of the whole genome were observed in adult zebrafish tissues (Gombeau *et al.*, 2016). However, no data are actually available on the DU-induced molecular alterations in a transgenerational context. Thus, in this study, we propose to investigate in the zebrafish *Danio rerio*, the effects associated with 6 days of parental exposure on the F1 generation, using an environmentally relevant concentration of DU, 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , that can be found in the vicinity of uranium mining areas (Garnier-Laplace *et al.*, 2001). DNA methylation was examined in the progeny at different developmental stages from fertilization to 96 hours post-fertilization (hpf). DNA methylation was determined at the genome-wide level using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) (Ravanat *et al.*, 2002) and at specific cleavage sites with the methylation-sensitive amplified fragment length

polymorphism (MS-AFLP) method (Xu *et al.*, 2000). Chronic exposure to depleted uranium has already been associated with transcriptional deregulation on adult exposed fish (Lerebours *et al.*, 2010b; Lerebours *et al.*, 2009). Therefore, we investigated the possible effects of DU exposure on the total RNA transferred from the mother to the progeny at the egg stage (post-fertilization, PF) and on the genome-wide transcriptional pattern at the 96 hpf stage, through RNA sequencing. Indeed, during the first hours post-fertilization (PF), the zygotic protein production is based on the maternal RNA until the zygotic genome activation occurs at 3.5 hpf (Aanes *et al.*, 2011; Haberle *et al.*, 2014), thus, the modifications in maternal RNA composition might alter the progeny development. Finally, since ultrastructural damages have already been observed in adult zebrafish following chronic exposure to DU (Barillet *et al.*, 2010), we analyzed the possible histopathological effects of DU on 96 hpf larvae by transmission electronic microscopy (TEM).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Experimental procedures.

Adult zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were purchased from a French supplier (Gis Amagen, Gif-sur-Yvette, France). Thirty males ( $0.47 \pm 0.05$  g wet weight [w.w.],  $3.57 \pm 0.13$  cm) and females ( $0.69 \pm 0.16$  g w.w.,  $3.78 \pm 0.16$  cm) were placed separately in 30 L tanks to avoid any interference by reproductive processes, with synthetic soft water (composition given in Appendix A). This type of water was chosen to optimize the bioavailability of DU (Denison, 2004). The fish were acclimated to the synthetic water for 3 weeks prior to be exposed to DU (complete exposure procedure given in Appendix A), and were fed twice a day with standard fish pellets (5% of body mass per fish per day; Tetramin™, Melle, Germany), and once a day with 24 hpf *Artemia salina* nauplii (JBL, Herblay, France).

The fish were divided into two different groups: a control group (no added DU), and a group exposed to  $20 \mu\text{g DU}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma, Lezennes, France). The ventilation rate for zebrafish has been estimated to  $72 \text{ mL/day/g}$  of body weight (Geffroy *et al.*, 2012), making a dose of  $1.45 \text{ mg DU}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  of body weight. After 6 days of exposure to DU, male and female zebrafish were mixed into a 15 L of clean water tank to allow reproduction between control males and females, and DU-exposed males and females.

Following the breeding (complete protocol in Appendix A), adult zebrafish were replaced in exposure tanks until they reached a total of 10 days of DU-exposure, and were euthanized

by immersion in melting ice, and dissected. The progeny was sampled at 7 developmental stages: PF, 3.5 hpf, 6 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf and 96 hpf.

During the experiment, no differences in fish length or weight were observed between DU exposure conditions. All procedures used in this experiment were approved by the Animal User and Ethical Committee at the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (Comité d'éthique IRSN n°81). The dissolved DU concentrations were monitored using filtered and acidified water samples, which were analyzed several times a day ([Table A.1](#)).

## 2.2. Uranium quantification.

After 10 days of exposure, 5 fish were taken from each tank to measure the uranium accumulation in half a whole brain, one eye and one gonad, and DNA methylation in the second half, to determine whether both parameters are correlated. The progeny was sampled at two developmental stages: PF and 96 hpf. At the first stage, 5 eggs were taken, and the chorions and embryos were mechanically separated to assess uranium accumulation in both compartments. At the 96 hpf stage, 3 larvae were used to perform this measure. The tissues were dried at 50 °C for 48 h and the dry weight [d.w.] was measured with a microbalance (Sartorius SE2, Göttingen, Germany). They were chemically digested for 3 h at 100 °C with



70% HNO<sub>3</sub>, followed by 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> until complete solubilization. The solutions of the digested organs were then evaporated to dryness. The samples were acidified with 2% (v/v) of HNO<sub>3</sub> 69% (trace-metal-analysis grade) and quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry using a 7500Cx spectrometer (ICP-MS, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a detection limit of 0.11 ng L<sup>-1</sup>. The corresponding raw data are given in [Table A.2](#) (adult) and [A.3](#) (progeny). The same technique was used to measure dissolved uranium concentrations in water samples.

### 2.3. Genomic DNA extraction.

Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Les Ulis, France), according to the manufacturer's protocol. In adult zebrafish, DNA was extracted from the same fish used to assess uranium accumulation, on half a brain (the first part used to assess uranium concentration), one eye (the other used to assess uranium accumulation) and one gonad (the second dedicated to uranium quantification). In the progeny, DNA was extracted from five pools of 30 eggs at the PF stage, five pools of 20 eggs at the 3.5 and 6 hpf stages, five pools of 10 eggs/embryos at the 24, 48 and 72 hpf stages and finally, five larvae were individually sampled at the 96 hpf stage. Following extraction, 1 µL of sample was used

to assess DNA concentration using the NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

#### 2.4. Measurement of DNA methylation using MS-AFLP.

This method is based on the digestion of genomic DNA with the restriction enzymes *EcoRI/MspI* and *EcoRI/HpaII*. Both *MspI* and *HpaII* share the same cleavage site 5'-CCGG-3', but *HpaII* cleavage activity is inhibited when the inner cytosine of the cleavage site is methylated.(Fulnecek and Kovarik, 2014) MS-AFLP was performed as described in the literature,(Xu *et al.*, 2000) with minor modifications (provided in Appendix A). The results, obtained in adult zebrafish (Figure A.2) and in the 7 developmental stages of the progeny (Figure 2), are the average methylation levels at the *HpaII* cleavage site obtained under the three selective PCR conditions (the corresponding raw data are given in Tables A.5 and A.6).

#### 2.5. Genome-wide DNA methylation measured with HPLC–MS/MS.

The 2'-deoxycytosine (dC), 5-methyl-2'-deoxycytosine (5-mdC), and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytosine (5-hmdC) nucleosides were detected and quantified with MS in the positive

ionization mode using the so-called multiple reaction monitoring mode (mrm) with transitions  $m/z = 228 \rightarrow m/z = 112$ ,  $m/z = 242 \rightarrow m/z = 126$ , and  $m/z = 258 \rightarrow m/z = 142$ , respectively (Pereira *et al.*, 2014). These measurements were made with a TSQ Quantum Ultra electrospray ionization tandem mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Illkirch, France). The conditions for DNA digestion were similar to those described previously (Ravanat *et al.*, 2002) and provided in Appendix A. The results were expressed as the percentage of 5-mdC relative to dC, and the percentage of 5-hmdC relative to 5-mdC. The extended protocol and the raw data corresponding to the results obtained in the adult zebrafish (Table A.7) and the progeny (Table A.8) are presented in Appendix A.

## 2.6. Total RNAs extraction and sequencing.

Total RNAs were extracted using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France) according to the manufacturer's protocol, from three whole gonads from adult female zebrafish (3 RNA extractions), three pools of 50 eggs each at the PF stage (3 RNA extractions), and three pools of 3 larvae each at the 96 hpf stage (3 RNA extractions). Following the extraction, RNA concentration was determined using the NanoDrop 2000 and 1  $\mu\text{g}$  of each RNA extraction was used to generate sequencing libraries

prior to the RNAseq analysis. The complete protocol used for RNAseq is provided in Appendix A and the raw data obtained for the three tissues (Table B.1 to B.3) are provided in Appendix B.

## 2.7. Transmission electron microscopy (TEM).

In this study, TEM analyses were led on the brain, gonads and eyes of adult zebrafish ( $n = 3$ ) and larvae at the 96 hpf ( $n = 3$ ). For each biological replicate, at least 50 micrographs of local detailed structures were taken, analyzed and compared between exposure conditions. The detailed protocol is provided in Appendix A.

## 2.8. Statistical analyses.

All statistical analyses were performed using 3–5 biological replicates per condition. The software R (3.0.2 version) was used for all statistical analyses. First, the normality and homogeneity of the variance were tested using the Shapiro–Wilks test and Levene test ( $\alpha = 0.05$ ), respectively. If normality and homoscedasticity were confirmed, one-way ANOVA was performed, followed by Dunnett’s test. Otherwise, ANOVA was replaced with the Kruskal–

Wallis test, followed by the Mann–Whitney test ( $\alpha = 0.05$ ). We evaluated the correlation between the uranium treatment, the sex, and the effects on DNA methylation through a Pearson correlation matrix. This matrix is given in [Figure A.5](#), with the Pearson correlation coefficient and the  $p$  value associated with the statistical test ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3. RESULTS

#### 3.1. DU accumulation in adult zebrafish and its progeny.

Uranium accumulation was measured after 10 days of experiment in adult zebrafish, and at the PF (embryo and chorion assessed separately) and 96 hpf stages in the progeny ([Figure 1](#)). In adult zebrafish, a significant uranium accumulation was observed in the brain ([Figure A.1A](#)) and eyes ([Figure A.1C](#)) of exposed males (1.55 and 1.89  $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w. versus 0.42 and 0.61  $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w. in controls, [Table A.2](#)) but not in gonads ([Figure A.1B](#)), whereas the uranium accumulation in exposed females was significant in the three organs (1.33, 2.31 and 0.77  $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w. in the brain, gonads and eyes respectively, vs 0.54, 0.03 and 0.40  $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w. in control females, [Table A.2](#)).

In the progeny of DU-exposed fish, uranium amount measured at the PF stage (Figure 1A) were equivalent in the embryo and the chorion compartment and significantly higher than in controls (7 and 14 fold higher in the embryo and the chorion of DU-exposed progeny respectively). However, the levels observed in 96 hpf larvae revealed that this discrepancy had disappeared since there was no more difference between the progeny of DU-exposed fish as compared to control larvae (Figure 1B, Table A.3).

### 3.2. Hypomethylation patterns at *Hpa*II cleavage sites in tissues.

Methylation levels in adult zebrafish organs have been assessed by MS-AFLP (Figure A.2). The levels measured in the brain (Figure A.2A) indicate a significant hypomethylation in males – but not in females - after exposure to DU, with a 44% decrease as compared to controls (33.7 % in exposed males versus 59.9% in controls, Table A.5). In gonads (Figure A.2B), no significant DU-induced effects were observed in exposed males, neither in exposed females. The data obtained in eyes (Figure A.2C) revealed a significant hypomethylation induced by the DU exposure, both in males and females. A slightly higher impact was observed in exposed males (52% decrease, 26.2% as compared to 54.4% in control males, Table A.5) than in exposed females (33% decrease, 36.7% as compared to 54.4% in control

females, [Table A.5](#)). Regarding the correlation between U accumulation and DNA methylation (Pearson correlation matrix, [Figure A.5](#)), the DNA methylation measured in eyes was negatively correlated to U accumulation in this organ and the methylation effects observed in both the brain and eyes were negatively correlated to the DU-treatment (U added in water) but not to U accumulation.

In the progeny ([Figure 2](#)), data collected at the 7 developmental stages did not reveal any significant effects associated with a parental DU-exposure on the methylation levels measured at *HpaII* cleavage sites ([Table A.6](#), [Figure 2](#)).

### 3.3. Parental DU-exposure and whole genome cytosine methylation in the progeny.

We examined the total amounts of 5-mdC and 5-hmdC in the target organs of adult fish and in the 7 developmental stages of the progeny. The levels measured in the target organs of adult zebrafish revealed only one significant DU-induced variation ([Table A.7](#)). Indeed, levels of 5-mdC measured in the brain of exposed males after 10 days were significantly 27% higher than those in controls (9.77% versus 7.67% in controls).

In the progeny of DU-exposed fish ([Figure 3](#)), huge variations were observed among the developmental stages. Since the 6 hpf stage, levels of 5-mdC began to increase significantly

in the DU-exposed offspring as compared to controls (8.7 % versus 7.6 %, [Table A.8](#)). At the following stages 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf and 96 hpf levels of 5-mdC in the DU-exposed progeny continued to increase and were 81%, 64%, 105% and 112% higher than in the control progeny (17.9 %, 15.5 %, 17.5 % and 15.4 % of 5-mdC versus 9.9 %, 9.4 %, 8.7 %, and 6.9 % respectively in the control progeny, [Table A.8](#)). A significant increase of the 5-hmdC/5-mdC ratio was also observed in DU-exposed offspring at stages 24, 48 and 72 hpf (0.85%, 1.26% and 2.12% versus 0.30%, 0.59%, 0.78% respectively in the control progeny, [Table A.8](#)).

### 3.4. Transcriptomic patterns induced by DU.

The RNA sequencing resulted in the reading of tens of millions of individual fragments, and the identification of tens of thousands of different transcripts ([Table 1](#)). The number of genes differentially expressed reached several hundreds to thousands units ([Table 1](#)). More precisely the statistically significant proportion of up-regulated genes in DU-exposed tissues (at least 2-fold) were equal to 9.7, 19.2, and 2.5 % of the expressed genes in female gonads, fertilized eggs, and 96 hpf larvae, respectively. The statistically significant proportion of down-regulated genes in DU-exposed tissues (at least 2-fold) were equal to 10.1, 32.6, and 0.3



% of the expressed genes in female gonads, fertilized eggs, and 96 hpf larvae, respectively (Table 1). These results indicate that the influence of DU on gene expression was much more important in fertilized eggs than in female gonads or larvae. When we looked at the expression of genes involved in DNA methylation, or demethylation, or those encoding methyl-binding proteins, we could see no relationship between the observed twofold increase of DNA methylation occurring as soon as 24 h in larvae coming from DU-exposed eggs – and maintained at the stage 96 hpf (Fig. 3) – and the differential expression of these genes. Rather, DNA methylating genes *dnmt1* and *dnmt3b* were down-regulated in 96 hpf larvae and presented an expression reduced by 30 % compared to control larvae (Table B.4). In addition, the level of expression of methylating enzymes genes in the fertilized eggs (*dnmt1*, *dnmt3*, *dnmt3b*, *dnmt3ab*, *dnmt3aa*, *dnmt4*, *dnmt5*, presenting a total frequency of expression of  $28.5 \cdot 10^{-4}$ ) is decreased 36-times in 96 hpf larvae (total frequency of expression of  $7.8 \cdot 10^{-5}$ ). Therefore, the increased level of global DNA methylation observed in larvae as compared to fertilized eggs cannot be explained by the level of expression of the involved enzymes' genes.

Strikingly, all the RNA libraries gave patterns of basal and differential gene expression much different from each other (Tables B1-3). In order to get a quicker glance at these differential patterns, we focused for each library on the thirty genes the most up and down-regulated as compared to the control library. In the gonads of 10 days DU-exposed females,

the up-regulated genes were mainly concerning the cytoskeleton, several cellular signalling pathways, the immune response, and down-regulated genes were also linked to several signalling pathways, nuclear metabolism (assembly and RNA scavenging) and ribosomal assembly (Table B.5).

In the eggs PF, transcripts that were present had been maternally transmitted and among the up-regulated genes were those associated with post-translational protein modification and trafficking, and cellular signaling pathways (Table B.6). Down-regulated genes were concerning the translational process, the regulation of the cell cycle and several cell signaling pathways (Table B.6).

In 96 hpf larvae, among the up-regulated genes were those associated with the lipid metabolism and peptide catabolism, the purine metabolism and the stress response (Table B.7). Down-regulated genes were involved in the repair of DNA, the transcriptional process, and the regulation of the circadian rhythm (Table B.7).

One way to look at the impact of DU is to analyze the differential regulation of the most expressed genes, since that of poorly expressed genes bears no physiological meaning. When looking at the 30 most expressed genes of the control gonads, 20 of them were repressed in the DU-exposed gonads, encompassing two genes involved in the glycolytic pathway, *gapdh* and *ldhba* (repressed 4 and 3-times, respectively), the five major ribosomal protein genes

(repressed 2 to 4-times), and the 2 main expressed tubulin genes *tubb4b* and *tuba4l* (repressed 3 and 2.5-times, respectively) (Table B.8). Interestingly, the 30 most expressed genes in control eggs were up-regulated approximately 2-fold in the DU-exposed eggs. Among them four cyclin genes, three cell division cycle genes, and four nuclear ribonucleoprotein genes indicating that the regulation of the cell cycle is the most important metabolic process in eggs (Table B.9). In 96 hpf larvae none of the 30 most expressed genes in the control displayed a differential expression above the limit of 2 (Table B.10).

### 3.5. DU exposure leads to histological damages in both adult fish and their progeny.

Histological analyses led on adult fish revealed alterations in both exposed male and female eyes and gonads, but not in the brain.

In the gonads, ultrastructural damages were detected in both exposed female and male. In the former, the previtellogenic and vitellogenic oocytes presented invaginations of the peripherals membranes (Figure A.3C), high degree of vacuolization in the oocyte's cytoplasm (Figure A.3E) and altered shape of the thecal cells (Figure A.3G). In the latter, microscopy analyses revealed altered structure of the seminiferous tubules and spermatogonia (Figure A.4E) as well as damaged Leydig cells (Figure A.4G).

In the eyes of exposed fish, the synaptic complex of the outer plexiform layer, area of the axon-axon junction between photoreceptors: rods and cones, and bipolar cells, (Gestri *et al.*, 2012) is hugely damaged (Figure 4E). We also observed alterations in the photoreceptors cells and particularly damaged nucleus (Figure 4G).

The progeny of DU-exposed fish also presented ultrastructural damage at the 96 hpf larva stage. In the longitudinal muscle, we observed expanded endomysium (Figure 5E), and disruption of actin and myosin filaments organization (Figure 5G).

## 4. DISCUSSION

### 4.1. DU-exposure and modifications in the DNA methylation patterns.

In this study, we demonstrated that an environmental concentration of depleted uranium can induce epigenetic modifications in the progeny of exposed adult zebrafish. We have already shown that DU triggered an increased global methylation of DNA in brain and eyes of male adults (Gombeau *et al.*, 2016). To our knowledge, only two other studies highlighted epigenetic modifications in a context of uranium exposure, the first led on mice surgically

implanted by DU pellets (Miller *et al.*, 2009), and the second on uranium mine workers (Su *et al.*, 2006), but these studies remain far from environmental concerns.

Concerning the results obtained using HPLC-MS/MS, levels of methylated cytosines in control fish and progeny are similar to those described in the literature (Kamstra *et al.*, 2015; Mhanni, 2004). The significant increase of the 5-mdC level detected in the brain of males exposed for 10 days is correlated to a significant uranium accumulation in the brain of these males (1.55 vs 0.42  $\mu\text{g U g}^{-1}$  d.w. in exposed and control males respectively, [Table A.2](#)). Similar effects on global DNA methylation in somatic organs have already been observed in the European eel exposed to environmentally relevant concentrations of cadmium (Pierron, 2014). No effect of DU on global DNA methylation was observed in male and female gonads. Likewise, in the eggs PF laid from exposed adults no effect of DU on global DNA methylation was observed, indicating that this type of epigenetic events was not transferred from parents to eggs. Until 3.5 hpf the embryos did not feature differential global DNA methylation compared to control embryos, implying that the maternally transferred RNAs did not trigger such epigenetic events. Two-fold differential global DNA methylation was evident at the 24 hpf stage. This is due to the presence of oocyte-transmitted DU in PF eggs and to the fact that at 3.5 hpf, the transcriptional machinery became autonomous in embryos. To our knowledge, this is the first time that altered DNA methylation patterns in the progeny of adult

fish chronically exposed to environmentally relevant concentrations of a heavy metal is reported.

The second approach to assess the DNA methylation, the MS-AFLP method, has allowed the detection of hypomethylated *Hpa*II cleavage sites in the brain of exposed males and eyes of both exposed males and females. Similar results have already been observed in the brain of polar bears exposed to methylmercury *via* food consumption (Pilsner, 2010). However, with such method, no significant effects were observed in the progeny whatever the developmental stages (Figure 2) in contrast with HPLC-MS/MS, suggesting that methylation patterns at the *Hpa*II cleavage sites are not, in this context, as sensitive as the total cytosines content.

The use of both HPLC-MS/MS and MS-AFLP, methods giving complementary information (Alonso *et al.*, 2015), has allowed the detection of modified DNA methylation patterns both in adults and their progeny. Even if these methods cannot identify the specific sequences in the genome that are targeted by these modifications, they point out methylation changes among two generations associated with parental exposure to an environmentally relevant concentration of DU.

#### 4.2. The transcriptomic response associated with DU exposure.

In the present study DU induced genome-wide transcriptomic modifications in gonads of exposed adult female, in eggs and larvae. Similar effects have already been observed in kidney of mice exposed to uranium through drinking water at concentrations of 80 and 160 mg.L<sup>-1</sup> giving doses of 13 and 26 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectively, a dose around 9 and 18-fold higher than that used in the present experiment on zebrafish (1.45 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). The up-regulated genes included those related to the oxidative stress-response, and those for cellular metabolism, ribosomal proteins, signal transduction, and solute transporters (Taulan et al., 2004).

The results obtained in the present study are in keeping with those obtained on brain zebrafish following exposure to 15 µg L<sup>-1</sup> for 10 days. Genes responding to DU were involved in the cell surface reception, cytoskeletal organization, signal transduction, regulation of gene expression, transcriptional processes, and protein synthesis and trafficking (Lerebours *et al.*, 2010b).

In the progeny from DU-exposed adults, a significant uranium accumulation was measured at the stage of the eggs PF, and could have influenced the observed transcriptional effects in eggs PF and in 96 hpf larvae. This maternal transfer of uranium into eggs has already been observed (Bourrachot *et al.*, 2014), and cannot be ruled out as a potential disruptor of early

developmental stages. To our knowledge, this is the first time that significant alterations of gene expression in the progeny of DU-exposed zebrafish are highlighted.

#### 4.3. Histological injuries associated with of DU ecotoxicity.

Our results highlighted a significant histological DU-induced alteration of adult eyes and larvae skeletal muscles. Damage observed in other tissues (male and female gonads) are in keeping with previously published results (Barillet *et al.*, 2010; Faucher *et al.*, 2012; Lerebours *et al.*, 2010b). Impacts on sensory organs (olfactory bulb and neuromasts) following chronic exposure to DU have already been observed in adult zebrafish (Faucher *et al.*, 2012; Lerebours *et al.*, 2010b). The observed alterations of the synaptic complex entangling photoreceptors between themselves and those at the cellular level of photoreceptors are here described for the first time and raise questions about the possible effects at the population level, such as social interactions, reproduction events or survival facing predation pressure. Additionally, the 96 hpf larvae presented severely injured skeletal muscle structure, and particularly damaged actin and myosin filaments suggesting an impairment of the locomotion function although no significant uranium accumulation could



be detected. Similar altered muscle ultrastructure effects have been observed in adult zebrafish exposed for 28 days to  $30 \mu\text{g U L}^{-1}$  (Lerebours *et al.*, 2010a).

How explain such histological damage in larvae muscles? In addition to the DU transferred into eggs, which necessarily exerted a toxic activity, maternal set of RNAs delivered to the eggs appeared much different from that of control eggs and may be linked to the 96 hpf larvae alterations. Indeed, the maternally transmitted transcriptome is crucial for the protein synthesis in the zygote from fertilization to 3.5 hpf (Aanes *et al.*, 2011). However, it is impossible to disentangle the precise contribution of the DU accumulated in oocyte, or of the transmitted maternal mRNAs, or of the DNA methylation appearing at the 24 hpf stage, to the observed histopathological outcomes in larvae muscles. More precisely, it is difficult to distinguish the causative agents, or to give an example, was the 2-fold increased DNA global methylation appearing in 24 hpf embryos a consequence of the modified transcriptome transmitted by the mother, or a causative agent of the transcriptional deregulation observed at 96 hpf?

## 5. CONCLUSION

In the current study, we highlighted that an environmentally relevant concentration of DU can induce several alterations in exposed adult zebrafish as well as in their progeny, with detectable effects from the chemical composition of DNA bases to the organ histological structure.

## 6. APPENDICES

The protocols used to expose zebrafish and obtaining eggs, the MS-AFLP and HPLC-MS/MS methods, to proceed to RNA sequencing and histological analyses are provided in Appendix A. Raw data corresponding to DU quantification (in water and biological samples), MS-AFLP and HPLC-MS/MS results as well as the additional figures corresponding to TEM analyses and the Pearson correlation matrix are provided in Appendix A. Finally, the RNA sequencing data are provided in Appendix B.

## 7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Le Guernic for helping with the statistical analysis and R. This project was supported by the European project COMET (7th PCRD EURATOM, Contract Number:

Fission-2012-3.4.1-604794) and the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety.

## 8. ABBREVIATIONS

U: Uranium

DU: Depleted Uranium

PF: Post-fertilization

hpf: Hour Post-Fertilization

dC: 2'-deoxycytosine

5-hmdC: 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytosine

5mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine

HPLC–MS/MS: High Performance Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry MS-

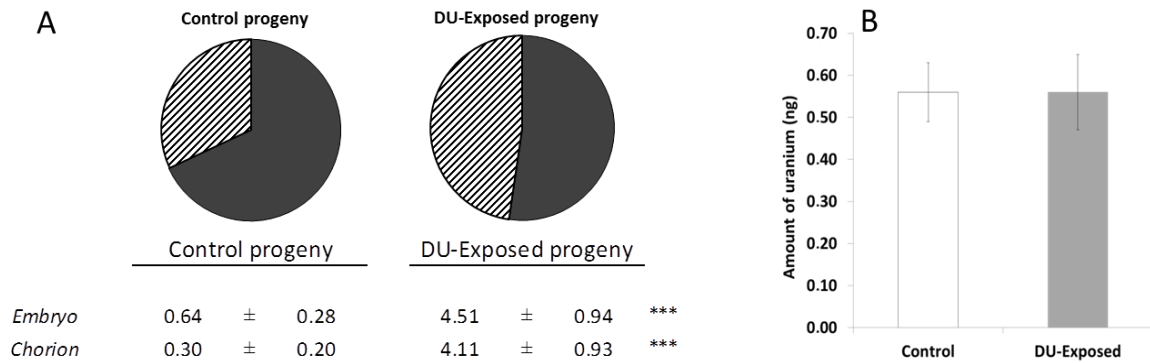
AFLP: Methylation-Sensitive Amplified Fragment Length Polymorphism

TEM: Transmission Electronic Microscopy

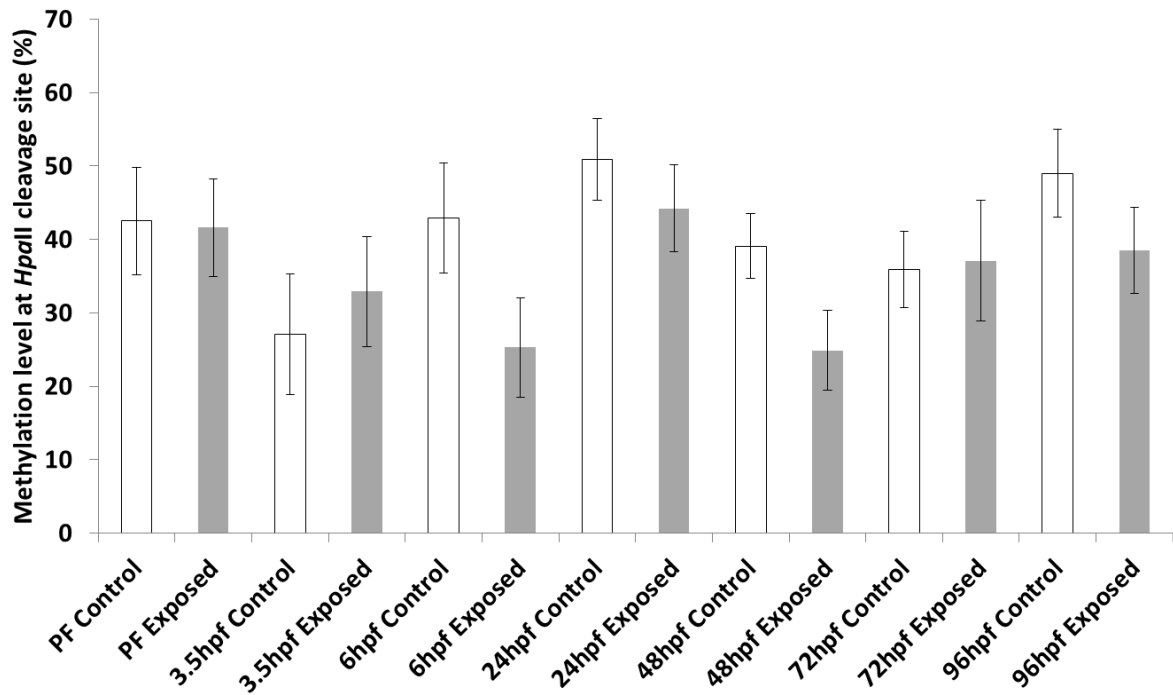
ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

mrm: multiple reaction monitoring

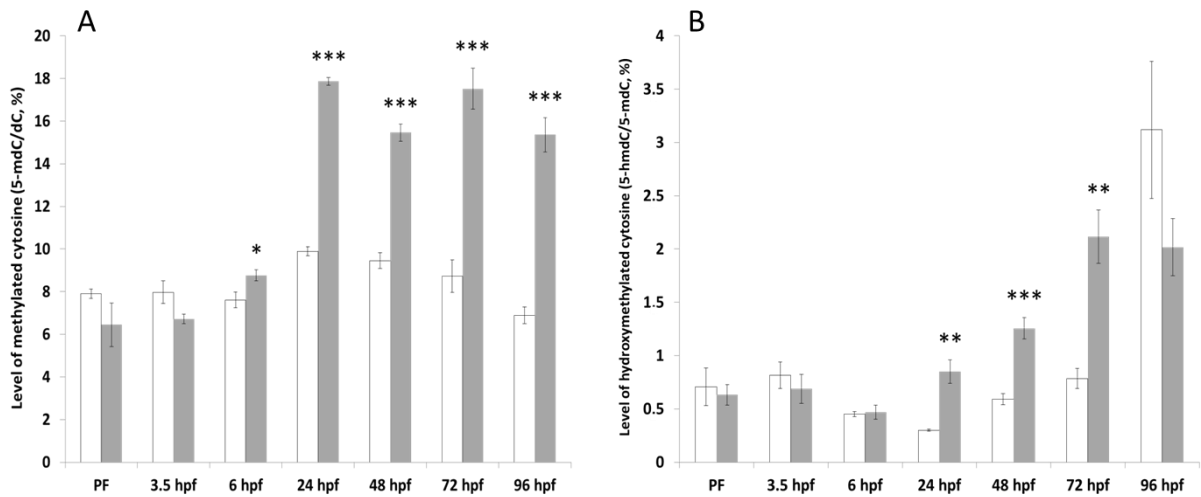
FIGURES AND TABLE



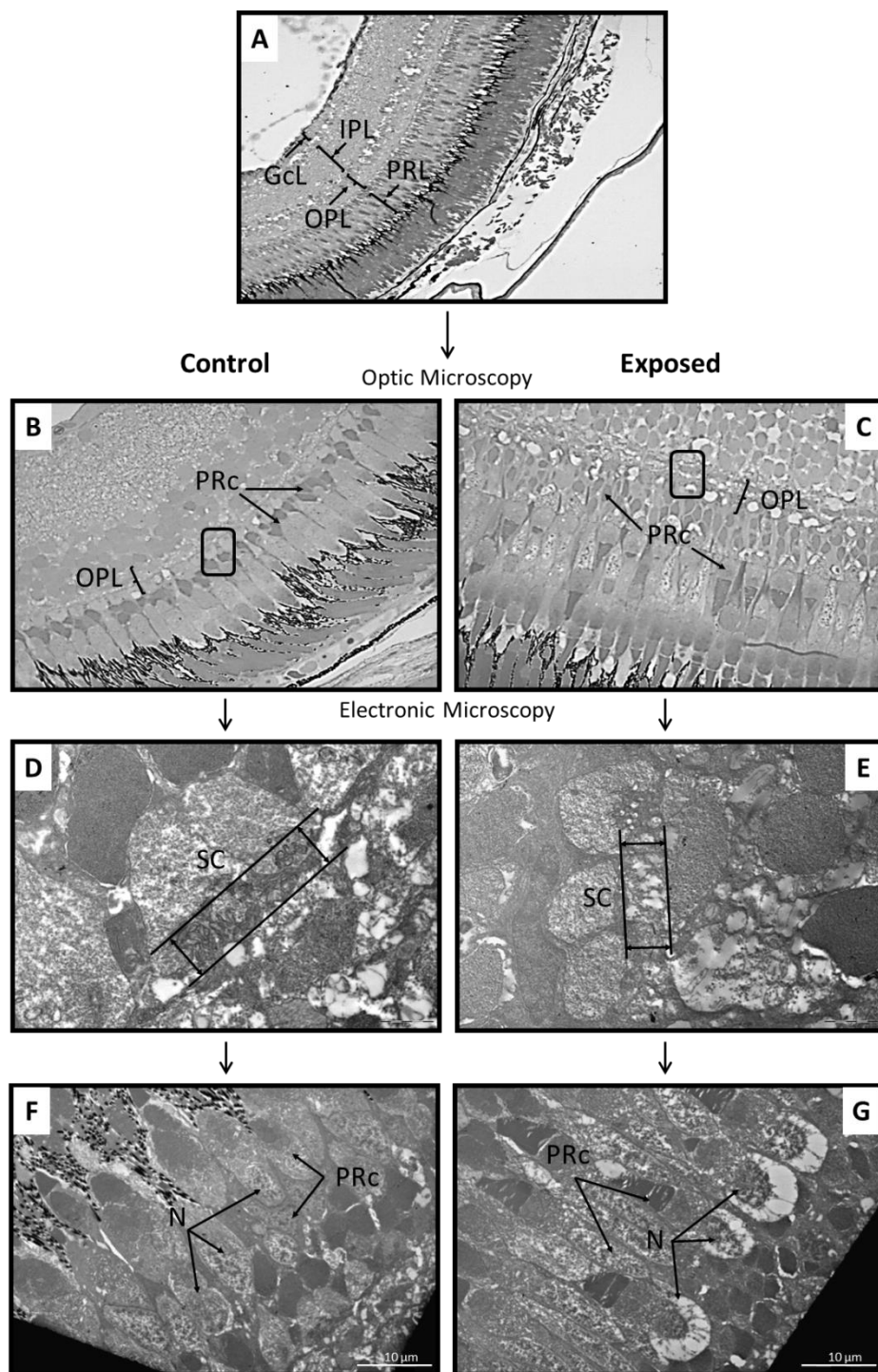
**Figure 1.** Amount of uranium transmitted in the progeny of DU-exposed adult zebrafish. (A) distribution of uranium at the PF stage in eggs from control or DU-exposed fish (ng U, mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ ) in the embryo (black) or in the chorion (hatched). (B) Uranium amount in larvae from control or DU-exposed adult fish at the 96 hpf stage (ng U, mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). \* Statistical difference as compared to the control group (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



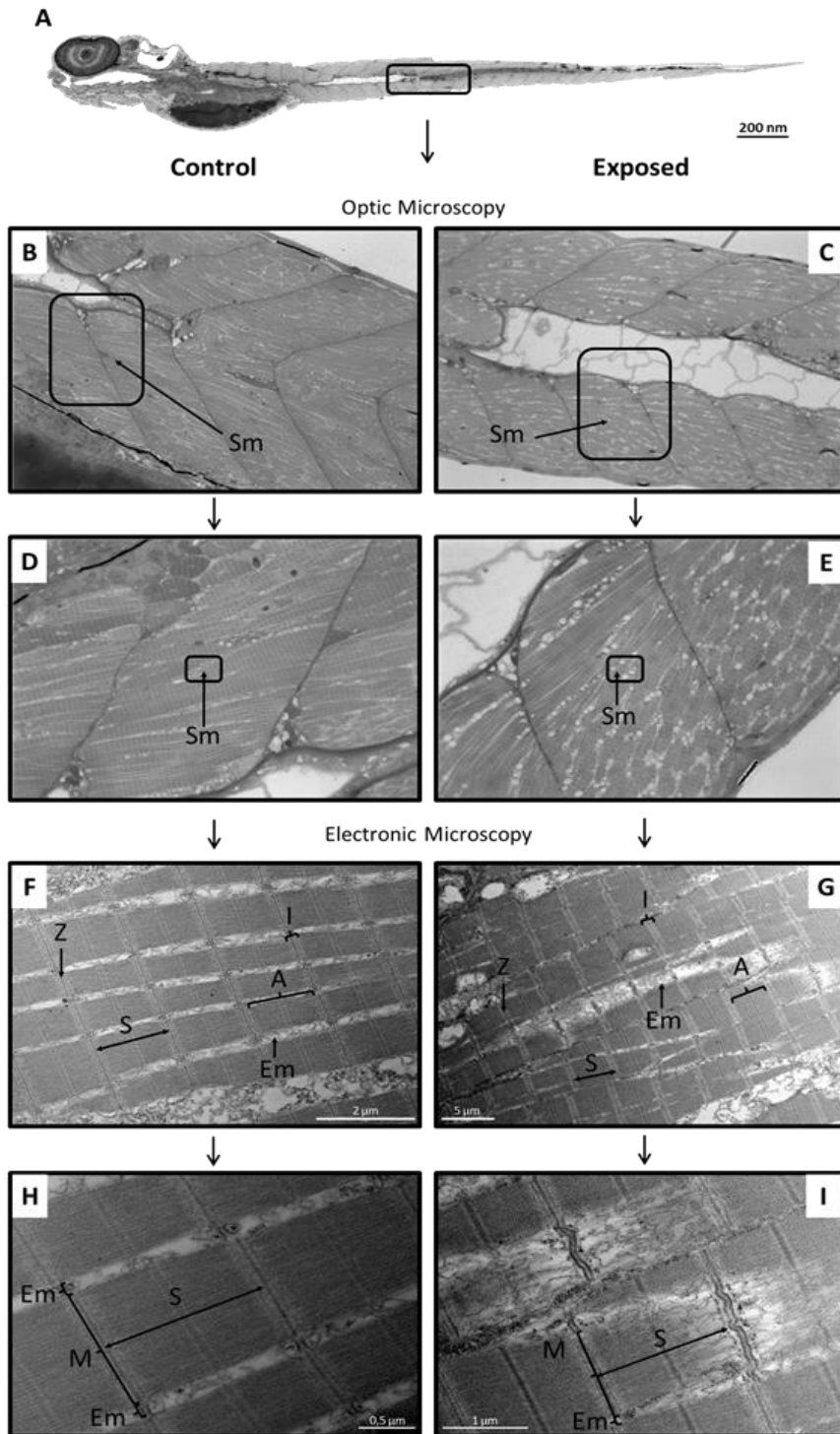
**Figure 2.** Percentage of methylation at *HpaII* cleavage sites assessed with MS-AFLP (means  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ) in the offspring of control (white bars) or exposed parents (grey bars) at the 7 developmental stages sampled.



**Figure 3.** (A) Level of 5-mdC relative to dC (in %) and (B) 5-hmdC relative to 5-mdC (in %) assessed with HPLC–MS/MS (means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ ) in the offspring of control (white bars) or exposed zebrafish (grey bars) at the 7 developmental stages sampled. \*Significantly different from the control group (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure 4.** Histopathological damage in eyes of adult zebrafish. Histological sections of eyes from control (A, B, D & F) and DU-exposed (C, E & G) adult zebrafish, with optic microscopy (A  $\times 20$ , B and C  $\times 100$ ) and transmission electronic microscopy (D to G). (GcL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, OPL: outer plexiform layer, PRL: photoreceptor cell layer, PRC: photoreceptor cell, SC: synaptic complex, N: nucleus).



**Figure 5.** Histopathological damage in skeletal muscles of 96 hpf larvae. Histological sections of 96 hpf control larvae (A, B, D, F and H) and 96 hpf larvae grown from DU-exposed eggs (C, E, G and I), with optic microscopy (B and C  $\times 40$ , D and E  $\times 100$ ) and transmission electronic microscopy (F to I). (Sm: skeletal muscle, A: A-band, I: I-band, Z: Z line, M, S: sarcomere, Em: endomysium).



Table 1. RNA sequencing analysis in the gonads of adult female zebrafish, fertilized eggs and 96 hpf larvae.

Tissue	Number of reads sequenced (mean $\pm$ SD, million reads)		Total number of genes expressed per condition (number of normalized reads > 10)			Number of genes differentially expressed in the DU-exposed condition <sup>a</sup>	
	Control	DU-exposed	Control	DU-exposed	Shared	Stimulated	Repressed
Female gonads	81 $\pm$ 21	84 $\pm$ 5	17029 $\pm$ 100	17344 $\pm$ 357	14324	1649 (856)	1722 (1383)
Fertilized eggs	96 $\pm$ 30	117 $\pm$ 2	13578 $\pm$ 40	14397 $\pm$ 88	12029	2692 (1612)	4558 (1465)
96 hpf larvae	83 $\pm$ 14	74 $\pm$ 4	21066 $\pm$ 67	21131 $\pm$ 104	19748	529 (436)	71 (48)

<sup>a</sup> Genes with a fold-change > (+/-) 2 and adjusted p-value (FDR) less than 0.05 were considered as differentially expressed. The numbers in parenthesis correspond to the number of genes with a significant differential expression following DU treatment and a number of reads higher than the filter of 5 % relative to the homogenous and mean expression (see explanations below).

Number of coding genes given by the Ensembl (Sanger Institute) data bank: 25,642. A homogenous and mean expression of each of these genes would give a reads frequency of 1 over 25,642. However, we have rather to take into consideration the number of genes expressed per condition (17,000, 14,000, and 21,000 for female gonads, fertilized eggs and 96 hpf larvae, respectively). With such a basis, a homogenous expression would give a reads frequency of 59, 71 and 48 x 10<sup>-6</sup>. Being given the total number of reads in the 3 control conditions, a homogenous expression would give 4779, 6816, and 3984 reads for female gonads, fertilized eggs and 96 hpf larvae, respectively. The differential expression of poorly expressed genes has no physiological meaning, so that we have to consider the genes relatively abundantly expressed. If we take a filter of 5 % relative to the homogenous expression, we have to disregard genes for which the number of reads is below 239, 341, and 199 for female gonads, fertilized eggs and 96 hpf larvae, respectively.

## REFERENCES

- Aanes, H., Winata, C.L., Lin, C.H., Chen, J.P., Srinivasan, K.G., Lee, S.G., Lim, A.Y., Hajan, H.S., Collas, P., Bourque, G., Gong, Z., Korzh, V., Alestrom, P., Mathavan, S., 2011. Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition. *Genome Res* 21, 1328-1338.
- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Medrano, M., Herrera, C.M., 2015. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Mol Ecol Resour* 6, doi: 10.1111/1755-0998.12426. [Epub ahead of print].
- Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., Adam-Guillermin, C., 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquat. Toxicol.* 100, 295-302.
- Barišić, D., Lulić, S., Miletić, P., 1992. Radium and uranium in phosphate fertilizers and their impact on the radioactivity of waters. *Water Research* 26, 607-611.
- Bird, A.P., 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70, 5-8.
- Bourrachot, S., Brion, F., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalie, I., Palluel, O., Adam-Guillermin, C., 2014. Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 154, 1-11.
- Denison, F., 2004. Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. In. Université de Provence Aix Marseille I.
- Dubrova, Y.E., Plumb, M., Gutierrez, B., Boulton, E., Jeffreys, A.J., 2000. Genome stability: Transgenerational mutation by radiation. *Nature* 405, 37-37.
- Faucher, K., Floriani, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2012. Uranium-induced sensory alterations in the zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 124-125, 94-105.
- Fulnecek, J., Kovarik, A., 2014. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics* 15, 2.
- Garnier-Laplace, J., Colle, C., Morello, M., 2001. Natural Uranium and the environment. [http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium\\_UK.pdf](http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium_UK.pdf).
- Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brethes, D., Bourdineaud, J.P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6, 144-160.
- Gestri, G., Link, B.A., Neuhaus, S.C., 2012. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev Neurobiol* 72, 302-327.
- Gombeau, K., Pereira, S., Ravanat, J.L., Camilleri, V., Cavalie, I., Bourdineaud, J.P., Adam-Guillermin, C., 2016. Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish. *J Environ Radioact* 154, 25-33.
- Haberle, V., Li, N., Hadzhiev, Y., Plessy, C., Previti, C., Nepal, C., Gehrig, J., Dong, X., Akalin, A., Suzuki, A.M., 2014. Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters. *Nature* 507, 381-385.
- Heard, E., Martienssen, R.A., 2014. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell* 157, 95-109.
- Holliday, R., 1994. Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15, 453-457.
- IAEA, O.N.a., 2012. *Uranium 2011: Resources, Production and Demand*; ISBN 978-92-64-17803-8. <http://www.oecd-nea.org/ndd/pubs/2012/7059-uranium-2011.pdf>.
- Kamstra, J.H., Loken, M., Alestrom, P., Legler, J., 2015. Dynamics of DNA hydroxymethylation in zebrafish. *Zebrafish* 12, 230-237.

Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brethes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2010a. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquat Toxicol* 100, 66-74.

Lerebours, A., Bourdineaud, J.-P., Van Der Ven, K., Vandebrouck, T., Gonzalez, P., Camilleri, V., Floriani, M., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2010b. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain; transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environ. Sci. Technol* 44, 1438-1443.

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

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K., 2013. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS One* 8.

Mhanni, A.A., McGowan, R.A., 2004. Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Development genes and evolution* 214, 412-417.

Miller, A.C., Stewart, M., Rivas, R., 2009. DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie* 91, 1328-1330.

Pereira, S., Malard, V., Ravanat, J.L., Davin, A.H., Armengaud, J., Foray, N., Adam-Guillermin, C., 2014. Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. *PLoS One* 9, e92974.

Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 797-803.

Pilsner, J.R., Lazarus, A.L., Nam, D.H., Letcher, R.J., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N., 2010. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Mol. Ecol.* 19, 307-314.

Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J., 2002. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 23, 1911-1918.

Russo, V.E., Martienssen, R.A., Riggs, A.D., 1996. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Salonen, L., 1994. 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *IAHS* 222, 71-148.

Skinner, M.K., Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Haque, M., Nilsson, E.E., 2013. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Medicine* 11.

Somers, C.M., Yauk, C.L., White, P.A., Parfett, C.L.J., Quinn, J.S., 2002. Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15904-15907.

Su, S., Jin, Y., Zhang, W., Yang, L., Shen, Y., Cao, Y., Tong, J., 2006. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine. *J Occup Health* 48, 261-266.

Szyf, M., 2015. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in Molecular Medicine* 21, 134-144.

Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., Romey, M.-C., 2004. Renal

toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental Health Perspectives*, 1628-1635.

Vandegheuchte, M.B., Lemiere, F., Janssen, C.R., 2009b. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150, 343-348.

WHO, 2012. *Uranium in Drinking-water*. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO/SDE/WSH/03.04/118/Rev/1.

Xu, M., Li, X., Korban, S., 2000. AFLP-Based detection of DNA Methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 361-368.





## Supporting Information

The transfer of depleted uranium from exposed adult zebrafish to eggs causes DNA hypermethylation and histopathological alterations in embryos, along with modified patterns of gene expression at the egg and larvae stages

Kewin Gombeau<sup>a</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>b</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>c,d</sup>, Olivier Armant<sup>5</sup>, Virginie Camilleri<sup>a</sup>, Isabelle Cavalie<sup>a</sup>, and Christelle Adam-Guillermin<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, INAC-SCIB, F-38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> CEA, INAC-SCIB Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, F-38000 Grenoble, France

<sup>e</sup> Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

\* Address for Correspondence

Dr. Christelle Adam-Guillermin

IRS[N]/PRP-ENV/SERIS/LECO

Centre de Cadarache - Bât 183 - BP3

13115 Saint Paul Lez-Durance

Phone : +334 42 19 94 01 - Fax : +334 42 19 91 51

E-mail: [christelle.adam-guillermin@irsn.fr](mailto:christelle.adam-guillermin@irsn.fr)

Number of pages: 19

Number of Protocols: 6

Number of Tables: 8

Number of Figures 5

### *Synthetic water composition and depleted uranium exposure*

The synthetic water was composed by:  $\text{CaCl}_2[2\text{H}_2\text{O}]$  42.49  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2[6\text{H}_2\text{O}]$  19.30  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4[7\text{H}_2\text{O}]$  24.65  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.78  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  11.33  $\text{mg L}^{-1}$ , and  $\text{NaNO}_3$  26.35  $\text{mg L}^{-1}$ , oxygenated by bubbling with air.

Water renewal was manually performed daily, with a 50% change of the total water volume in each tank. The temperature was set at  $28 \pm 1$  °C, and the pH at  $6.5 \pm 0.1$  with HCl using peristaltic pumps controlled by automated pH regulators (Consort R301, Illkirch, Belgium). The pH and water composition were chosen to ensure a good balance between the maximal bioavailability of DU and the optimal physiological conditions of the zebrafish. During acclimation and exposure, the stocking density was 1 fish  $\text{L}^{-1}$  and the light cycle consisted of 14/10 h (day/night).

The dissolved DU concentrations were monitored using filtered and acidified water samples, which were analyzed several times a day. To ensure that the contamination pressure in each tank was as close as possible to the nominal concentration, the peristaltic pump system distributed DU from a stock solution at the concentration required in the contaminated tanks. The values measured throughout the exposure phase are given in the supplementary data (Table S1).



### *Breeding*

During the acclimation phase, fish were bred weekly to increase the likelihood of successful breeding during the experiment. Six males and six females were placed in 15L tanks filled with synthetic clean water. Breeding tanks contained plastic box covered by a mesh cover allowing the eggs capture. The top of the plastic box was 2 cm below the water level. The breeding water was maintained at  $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  during the breeding period. During breeding, males and females were placed in the breeding tank the previous evening, and separated by a perforated plastic plate. The following morning, the plastic plate was removed to initiate the reproduction. After the breeding, fish were replaced in experimental aquaria.

Eggs were obtained from control or exposed adults, and sampled at 7 developmental stages: post-fertilization (PF, one cell stage); 3.5; 6; 24; 48; 72; and 96 hour post-fertilization (hpf). Eggs were kept in synthetic clean water composed by sterile water supplemented by  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  salts “Instant Océan®” at  $28^{\circ}\text{C}$ . During the experiment, no differences on the mortality and the hatching success were observed between the conditions.

### *MS-AFLP protocol*

Two sets of double digestion reactions containing 5 U of both *EcoRI* and *MspI* or 5 U of both *EcoRI* and *HpaII* were simultaneously incubated overnight at 37 °C using 250 ng of genomic DNA, and then denatured at 65 °C for 10 min. An overnight ligation step was then conducted on each reaction at 18 °C using 1 U of T4 DNA ligase, 5 pmol of the *EcoRI* adaptor, and 50 pmol of the *MspI/HpaII* adaptors. The ligated fragments were amplified with a preselective PCR using the following parameters: (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 35 cycles. The reaction mixture was diluted by a factor of 1.25, and 5 µL of this preselective PCR product was used as the template DNA for the three types of selective PCR, with specific sets of primers (Table S4). Each selective PCR contained 5 ng and 30 ng of the *EcoRI* (5'-HEX labeled) and *MspI/HpaII* primers, respectively, and was performed with the following parameters: (94 °C for 30 s, 65 °C (– 0.7 °C/cycle) for 1 min, 72 °C for 1 min) × 12 cycles, followed by (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 23 cycles. The migration of the PCR products of the selective amplification was monitored on an ABI 3730 DNA Analyzer (Sanger sequencer) with the internal size marker, ROX 500 (Plateforme GeT-Purpan, Toulouse, France). The results were analyzed with the Peak Scanner™ Software v1.0 (ABI). For each sample, we noted the number of fragments in each digest and under each type of selective amplification, and calculated the demethylation ratio as the number of fragments ( $N$ ) obtained in the codigestion with *EcoRI* and *HpaII* ( $N_{HpaII}$ ) divided by the number obtained with *EcoRI* and *MspI* ( $N_{MspI}$ ). The methylation ratio was calculated with the following formula:  $(1 - [N_{HpaII}/N_{MspI}]) \times 100$ . All the adapter and primer sequences were provided by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and are shown in Table S3. The enzymes were provided by Promega (Charbonnières-les-Bains, France).

### *HPLC-MS/MS protocol*

DNA samples were digested for 2 h at 37 °C with 5 U of nuclease P1 (Sigma Co., St Louis, MO, USA) together with 0.004 U of phosphodiesterase II (Sigma Co.). The samples were then treated with 0.003 U of phosphodiesterase I (Sigma Co.) and 5 U of alkaline phosphatase (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) for 2 h at 37 °C. The enzymes were neutralized by the addition of 10 µL of 0.1 M HCl and the samples were centrifuged for 5 min at 5000 × g before their analysis with HPLC–MS/MS. The hydrolyzed nucleosides were separated with HPLC using a linear gradient of acetonitrile in 2 mM ammonium formate, from 0% to 20% in 20 min, using an Uptisphere 3 µm (150 × 2 mm i.d.) octadecyl silyl silica gel column from Interchim (Montluçon, France) at a flow rate of 200 µl min<sup>-1</sup>. Under these conditions, dC, 5-mdC, and 5-hmdC were eluted at 7.6, 11.4, and 8.1 min, respectively. The eluates were quantified with external calibration.

### *RNAseq protocol*

Extracted total RNA samples showed no sign of degradation (RNA index number > 9) on RNA nanochips (Bioanalyser 2100, Agilent). 1 µg of total RNA per sample was used to generate individual sequencing libraries with the TruSeq mRNA kit v2 (Illumina). Briefly, mRNA were extracted by poly(A) RNA selection using poly-dT coated magnetic beads followed by fragmentation. 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis was performed with the Superscript II (ThermoFisher) using random hexamer primers. The cDNA fragments were subjected to end-repair and dA-tailing, and finally ligated to specific double stranded bar-coded adapters. Libraries were finally subjected to 12 cycles of PCR. Size and concentration of sequencing libraries were determined with DNA-chip (Bioanalyser 2100, Agilent) and the concentrations adjusted to 8 pM. Multiplexed samples were loaded over 7 sequencing lanes. Paired end reads (2 x 50 nucleotides) were obtained on a HiSeq1500 using SBS v3 kits (Illumina). Cluster detection and base calling were performed using RTAv1.13 and quality of reads assessed with CASAVA v1.8.1 (Illumina). The sequencing resulted in 1.5 billion pairs of 50 nt long reads with a mean Phred quality score > 30. The reads were mapped against the zebrafish genome (Zv9) using tophat version 2.0.11 with the options `-r 180 --mate-std-dev 80 --b2-sensitive --no-novel-juncs -a 5 -p 5 --library-type fr-unstranded` and using known exon junctions (Ensembl release 75). Gene expression was determined by counting for each gene the number of reads that overlapped known gene (Ensembl release 75) with HTSeq version 0.5.3p3. Genes with a number of normalized reads (computed with DESeq2) > 10 reads were considered as being detected. Differential expression was computed using the R package DESeq2. Genes with a fold-change > (+/-) 2 and adjusted p-value (FDR) less than 0.05 were considered as differentially expressed.

### *TEM protocol*

After dissections/samplings, the tissues/larvae were fixed for two days at 4 °C with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4. The samples were washed for 5 min three times with the same buffer. Samples were postosmicated with 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer for 1 h, then dehydrated through a graded ethanol series, and finally embedded in monomeric resin Epon 812. All chemicals used for histological preparation were purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA). Sections for optical and electron microscope, 500 and 80 nm respectively, were obtained using an ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The semi-thin sections were stained with aqueous blue toluidine and examined under a light microscope (DM750, Leica) equipped with a Leica camera ICC50 and using the LAS EZ Software. For TEM analysis, ultrathin sections were mounted on copper grids and examined in a Tecnai G<sup>2</sup> Biotwin Electron Microscope (FEI Company, Eindhoven, the Netherlands) using an accelerating voltage of 100 kV and equipped with a CCD camera Megaview III (Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

Table A.1. Daily measure of dissolved uranium concentrations in the water during the experiment. Control values were under the LD. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g DU.L}^{-1}$ .

---

Day	Exposed, M.	Exposed, F.
1	12.2	12.2
2	13.9	15.9
3	15.8	17.1
4	12.8	15.1
5	16.7	17.7
6	13.7	15.7
7	18.9	20.6
8	14.6	19.6
9	15.8	17.1
10	20.2	23.4

---

Table A.2. Uranium bioaccumulation in fish organs after 10 days of exposure. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g U.g}^{-1}$  dry weight (Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ ). \* Significant difference as compared to control (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

Organs	Male						Female					
	Control			Exposed			Control			Exposed		
Brain	0.42	$\pm$	0.22	1.55	$\pm$	1.11 *	1.14	$\pm$	0.86	1.33	$\pm$	0.49
Gonads	0.46	$\pm$	0.20	0.92	$\pm$	0.40	0.03	$\pm$	0.01	2.31	$\pm$	1.52 *
Eyes	0.61	$\pm$	0.18	1.89	$\pm$	0.66 **	0.40	$\pm$	0.18	0.77	$\pm$	0.24 *

Table A.3. Uranium content in the progeny of control and DU-exposed fish at the first and last sampling stage. Amounts of uranium are expressed in ng U (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3-5$ ). \* Significant difference as compared to control (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). hpf = hour post-fertilization.

Stages	Control	DU-Exposed
Post-Fertilization		
<i>Embryo</i>	0.64 $\pm$ 0.28	4.51 $\pm$ 0.94 ***
<i>Chorion</i>	0.30 $\pm$ 0.20	4.11 $\pm$ 0.93 ***
96 hpf		
<i>Larva</i>	0.56 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.09



Table A.4. Adapters and primers sequences used in MS-AFLP

---

<i>EcoR</i> I adapter F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoR</i> I adapter R	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II adapter F	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II adapter R	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
<i>EcoR</i> I pre-selective primer	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II pre-selective primer	5'-GATGAGTCTAGAACGG-3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAG primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>EcoR</i> I - HEX - AAC primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II + TAG primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG-3'
<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II + TAC primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAC-3'

---

Table A.5. Methylation levels at *Hpa* II cleavage site in brain, gonads and eyes of fish after 10 days of DU exposure. Results (mean  $\pm$  SEM) were obtained from 5 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as  $n$  total = 15. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100. \* Significant difference as compared to controls from the same sex (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001).

	Brain			
	Male		Female	
	Control	Exposed	Control	Exposed
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.35 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.09
Methylation level (%)	65.3 $\pm$ 2.94	20.8 $\pm$ 8.61	50.9 $\pm$ 2.43	43.4 $\pm$ 9.12
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>				
Ratio	0.42 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.09
Methylation level (%)	57.8 $\pm$ 5.78	23.6 $\pm$ 8.96	49.2 $\pm$ 7.26	45.6 $\pm$ 9.42
<b><i>EcoRI</i>-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.43 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.14
Methylation level (%)	56.5 $\pm$ 3.93	56.7 $\pm$ 3.37	55.4 $\pm$ 4.76	48.6 $\pm$ 13.6
<b>Total</b>				
Ratio	0.40 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.06
Methylation level (%)	59.9 $\pm$ 2.56	33.7 $\pm$ 5.90 ***	51.8 $\pm$ 2.87	45.9 $\pm$ 5.86
	Gonads			
	Male		Female	
	Control	Exposed	Control	Exposed
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.61 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.22
Methylation level (%)	39.4 $\pm$ 12.4	28.5 $\pm$ 7.65	58.9 $\pm$ 7.27	38.3 $\pm$ 21.7
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>				
Ratio	0.66 $\pm$ 0.13	0.78 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.13	0.81 $\pm$ 0.08
Methylation level (%)	34.0 $\pm$ 13.0	22.5 $\pm$ 11.8	34.3 $\pm$ 12.6	18.7 $\pm$ 8.27
<b><i>EcoRI</i>-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.69 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.09	0.61 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.08
Methylation level (%)	31.3 $\pm$ 11.0	36.1 $\pm$ 9.32	39.3 $\pm$ 6.09	41.9 $\pm$ 8.03
<b>Total</b>				
Ratio	0.65 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.06
Methylation level (%)	35.0 $\pm$ 6.48	29.5 $\pm$ 5.45	44.2 $\pm$ 5.63	31.6 $\pm$ 6.19
	Eyes			
	Male		Female	
	Control	Exposed	Control	Exposed
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.48 $\pm$ 0.10	0.57 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.09
Methylation level (%)	52.1 $\pm$ 9.75	42.9 $\pm$ 8.60	55.4 $\pm$ 7.53	49.7 $\pm$ 8.65
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>				
Ratio	0.45 $\pm$ 0.10	0.93 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.04
Methylation level (%)	55.1 $\pm$ 10.20	7.3 $\pm$ 4.52	62.8 $\pm$ 4.10	37.2 $\pm$ 4.10
<b><i>EcoRI</i>-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>				
Ratio	0.44 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.13	0.74 $\pm$ 0.08
Methylation level (%)	56.1 $\pm$ 6.51	28.3 $\pm$ 6.35	45.0 $\pm$ 12.50	25.7 $\pm$ 8.39
<b>Total</b>				
Ratio	0.46 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.05
Methylation level (%)	54.4 $\pm$ 4.72	26.2 $\pm$ 5.30 **	54.4 $\pm$ 5.08	36.7 $\pm$ 4.64 *

Table A.6. Methylation levels at *Hpa* II cleavage site in the progeny of control and DU exposed fish at different developmental stages. Results (Mean  $\pm$  SEM) were obtained from 5 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as *n* total = 15. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100. hpf = hour post-fertilization.

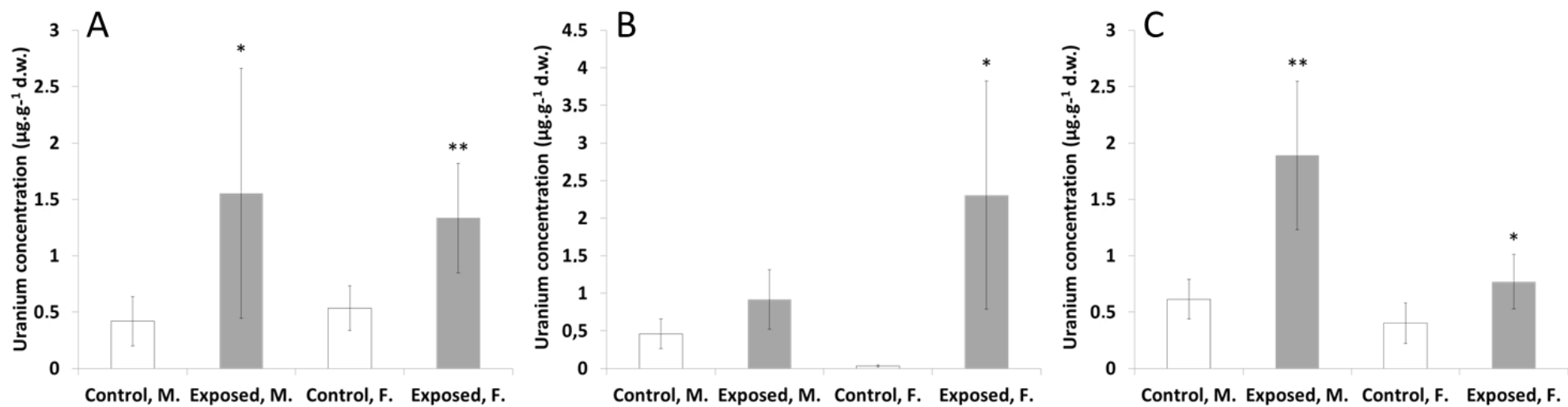
	Post-Fertilisation		3.5 hpf		6 hpf		24 hpf		48 hpf		72 hpf		96 hpf	
	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed	Control	DU-Exposed
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>														
Ratio	0.75 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.22	0.71 $\pm$ 0.17	0.64 $\pm$ 0.08	0.73 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.15	0.31 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.07
Methylation level (%)	24.8 $\pm$ 15.2	44.4 $\pm$ 22.2	29.2 $\pm$ 17.2	36.3 $\pm$ 8.00	26.7 $\pm$ 15.2	38.7 $\pm$ 11.5	54.9 $\pm$ 9.25	47.9 $\pm$ 12.6	52.0 $\pm$ 6.80	19.8 $\pm$ 8.45	31.0 $\pm$ 12.0	50.5 $\pm$ 14.5	69.2 $\pm$ 4.35	57.1 $\pm$ 7.14
<b><i>EcoR</i> I-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>														
Ratio	0.49 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.11	0.87 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.10	0.56 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.19	0.59 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.11
Methylation level (%)	51.2 $\pm$ 5.13	36.8 $\pm$ 10.8	13.3 $\pm$ 8.16	4.0 $\pm$ 4.00	55.4 $\pm$ 12.7	28.7 $\pm$ 12.5	53.9 $\pm$ 10.1	43.7 $\pm$ 8.24	38.0 $\pm$ 3.27	10.7 $\pm$ 6.59	38.7 $\pm$ 5.64	26.4 $\pm$ 18.7	40.7 $\pm$ 11.0	23.3 $\pm$ 11.3
<b><i>EcoR</i> I-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>														
Ratio	0.61 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.10	0.61 $\pm$ 0.17	0.41 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.11	0.58 $\pm$ 0.12	0.73 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.14	0.63 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.10
Methylation level (%)	51.4 $\pm$ 13.8	46.7 $\pm$ 10.2	39.3 $\pm$ 16.7	59.1 $\pm$ 8.70	46.8 $\pm$ 9.44	8.57 $\pm$ 8.57	43.9 $\pm$ 11.1	41.9 $\pm$ 12.4	27.3 $\pm$ 8.33	43.0 $\pm$ 7.01	38.0 $\pm$ 9.70	35.0 $\pm$ 12.3	37.2 $\pm$ 8.86	28.9 $\pm$ 10.6
<b>Total</b>														
Ratio	0.62 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.08	0.67 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.07
Methylation level (%)	42.5 $\pm$ 7.35	41.6 $\pm$ 6.62	27.1 $\pm$ 8.19	32.9 $\pm$ 7.51	42.9 $\pm$ 7.50	25.3 $\pm$ 6.75	50.9 $\pm$ 5.60	44.2 $\pm$ 5.93	39.1 $\pm$ 4.40	24.9 $\pm$ 5.47	35.9 $\pm$ 5.15	37.1 $\pm$ 8.24	49.0 $\pm$ 5.95	38.5 $\pm$ 5.90

Table A.7. Percentage of methylated and hydroxymethylated cytosines measured by HPLC-MS/MS in the brain, the gonads and the eyes of control and exposed after 10 days exposure. Results (mean  $\pm$  SD) were obtained on five biological replicates. \* Significant difference as compared to the offspring from control fish ( $*p < 0.5$ ). <sup>‡</sup> Statistical difference as compared to the values from the female of the same exposure condition (<sup>‡</sup> $p < 0.5$ ; <sup>‡‡</sup> $p < 0.01$ ).

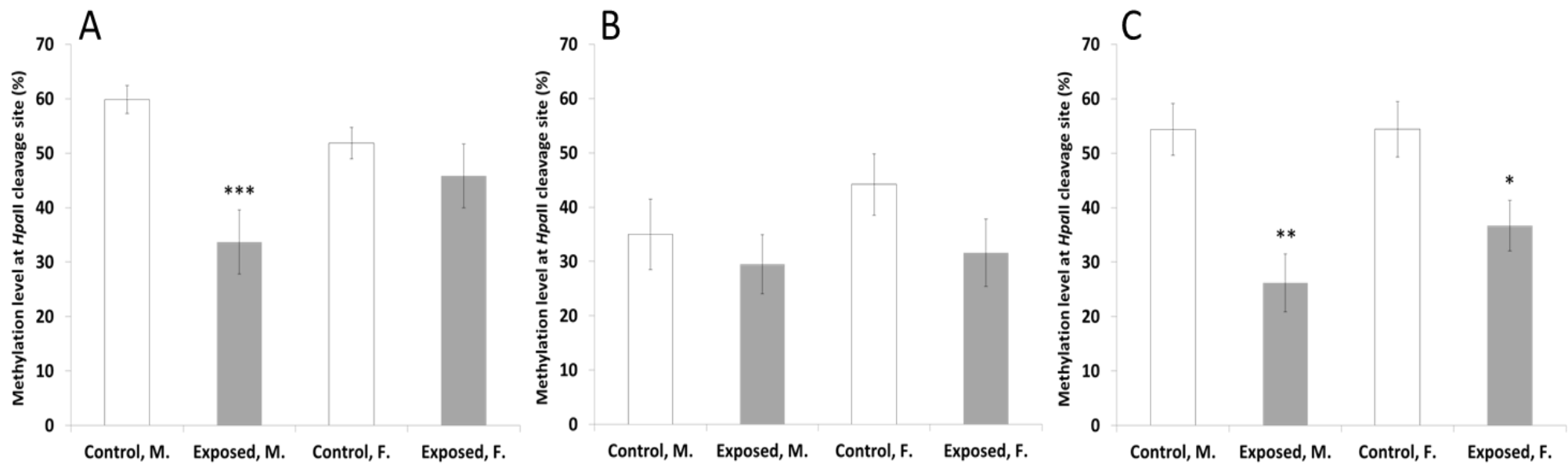
Organs	Male				Female					
	Control		Exposed		Control		Exposed			
Brain										
<i>5-mdC/dC</i>	7.67	$\pm$ 0.82	<sup>‡‡</sup>	9.77	$\pm$ 1.13	*	9.50	$\pm$ 0.67	8.87	$\pm$ 1.69
<i>5-hmdC/5-mdC</i>	7.03	$\pm$ 2.56		5.69	$\pm$ 2.83		4.69	$\pm$ 0.69	4.98	$\pm$ 1.75
Gonads										
<i>5-mdC/dC</i>	10.9	$\pm$ 1.10	<sup>‡</sup>	11.1	$\pm$ 1.15	<sup>‡</sup>	8.06	$\pm$ 1.71	8.19	$\pm$ 2.00
<i>5-hmdC/5-mdC</i>	0.16	$\pm$ 0.11		0.28	$\pm$ 0.17		0.59	$\pm$ 0.08	1.01	$\pm$ 0.71
Eyes										
<i>5-mdC/dC</i>	9.79	$\pm$ 0.90		10.1	$\pm$ 0.43		11.1	$\pm$ 1.00	10.6	$\pm$ 0.91
<i>5-hmdC/5-mdC</i>	1.48	$\pm$ 0.36		1.29	$\pm$ 0.33		1.33	$\pm$ 0.46	1.38	$\pm$ 0.42

Table A.8. Percentage of methylated and hydroxymethylated cytosines measured by HPLC-MS/MS in the progeny of control and DU-exposed fish at different developmental stages. Results (mean  $\pm$  SD) were obtained on five biological replicates. \* Significant difference as compared to the offspring from control fish (\* $p$  < 0.5; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001). hpf = hour post-fertilization.

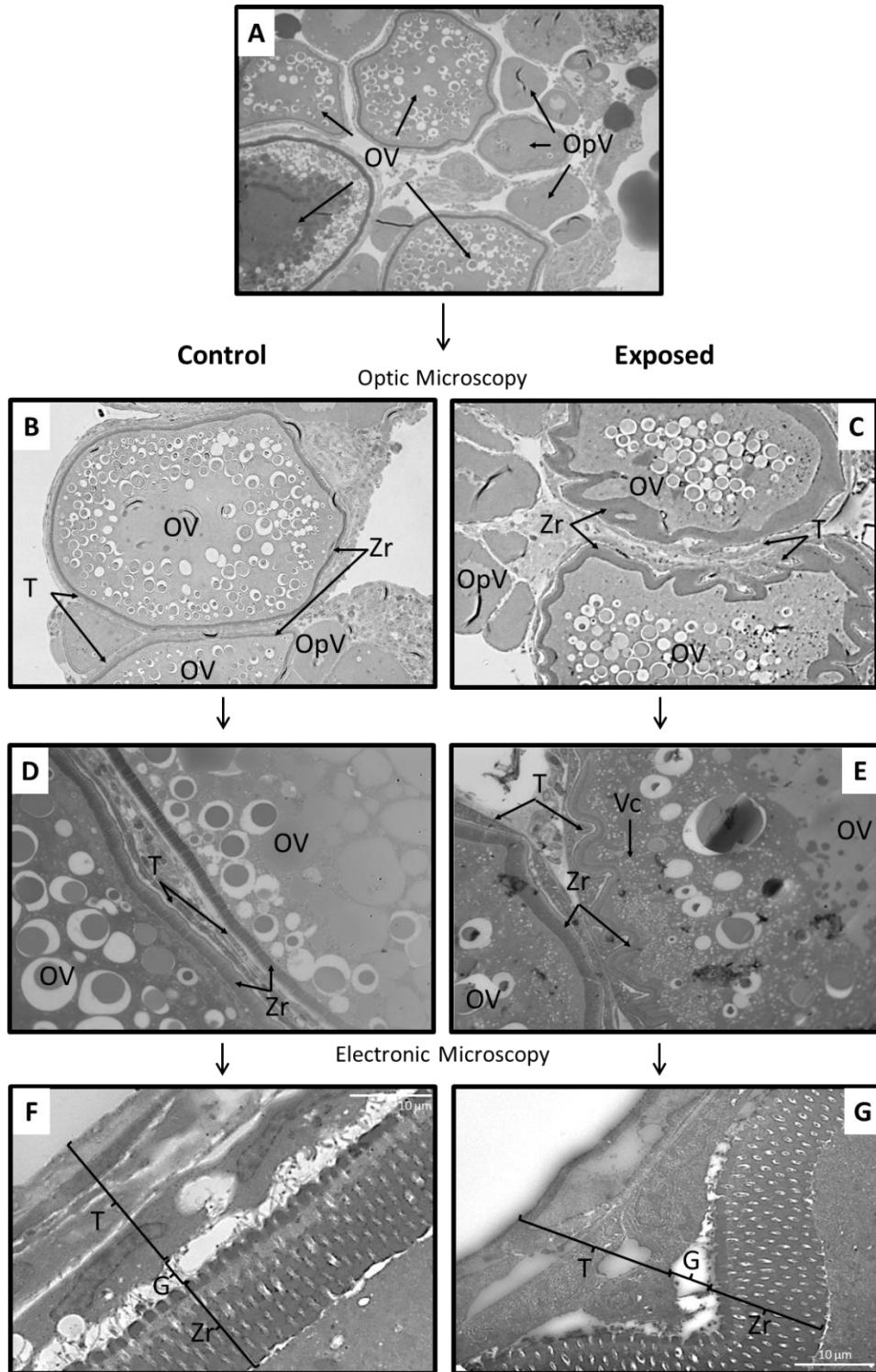
Stage	5-mdC/dC						5-hmdC/5-mdC							
	Control			DU-Exposed			Control			DU-Exposed				
PF	7.90	$\pm$	0.48	6.44	$\pm$	2.26	0.71	$\pm$	0.39	0.63	$\pm$	0.22		
3.5 hpf	7.97	$\pm$	1.19	6.72	$\pm$	0.48	0.82	$\pm$	0.28	0.69	$\pm$	0.31		
6 hpf	7.61	$\pm$	0.85	8.76	$\pm$	0.58	*	0.45	$\pm$	0.05	0.47	$\pm$	0.15	
24 hpf	9.90	$\pm$	0.48	17.9	$\pm$	0.40	***	0.30	$\pm$	0.02	0.85	$\pm$	0.25	**
48 hpf	9.46	$\pm$	0.82	15.5	$\pm$	0.89	***	0.59	$\pm$	0.12	1.26	$\pm$	0.22	***
72 hpf	8.73	$\pm$	1.69	17.5	$\pm$	2.16	***	0.78	$\pm$	0.21	2.12	$\pm$	0.56	**
96 hpf	6.89	$\pm$	0.87	15.4	$\pm$	1.79	***	3.12	$\pm$	1.44	2.02	$\pm$	0.60	



**Figure A.1.** Uranium concentration in the brain (A), in the gonads (B) and in the eyes (C) of adult zebrafish ( $\mu\text{g U.g}^{-1}$  d.w.; mean  $\pm$  SD,  $n = 3-5$ ) after 10 days of DU exposure. M = male, F = female. \* Statistical difference as compared to the control group (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

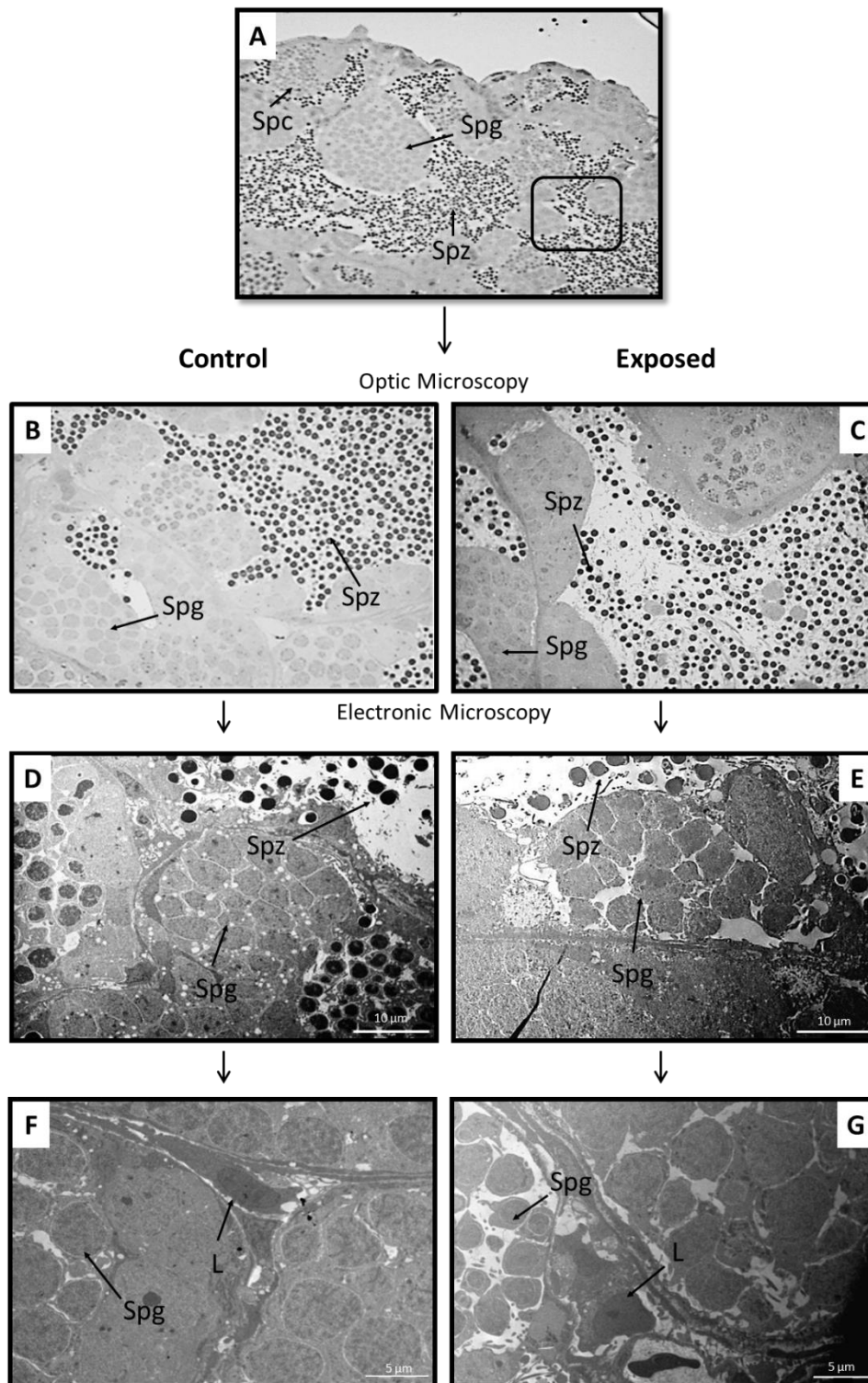


**Figure A.2.** Level of methylation at *HpaII* cleavage sites (%) assessed with MS-AFLP (means  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ) in the brain (A), gonads (B), and eyes (C) of adult zebrafish after 10 days of DU exposure. M = male, F = female. \*Significantly different from the control group (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure A.3.** Histological sections of ovary from control (A, B, D & F) and DU-exposed (C, E & G) female zebrafish, with optic microscopy (A  $\times 20$ , B and C  $\times 40$ , D and E  $\times 100$ ) and transmission electronic microscopy (F and G). (OV: vitellogenic oocyte, OpV: previtellogenic oocyte, Zr: zona radiata, T: theca; G: Granulosa, Vc: vacuolization).





**Figure A.4.** Histological sections of testis from control (A, B, D & F) and DU-exposed (C, E & G) male zebrafish, with optic microscopy (A  $\times 40$ , B and C  $\times 100$ ) and transmission electronic microscopy (D to G). (Spg: spermatogonia, Spc: spermatocyte, Spz: spermatozoa, ; L: Leydig cells).

Condition		0.0239		0.004				0.0048	0.0076	0.0088
	Sex					0.0014				0.0064
-0.53		AFLP.B								
			AFLP.G							
-0.74				AFLP.E				0.0011		0.0012
					HPLC.B					
	-0.69					HPLC.G				
							HPLC.E			
0.63				-0.70				Uacc.B		0.0017
0.61									Uacc.G	
0.60	-0.62			-0.70				0.68		Uacc.E

**Figure A.5.** Pearson matrix correlation built on individual observation. “Condition” = DU treatment; “AFLP.B/.G/.E” = MS-AFLP levels measured in the brain, the gonads and the eyes respectively; “HPLC.B/.G/.E” = HPLC-MS/MS levels measured in the brain, the gonads and the eyes respectively; “Uacc.B/.G/.E” = Uranium accumulation measured in the brain, the gonads and the eyes respectively. The downleft part of the Pearson matrix provides correlation coefficient (red = negative correlation, blue = positive correlation) and the topright part of the Pearson matrix provides the *p* value associated with the test.





## 2. Principales conclusions

Cette seconde expérience visait à déterminer l'existence d'un transfert des marques épigénétiques à la descendance issue de parents exposés ainsi qu'à étudier l'écotoxicité de l'uranium appauvri par le biais d'une approche multi-biomarqueurs, de l'échelle moléculaire à la structure histologique. Plusieurs points ont pu être identifiés :

### 2.1. Les profils de méthylation induits en réponse à l'exposition à l'uranium appauvri

Les résultats obtenus au cours de cette seconde expérience ont permis de mettre en évidence l'apparition de modifications dans les profils de méthylation de l'ADN de la descendance issue de parents exposés. Ces données sont extrêmement intéressantes, et n'ont à notre connaissance jamais été publiées dans la littérature. Egalement, les résultats obtenus corroborent ceux de la première expérience sur les poissons zèbre adultes quant à l'impact de l'exposition à l'uranium appauvri sur les profils de méthylation de l'ADN génomique.

En effet, une exposition de 10 jours à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  induit chez les mâles exposés une diminution de 44% et de 52% du niveau de méthylation au site de coupure de l'enzyme *HpaII*, ainsi qu'une augmentation de 27% du niveau de cytosines méthylées à l'échelle du génome entier. En revanche, chez les femelles exposées, peu de variations ont été rapportées puisque seule une diminution de 33% du niveau de méthylation a été observée au site de coupure de l'enzyme *HpaII* dans les yeux. Concernant les corrélations entre uranium et effets biologiques, la matrice de corrélation de Pearson indique que les effets mesurés par la technique d'AFLP-MS dans le cerveau et les yeux sont corrélés à la pression de contamination dans les bacs. En revanche, seuls les niveaux de méthylation par AFLP-MS dans les yeux ont pu être corrélés à une accumulation significative de l'uranium dans ce tissu.

Concernant les données de méthylation de l'ADN mesurées au sein des différents stades de développement de la descendance de parents témoins ou exposés, les résultats

obtenus par AFLP-MS ne permettent pas de mettre en évidence de différences significatives entre les deux groupes. L'étude du niveau de cytosines méthylées à l'échelle du génome entier dans les œufs fertilisés issus de parents exposés n'a pas non plus permis de détecter un effet sur les profils de méthylation de l'ADN, indiquant que les effets sur ce type de marques épigénétiques à l'échelle globale du génome n'est pas transmise de la génération parentale à la descendance. De plus, jusqu'au stade 3,5 hpf, le génome du zygote est inactif et la synthèse protéique est assurée par le pool d'ARNs transmis par la mère aux œufs. Aucun effet sur les profils de méthylation n'a également été détecté à ce stade, ce qui signifie que ce pool d'ARNs n'est pas non plus en lien avec les profils de méthylation de l'ADN à ce stade. En revanche, à partir du stade 24 hpf, le niveau de cytosines méthylées dans la descendance issue de parents exposés est significativement deux fois supérieurs à celui de la descendance issue de parents témoins. Cette augmentation peut uniquement être imputée d'une part à la présence d'uranium transmis par la mère dans les œufs, ainsi qu'à l'activation du génome zygotique au stade 3,5 hpf et l'acquisition de l'autonomie transcriptionnelle.

A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence l'impact de l'exposition parentale chronique à une concentration environnementale d'uranium appauvri sur les profils de méthylation de la descendance.

### 2.2. La réponse transcriptomique à l'exposition uranifère d'une génération à la suivante

Les résultats obtenus suite à l'analyse du statut transcriptomique sont en lien avec les données de la littérature. En effet, des effets similaires ont déjà été observés dans les reins de souris exposées par voie orale au nitrate d'uranyle à hauteur de 80 et 160 mg.L<sup>-1</sup>. Les gènes surexprimés correspondaient à la réponse au stress oxydatif, au métabolisme cellulaire, aux protéines ribosomiales, et la transduction du signal (Taulan et al., 2004).

Les résultats obtenus sont également en lien avec ceux obtenus dans le cerveau de poissons zèbre exposés durant 10 jours à 15 µg DU.L<sup>-1</sup> d'uranium appauvri. Les gènes impactés étant impliqués dans la réception cellulaire de surface, l'organisation du

cytosquelette, la transduction du signal, la régulation de l'expression génique, le processus de transcription ainsi que la synthèse et l'adressage protéique (Lerebours et al., 2010b).

Dans la descendance issue de parents exposés, une accumulation significative d'uranium a été détectée au stade PF et pourrait-être responsable des perturbations transcriptionnelles observées aux stades œufs fertilisés et larves 96 hpf. A notre connaissance, c'est la première fois que des altérations de l'expression des gènes sont mises en évidence dans la descendance issue de parents exposés à l'uranium appauvri.

### 2.3. Exposition à l'uranium appauvri et dommages histologiques

Les analyses histologiques témoignent d'impacts dans les yeux des poissons adultes ainsi que le muscle squelettique des larves âgées de 96 heures. Les dommages observés dans les autres tissus corroborent ceux déjà publiés précédemment (Barillet et al., 2010; Faucher et al., 2012; Lerebours et al., 2010b) .

Chez les adultes, l'exposition uranifère a pu être mise en lien avec des dommages importants dans les yeux, et notamment au niveau des complexes synaptiques, qui sont l'interface de jonctions axone-axone entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, impliqués dans la transmission du message visuel (Gestri *et al.* 2012), ainsi qu'une altération du noyau des cellules photoréceptrices. Ces résultats semblent mettre en évidence que la vision des organismes pourrait être impactée, et sont en lien avec les résultats obtenus sur l'endommagement des organes sensoriels chez le poisson zèbre suite à une exposition chronique à l'uranium appauvri (Lerebours *et al.* 2010a; Faucher *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent que l'altération des organes sensoriels à l'échelle individuelle pourrait impacter la population en raison de l'importance de ces organes dans les interactions entre les individus (e.g. comportements sociaux, reproduction) ainsi que leur survie (e.g. prise alimentaire, échappement face à un stress tel que la prédation).

Egalement, l'ultrastructure du muscle squelettique longitudinal a été étudiée chez les larves issues de parents témoins et exposés. Nous avons pu observer que l'exposition parentale induit des perturbations dans le développement morphologique de ce tissu avec notamment une distension de l'endomysium, tissu conjonctif jointant les fibres musculaires, ainsi qu'une désorganisation des réseaux de filaments d'actine et de myosine, responsables

## Chapitre 5. 2. Principales conclusions

de la contraction musculaire. L'impact de l'uranium appauvri sur la structure du muscle a déjà été mis en évidence chez des poissons adultes exposés à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'uranium appauvri, en revanche c'est la première fois que de tels effets sont observés dans la descendance, de plus, sans accumulation significative d'uranium.

Comment expliquer les impacts histologiques chez ces larves ? En plus du transfert d'uranium dans les œufs, qui obligatoirement y exerce une toxicité donnée, le pool d'ARNs maternels, responsable de la synthèse protéique jusqu'au stade 3,5 hpf (Aanes et al., 2011), est également impacté et pourrait être associé aux effets observés chez ces larves. Cependant, il est impossible de distinguer la contribution précise de l'accumulation d'uranium dans les œufs, des impacts sur le pool d'ARNs maternels ou encore les modifications dans les profils de méthylation de l'ADN génomique dans l'apparition des histopathologies chez ces larves. Plus précisément, on ne peut distinguer les agents causatifs de ces effets, par exemple, l'augmentation d'un facteur 2 du niveau de méthylation global de l'ADN génomique au stade 24 hpf est-elle une conséquence des modifications du transcriptome cédé par la mère, ou une cause des perturbations du profil transcriptomique chez les larves ?







---

---

## **Chapitre 6. Exposition aux $^{137}\text{Cs}$ *in situ* et effets associés sur la méthylation globale de l'ADN génomique et l'intégrité de l'ADN mitochondrial**

---



*Dans ce chapitre, nous allons aborder les résultats obtenus suite à l'analyse des échantillons de grenouilles prélevés in situ sur le site de Fukushima Daiichi. Ce chapitre se compose d'une introduction en français qui rappelle les hypothèses scientifiques explorées ainsi que les moyens scientifiques déployés pour répondre à cette problématique, l'article scientifique en anglais ayant fait suite à cette expérience, et une troisième partie rédigée en français faisant état des principales conclusions émanant de ces travaux. Ce chapitre est basé sur l'ébauche de l'article « Genome hypermethylation and mitochondrial DNA damage in Japanese tree frogs from Fukushima » en cours de rédaction.*



## 1. Introduction

De nombreuses activités anthropiques engendrent une augmentation du niveau de radioactivité dans les écosystèmes, impactant les organismes qui y vivent. Il existe encore de nombreuses incertitudes et inconnues relatives aux effets radioinduits à l'échelle des populations et au fil des générations. Ce déficit de connaissances représente un obstacle important dans la mise en place de normes de protections adaptées pour l'environnement.

Lors d'accidents nucléaires, de grandes quantités de radionucléides artificiels (n'existant pas à l'état naturel, produits lors du cycle du combustible nucléaire) sont émises dans l'environnement. En particulier, l'accident survenu à la centrale nucléaire de Fukushima Daiichi le 11 mars 2011, a induit un rejet massif de radionucléides dans l'environnement et des débits de doses ambiante externe allant de quelques dizaines de  $\text{nGy}\cdot\text{h}^{-1}$  à plusieurs centaines de  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Aliyu *et al.* 2015). Ces dernières valeurs sont largement supérieures à la valeur de référence (benchmark) proposée pour la protection des écosystèmes continentaux et fixée à  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Garnier-Laplace *et al.* 2006).

Très peu de données ont été acquises sur les effets biologiques induits sur la faune exposée dans son habitat naturel suite à cet accident. La majorité des résultats obtenus concerne le suivi *in situ* d'un papillon endémique (*Zizeeria maha*) par l'équipe d'Hiyama et ses collaborateurs (Hiyama *et al.* 2012; Hiyama *et al.* 2013; Iwata *et al.* 2013; Nohara *et al.* 2014; Taira *et al.* 2014; Hiyama *et al.* 2015). Ils ont mis en évidence l'induction d'un taux de malformations conséquent chez les populations exposées entre 2011 et 2012, avec cependant, une diminution conséquente de ces effets depuis la fin de l'année 2012. De surcroît, à ce jour, bien que des effets transgénérationnels aient été montrés chez les papillons, aucune étude n'a porté sur le rôle des modifications épigénétiques radioinduites sur l'apparition de tels effets.

Egalement, Mousseau, Møller, et leurs collaborateurs (Bonisoli-Alquati *et al.* 2015; Møller *et al.* 2015a; Møller *et al.* 2015b) ont mis en évidence un impact des retombées radioactives sur l'abondance de nombreuses espèces d'oiseaux qui se trouve être inversement corrélée au niveau ambiant de radiation ionisante. Cependant, dans une récente publication (Bonisoli-Alquati *et al.* 2015), ces auteurs n'ont pas trouvé de corrélation entre le niveau ambiant de radiation ionisante mesuré et l'apparition de dommages à l'ADN.

Le manque de corrélation observé peut être expliqué par la manière dont les auteurs ont pris en compte le niveau d'exposition. Effectivement, se baser sur le débit de dose ambiante externe mesurée ponctuellement pour interpréter les effets biologiques peut introduire un biais, puisque cette dernière ne reflète pas nécessairement la dose externe à laquelle l'organisme peut être exposé à travers son mode de vie. De surcroît, le débit de dose interne n'est pas pris en compte, ce qui implique que les débits de dose totale absorbée par les organismes sont sous-évalués.

A travers cette étude, nous proposons d'amener de plus amples informations sur les effets des retombées radioactives de Fukushima Daiichi sur les modifications épigénétiques et les dommages au matériel génétique chez un modèle amphibien endémique : la grenouille arboricole Japonaise (*Hyla japonica*). Dans le domaine de la radioécologie, très peu de données sont disponibles dans un contexte d'exposition chronique à de faibles niveaux de radiations ionisantes. En effet, les seules données disponibles ont été observées sur des organismes végétaux exposés aux hauts niveaux d'activité radiologique de la zone d'exclusion de Tchernobyl (Kovalchuk *et al.* 2003; Kovalchuk *et al.* 2004), qui ont permis de mettre en évidence une hyperméthylation du génome associée à l'augmentation de la stabilité génomique.

### 1.1. Sensibilité des profils de méthylation à l'exposition aux radionucléides

Nous avons cherché à caractériser les effets d'une exposition chronique à de faibles niveaux de radionucléides sur les profils de méthylation de la grenouille arboricole Japonaise exposée *in situ* aux retombées radioactives engendrées par l'accident nucléaire de Fukushima Daiichi. Les effets des expositions chroniques aux faibles niveaux de radiations ionisantes sur la méthylation de l'ADN sont peu connus, et cela même en dépit de leur importance dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. Pour cela, nous avons étudié les réponses chez quatre groupes de 10 grenouilles présentant un débit de dose total homogène et croissant : le site C2 ( $2,46 \pm 0,12 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) qui représente le groupe témoin, et les sites R1 ( $11,1 \pm 0,38 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ), R2 ( $22,6 \pm 1,98 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) et R3 ( $46,9 \pm 5,07 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ), les sites contaminées. Ce débit de dose total correspond à la somme du débit de dose externe



mesuré sur les sites de prélèvement des grenouilles additionné au débit de dose interne mesuré dans chaque grenouille.

Par le biais de cette étude, nous pourrons à la fois valider les approches moléculaires développées au laboratoire chez un modèle biologique au génome non séquencé. Nous pourrons également établir l'existence d'une réponse épigénétique dans un contexte d'exposition chronique chez des organismes ayant absorbé un débit de dose total homogène au sein de chaque groupe.

## 1.2.L'apport moléculaire de l'analyse des lésions à l'ADN mitochondrial

Nous voulions caractériser l'apparition de dommages au matériel génétique au regard du débit de dose total mesuré chez les organismes chroniquement exposés.

Comme cela a été précisé précédemment, la séquence du génome du modèle biologique de cette étude est encore inconnue. En revanche, la séquence complète du génome mitochondrial pour cette espèce est connue et référencée sous le numéro d'accèsion NC\_010232.1.

Ainsi, nous avons pu développer une approche moléculaire permettant de quantifier le nombre moyen de lésions à l'ADN mitochondrial et plus particulièrement, sur un fragment d'une longueur de 10,7 kpb.

Cette approche nous permettra ainsi de déterminer s'il existe une relation linéaire entre les niveaux d'exposition aux radionucléides et l'apparition de dommages à l'ADN mitochondrial, ainsi que d'établir un lien entre atteintes au matériel génétique et niveaux de méthylation de l'ADN génomique.



# Genome hypermethylation and mitochondrial DNA damage in Japanese tree frogs from Fukushima

*Kewin Gombeau<sup>a</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>b</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>c,d</sup>, Thierry Lengagne<sup>e</sup>, Jean-Marc Bonzom<sup>a</sup>, and Christelle Adam-Guillermin<sup>a,\*</sup>*

<sup>a</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO,  
Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France

<sup>b</sup>Université de Bordeaux, CNRS, UMR 5805, EPOC, 33400 Talence, France

<sup>c</sup>Univ. Grenoble Alpes, INAC-SCIB, 38000 Grenoble, France

<sup>d</sup>CEA, INAC-SCIB Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, 38000 Grenoble, France

<sup>e</sup>Université de Lyon, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés,  
Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, 6 rue Raphaël Dubois, 69622, Villeurbanne, France

\*Corresponding author



## Abstract

In this study, we investigated the effects of a chronic exposure to low doses of radioactivity on molecular marks in the Japanese tree frog exposed *in situ* to the Fukushima Daiichi NPP (Nuclear Power Plant) releases. We selected four sites, including one control and three contaminated sites, and ten frogs per site with a homogeneous absorbed dose rate to evaluate the dose-effect relationship. We observed a positive correlation between increasing absorbed dose rate (DR) measured in frogs, DNA hypermethylation and mitochondrial (Mt) DNA damage. In the control group, frogs presented a total level of methylated cytosines of 18.4% and 0.5 lesions over 10.7 kbp in the Mt DNA. In exposed frogs, increasing DRs from 11.1 to 46.9  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  are associated with an increase of methylated cytosines, ranging from 26 to 31%, as well as a 3.5 to 4.2-fold higher average number of lesions to Mt DNA. To our knowledge, these results are the first one to highlight epigenetic modifications and Mt DNA damage in vertebrates exposed at Fukushima Daiichi NPP releases.



## INTRODUCTION

The Fukushima Daiichi nuclear power plant (FDNPP) accident released a huge amount of radionuclides in the environment. Nowadays, the resulting ambient dose rates (DR) measured in the Fukushima prefecture range from the background level (tens of  $\text{nGy h}^{-1}$ ) up to hundreds of  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  (see Figure S1) (Aliyu *et al.* 2015). Such high levels of radioactivity remain widely higher than the  $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$  benchmark value proposed to protect exposed populations of non-human biota in continental ecosystems (Garnier-Laplace *et al.* 2006).

To date, few *in situ* studies have investigated the biological effects of the radionuclides released following the FDNPP accident on wildlife chronically exposed in their living habitat. Indeed, most of these studies were carried out by Hiyama team, with several studies led on the endemic pale grass blue butterfly: *Zizeeria maha* (Hiyama *et al.* 2012; Hiyama *et al.* 2013; Iwata *et al.* 2013; Nohara *et al.* 2014; Taira *et al.* 2014; Hiyama *et al.* 2015). They particularly led three years of monitoring of the pale grass blue butterfly *in situ* (Hiyama *et al.* 2015). Authors observed increased abnormality rates (ARs) in the butterfly populations (adults and offspring) exposed to ionising radiations (IR) between springs 2011 to 2012, followed by a return to normal ARs since fall 2012. These authors assumed that the observed biological responses might be explained by epigenetic modifications. Additional deleterious impacts

induced by FDNPP radioactive fallout were reported by Møller and Mousseau team on the abundance of several bird species which was associated with the radiation contamination level (Møller *et al.* 2015a; Møller *et al.* 2015b). Indeed, a negative correlation was observed between bird species' abundance and the ambient level of radiation, correlation even greater than in the Chernobyl exclusion zone (CEZ). The studies led in Fukushima appear to lack of molecular approach that could bring insights on the link between these physiological effects observed and the level of exposure to ionising radiation, and particularly, the genetic damage and epigenetic modifications as pointed out by Hiyama and collaborators. Among epigenetic modifications, the DNA methylation is a mechanism which has been well studied (Bird 1992). It is involved in the regulation of many biological functions such as the regulation of gene expression (Attwood *et al.* 2002; Guo 2011), the chromosomal stability (Robertson and Jones 2000), and might allow organisms to cope with environmental stress (Rando and Verstrepen 2007). In a context of gamma irradiation, it has already been supposed to play a role in the stability of the DNA molecule (Kovalchuk *et al.* 2003; Kovalchuk *et al.* 2004) as well as in DNA repair mechanisms of radiation-induced damage (Pogribny *et al.* 2004). Thus, in organisms chronically exposed to the FDNPP releases, genomic DNA might undergo variations in DNA methylation levels, that could depend on the level of exposure.



Additionally, in the CEZ, several studies have focused on the biological effects associated with radiation exposure, and particularly on the molecular impacts associated with the genetic material (Savchenko 1995; Ellegren *et al.* 1997; Pomerantseva *et al.* 1997; Ryabokon and Goncharova 2006; Bonisoli-Alquati *et al.* 2010). The authors pointed out significant radio-induced effects from chromosomal aberration to mutation events at microsatellite loci in the germline. Particularly, a study led on the bank vole, a small endemic mammal, highlighted deleterious effects of radiations over 22 generations (10 years following the accident) chronically exposed to low doses, with increased chromosome abnormalities and embryonic lethality despite a huge decrease in the exposure levels of radiations over the past years (Ryabokon and Goncharova 2006). These data, together with the positive relation identified between damage to the DNA molecule and chronic ionising radiation exposure (Møller and Mousseau 2015c), strengthen the hypothesis that genetic damage might be observed in vertebrate organisms chronically exposed to the FDNPP releases.

Thus, evidencing the lack of knowledge on impacts at the molecular levels associated with a long-term exposure *in situ* in the Fukushima Daiichi contaminated area (Garnier-Laplace *et al.* 2011), we address in the present study the effects of chronic exposure to IR on molecular marks: the epigenetic modifications, through the quantification of the genomic DNA methylation level, and genetic damage by means of the analysis of the mitochondrial (Mt)

DNA integrity, in an endemic amphibian sampled in the Fukushima Daiichi contaminated areas: the Japanese tree frog (*Hyla japonica*).

Thus, we hypothesize that a chronic low dose exposure to gamma radiations might be correlated to variations of DNA methylation patterns and significant damage to the mitochondrion DNA which might highlight deleterious effects on the genetic material of exposed individuals. To answer this question, both parameters were measured in a somatic organ of the Japanese tree frog: the tibia muscle, an organ composed by well differentiated cells (supposed to have a stable level of DNA methylation) and presenting a high abundance of mitochondrion (due to its function in the locomotion consuming energy produced through mitochondrial respiration). As such, this study aims at investigating the relationship between these biological responses and the total dose absorbed by these chronically exposed individuals.

## MATERIALS AND METHODS

**In situ samplings.** The *in situ* sampling campaign was carried out during *Hyla japonica* breeding season. Six sites were studied (see Figure S1), three considered as control sites with a low background level of radioactivity (C1, C2 and C3), and three contaminated sites with

increasing background level of radioactivity (R1, R2 and R3). Among these sites, 160 calling male frogs were sampled. In this study, we only focused on four sites: one control site (the C2 site, Figure S1) and three contaminated sites (the R1, R2 and R3 sites, Figure S1). The biological responses (DNA methylation and Mt DNA damages) were studied in 10 frogs per site. Frogs were selected based on the total individual dose rate (TIDR) absorbed by each frog during the breeding period, as such we obtained four groups of frogs: C2, R1, R2 and R3, presenting homogenous and increasing average TIDRs (Table 1).

The procedure used to capture frogs as well as the protocol applied to determine radionuclide concentrations are provided in the supporting information section.

**Estimation of the TIDR absorbed by the frogs.** We combined radionuclide activity concentrations measured in collected samples (i.e., frog carcass, water, soil and sediment samples, expressed in Bq per unit of mass) and Dose Conversion Coefficients (DCCs, expressed in  $\mu\text{Gy/h}$  per Bq per unit of mass) to estimate the TIDR absorbed by each frog during the breeding period. DCCs were calculated both for internal and external exposure using the EDEN v3 software (complete protocol provided in supporting information), considering shapes, and elementary compositions of the organism (here, an individual frog)

and of the environmental radiation sources (here, water, soil and sediment), for a given radionuclide ( $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ) (see more details in supporting information). Individual weighted TIDR measured in frogs are given in Table S1, and average TIDR per site in the Table 1.

**Genomic DNA extraction.** Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Les Ulis, France), according to the manufacturer's protocol, from the tibia muscle of frogs. The tissue was collected *in situ*, quick frozen, and kept to  $-20^{\circ}\text{C}$  until the transport in France where they were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until extraction. Following extraction, 1  $\mu\text{L}$  of sample was used to determine DNA concentration using the NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

**Measurement of DNA methylation using MS-AFLP.** This method is based on the digestion of genomic DNA with the restriction enzymes *EcoRI/MspI* and *EcoRI/HpaII*. Both *MspI* and *HpaII* share the same cleavage site 5'-CCGG-3', but *HpaII* cleavage activity is inhibited when the inner cytosine of the cleavage site is methylated. (Fulnecek and Kovarik 2014) This method is a site-specific approach that provides interesting data on the level of methylation measured at an enzymatic restriction site. MS-AFLP was performed as described in the literature (Xu *et al.* 2000), with minor modifications (provided in supporting

information). The results obtained are presented in Figure 2 and correspond to the average methylation levels at the *HpaII* cleavage site obtained under the three selective PCR conditions (the corresponding raw data are given in Table S3).

**Genome-wide DNA methylation measured with HPLC–MS/MS.** Complementary to the site-specific approach, the analysis of the abundance of methylated cytosines provides results at the genome scale. The 2'-deoxycytosine (dC), 5-methyl-2'-deoxycytosine (5-mdC), and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytosine (5-hmdC) nucleosides were detected and quantified with MS in the positive ionization mode using the so-called multiple reaction monitoring mode (mrm) with transitions  $m/z = 228 \rightarrow m/z = 112$ ,  $m/z = 242 \rightarrow m/z = 126$ , and  $m/z = 258 \rightarrow m/z = 142$ , respectively (Pereira *et al.* 2014). These measurements were made with a TSQ Quantum Ultra electrospray ionization tandem mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Illkirch, France). The conditions for DNA digestion were similar to those described previously (Ravanat *et al.* 2002) and provided in supporting information. The results, expressed as the percentage of 5-mdC relative to dC, and the percentage of 5-hmdC relative to 5-mdC, are presented in the Figure 3. The extended protocol and the raw data (Table S4) are given in the supporting information.

**Assessment of the mitochondrial DNA damage.** The method used to assess the damage to the mitochondrial (Mt) DNA has been described in the literature (Santos *et al.* 2006; Hunter *et al.* 2010). The principle of this method is to assess the Mt DNA damage based on the efficiency of PCR product synthesis of two fragments: (i) a long fragment sizing 10.7 kb, called mitochondrial long fragment (MiLF); (ii) a short fragment sizing 180 bp, called mitochondrial short fragment (MiSF, comprised in the sequence of the MiLF, see Figure S3 in supporting information). Briefly, two sets of PCRs are run on the same DNA sample obtained from the tibia muscle. The first PCR targets the MiLF, and the second the MiSF. Following PCRs, samples are diluted and incubated with a solution of Picogreen® (Life Technologies, Saint Aubin, France) to allow the quantification of the PCRs efficiency by fluorescence. The comparison of the fluorescence measured following the two sets of PCRs and among the conditions as compared to the control group enable the computation and the normalization of the average number of lesions in the MiLF over 10.7 kb. The complete protocol and the raw data (Table S6 and Excel sheet corresponding to the fluorescence measures over the three independent PCRs realized for each fragment) are given in supporting information.

**Statistical analyses.** All statistical analyses were performed using 10 biological replicates per condition. The software R (3.0.2 version) was used for all statistical analyses. First, the

normality and homogeneity of the variance were tested using the Shapiro–Wilks test and Levene test ( $\alpha = 0.05$ ), respectively. Normality and homoscedasticity were confirmed, and followed by one-way ANOVA and Tukey’s test performed to test whether DNA methylation or Mt DNA damage were dependent on the TIDR received by frogs ( $\alpha = 0.05$ ). Then, a Pearson correlation matrix was established to deeper explore the relationships (positive or negative) between the TIDR and the biological effects studied (Figure 5).

## RESULTS

**The internal DR mainly contributes to the TIDR received by frogs.** The internal, external and average TIDRs are presented in the Figure 1 and the Table 1. Statistically significant TIDRs were observed between sites C2, R1, R2 and R3 (2.31, 10.6, 22.3, and 46.2  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  respectively). The internal DR received by frogs contributes to at least 90 % of the average TIDR received by frogs (93.9, 95.5, 98.7 and 98.5 % respectively in the C2, R1, R2 and R3 group). In comparison, the contribution of the external DR appears to be much less important and almost negligible as compared to the internal DR received by frogs (0.12, 0.54, 0.34 and 0.74  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  versus 2.31, 10.6, 22.3, and 46.2  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  respectively in the C2, R1, R2 and R3 group, Table 1).

**Methylation patterns at HpaII cleavage sites.** Levels of methylation measured at *HpaII* cleavage site are presented in Figure 2. No significant variation was observed among the sampled sites. However, a trend to a decrease in the methylation level at *HpaII* cleavage site was observed with increasing DRs (53.7% in the C2 site and 39.7, 44.5, 28.4% in the R1, R2 and R3 site respectively, Table S3).

**Dose-dependent hypermethylation of the tibia muscle genomic DNA.** The results obtained using the HPLC-MS/MS method are presented in Figure 3. The level of 5-mdC measured in frogs from the R1, R2 and R3 sites were significantly 26, 27 and 31% higher than those measured in the C2 site (23.2, 23.4 and 24.2% respectively versus 18.4% in the C2 group, Table S4). This increase was almost dose-dependent since the levels measured in frogs from intermediate contaminated sites (R1 and R2) were significantly higher than those in C2 site, and lower than those in the R3 site (Figure 3).

We also measured the abundance of the 5-hmdC. Results obtained revealed that levels in contaminated sites were significantly higher than those measured in the C2 site, with almost 90% higher abundance of 5-hmdC in the R1, R2 and R3 sites (1.77, 1.78 and 1.75% respectively versus 0.94% in the C2 group, Table S4).



Finally, we observed a positive correlation between the TIDRs measured in frogs and the results obtained using HPLC-MS/MS method, suggesting increasing level of methylated cytosines with higher TIDR measured (Figure 5).

**Mt DNA damage assessment by quantitative PCR.** The measures of the average number of lesions in the MiLF are presented in Figure 4. First, we observed that in the C2 group, the background average number of lesions in the MiLF is 0.5. The results obtained in the R1, R2 and R3 groups revealed that the average number of lesions is greater than levels in the C2 group (3.5, 3.7 and 4.2 fold higher respectively, Table S6). Moreover, a significant positive correlation was found between increasing TIDRs in frogs and the increased of MiLF damage (Figure 5).

## DISCUSSION

**Caesium activity levels: the internal dose explains the biological effects.** This study is the first report to provide accurate data on the dose rate measured in a terrestrial vertebrate model exposed *in situ* following the FDNPP accident ; until now, only the radiocaesium activity was investigated (Matsushima *et al.* 2015). We identified the contribution of both the

internal (which is the combination of gamma and weighted beta caesium activities) and the external radioactivity levels in the total dose absorbed by organisms. We found the former to be responsible for at least 95% of the total dose in contaminated sites (Figure 1 and Table 1). This is an important finding since most of the studies carried out in both the Chernobyl and Fukushima area analysed the biological effects in relation to ambient measured DR (Pomerantseva *et al.* 1997; Wickliffe *et al.* 2003; Hiyama *et al.* 2012; Hiyama *et al.* 2013; Iwata *et al.* 2013; Nohara *et al.* 2014; Taira *et al.* 2014; Hiyama *et al.* 2015; Møller *et al.* 2015a; Møller *et al.* 2015b), and do not consider the internal radiation exposure, which might reflect the greater part of the radiation dose absorbed by animals. Thereby, assessing both internal and external exposure levels enables: (i) to reconstruct a relevant estimation of the total radiation dose absorbed by organisms, as well as (ii) to realize a robust and realistic exploration of the radiation dose-biological effect relationships in chronically *in situ* exposed animals.

**Radio-induced DNA methylation patterns.** The quantification of the total methylated cytosines content highlights an almost dose-dependent increase with increasing average TIDR measured in frogs (Figure 3), positive correlation which was also found in the Pearson correlation matrix (Figure 5). One hypothesis to explain these variations of DNA methylation

might involve damage to the genomic DNA. Indeed, the appearance of DNA damage following IR exposure is a well-established phenomenon, and particularly through water radiolysis and enhancement of reactive oxygen species production (Spitz *et al.* 2004; Douki *et al.* 2006). Furthermore, the increase of DNA damage might be linked with higher levels of DNA methylation since the latter is known to be involved in increasing the genomic stability (O'Hagan 2014) and has already been evidenced to increase in a similar context of IR exposure (Kovalchuk *et al.* 2003; Kovalchuk *et al.* 2004).

Furthermore, we assessed the level of hydroxymethylated cytosines. The data reveals that the level of 5-hmC follows the same dynamic as 5-mC, with a positive correlation between increasing TIDR and 5-hmC genomic content (Figure 5). Little is known about the function of this oxidized form of 5-mC except its putative role in gene expression through DNA demethylation (Tollervey and Lunyak 2012), as well as in DNA repair mechanism (Niehrs and Schäfer 2012). Additionally, we measured the methylation level at *HpaII* cleavage site. No significant effects were observed, but a trend to decreased methylation level with increasing average TIDR. Similar results have been observed in mice chronically exposed to IR (Kovalchuk *et al.* 2004; Pogribny *et al.* 2004), and might be associated with increased genomic instability. Together, these data on global 5-mC, 5-hmC and the site-specific

approach appear to be complementary, as it has already been described (Alonso *et al.* 2015), and might indicate increasing DNA damage with the exposure level.

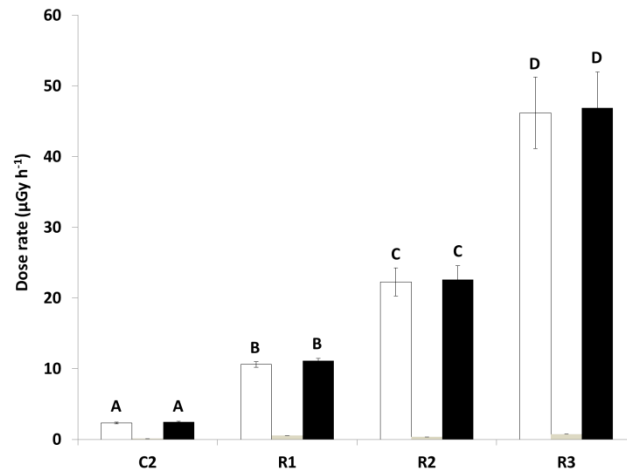
**The analysis of Mt DNA integrity demonstrates damaged genetic material.** The method used to assess Mt DNA damage provides the average number of lesions in a 10.7 kbp fragment contained in the 19.5 kbp of *Hyla japonica* Mt DNA. The Figure S3 (presented in supporting information) provides genes coded by this 10.7 kbp fragment. These genes are involved in mitochondrion function, as cellular respiration (e.g. *nd1-4l*, *cox1-3*, *atp6*, *8*) and protein synthesis (e.g. several tRNAs). Moreover, unlike genomic DNA, in the mitochondrial DNA very few sequences do not code for genes, as only 38/10 712 bp are not included in gene sequences. Thus, as the basal probability that a lesion occurs in coding sequences is high, we can assume that the increased average number of lesions with increasing TIDR measured might be related to damage in coding sequences, and could alter mitochondrial functions. The results presented herein corroborate with the data obtained on earthworms collected in low or highly contaminated area in the Fukushima prefecture (Fujita *et al.* 2014), and with the data obtained on vertebrates under similar chronic exposure to low DRs in the Chernobyl area, particularly regarding the increased level of damage to genetic material

(Savchenko 1995; Ellegren *et al.* 1997; Pomerantseva *et al.* 1997; Ryabokon and Goncharova 2006; Bonisoli-Alquati *et al.* 2010).

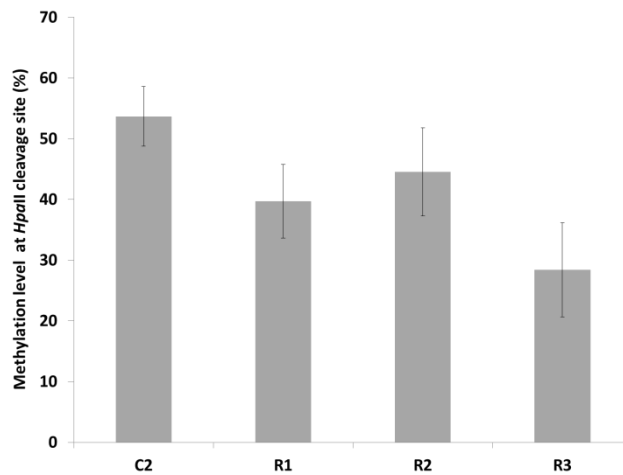
**Comparison to international protection benchmarks for non-human biota.** For decades, the evaluation of effects induced by chronic exposure to low doses of radioactivity on organisms exposed in their living habitats has been a great challenge, leading to the proposal of protection benchmarks for non-human biota. Indeed, in the early 90's, the NCRP (NCRP 1990), US DOE (Energy 1990) and IAEA (IAEA 1992) considered 400  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  as a relevant guideline to protect freshwater organisms, as well as 40  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  for terrestrial organisms proposed by the latter agency. In 2003, within the European FASSET project (Larsson 2004), these values were reconsidered to 100  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  for both freshwater and terrestrial organisms, and even decreased to 10  $\mu\text{Gy h}^{-1}$  within the Erica project (Garnier-Laplace *et al.* 2006), which is until now the most protective benchmark. This value was derived from data obtained following chronic exposure to external sources of gamma/X-ray emitters on several species, gathering using a species-sensitivity approach the  $\text{EC}_{10}$  values on population-relevant endpoints (e.g. morbidity, mortality and reproduction). However, as concluded in the deliverable (Beresford *et al.* 2007), this dataset lacks of “ecologically relevant data”. This is strengthened by the results presented by Garnier-Laplace and

collaborators (Garnier-Laplace *et al.* 2013), which suggest that animals chronically exposed in their natural environment appeared to be more sensitive to radiation than those exposed to gamma external radiation in controlled experiment. There is a huge lack of data concerning internal radiation exposure, which can, as presented in our study, contribute to at least 95% of the TIDR measured in *in situ* exposed organisms. In our study, this internal DR was mainly due to caesium activity, and particularly its beta emitter activity. To take into account the different relative biological effectiveness (RBE) of beta versus gamma radiation, the calculated DRs were weighted using a weighting factor of 3 (higher risk when organisms are internally exposed to beta particles) (Beresford *et al.* 2007). The resulting average weighted TIDRs calculated at site R1 were of  $11.1 \mu\text{Gy h}^{-1}$ , just over the  $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$  benchmark, and induced significant genomic DNA hypermethylation (26% higher than controls, Figure 3), and damage to Mt DNA (3.5-fold higher than control group, Figure 4). Both of these markers might indicate altered genetic material as genomic DNA instability, which means potential mutation insertion and a transfer over the generations that could impact the population level. In this context, the benchmark calculation for non-human biota protection should consider molecular impacts and not only population-relevant endpoints. Finally, it highlights the need to get further data on: (i) robust dose calculation in organisms exposed in their living habitats, and (ii) biological effects in organisms exposed *in situ* to ionising radiation.

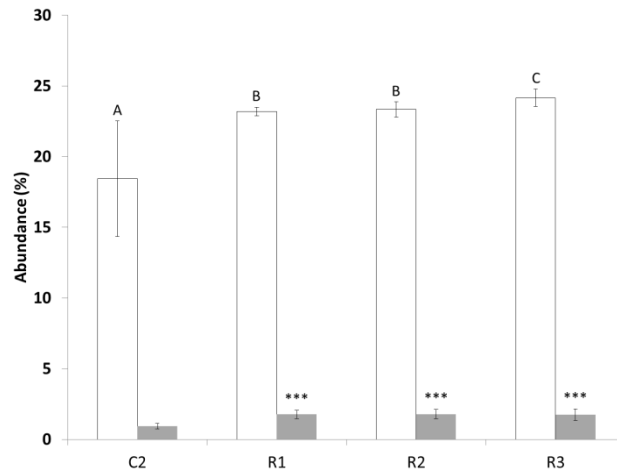
## Figure captions



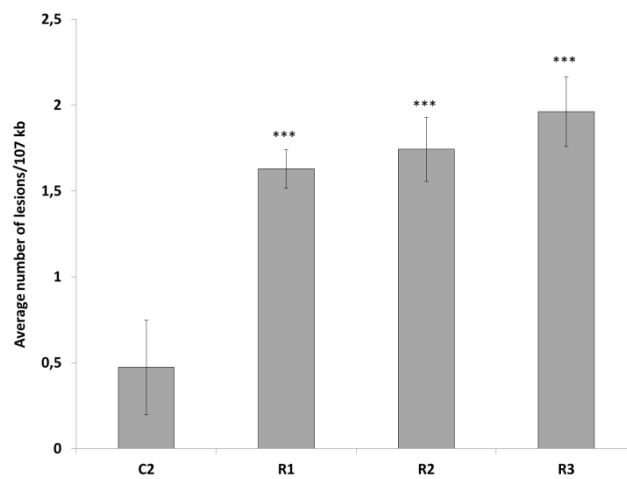
**Figure 1.** Internal (white bar), external (grey bar) and total (black bars) dose rate measured in frogs from the C2, R1, R2 and R3 sites (Mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ). The letters represent statistically different levels between each group of frogs.



**Figure 2.** Percentage of methylation at *HpaII* cleavage sites assessed with MS-AFLP (Mean  $\pm$  SEM,  $n = 30$ ) in the genomic DNA of the tibia muscle of frogs sampled in four sites surrounding Fukushima Daiichi nuclear power plant.



**Figure 3.** Abundance of 5-mdC relative to dC (white bars) and 5-hmdC relative to 5-mdC (grey bars) assessed with HPLC–MS/MS (Mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ) in the genomic DNA of the tibia muscle of frogs sampled in four sites surrounding Fukushima Daiichi nuclear power plant. The letters represent statistical differences between groups ( $p < 0.05$ ). \*Significantly different from the C2 group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).



**Figure 4.** Average number of lesions in the MiLF (grey bars) assessed with the quantitative PCR method (Mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ ). The average number of lesions was calculated from three independent PCRs. \*Significantly different from the C2 group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

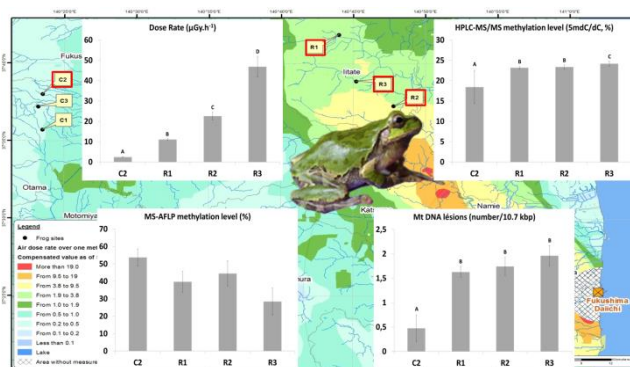


TIDR		0.0008	0.0042	0.0038
	AFLP		0.0345	0.0345
0.53		HPLC.mC	0.000	0.000
0.47	0.39	0.62	HPLC.hmC	0.0003
0.47	0.35	0.83	0.56	Mt DNA

**Figure 5.** Pearson matrix correlation built on individual observation. “TIDR” = Total Individual Dose Rate; “AFLP” = MS-AFLP levels; “HPLC.mC” = individual 5-mC levels; “HPLC.hmC” = individual 5-hmC levels. The down left part of the Pearson matrix provides correlation coefficient (blue = positive correlation) and the top right part of the Pearson matrix provides the *p* value associated with the test ( $\alpha = 0.05$ ).

**Table 1.** Mean of the total radioactivity, internal, external and TIDR measured in the frogs sampled in the sites selected in our study (Mean  $\pm$  SD, n = 10).

Site	Total radioactivity (Bq g <sup>-1</sup> )	Weighted DRs		
		Internal DR ( $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> )	External DR ( $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> )	TIDR ( $\mu$ Gy h <sup>-1</sup> )
C2	7.1 $\pm$ 0.3	2.31 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.00	2.46 $\pm$ 0.12
R1	30.3 $\pm$ 0.4	10.6 $\pm$ 0.39	0.54 $\pm$ 0.00	11.1 $\pm$ 0.38
R2	63.8 $\pm$ 5.6	22.3 $\pm$ 1.98	0.34 $\pm$ 0.00	22.6 $\pm$ 1.98
R3	127.5 $\pm$ 13.7	46.2 $\pm$ 5.07	0.74 $\pm$ 0.00	46.9 $\pm$ 5.07



**Graphical abstract**

## ASSOCIATED CONTENT

**Supporting information.** The protocols used to capture frogs and determine radionuclides concentrations, to calculate the DCCs and TIDRs, and the MS-AFLP and HPLC-MS/MS and Mt DNA damage methods are provided in supporting information. Raw data corresponding to individual internal, external and total DRs, MS-AFLP, HPLC-MS/MS and Mt DNA damage are also provided in supplementary information. This material is free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: 33442199401

Email: [christelle.adam-guillermin@irsn.fr](mailto:christelle.adam-guillermin@irsn.fr)

### Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. § These authors contributed equally.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the European project COMET (7<sup>th</sup> PCRD EURATOM, contract number: Fission-2012-3.4.1-604794), the French Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, and the French “NEEDS Environment” As-Hyla project. Many thanks to D. Orjollet for gamma-germanium measurements, K. Beaugelin-Seiller for dose calculation and to J.-M. Métivier for providing the study map.

## REFERENCES

1. Aliyu, A. S.; Evangeliou, N.; Mousseau, T. A.; Wu, J.; Ramli, A. T., An overview of current knowledge concerning the health and environmental consequences of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (FDNPP) accident. *Environment International* 2015, 85, 213-228.
2. Garnier-Laplace, J.; Della-Vedova, C.; Gilbin, R.; Copplestone, D.; Hingston, J.; Ciffroy, P., First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. *Environmental science & technology* 2006, 40, (20), 6498-6505.
3. Hiyama, A.; Nohara, C.; Kinjo, S.; Taira, W.; Gima, S.; Tanahara, A.; Otaki, J. M., The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2012, 2, 570.
4. Hiyama, A.; Nohara, C.; Taira, W.; Kinjo, S.; Iwata, M.; Otaki, J. M., The Fukushima nuclear accident and the pale grass blue butterfly: evaluating biological effects of long-term low-dose exposures. *BMC Evol Biol* 2013, 13, (168), 1471-2148.
5. Hiyama, A.; Taira, W.; Nohara, C.; Iwasaki, M.; Kinjo, S.; Iwata, M.; Otaki, J. M., Spatiotemporal abnormality dynamics of the pale grass blue butterfly: three years

of monitoring (2011–2013) after the Fukushima nuclear accident. *BMC Evolutionary Biology* 2015, 15, (1), 15.

6. Iwata, M.; Hiyama, A.; Otaki, J. M., System-dependent regulations of colour-pattern development: a mutagenesis study of the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2013, 3, 2379.

7. Nohara, C.; Taira, W.; Hiyama, A.; Tanahara, A.; Takatsuji, T.; Otaki, J. M., Ingestion of radioactively contaminated diets for two generations in the pale grass blue butterfly. *BMC Evolutionary Biology* 2014, 14, 193.

8. Taira, W.; Nohara, C.; Hiyama, A.; Otaki, J. M., Fukushima's biological impacts: the case of the pale grass blue butterfly. *J Hered* 2014, 105, (5), 710-22.

9. Møller, A. P.; Mousseau, T. A.; Nishiumi, I.; Ueda, K., Ecological differences in response of bird species to radioactivity from Chernobyl and Fukushima. *Journal of Ornithology* 2015a, 1-10.

10. Møller, A. P.; Nishiumi, I.; Mousseau, T. A., Cumulative effects of radioactivity from Fukushima on the abundance and biodiversity of birds. *Journal of Ornithology* 2015b, 1-9.

11. Bird, A. P., The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992, 70, 5-8.

12. Attwood, J. T.; Yung, R. L.; Richardson, B. C., DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, (2), 241-57.
13. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., Song, H., Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 2011, 145, (3), 423-34.
14. Robertson, K. D.; Jones, P. A., DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000, 21, (3), 461-7.
15. Rando, O. J.; Verstrepen, K. J., Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 2007, 128, (4), 655-68.
16. Kovalchuk, I.; Abramov, V.; Pogribny, I.; Kovalchuk, O., Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. *Plant physiology* 2004, 135, (1), 357-63.
17. Kovalchuk, O.; Burke, P.; Arkhipov, A.; Kuchma, N.; James, S. J.; Kovalchuk, I.; Pogribny, I., Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl--a mechanism for radiation adaptation? *Mutat Res* 2003, 529, (1-2), 13-20.

18. Pogribny, I.; Raiche, J.; Slovack, M.; Kovalchuk, O., Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320, (4), 1253-61.
19. Bonisoli-Alquati, A.; Voris, A.; Mousseau, T. A.; Møller, A. P.; Saino, N.; Wyatt, M. D., DNA damage in barn swallows (*Hirundo rustica*) from the Chernobyl region detected by use of the comet assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2010, 151, (3), 271-277.
20. Ellegren, H.; Lindgren, G.; Primmer, C. R.; Møller, A. P., Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature* 1997, 389, (6651), 593-596.
21. Pomerantseva, M. D.; Ramaiya, L. K.; Chekhovich, A. V., Genetic disorders in house mouse germ cells after the Chernobyl catastrophe. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1997, 381, (1), 97-103.
22. Ryabokon, N. I.; Goncharova, R. I., Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiation and environmental biophysics* 2006, 45, (3), 167-177.



23. Savchenko, V. K., The ecology of the Chernobyl catastrophe. Scientific outlines of an international programme of collaborative research. 1995.

24. Møller, A. P.; Mousseau, T. A., Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates. *Scientific Reports* 2015c, 5.

25. Garnier-Laplace, J.; Beaugelin-Seiller, K.; Hinton, T. G., Fukushima wildlife dose reconstruction signals ecological consequences. *Environ Sci Technol* 2011, 45, (12), 5077-8.

26. Fulnecek, J.; Kovarik, A., How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics* 2014, 15, (1), 2.

27. Xu, M.; Li, X.; Korban, S., AFLP-Based detection of DNA Methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2000, 18, 361-68.

28. Pereira, S.; Malard, V.; Ravanat, J. L.; Davin, A. H.; Armengaud, J.; Foray, N.; Adam-Guillermin, C., Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. *PLoS One* 2014, 9, (3), e92974.

29. Ravanat, J. L.; Douki, T.; Duez, P.; Gremaud, E.; Herbert, K.; Hofer, T.; Lasserre, L.; Saint-Pierre, C.; Favier, A.; Cadet, J., Cellular background level of 8-

oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 2002, 23, (11), 1911-8.

30. Hunter, S. E.; Jung, D.; Di Giulio, R. T.; Meyer, J. N., The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. *Methods* 2010, 51, (4), 444-51.

31. Santos, J. H.; Meyer, J.; Mandavilli, B. S.; Van Houten, B., Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. In *DNA Repair Protocols*, Henderson, D., Ed. Humana Press: 2006; Vol. 314, pp 183-199.

32. Wickliffe, J. K.; Rodgers, B. E.; Chesser, R. K.; Phillips, C. J.; Gaschak, S. P.; Baker, R. J., Mitochondrial DNA heteroplasmy in laboratory mice experimentally enclosed in the radioactive Chernobyl environment. *Radiation research* 2003, 159, (4), 458-464.

33. Douki, T.; Ravanat, J.-L.; Pouget, J.-P.; Testard, I.; Cadet, J., Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *International journal of radiation biology* 2006, 82, (2), 119-127.

34. Spitz, D. R.; Azzam, E. I.; Jian Li, J.; Gius, D., Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 2004, 23, (3), 311-322.
35. O'Hagan, H. M., Chromatin modifications during repair of environmental exposure-induced DNA damage: A potential mechanism for stable epigenetic alterations. *Environ. Mol. Mutagen.* 2014, 55, (3), 278-291.
36. Tollerverey, J. R.; Lunyak, V. V., Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 2012, 7, (8), 823-40.
37. Niehrs, C.; Schäfer, A., Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends in Cell Biology* 2012, 22, (4), 220-227.
38. Kovalchuk, O.; Burke, P.; Besplug, J.; Slovack, M.; Filkowski, J.; I., P., Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat Res* 2004, 548, (1-2), 75-84.
39. Alonso, C.; Perez, R.; Bazaga, P.; Medrano, M.; Herrera, C. M., MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Mol Ecol Resour* 2015, 6, (10), doi: 10.1111/1755-0998.12426. [Epub ahead of print].

40. Fujita, Y.; Yoshihara, Y.; Sato, I.; Sato, S., Environmental radioactivity damages the DNA of earthworms of Fukushima Prefecture, Japan. *Eur J Wildl Res* 2014, 60, (1), 145-148.

41. NCRP, Effects of Ionizing Radiation on Aquatic Organisms. (NCRP Report No.109). Washington DC: NCRP. 1990.

42. Energy, U. S. D. o., Radiation Protection of the Public and the Environment, as amended. (DOE Order 5400.5). Washington DC: United States Department of Energy. 1990.

43. IAEA, Effects of ionising radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards. Technical Reports Series No. 332. Vienna: International Atomic Energy Agency. 1992.

44. Larsson, C. M., The FASSET Framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems—an overview. *Journal of Radiological Protection* 2004, 24, (4A), A1.

45. Beresford, N.; Brown, J.; Copplestone, D.; Garnier-Laplace, J.; Howard, B.; Larsson, C.-M.; Oughton, D.; Prohl, G.; Zinger, I., D-ERICA: An integrated approach

to the assessment and management of environmental risk from ionising radiation.

Description of purpose, methodology and application. 2007.

46. Garnier-Laplace, J.; Geras'kin, S.; Della-Vedova, C.; Beaugelin-Seiller, K.; Hinton, T. G.; Real, A.; Oudalova, A., Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. *Journal of Environmental Radioactivity* 2013, 121, 12-21.



## Supporting Information

### Genome hypermethylation and mitochondrial DNA damage in Japanese tree frogs from Fukushima

Kewin Gombeau<sup>a</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>b</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>c,d</sup>, Thierry Lengagne<sup>e</sup>  
Jean-Marc Bonzom<sup>a</sup>, and Christelle Adam-Guillermin<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO,  
Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, INAC-SCIB, F-38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> CEA, INAC-SCIB Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, F-38000  
Grenoble, France

<sup>e</sup> Université de Lyon, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés,  
Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, 6 rue Raphaël Dubois, 69622, Villeurbanne, France

\* Address for Correspondence

Dr. Christelle Adam-Guillermin

IRS[N]/PRP-ENV/SERIS/LECO

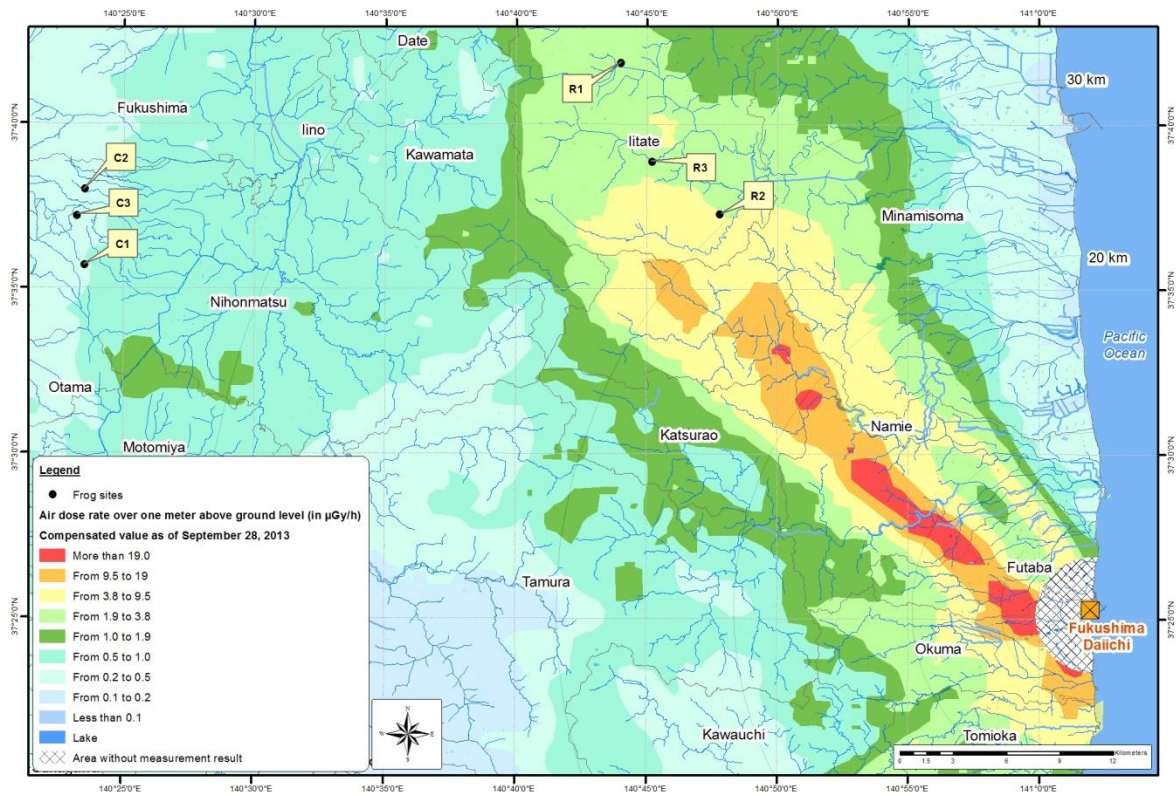
Centre de Cadarache - Bât 183 - BP3

13115 Saint Paul Lez-Durance

Phone : +334 42 19 94 01 - Fax : +334 42 19 91 51

E-mail: [christelle.adam-guillermin@irsn.fr](mailto:christelle.adam-guillermin@irsn.fr)

Number of pages: 18; Number of Figures: 2; number of Protocols: 5; number of Tables: 6



**Figure S1:** Map of background radiation ( $\mu\text{Gy/h}$ ) in the Fukushima area and location of the six sampling sites



### *Frog capture and radionuclide concentration determination*

Male frogs were captured during the night in flooded paddy fields surrounded by forest, and kept in individual boxes (diameter: 12 cm, height: 7 cm) with a perforated cover and 2 cm of water until the next morning when they were euthanized and dissected. The day of the capture, six samples of: (i) water (i.e. 10 ml collected at water depths of approximately 2 cm), (ii) soil (i.e. 0-5 layer depth in the forest) and (iii) sediment (i.e., 0-5 cm layer depth inside the paddy field) were collected. These samples were pooled to form one unique composite sample of water, soil and sediment, respectively, to determine the external dose rate for each study site.

Prior to radionuclide concentration calculation, all collected samples were weighted (Sartorius SE2, Göttingen, Germany). Frog carcass samples were dried at 60°C for 48h, then chemically digested with 2 mL HNO<sub>3</sub> 70 % at 150 °C for 48h followed by 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % at the same temperature for 24h until complete solubilization. This procedure was repeated until complete digestion of the samples. Then, samples were diluted in 20 mL of acidified water (2%, HNO<sub>3</sub> 70 %). Soil and sediment samples were also dried (60°C for 48h) and then transferred into a 60 mL plastic container. Water samples were directly transferred to 20 mL glass vessels with 2 mL of HNO<sub>3</sub> 70 %. Samples were then analyzed by gamma spectrometry, equipped with a high-purity germanium detector and a multi-channel analyzer (Type P germanium crystal 170 cm<sup>3</sup>, Eurisy-Mesure), to measure the concentration of gamma-emitting radionuclides. The germanium-detector was calibrated using several solid calibration standards of specific shape for each sample type. All samples were measured for a period ranging from 10 minutes to 64 hours, according to their estimated radionuclide concentrations. Cesium (<sup>134</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs) and <sup>110m</sup>Ag were the only radioelements detectable in

the samples.  $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$  concentrations were then summed to obtain the total radionuclide concentration.

### *Dose Conversion Coefficients (DCCs) and Dose Rate (DR) calculation*

The EDEN software (version 3) was used for all DCC calculation (Beaugelin-Seiller et al. 2006). The latter requires defining exposure scenario built on three elementary components: shapes, elementary composition and radionuclide composition of the organism and its environment. By convention, the shape of any organism is described by an ellipsoid defined by the length of its three axes, any other component being described by a semi-infinite layer. Any source of radiation, in internal as well as in external configuration, is considered homogeneous in all its characteristics, e.g. its biochemical composition, its density and its radionuclide concentrations.

The user has to specify the elementary composition of each scenario component (organism and other) selecting the contribution of each element to the total mass of the component, expressed in percentage, as well as the combinations of radionuclides to take into consideration, called sources.

In the present study, DCCs were determined considering the exposure condition scenario presented in Figure S2. Organisms considered are individual frog males during the breeding season and media are air, water, sediment, and soil. In each case, the male is defined as internal radiation source and media were used as external radiation sources. The ellipsoid shapes of the organisms were defined from their individual sizes, directly measured on each male. Here, we considered  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{110\text{m}}\text{Ag}$  as source since they were the only radionuclides detected with germanium- $\gamma$  spectrometry measurement; the radioactivity of the caesium daughter product (i.e., barium-137m) has been considered in the calculation of DCCs. Exposure condition scenario was thus specific to each considered paddy field and DCCs were specific to each male for each considered radionuclide. Internal and external

DCCs are presented in Table S2. To account for the relative biological effectiveness of the different types of radiation, weighting factors were applied (10 for  $\alpha$ -radiation, 3 for low- $\beta$  radiation ( $E < 10$  keV), and 1 for other  $\beta$ -radiation and  $\gamma$ -radiation) (Beresford et al. 2007).

Once DCCs were calculated, we converted radionuclide activity concentrations (Bq/g) into absorbed dose rates ( $\mu\text{Gy/h}$ ). We calculated internal, external and total dose rates for frog males as shown below:

$$\text{IDR}_{\text{int}} = \sum_{i=1}^n \text{DCC}_{\text{int}}(i) \cdot [\text{AC}(i)] \quad [\text{S1}]$$

$$\text{IDR}_{\text{ext}} = \left[ \sum_{i=1}^n T_{\text{water}} \cdot \text{DCC}_{\text{ext-water}}(i) \cdot \text{AC}_{\text{water}}(i) + T_{\text{soil}} \cdot \text{DCC}_{\text{ext-soil}}(i) \cdot \text{AC}_{\text{soil}}(i) + T_{\text{sed.}} \cdot \text{DCC}_{\text{ext-sed}}(i) \cdot \text{AC}_{\text{sed}}(i) + T_{\text{air}} \cdot \text{DCC}_{\text{ext-branch}}(i) \cdot \text{AC}_{\text{soil}}(i) \right] \quad [\text{S2}]$$

$$\text{TIDR}_{\text{tot}} = \text{IDR}_{\text{int}} + \text{IDR}_{\text{ext}} \quad [\text{S3}]$$

$\text{IDR}_{\text{int}}$  [ $\mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ ] total internal individual dose rate;

$\text{IDR}_{\text{ext}}$  [ $\mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ ] total external individual dose rate;

$\text{TIDR}_{\text{tot}}$  [ $\mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ ] total individual dose rate;

$i$  radionuclide index ( $^{137}\text{Cs}$ , including  $^{137\text{m}}\text{Ba}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{110\text{m}}\text{Ag}$ );

$\text{DCC}_{\text{int}}(i)$  [ $\mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$  per  $\text{Bq} \cdot \text{g}^{-1}$  wet weight] dose conversion coefficient for internal exposure to radionuclide  $i$ ;

$DCC_{ext}(i)$  [ $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  per  $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight] dose conversion coefficient for external exposure to radionuclide  $i$  in water ( $DCC_{ext\_water}$ ), in soil for the frog on soil ( $DCC_{ext\_soil}$ ) and on the branch ( $DCC_{ext\_branch}$ ) and in sediment ( $DCC_{ext\_sed}$ );

$T$  fraction of time spent in a given habitat ( $T_{water}$  : at the water surface,  $T_{soil}$  : on the bank,  $T_{sed}$  : at the sediment/water interface,  $T_{air}$ : on the branch), such as  $\Sigma T=1$

$AC(i)$  [ $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight] activity concentration of radionuclide  $i$  in frog;

$AC_{water}(i)$  [ $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  weight] activity concentration of radionuclide  $i$  in water;

$AC_{soil}(i)$  [ $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight] activity concentration of radionuclide  $i$  in soil;

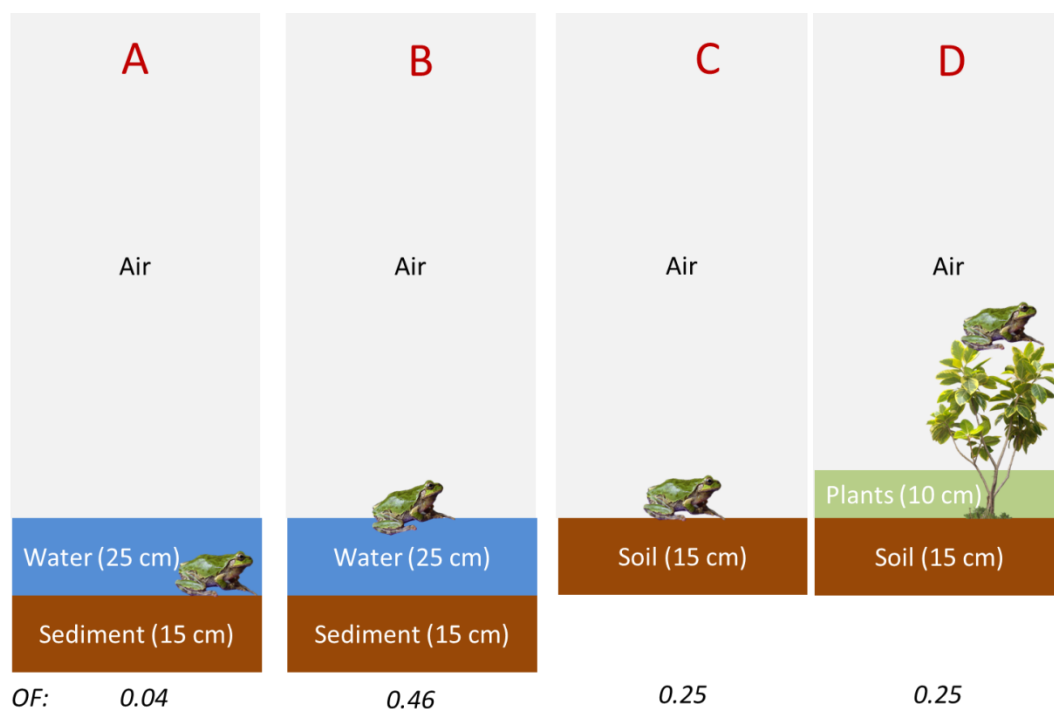
$AC_{sed}(i)$  [ $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight] activity concentration of radionuclide  $i$  in sediment;

## Reference

Beresford, N.A., Brown, J., Copplestone, D., Garnier-Laplace, J., Howard, B., Larsson, C.-M., Oughton, D., Pröhl, G., Zinger, I. (Eds.), 2007. D-ERICA: An Integrated Approach to the assessment and management of environmental risks from ionising radiation. Description of purpose, methodology and application. EC project contract no. FI6R-CT-2004-508847.

<https://wiki.ceh.ac.uk/download/attachments/115017395/D-Erica.pdf?version=1>

Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J and Gariel J-C 2006 Modelling the radiological dose in non-human species: principles, computerization and application *Health Physics* **90** 485-93



**Figure S2.** Exposure scenarios used to estimate the Dose Conversion Coefficients (DCCs) applied to each frog male during the breeding period to assess the total individual dose rate it received. Numbers in brackets indicate the thickness of the different habitats of the frog, OF (occupancy factor) below corresponds to the ratio of time that animal spent in each habitat, based on field observations (A) at the sediment-water interface; (B) at the water surface; (C) on soil ; (D) 50 cm above ground.

**Table S1.** Individual weighted dose rate (DR) measured in each frogs sampled in the sites selected in our study. DR were calculated based on the cumulated gama radioactivity measured for  $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$  radionuclides and the appropriate dose conversion coefficient using the Eden V3 software. N/D = The age of the frog could not be determined.

Site	Frog	Age (year)	Weighted		
			Internal DR ( $\mu\text{Gy h}^{-1}$ )	External DR ( $\mu\text{Gy h}^{-1}$ )	Total DR ( $\mu\text{Gy h}^{-1}$ )
C2	n°1	2	2.50	0.12	2.62
	n°2	2	2.46	0.12	2.58
	n°3	4	2.43	0.12	2.55
	n°4	3	2.36	0.12	2.48
	n°5	2	2.36	0.12	2.48
	n°6	3	2.36	0.12	2.48
	n°7	2	2.31	0.12	2.43
	n°8	4	2.31	0.12	2.43
	n°9	4	2.23	0.12	2.35
	n°10	4	2.10	0.12	2.22
R1	n°1	4	10.9	0.54	11.4
	n°2	4	10.9	0.54	11.4
	n°3	3	9.78	0.54	10.3
	n°4	2	10.8	0.54	11.3
	n°5	N/D	10.8	0.54	11.3
	n°6	2	10.8	0.54	11.3
	n°7	3	10.7	0.54	11.2
	n°8	N/D	10.6	0.54	11.1
	n°9	4	10.5	0.54	11.0
	n°10	N/D	9.99	0.54	10.5
R2	n°1	3	24.7	0.34	25.0
	n°2	2	24.6	0.34	24.9
	n°3	3	24.5	0.34	24.8
	n°4	3	23.4	0.34	23.7
	n°5	N/D	22.5	0.34	22.8
	n°6	3	21.7	0.34	22.0
	n°7	3	21.4	0.34	21.7
	n°8	3	20.4	0.34	20.7
	n°9	4	20.2	0.34	20.5
	n°10	3	19.3	0.34	19.6
R3	n°1	N/D	53.8	0.74	54.5
	n°2	4	50.0	0.74	50.7
	n°3	3	49.3	0.74	50.0
	n°4	3	49.2	0.74	49.9
	n°5	3	49.1	0.74	49.8
	n°6	2	47.6	0.74	48.3
	n°7	2	43.5	0.74	44.2
	n°8	N/D	41.7	0.74	42.4
	n°9	5	39.6	0.74	40.3
	n°10	4	38.5	0.74	39.2

### *MS-AFLP protocol*

Two sets of double digestion reactions containing 5 U of both *EcoRI* and *MspI* or 5 U of both *EcoRI* and *HpaII* were simultaneously incubated overnight at 37 °C using 250 ng of genomic DNA, and then denatured at 65 °C for 10 min. An overnight ligation step was then conducted on each reaction at 18 °C using 1 U of T4 DNA ligase, 5 pmol of the *EcoRI* adaptor, and 50 pmol of the *MspI/HpaII* adaptors. The ligated fragments were amplified with a preselective PCR using the following parameters: (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 35 cycles. The reaction mixture was diluted by a factor of 1.25, and 5 µL of this preselective PCR product was used as the template DNA for the three types of selective PCR, with specific sets of primers (Table S4). Each selective PCR contained 5 ng and 30 ng of the *EcoRI* (5'-HEX labeled) and *MspI/HpaII* primers, respectively, and was performed with the following parameters: (94 °C for 30 s, 65 °C (– 0.7 °C/cycle) for 1 min, 72 °C for 1 min) × 12 cycles, followed by (94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) × 23 cycles. The migration of the PCR products of the selective amplification was monitored on an ABI 3730 DNA Analyzer (Sanger sequencer) with the internal size marker, ROX 500 (Plateforme GeT-Purpan, Toulouse, France). The results were analyzed with the Peak Scanner™ Software v1.0 (ABI). For each sample, we noted the number of fragments in each digest and under each type of selective amplification, and calculated the demethylation ratio as the number of fragments ( $N$ ) obtained in the codigestion with *EcoRI* and *HpaII* ( $N_{HpaII}$ ) divided by the number obtained with *EcoRI* and *MspI* ( $N_{MspI}$ ). The methylation ratio was calculated with the following formula:  $(1 - [N_{HpaII}/N_{MspI}]) \times 100$ . All the adapter and primer sequences were provided by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and are shown in Table S3. The enzymes were provided by Promega (Charbonnières-les-Bains, France).



**Table S2.** Adapters and primer sequences used in MS-AFLP

---

<i>Eco</i> R I adapter F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>Eco</i> R I adapter R	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II adapter F	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
<i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II adapter R	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
<i>Eco</i> R I pre-selective primer	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II pre-selective primer	5'-GATGAGTCTAGAACGG-3'
<i>Eco</i> R I - HEX - AAG primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>Eco</i> R I - HEX - AAC primer	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II + TAG primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG-3'
<i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II + TAC primer	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAC-3'

---

**Table S3.** Methylation levels at *Hpa* II cleavage site in the genomic DNA extracted from the muscle of frogs sampled in the sites selected in our study. Results (mean  $\pm$  SEM) were obtained from 10 replicates per condition, each amplified under 3 different conditions such as *n* total = 30. Ratios correspond to the number of fragments in *Hpa* II condition divided by that in *Msp* I condition. Methylation levels were calculated using the following formula: (1-ratio) x 100.

	C2			R1			R2			R3		
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAG</b>												
Ratio	0.39	$\pm$	0.07	0.44	$\pm$	0.07	0.58	$\pm$	0.20	0.72	$\pm$	0.19
Methylation level (%)	61.2	$\pm$	7.04	55.7	$\pm$	7.29	42.3	$\pm$	19.6	28.3	$\pm$	18.9
<b><i>EcoRI</i>-AAG / <i>Msp</i> I-TAC</b>												
Ratio	0.46	$\pm$	0.09	0.85	$\pm$	0.09	0.48	$\pm$	0.11	0.77	$\pm$	0.16
Methylation level (%)	53.8	$\pm$	9.13	14.6	$\pm$	9.36	52.2	$\pm$	11.3	23.3	$\pm$	16.3
<b><i>EcoRI</i>-AAC / <i>Msp</i> I-TAG</b>												
Ratio	0.54	$\pm$	0.09	0.55	$\pm$	0.09	0.62	$\pm$	0.11	0.68	$\pm$	0.10
Methylation level (%)	46.1	$\pm$	9.32	45.2	$\pm$	8.82	38.3	$\pm$	11.0	32.1	$\pm$	10.3
<b>Total</b>												
Ratio	0.46	$\pm$	0.05	0.60	$\pm$	0.06	0.55	$\pm$	0.07	0.72	$\pm$	0.08
Methylation level (%)	53.7	$\pm$	4.89	39.7	$\pm$	6.05	44.5	$\pm$	7.27	28.4	$\pm$	7.73

### *HPLC-MS/MS protocol*

DNA samples were digested for 2 h at 37 °C with 5 U of nuclease P1 (Sigma Co., St Louis, MO, USA) together with 0.004 U of phosphodiesterase II (Sigma Co.). The samples were then treated with 0.003 U of phosphodiesterase I (Sigma Co.) and 5 U of alkaline phosphatase (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) for 2 h at 37 °C. The enzymes were neutralized by the addition of 10 µL of 0.1 M HCl and the samples were centrifuged for 5 min at  $5000 \times g$  before their analysis with HPLC–MS/MS. The hydrolyzed nucleosides were separated with HPLC using a linear gradient of acetonitrile in 2 mM ammonium formate, from 0% to 20% in 20 min, using an Uptisphere 3 µm (150 × 2 mm i.d.) octadecyl silyl silica gel column from Interchim (Montluçon, France) at a flow rate of  $200 \mu\text{l min}^{-1}$ . Under these conditions, dC, 5-mdC, and 5-hmdC were eluted at 7.6, 11.4, and 8.1 min, respectively. The eluates were quantified with external calibration.

**Table S4.** Individual measure by HPLC-MS/MS of the 5-mdC/dC (%) and 5-hmdC/5-mdC (%) content in each sample of genomic DNA extracted from the tibial muscle of frogs sampled in the selected sites in our study. Letters indicate significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). \*\*\*Significantly different from C2 group ( $p < 0.001$ ).

Site	Frog	5-mdC/dC (%)		5-hmdC/5-mdC (%)	
C2	n°1	11.8		0.69	
	n°2	18.7		0.77	
	n°3	19.8		1.17	
	n°4	23.9		1.25	
	n°5	21.7		0.93	
	n°6	21.0		0.95	
	n°7	14.3		0.65	
	n°8	18.5		0.82	
	n°9	13.1		1.02	
	n°10	21.7		1.11	
		Mean ± SD	18.4 ± 4.08	A	0.94 ± 0.20
R1	n°1	23.3		2.17	
	n°2	22.8		1.55	
	n°3	23.0		1.79	
	n°4	23.5		1.28	
	n°5	22.9		1.78	
	n°6	22.8		2.01	
	n°7	23.7		1.69	
	n°8	23.3		2.09	
	n°9	23.2		1.91	
	n°10	23.4		1.41	
		Mean ± SD	23.2 ± 0.30	B	1.77 ± 0.29
R2	n°1	23.2		1.12	
	n°2	22.7		2.34	
	n°3	23.6		1.84	
	n°4	23.0		1.77	
	n°5	22.7		1.99	
	n°6	23.1		1.94	
	n°7	23.2		2.02	
	n°8	24.0		1.64	
	n°9	24.2		1.73	
	n°10	23.8		1.45	
		Mean ± SD	23.4 ± 0.54	B	1.78 ± 0.33
R3	n°1	24.0		1.95	
	n°2	23.6		1.09	
	n°3	23.4		2.18	
	n°4	24.2		2.01	
	n°5	24.6		1.04	
	n°6	24.2		1.86	
	n°7	25.2		1.39	
	n°8	23.2		2.14	
	n°9	24.2		1.91	
	n°10	24.8		1.89	
		Mean ± SD	24.2 ± 0.63	C	1.75 ± 0.42

### *Quantitative PCR protocol to assess Mt DNA damage*

The principle of this method is to assess the Mt DNA damage based on the efficiency of PCR product synthesis of two fragments: (i) a long fragment sizing 10.7 kb, called mitochondrial long fragment (MiLF); (ii) a short fragment sizing 180 bp, called mitochondrial short fragment (MiSF), with its sequence included in the sequence of the MiLF.

The PCR reactions must be ran under two conditions: (i) The amount of DNA template must be identical in each MiSF or MiLF reactions, (ii) When PCR reactions are finished, DNA synthesis must be stopped in the exponential phase (each set of reactions must contain a 50% control, which will allow to verify that PCR reactions were stopped in the exponential phase of DNA synthesis). The MiLF PCR reactions were ran using the following proportion of reagents:

- 15 ng of template DNA (7,5 ng in the Control 50%)
- 1  $\mu$ L of the 5  $\mu$ M forward primer
- 1  $\mu$ L of the 5  $\mu$ M reverse primer
- 12.5  $\mu$ L of « LongAmp™ Taq 2X Master Mix » (NEB, Every, France)
- A volume of sterile water to reach 25  $\mu$ L

The PCR parameters were as follow: 94 °C 3min followed by 20×(94 °C 15sec, 68 °C 45sec and 65 °C 10min) followed by a final extension step at 65 °C during 10min.

Concerning the synthesis of the MiSF, the PCR reactions were ran as follow:

- 50 ng of template DNA (25 ng in the Control 50 %)

- 1  $\mu\text{L}$  of the 5  $\mu\text{M}$  forward primer
- 1  $\mu\text{L}$  of the 5  $\mu\text{M}$  reverse primer
- 1  $\mu\text{L}$  of a 10mM dNTP mix
- 1  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{MgCl}_2$
- 0.5  $\mu\text{L}$  « GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase » (Promega, France)
- 5  $\mu\text{L}$  of 5X buffer « GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase » (Promega, France). - A volume of sterile water to reach 25  $\mu\text{L}$

The PCR parameters were as follow: 94 °C 2min followed by 28×(94 °C 30sec, 55.2 °C 30sec and 72 °C 1min).

The PCR products were 1:10 diluted in sterile water. Five microliters of diluted PCR products were placed in duplicates in two wells of a 96-well fluorescence microplate (Microplaque Microfluor® 2 noire, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) containing 95  $\mu\text{L}$  of sterile water. A standard curve was prepared from a stock solution of lambda( $\lambda$ )-HindIII DNA fragments (0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), and 5  $\mu\text{L}$  were added in duplicates in the fluorescence microplate wells containing 95  $\mu\text{L}$  of sterile water.

A working solution of PicoGreen® (New England Biolabs, France) was prepared by adding 5  $\mu\text{L}$  of the stock solution to 1 mL of sterile water, and 100  $\mu\text{L}$  were added to each wells of the fluorescence microplate and incubated during 10min.

After the incubation step, the fluorescence was measured using the microplate fluorescence reader « Infinite® M1000 PRO » (Tecan, Lyon, France). The excitation was set

at 480nm with a 5nm bandwidth, and the emission detected at 526nm with a 10 nm bandwidth.

The primers were designed using the « Primer-BLAST » software based on the *Hyla japonica* mitochondrial sequence (NC\_010232.1), and are presented in the Table 4. The primers positions on the *Hyla japonica* mitochondrion sequence are given in the Scheme 1.

**Table S5.** Sequence of the primer used in the quantitative PCR assay.

Primer	Sequence (5' – 3')	Sequence covered
<i>MiLF forward</i>	ACCCCACATCGCCAGGGAAC TACG	From the 4 845 <sup>th</sup> bp to 15 556 <sup>th</sup> bp
<i>MiLF reverse</i>	AGTCATCAGGCGGCGGACAAGGG	
<i>MiSF forward</i>	CCTCAATGCAGCAGCCCCTT	From the 15 239 <sup>th</sup> bp to 15 418 <sup>th</sup> bp
<i>MiSF reverse</i>	ATTAGGGACCCGGCGATGCT	





**Table S6.** Average normalized number of lesions over the three PCR replicates targeting the long mitochondrial fragment (MiLF). Results are presented as Mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). \* Significant difference as compared to the data collected on the control site C2 (\*\* $p < 0.001$ ).

	C2			R1				R2				R3			
Number of lesions/107 kb	0.53	$\pm$	0.25	1.98	$\pm$	0.09	***	1.95	$\pm$	0.11	***	2.52	$\pm$	0.15	***





## 2. Principales conclusions

### 2.1. Prédominance de l'exposition interne et pondération de l'activité radiologique

Cette étude fournit une quantification précise de l'apport de l'exposition externe et interne dans la dose totale de radioactivité absorbée par des vertébrés exposés de manière chronique aux retombées de l'accident nucléaire de Fukushima Daiichi. Nous avons notamment identifié que l'exposition interne est responsable d'au moins 95% de la dose totale de radioactivité absorbée. Ce résultat est extrêmement intéressant puisque dans la plupart des études réalisées sur les sites contaminés de Tchernobyl et Fukushima, les résultats sont rapportés au débit de dose ambiant mesuré (Pomerantseva *et al.* 1997; Wickliffe *et al.* 2002; Hiyama *et al.* 2012; Hiyama *et al.* 2013; Iwata *et al.* 2013; Nohara *et al.* 2014; Taira *et al.* 2014; Hiyama *et al.* 2015; Møller *et al.* 2015a; Møller *et al.* 2015b), ce qui peut introduire un biais de taille dans l'estimation de la dose totale absorbée. Ainsi, expliciter la contribution de l'exposition externe et interne dans la dose totale absorbée permet : (i) de reconstruire une estimation pertinente de la dose totale réellement absorbée, (ii) de déterminer les seuils à partir desquels les effets sont observés, et de (iii) pouvoir établir une relation robuste entre les niveaux de dose absorbés et les effets biologiques observés.

### 2.2. Profils de méthylation radio-induits

L'analyse des niveaux de cytosines méthylées à l'échelle globale du génome entre chaque groupe a permis de mettre en évidence une augmentation, presque dose-dépendante, du niveau de méthylation relativement à la dose totale de radioactivité mesurée dans les grenouilles. Cela a également pu être mis en évidence dans la matrice de corrélation de Pearson qui révèle la présence d'une corrélation positive entre l'augmentation des effets sur la méthylation de l'ADN au regard du niveau de radioactivité total mesuré pour chaque grenouille. Une hypothèse expliquant ces résultats impliquerait le

niveau de dommages à l'ADN puisque : (i) la relation entre exposition aux radiations ionisantes et apparitions de dommages au matériel génétique est une relation établie, particulièrement par le biais de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène à travers le phénomène de radiolyse de l'eau (Spitz *et al.* 2004; Douki *et al.* 2006), (ii) la méthylation de l'ADN est un mécanisme ayant déjà été impliqué dans la stabilité chromosomique (O'Hagan 2014), et cela également lors d'expositions aux radiations ionisantes (Kovalchuk *et al.* 2003; Kovalchuk *et al.* 2004).

De plus, nous avons suivi le niveau de cytosines hydroxyméthylées (5-hmC), et les données obtenues révèlent une dynamique identique à celle des formes méthylées, avec une corrélation positive de l'augmentation du niveau de 5-hmC relativement au niveau croissant d'exposition. En revanche, peu de données sont disponibles sur les fonctions de ces formes hydroxyméthylées, si ce n'est un rôle dans la régulation de l'expression des gènes (Tollervey and Lunyak 2012) ainsi que dans certains mécanismes de réparation de l'ADN (Niehrs and Schäfer 2012). Enfin, nous avons suivi le niveau de méthylation au site de coupure de l'enzyme *HpaII*. Aucun effet significatif n'a pu être observé, cependant, les données présentent une forte tendance à la diminution du niveau de sites méthylés avec l'augmentation du niveau d'exposition radiologique. Des résultats similaires ont été observés lors d'exposition aux radiations ionisantes et pourraient être associés à l'augmentation de l'instabilité génomique (Kovalchuk *et al.* 2004; Pogribny *et al.* 2004).

En conclusion, les données présentées sur l'utilisation des deux techniques développées au laboratoire pour quantifier les niveaux de méthylation de l'ADN génomique fournissent des résultats concluants. Les variations observées sont complémentaires, et semblent mettre en évidence que ces variations dans les profils de méthylation soient liées à une augmentation des dommages à l'ADN génomique avec une exposition croissante à la radioactivité.

### 2.3.L'ADN mitochondrial témoigne des atteintes au matériel génétique

La technique utilisée dans cette étude permet de quantifier le nombre moyen de lésions sur un fragment d'ADN mitochondrial mesurant 10,7 kpb (le génome mitochondrial

complet mesurant 19,5 kpb). Ce fragment code pour de nombreux gènes impliqués dans la fonction mitochondriale de production d'énergie (e.g. *nd1-4l*, *cox1-3*, *atp6-8*) ainsi que dans la synthèse protéique (e.g. de nombreux ARNs de transfert). A l'inverse du génome nucléaire, il y a très peu de paires de bases non-codantes dans l'ADN mitochondrial, avec uniquement 38/10 712 pb non codantes dans le MiLF. Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence l'augmentation du nombre de dommages moyens au MiLF, également positivement corrélé avec le niveau d'exposition. Ainsi, il est facilement imaginable que ces atteintes touchent des séquences codantes, et que la fonction mitochondriale soit impactée.

Enfin, les données présentées suite à cette analyse corroborent bien les résultats obtenus sur les sites de Tchernobyl, et plus particulièrement l'association de l'exposition chronique à de faibles niveaux de radioactivité avec l'apparition de dommages au matériel génétique (Savchenko 1995; Ellegren *et al.* 1997; Pomerantseva *et al.* 1997; Ryabokon and Goncharova 2006).

### 2.4. Extrapolation des seuils de protection au regard de la réalité du terrain

Depuis plusieurs années, la caractérisation des effets biologiques associés à l'exposition chronique aux faibles niveaux de substances radioactives est devenue un véritable challenge, conduisant notamment à l'établissement de seuils protecteurs pour les écosystèmes. En effet, au début des années 90, la NCRP (NCRP 1990), la US DOE (Energy 1990) ainsi que l'IAEA (IAEA 1992) ont considéré un débit de dose de  $400 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  comme protecteur pour les organismes d'eau douce, et de  $40 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  (IAEA) pour les organismes terrestres. En Europe, le projet européen FASSET (Larsson 2004) a permis d'établir la valeur de  $100 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  comme étant protectrice pour les organismes d'eau douce et terrestres, valeur ayant même été revue à la baisse depuis 2007 avec le projet Erica (Beresford *et al.* 2007) qui a permis de diminuer le niveau seuil à  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , à l'heure actuelle la valeur la plus protectrice pour les écosystèmes.

Cette valeur est dérivée de données obtenues en laboratoire suite à l'exposition chronique à des sources externes de rayonnements gamma et de rayon X chez plusieurs

espèces, à l'aide d'une approche de distribution de la sensibilité des espèces basée sur les  $EC_{10}$  calculées sur plusieurs paramètres biologiques pertinents à l'échelle des populations (e.g. morbidité, mortalité et reproduction). Cependant, comme cela est conclu dans cet article (Beresford *et al.* 2007), il y a un manque de données pertinentes d'un point de vue écologique, et particulièrement, concernant les contextes d'exposition aux radioéléments *in situ*. Cela a notamment été mis en évidence par Garnier-Laplace et ses collaborateurs (2013), à partir des données présentes dans la littérature. En effet, ces auteurs ont déterminé que certaines espèces ont une plus grande sensibilité aux rayonnements ionisants lorsqu'elles sont exposées dans leur habitat naturel en comparaison à des organismes exposés dans des conditions expérimentales contrôlées.

Egalement, la part de l'exposition interne aux radionucléides dans la dose totale de radioactivité absorbée par les organismes peut être majoritaire. Ainsi, se référer uniquement au débit de dose ambiante mesurée afin d'interpréter les effets biologiques observés chez les organismes, peut induire un biais considérable dans la relation dose-effet observé. Dans notre étude, nous avons observé une part considérable de l'exposition interne dans la dose totale de radioactivité absorbée, notamment dû à la pondération de l'émission de particules beta par le  $^{137}\text{Cs}$ . En raison de la dangerosité accrue de ces particules beta, les niveaux de radioactivité mesurés sont pondérés d'un facteur trois pour prendre en compte la différence d'efficacité biologique relative (RBE) entre les rayonnements beta et gamma (Beresford *et al.* 2007). Le niveau moyen d'activité radiologique pondérée absorbée par les grenouilles du groupe R1 est de  $11,1 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , valeur à peine supérieure à la valeur protectrice de  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ . A ce niveau, nous avons observé une hyperméthylation significative de l'ADN génomique (26% d'augmentation relativement aux organismes témoins) ainsi qu'une augmentation du nombre moyen de lésions à l'ADN mitochondrial (supérieur d'un facteur 3,5). Ces deux marqueurs peuvent être associés à l'atteinte au matériel génétique, impliquant la possible apparition de mutations à l'ADN, un transfert au fil des générations et donc un possible impact à l'échelle des populations. Dans ce contexte, il semblerait que le calcul d'un benchmark pour la protection des espèces non-humaines exposées aux radiations ionisantes devrait prendre en compte des effets moléculaires pouvant se répercuter à l'échelle des populations.



## Chapitre 6. 2. Principales conclusions

En conclusion, ces résultats révèlent la nécessité d'acquérir de plus amples données sur : (i) la dose à laquelle sont exposés les organismes dans leur habitat naturel, ainsi que (ii) les effets biologiques chez les organismes exposés *in situ* aux radiations ionisantes.



---

---

## **Chapitre 7. Discussion générale et perspectives**

---



*Ce chapitre présente la synthèse des travaux réalisés, les avancées scientifiques qui en découlent et les perspectives de recherche à explorer.*



## **1. Synthèse des principales avancées scientifiques**

Ce travail de recherche repose sur l'évaluation de la variation du niveau de méthylation de l'ADN génomique chez deux modèles biologiques ayant été chroniquement exposés aux substances radioactives dans deux contextes différents, mais cependant représentatifs des problématiques majeures en radioécologie. Actuellement, très peu de résultats ont été publiés concernant la mise en place d'une réponse épigénétique dans un tel contexte d'exposition. De ce fait, les travaux présentés dans cette thèse constituent une avancée certaine dans l'amélioration de la caractérisation des réponses biologiques lors d'expositions chroniques à de faibles niveaux de substances radioactives, avancées résumées dans les parties suivantes.

### 1.1. Pertinence de la double approche par AFLP-MS et HPLC-MS/MS

Le choix des méthodes employées pour l'analyse des profils de méthylation suite à l'exposition chronique aux substances radioactives s'est orienté sur des méthodes d'analyse de la méthylation globale de l'ADN. En effet, l'étude « séquence spécifique » des marques de méthylation par l'utilisation de puces à ADN méthylé ou le recours à du séquençage après traitement au bisulfite, est extrêmement onéreux et sans garantie de succès.

Ainsi, le choix de méthodes adaptées à notre problématique a été effectué selon l'orientation suivante : dans le cadre du projet européen COMET, une des problématiques de recherche visait à développer des outils d'analyse des profils de méthylation qui puissent être appliqués à diverses espèces d'organismes exposées dans différents contextes et qui puissent être transposables du laboratoire au terrain. Il a donc fallu opter pour des techniques ne ciblant pas de séquences très étendues dans le génome et pouvant être appliquées chez des organismes dont le génome n'est pas encore séquencé, cependant nous permettant : (i) d'être relativement précis dans la nature des observations effectuées, point que nous pouvions obtenir avec l'approche « site-spécifique » par AFLP-MS, (ii) d'avoir une idée de la dynamique à l'échelle du génome entier, démontré avec succès par l'utilisation de l'HPLC-MS/MS. Afin de disposer d'une palette de réponses biologiques plus large, ces

techniques ont été associées à l'étude de marqueurs moléculaires différents tels que l'expression de gènes, ou l'apparition d'atteintes au matériel génétique.

Les variations des profils de méthylation de l'ADN génomique ont donc pu être étudiées chez les deux modèles biologiques exposés dans des contextes différents d'exposition aux substances radioactives en utilisant les mêmes méthodes d'analyses. L'utilisation conjointe de ces deux techniques a permis de mettre en avant l'apparition d'effets soit au niveau d'un site de coupure enzymatique et/ou soit à l'échelle du génome entier, témoignant de leur complémentarité dans la détection des variations survenant à ces faibles niveaux d'exposition. De ce fait, le choix de ces techniques d'analyse est donc une réussite et il permettra, dans le cadre du projet européen COMET, (i) d'obtenir des résultats comparables sur la sensibilité des variations dans les profils de méthylation de l'ADN génomique de différentes espèces d'organismes modèles exposées chroniquement à de faibles niveaux de substances radioactives (*Arabidopsis*, vers de terre), ainsi que (ii) de disposer de techniques d'analyses transposables du laboratoire au terrain, tant chez des organismes dont le génome est séquencé que chez ceux pour lesquels cette séquence est encore inconnue.

## 1.2.Sensibilité des profils de méthylation aux faibles niveaux de substances radioactives

Dans le domaine de la radioécologie, la caractérisation des réponses biologiques s'effectue à de faibles niveaux d'exposition aux substances radioactives qui sont représentatives des contextes de pollutions environnementales. Ainsi, au sein de chaque volet expérimental, la chimiotoxicité de l'uranium appauvri et la radiotoxicité des retombées de l'accident nucléaire de la centrale de Fukushima Daiichi, les deux modèles biologiques ont été exposés à des niveaux de substances radioactives faibles. Chez le poisson zèbre, une exposition chronique à hauteur de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (bruit de fond géochimique en Europe allant de  $0,2$  à  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ , (Garnier–Laplace *et al.* 2001)) a entraîné des effets significatifs sur les profils de méthylation, qui ont pu être notamment détectés dès 7 jours d'exposition. De la même manière, chez la grenouille arboricole Japonaise, l'exposition chronique à un débit de dose total de  $11,1 \mu\text{Gy.h}^{-1}$  (débit de dose protecteur pour les populations d'espèces non-



humaines estimé à  $10 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ , (Garnier-Laplace *et al.* 2006)) est également responsable de variations importantes dans les niveaux de méthylation de l'ADN génomique extrait du muscle.

Egalement, afin de déterminer l'amplitude des variations dans les profils de méthylation de l'ADN génomique, chaque volet expérimental comprenait plusieurs niveaux d'exposition aux différentes substances radioactives. Concernant l'uranium appauvri, nous avons également contaminé les poissons zèbre à hauteur de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ainsi que sélectionné des grenouilles ayant présenté une exposition à des débits de dose totaux plus importants ( $22,6$  et  $46,9 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  pour les sites R2 et R3 respectivement). Dans chacun des deux volets expérimentaux, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une modification des profils de méthylation de l'ADN génomique d'autant plus importante que les niveaux d'exposition augmentaient, et cela notamment relativement aux données obtenues par l'analyse HPLC-MS/MS.

Au cours de la première expérience d'exposition à l'uranium appauvri chez le poisson zèbre, une augmentation des effets sur les profils de méthylation a été observée au cours du temps sans nécessairement que l'accumulation de l'uranium dans les tissus soit significative. Cela soulève un point intéressant dans l'observation des marques épigénétiques, qui sont connues pour intégrer l'historique d'exposition des organismes aux stress environnementaux tout au long de leur vie, pouvant même conserver une empreinte du stress lorsque ce dernier s'est dissipé (Head J.A. *et al.* 2012; Hala *et al.* 2014). Ainsi, l'augmentation des effets sur les marques de méthylation entre les deux temps de prélèvement de la première expérience, et cela parfois même en dépit d'une accumulation croissante ou bien même équivalente d'uranium, serait donc liée à l'accumulation transitoire d'uranium dans le tissu plutôt qu'à une quantité d'uranium accumulée mesurée à un instant  $t$ . En effet, les pressions de contamination exercées sur les organismes sont relativement faibles et peuvent induire la mise en place de réponses biologiques adaptées pour lutter contre la contamination (McGeer *et al.* 2003). Cette réponse peut notamment impliquer des mécanismes d'excrétion du polluant hors du tissu, tel que cela a déjà été observé avec la protéine MXR chez la corbicule asiatique exposée à l'uranium appauvri (Tran *et al.* 2005), pouvant ainsi expliquer l'absence d'accumulation significative de l'uranium au temps tardif.

En conclusion, dans le cadre de la radioécologie et particulièrement à des niveaux d'exposition aussi faibles, il n'existe pas à notre connaissance d'étude ayant mis en évidence des effets similaires que cela concerne l'uranium appauvri ou l'exposition aux radiations ionisantes. Ces données sont donc relativement inédites, et amènent de nouvelles informations sur la nature des réponses biologiques pouvant être observées suite à l'exposition chronique à de faibles niveaux de substances radioactives. Définir et caractériser précisément ces réponses épigénétiques permettra d'établir des marqueurs spécifiques à l'exposition chronique aux faibles doses de substances radioactives.

### 1.3. Intérêt des études au laboratoire relativement au terrain

Les études menées au laboratoire ont permis d'approfondir la nature des effets de l'exposition chronique aux substances radioactives relativement aux données acquises sur le terrain.

Chez le poisson zèbre, les modifications des profils de méthylation ont majoritairement été observées chez les mâles, avec des effets plus précoces et présentant une amplitude de variation plus importante relativement aux organismes témoins. Il n'existe encore à ce jour que très peu de données témoignant de tels effets et proposant une explication autre que la différence du statut hormonal entre mâles et femelles (Kovalchuk *et al.* 2004; Gabory *et al.* 2009). Pour étayer cette hypothèse, l'expression de nombreux gènes a été étudiée par RT-QPCR (Annexe 4). Très peu de différences ont pu être observées en lien avec l'exposition uranifère, en revanche, la quasi-totalité des différences significatives observées l'ont été dans les gonades et selon le sexe. Dans cet organe, les gènes étudiés étaient majoritairement surexprimés chez les mâles relativement aux femelles, et notamment ceux impliqués dans le processus de méthylation de l'ADN génomique (Annexe 4). Ces différences d'expression de gènes pourraient donc être à l'origine des différences de niveaux de méthylation inter-sexes, mais n'expliquent pas l'apparition d'effets plus importants chez les mâles par rapport aux femelles. Ces données sont intéressantes puisqu'elles permettent d'apporter de nouvelles informations sur les différences existant entre mâles et femelles autres que la différence du statut hormonal et offrent de nouvelles pistes à explorer afin d'améliorer la compréhension des effets sexe-dépendants.

## Chapitre 7. 1. Synthèse des principales avancées scientifiques

Les études menées au laboratoire ont permis d'étudier les réponses épigénétiques dans plusieurs organes. Des réponses significatives ont pu être identifiées dans tous les organes étudiés, et parfois même en dépit d'une accumulation significative d'uranium dans les tissus, avec des effets sur les profils de méthylation observés tant dans les organes somatiques que dans les organes reproducteurs. Cependant, le processus de reproduction peut masquer les effets dans ces tissus. De ce fait, dans le cadre de l'étude des réponses épigénétiques, il apparaît nécessaire d'intégrer à la fois des organes somatiques et reproducteurs dans l'étude des réponses biologiques puisque (i) cela permet d'étudier la mise en place de réponses à l'échelle de l'individu ou qui peuvent être répercutées sur plusieurs générations, (ii) les effets masqués dans les gonades en raison du processus de reproduction peuvent être dans ce cas détectés dans les organes somatiques.

Enfin, les expositions à l'uranium appauvri ont également permis d'explorer l'implication de l'exposition parentale à l'uranium appauvri sur les marques épigénétiques de la descendance. Les résultats témoignent de variations tant sur les profils de méthylation de la descendance, que sur le statut transcriptomique de fonctions biologiques associées aux mécanismes épigénétiques telles que la modification des histones ou les ARNs non codants. Ces résultats sont extrêmement intéressants puisqu'ils mettent en évidence toute la complexité de l'étude du transfert générationnel impliquant les trois types de modifications épigénétiques. Etudier seulement les variations de méthylation de l'ADN génomique ne permet pas de cerner la totalité des mécanismes responsables du transfert des effets au cours des générations. Cependant, intégrer cette analyse dans une approche multi-marqueur et notamment conjointement au séquençage d'ARNs a permis de comprendre que ce transfert implique d'autres acteurs épigénétiques et ouvre de nouvelles pistes à explorer dans la caractérisation des facteurs épigénétiques associés au transfert générationnel de la toxicité des substances radioactives.

Concernant les études menées sur le terrain, elles permettent d'étudier les organismes dans leur habitat naturel, mais également, de se placer dans des conditions expérimentales réelles. Ainsi, les réponses biologiques observées sont, à l'inverse de celles observées au laboratoire, représentatives de la réalité écologique. A ce titre, le challenge physiologique auquel sont confrontées les espèces sur le terrain, permet de mettre en évidence une sensibilité supérieure à celle qui aurait été observée en laboratoire. Cependant, il est

beaucoup plus délicat d'interpréter ces données et notamment en raison du nombre important de facteurs confondants (e.g. température, durée d'ensoleillement, prédation, accessibilité à la nourriture etc...).

## **2. Modes d'action hypothétiques des substances radioactives**

A partir des résultats obtenus dans cette thèse, il est possible d'émettre certaines hypothèses quant aux modes d'action des substances radioactives sur les profils de méthylation des modèles biologiques exposés.

### 2.1. Variations des profils de méthylation au regard des propriétés génotoxiques des substances radioactives

Les réponses biologiques mesurées témoignent d'impacts similaires sur les profils de méthylation de l'ADN génomique, sans spécificité à une substance radioactive ou une voie d'exposition en particulier. En effet, les expositions à long terme ont entraîné chez nos deux modèles biologiques une hyperméthylation à l'échelle globale du génome, et une hypométhylation à l'échelle du site de restriction de l'enzyme *HpaII*.

Peu de données sont disponibles sur les modifications épigénétiques dans le cadre d'études en écotoxicologie. Malgré tout, il existe quelques réflexions scientifiques pouvant expliquer les réponses biologiques ayant été induites par les substances radioactives. L'hyperméthylation globale du génome peut être associée à l'apparition de dommages à l'ADN, permettant notamment d'augmenter la stabilité chromosomique (O'Hagan 2014). La dynamique du niveau de formes hydroxyméthylées, peut également être impliquée dans le processus de réponse à ces dommages génétiques, en étant associée aux mécanismes de réparation de l'ADN (Niehrs and Schäfer 2012). Il est donc possible d'associer une partie de ces variations observées à l'échelle globale du génome, à l'apparition de dommages à l'ADN génomique. Il est également possible de mettre en lien les données d'HPLC-MS/MS et d'AFLP-MS concernant ce point, puisque l'hypométhylation des sites de coupures de l'enzyme *HpaII* suite à l'exposition aux substances radioactives a également été supposée

associée à l'induction d'une instabilité génomique (Kovalchuk *et al.* 2004; Pogribny *et al.* 2004). Cette hypothèse ne semble pas être inappropriée au regard des propriétés génotoxiques de ces substances radioactives telles qu'elles ont été présentées dans le Chapitre 2. Pour corroborer cette hypothèse, l'utilisation combinée de marqueurs d'une nature différente, tels que l'analyse histologique, le séquençage d'ARNs ou la quantification des dommages à l'ADN mitochondrial, apporte des informations intéressantes. En effet, relativement aux analyses réalisées chez le poisson zèbre, nous avons pu mettre en évidence des dommages histologiques importants dans la quasi-totalité des tissus observés. Ces résultats témoignent bien d'impacts patents sur les organes pouvant même mettre en péril leur fonctionnement. Egalement, l'analyse du statut transcriptomique a permis d'identifier de nombreux impacts sur des voies moléculaires associées au stress cellulaire (e.g. lutte contre le stress oxydant, respiration mitochondriale) mais également associées à des mécanismes apoptotiques et de réponses aux dommages à l'ADN. Ces données confirment à leur tour qu'il existe bien des dommages génétiques qui semblent être induits par l'exposition uranifère. Concernant le modèle grenouille, la quantification du nombre moyen de dommages au MiLF révèle qu'il existe bien une atteinte au matériel génétique, qui est de plus, positivement corrélée à la fois, au niveau d'exposition aux radiations ionisantes ainsi qu'à l'hyperméthylation de l'ADN génomique.

De ce fait, il semblerait que l'un des modes d'action des substances radioactives sur les marques de méthylation de l'ADN génomique impliquerait l'induction de dommages à l'ADN, et la modification des profils de méthylation en réponse à l'apparition de ces atteintes. Il reste cependant certains points à éclaircir quant à la cinétique d'apparition de ces variations du niveau de méthylation, l'existence d'une relation dose-effet, ainsi que le lien direct entre niveau d'exposition/ niveau d'atteinte à l'ADN/ et la variation du niveau de méthylation.

## 2.2. Les modifications épigénétiques dans la régulation de la réponse génique à l'exposition aux substances radioactives

Les marques épigénétiques sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. Une des fonctions d'intérêt de la méthylation de l'ADN concerne notamment la régulation de l'expression des gènes (Bird 1992). Dans nos études, nous ne

nous sommes pas intéressés aux séquences spécifiquement impactées par les variations des niveaux de méthylation, et de ce fait, ne pouvons pas conclure sur l'implication des variations observées sur les profils de méthylation dans la régulation de l'expression de gènes au regard de la méthylation de l'ADN. En revanche, dans la littérature, certaines données sont disponibles sur les effets de l'exposition aux éléments trace métalliques ou aux rayonnements ionisants sur le niveau d'expression des gènes. Concernant les éléments trace métalliques, tels que l'arsenic, le nickel ou le cadmium, de nombreux effets ont été observés, avec pour certains une hyperméthylation associée à la répression de l'expression de gènes et pour d'autres une hypométhylation induisant une activation de leur expression (Martinez-Zamudio and Ha 2011). De la même manière, l'exposition à des radiations ionisantes a également été associée à l'hyperméthylation ainsi qu'à l'hypométhylation de régions spécifiques du génome (Aypar *et al.* 2011). Concernant les données qui ont été présentées, il nous est impossible d'arriver à de telles conclusions puisque nous n'avons pas pu identifier de séquences régulatrices de l'expression des gènes pour lesquelles le niveau de méthylation est spécifiquement impacté. Toutefois, l'hypothèse impliquant la dynamique de régulation de l'expression des gènes ne semble pas inepte, notamment en raison des résultats obtenus lors de l'analyse par séquençage d'ARN qui ont permis de souligner la modification de l'expression d'un très grand nombre de gènes en réponse à l'exposition uranifère.

De la même manière, des effets ont également été observés sur les marques associées aux histones (Martinez-Zamudio and Ha 2011) ainsi que sur l'abondance de miARNs (Aypar *et al.* 2011), faisant de ces deux processus épigénétiques de possibles cibles impactées par l'exposition aux substances radioactives. Au regard des résultats obtenus lors de la seconde expérience d'exposition à l'uranium appauvri, les processus biologiques associés à la modification des histones ainsi qu'aux ARNs non-codants ont montré une dérégulation suite à l'analyse par séquençage d'ARNs. Ces résultats attestent bien de l'implication de ces facteurs épigénétiques dans la réponse à la contamination uranifère, et fournissent des pistes à explorer dans la caractérisation des marques spécifiques apparaissant sur les histones ainsi que l'expression spécifique de miARNs en tant que signature de la réponse à l'exposition aux substances radioactives.

Egalement, il est possible d'envisager que les enzymes impliquées dans la régulation du niveau de méthylation de l'ADN soient altérées dans de tels contextes d'exposition. Cela a notamment été mis en évidence dans le cadre de l'étude de l'exposition au cadmium sur des cultures de cellules de rates de rat. Cette exposition a entraîné une diminution significative du niveau d'activité des méthyltransférases de l'ADN et de la méthylation de l'ADN. Il se pourrait donc que ces enzymes soient une des cibles de la toxicité des substances radioactives. En revanche, les analyses par RT-QPCR ou par séquençage des ARNs n'ont pas permis d'identifier de variations significatives du niveau d'expression des gènes codants pour ces enzymes, il se pourrait donc que seule l'activité protéique soit impactée.

### **3. Perspectives de recherche**

Ces travaux ont permis de montrer la faisabilité de l'étude des marques épigénétiques et de leur application dans le domaine de la radioécologie, et sont la base pour de nombreux axes de recherches.

*Cinétique et dose-réponse associées aux variations des niveaux de méthylation* : Afin d'améliorer les connaissances sur de variation du niveau de méthylation de l'ADN génomique en réponse à l'exposition aux substances radioactives, il serait intéressant de caractériser ces deux points afin d'évaluer la pertinence de ce biomarqueur en tant que marqueur d'exposition précoce aux substances radioactives.

*Mécanismes biologiques associés aux réponses identifiées* : Les variations observées sur les profils de méthylation de l'ADN génomique sont extrêmement intéressantes, fournissent de nouvelles données sur les modes d'action des faibles doses de substances radioactives, mais laissent des questions en suspens relativement à la nature biologique de ces réponses. En effet, ces variations peuvent être associées à des effets délétères tels que l'augmentation des dommages au matériel génétique témoignant ainsi d'effets liés à l'exposition, ou à la régulation de l'expression de gènes induisant une réponse biologique adaptée à l'exposition. Approfondir l'étude sur la nature de ces variations, en termes d'effets délétères ou bien

### Chapitre 7. 3. Perspectives de recherche

associés à une adaptation, permettrait d'identifier des marques témoignant de la dangerosité pour les organismes exposés.

*Marques de méthylation spécifiques de l'exposition aux substances radioactives* : Bien que les avancées présentées ici soient importantes, elles ne mettent pas en avant de signatures substances- ou organismes-spécifiques associées à ces deux contextes d'exposition. Pour cela, il serait d'un grand intérêt d'approfondir les analyses afin de déterminer quelles séquences de l'ADN sont spécifiquement impactées par une substance radioactive unique. De ce fait, lorsque ces séquences spécifiques auront été identifiées, elles pourront être utilisées en tant que biomarqueur sensible, puisque répondant aux faibles doses et étant spécifiques à l'exposition à cette substance radioactive.

*Méthylation de l'ADN, code histone et ARNs non-codants, la trinité épigénétique* : Les résultats obtenus suite au séquençage d'ARN ont permis de mettre en évidence une réponse épigénétique à l'exposition uranifère autre que la méthylation de l'ADN. En effet, les processus biologiques liés à la modification des histones ainsi qu'aux ARNs non codants sont également perturbés, témoignant de la nécessité d'étudier simultanément les trois principaux acteurs impliqués dans les modifications épigénétiques afin d'obtenir une vision globale et intégratrice des effets induits. Ainsi, afin d'améliorer la robustesse de l'utilisation des modifications épigénétiques en tant que marqueur d'exposition sensible aux substances radioactives, il semble important de caractériser les effets de ces expositions sur ces deux autres catégories de modifications épigénétiques. De cette manière, il sera possible de renseigner pour chaque substance radioactive et organisme exposé les séquences de l'ADN spécifiquement impactées par les variations de méthylation, le code histone associé et les séquences d'ARNs non-codantes impliquées.

*Sensibilité du modèle biologique* : Dans le domaine de la radioécologie, et de l'écotoxicologie au sens large, plusieurs espèces sont utilisées en tant que modèle biologique selon la nature des effets voulant être étudiés. Actuellement, plusieurs modèles biologiques sont disponibles ; par exemple, un vertébré aquatique tel que le poisson zèbre, un modèle mammifère terrestre à l'image de la souris, ou quand bien même un invertébré vivant dans



les premières couches du sol tel que le nématode. Il serait intéressant de caractériser la sensibilité des réponses épigénétiques chez chacune des espèces modèles au regard d'une exposition similaire à une substance radioactive afin de caractériser la sensibilité de la réponse inter-modèle.

*Implication du sexe dans la réponse épigénétique* : Les résultats obtenus chez le poisson zèbre font ressortir une différence entre mâles et femelles dans la réponse épigénétique associée à l'exposition chronique à l'uranium appauvri. Peu d'études ont mis en évidence ce phénomène, et ne fournissent pas d'hypothèses étayées autres que l'éventuelle implication du système hormonal. L'analyse du profil transcriptomique a également été réalisée chez les mâles au cours de la seconde expérience au laboratoire, cependant, en raison d'une trop grande variabilité entre les individus, les données n'ont pas pu être interprétées. Ainsi, caractériser la nature biologique des différences inter-sexes (e.g. à l'aide de reproductions croisées où seul l'un des sexes a été contaminé) permettrait de clarifier ce point, et d'identifier potentiellement un des deux sexes comme majoritairement responsable du transfert des marques épigénétiques à la descendance.

*Transfert générationnel, pertinence à l'échelle des populations et protection de l'environnement* : En dernier lieu, un des attraits de l'étude des marques épigénétiques concerne leur implication dans le transfert générationnel. Nous avons pu mettre en évidence qu'il existe bien un transfert générationnel de la toxicité de l'uranium sur les premiers stades de développement de la descendance impliquant des modifications épigénétiques, cependant, les modifications épigénétiques sont considérées comme héréditaires lorsque le transfert est stable sur 2 à 3 générations (Jablonka and Raz 2009). En raison des contraintes imposées par une expérience multigénérationnelle en laboratoire, une telle étude n'a pas pu être réalisée en laboratoire. En revanche, les données acquises jusque-là sont très précieuses pour les recherches futures qui viseront à caractériser la pérennité transgénérationnelle du transfert des marques épigénétiques induites par l'exposition chronique aux substances radioactives. Plus généralement, le domaine de la radioécologie a pour but d'améliorer la protection des écosystèmes exposés aux substances radioactives. Les études réalisées dans ce domaine visent non seulement à améliorer la connaissance des

effets biologiques associés à ces expositions mais également à apporter de nouvelles indications permettant d'améliorer les seuils de protection établis. Les travaux réalisés dans cette thèse mettent en avant l'implication des modifications épigénétiques dans la propagation des effets au cours des générations, et soulignent la nécessité de perfectionner les connaissances dans ce domaine et plus particulièrement sur les effets pouvant survenir à l'échelle des populations. Caractériser les modifications impliquées dans ce transfert permettra d'intégrer ces marqueurs dans la batterie des effets à étudier à l'échelle des populations, pour définir des seuils adaptés pour la protection des populations à long terme.

## 4. En conclusion

L'étude des modifications dans les profils de méthylation de l'ADN génomique a permis d'évaluer l'intérêt que représente le domaine de l'épigénétique dans la compréhension des réponses biologiques associées aux expositions chroniques aux faibles doses de substances radioactives. Les résultats obtenus au cours de cette thèse fournissent des bases solides sur lesquelles pourront être fondées les recherches futures qui viseront à caractériser la signature spécifique à chaque substance radioactive. Particulièrement, ce domaine de la recherche offre la possibilité de développer une nouvelle batterie de biomarqueurs, représentés par la trinité épigénétique, qui permettrait d'attribuer à chaque substance radioactive, et peut être même à chaque espèce, une signature tridimensionnelle unique et spécifique à cette exposition.

Les avancées présentées dans ces travaux de recherche amènent de précieuses informations en réponse aux questionnements posés dans le cadre du projet européen COMET, et notamment face à la sensibilité de ce marqueur dans de tels contextes d'exposition. Les techniques développées pour analyser les profils de méthylation de l'ADN génomique répondent aux enjeux énoncés dans le cadre du projet COMET, notamment ceux concernant le développement de techniques applicables à des modèles biologiques au génome non séquencé, et pouvant être transposées du laboratoire au terrain. Enfin, la mise en évidence de l'implication de réponses épigénétiques dans le transfert générationnel témoigne de l'importance d'intégrer ces marqueurs sensibles dans les paramètres

#### **Chapitre 7. 4. En conclusion**

biologiques utilisés pour déterminer les seuils de protection pour les populations exposées afin d'améliorer la protection à long terme des organismes exposés dans leur habitat naturel.



---

---

## Références bibliographiques

---

- Aanes, H., et al. (2011). "Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition." *Genome Res* **21**(8): 1328-1338.
- Aliyu, A. S., et al. (2015). "An overview of current knowledge concerning the health and environmental consequences of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (FDNPP) accident." *Environment International* **85**: 213-228.
- Alonso, C., et al. (2015). "MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species." *Mol Ecol Resour* **6**(10): doi: 10.1111/1755-0998.12426. [Epub ahead of print].
- Alonso, C., et al. (2015). "MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species." *Molecular Ecology Resources*: n/a-n/a.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-355.
- Andersen, I. S., et al. (2013). "Epigenetic marking of the zebrafish developmental program." *Curr Top Dev Biol* **104**: 85-112.
- Andersen, I. S., et al. (2012). "Developmental features of DNA methylation during activation of the embryonic zebrafish genome." *Genome Biol* **13**(7): R65.
- Angers, B., et al. (2010). "Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after." *Mol Ecol* **19**(7): 1283-1295.
- Anway M. D., C. A. S., Uzumcu M., Skinner M. K. (2005). "Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility." *Science* **308**(5727): 1466-1469.
- Arico, J. K., et al. (2011). "Epigenetic patterns maintained in early *Caenorhabditis elegans* embryos can be established by gene activity in the parental germ cells." *PLoS Genet* **7**(6): 9.
- Attwood, J. T., et al. (2002). "DNA methylation and the regulation of gene transcription." *Cell Mol Life Sci* **59**(2): 241-257.
- Augustine, S., et al. (2012). "Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*." *Aquat Toxicol* **119**: 9-26.
- Aypar, U., et al. (2011). "Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **707**(1): 24-33.
- Baker, R., et al. (1999). "On the Utility of Heteroplasmy in Genotoxicity Studies: An Example from Chernobyl." *Ecotoxicology* **8**(4): 301-309.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Res* **21**(3): 381-395.
- Barillet, S., et al. (2011). "Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure." *Environ. Pollut.* **159**(2): 495-502.
- Barillet, S., et al. (2007). "Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium." *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(3): 497-505.
- Barillet, S., et al. (2005). "Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*. First experimental results. Radioprotection." *Radioprotection Suppl 1, vol 40*: 175-181.

- Barillet, S., et al. (2010). "Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure." *Aquat. Toxicol.* **100**(3): 295-302.
- Barišić, D., et al. (1992). "Radium and uranium in phosphate fertilizers and their impact on the radioactivity of waters." *Water Research* **26**(5): 607-611.
- Bartolomei, M. S., et al. (1993). "Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene." *Genes Dev* **7**(9): 1663-1673.
- Basset, C., et al. (2008). "Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography." *J Chromatogr A* **1185**(2): 233-240.
- Beresford, N., et al. (2007). "D-ERICA: An integrated approach to the assessment and management of environmental risk from ionising radiation. Description of purpose, methodology and application."
- Bernstein, E. and C. D. Allis (2005). "RNA meets chromatin." *Genes Dev* **19**(14): 1635-1655.
- Bird, A. P. (1992). "The essentials of DNA methylation." *Cell* **70**: 5-8.
- Bonisoli-Alquati, A., et al. (2015). "Abundance and genetic damage of barn swallows from Fukushima." *Scientific Reports* **5**.
- Bonisoli-Alquati, A., et al. (2010). "DNA damage in barn swallows (*Hirundo rustica*) from the Chernobyl region detected by use of the comet assay." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **151**(3): 271-277.
- Bougas, B., et al. (2013). "How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*)—results from a 1000 candidate-gene microarray." *Aquatic toxicology* **142**: 355-364.
- Bourrachot, S., et al. (2014). "Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*)." *Aquat. Toxicol.* **154**: 1-11.
- Bourrachot, S., et al. (2008). "The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)." *Aquat Toxicol* **90**(1): 29-36.
- Braconi, C., et al. (2010). "MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes." *Hepatology* **51**(3): 881-890.
- Branco, M. R., et al. (2011). "Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome." *Nat Rev Genet* **13**(1): 7-13.
- Burri, N., et al. (2001). "Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer." *Lab Invest* **81**(2): 217-229.
- Carone, B. R., et al. (2010). "Paternaly induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals." *Cell* **143**(7): 1084-1096.
- Castel, S. E. and R. A. Martienssen (2013). "RNA interference in the nucleus: Roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond." *Nature Reviews Genetics* **14**(2): 100-112.
- Cayuso Mas, J., et al. (2011). "Chromatin modification in zebrafish development." *Methods Cell Biol* **104**: 401-428.
- Chuang, L. S., et al. (1997). "Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1." *Science* **277**(5334): 1996-2000.
- Cosgrove, M. S., et al. (2004). "Regulated nucleosome mobility and the histone code." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-1043.
- Dedieu, A., et al. (2009). "Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry." *J Chromatogr A* **1216**(28): 5365-5376.
- Denison, F. (2004). "Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve." In. Université de Provence Aix Marseille I.

- Dinger, M. E., et al. (2008). "Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation." Genome Res **18**(9): 1433-1445.
- Dolinoy, D. C. (2008). "The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome." Nutr Rev **66 Suppl 1**: S7-11.
- Douki, T., et al. (2006). "Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions." International journal of radiation biology **82**(2): 119-127.
- Dubrova, Y. E., et al. (2000). "Genome stability: Transgenerational mutation by radiation." Nature **405**(6782): 37-37.
- Eden, A., et al. (2003). "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation." Science **300**(5618): 455.
- Ehrlich, M. (2003). "The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease." Clin Immunol **109**(1): 17-28.
- Eliseyeva, K. G., et al. (1996). "Chromosome aberrations in different tissues of mouse-type rodents and amphibians in regions of Belarus contaminated by radionuclides." Cytology and genetics **30**: pp. 20-25.
- Ellegren, H., et al. (1997). "Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl." Nature **389**(6651): 593-596.
- Energy, U. S. D. o. (1990). "Radiation Protection of the Public and the Environment, as amended." (DOE Order 5400.5). Washington DC: United States Department of Energy.
- Faucher, K., et al. (2012). "Uranium-induced sensory alterations in the zebrafish *Danio rerio*." Aquat. Toxicol. **124-125**: 94-105.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers." Biochem. Biophys. Res. Commun. **111**(1): 47-54.
- Ficz, G., et al. (2011). "Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation." Nature **473**(7347): 398-402.
- Flatau, E., et al. (1984). "DNA methylation in 5-aza-2'-deoxycytidine-resistant variants of C3H 10T1/2 Cl8 cells." Mol Cell Biol **4**(10): 2098-2102.
- Fraga, M. F., et al. (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." Nat Genet **37**(4): 391-400.
- Fraga, M. F. and M. Esteller (2002). "DNA methylation: a profile of methods and applications." Biotechniques **33**(3): 636-649.
- Fragou, D., et al. (2011). "Epigenetic mechanisms in metal toxicity." Toxicol. Mech. Methods **21**(4): 343-352.
- Francis, D., et al. (1999). "Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat." Science **286**(5442): 1155-1158.
- Franco, R., et al. (2008). "Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis." Cancer Lett **266**(1): 6-11.
- Fujita, Y., et al. (2014). "Environmental radioactivity damages the DNA of earthworms of Fukushima Prefecture, Japan." European Journal of Wildlife Research **60**(1): 145-148.
- Fulnecek, J. and A. Kovarik (2014). "How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles?" BMC Genetics **15**(1): 2.
- Gabory, A., et al. (2009). "Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming." Mol Cell Endocrinol **304**(1-2): 8-18.
- Gabory, A., et al. (2011). "Developmental programming and epigenetics." The American journal of clinical nutrition **94**(6 Suppl): 1943S-1952S.
- Gagnaire, B., et al. (2015). "Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of in situ metal toxicity." Ecotoxicology **24**(1): 215-231.
- Garnier-Laplace, J., et al. (2011). "Fukushima wildlife dose reconstruction signals ecological consequences." Environ Sci Technol **45**(12): 5077-5078.

- Garnier-Laplace, J., et al. (2006). "First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances." Environmental science & technology **40**(20): 6498-6505.
- Garnier-Laplace, J., et al. (2013). "Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates." Journal of Environmental Radioactivity **121**: 12-21.
- Garnier-Laplace, J., et al. (2001). "Natural Uranium and the environment." [http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium\\_UK.pdf](http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Uranium_UK.pdf).
- Garza-Manero, S., et al. (2014). "Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease." Brain. Res. **10**: 80-93.
- Garzon, R., et al. (2009). "MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1." Blood **113**(25): 6411-6418.
- Geras'kin, S. A., et al. (2008). "Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident." Environ Int **34**(6): 880-897.
- Gestri, G., et al. (2012). "The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases." Dev Neurobiol **72**(3): 302-327.
- Gonzalez-Zulueta, M., et al. (1995). "Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing." Cancer Res **55**(20): 4531-4535.
- Gregg, C., et al. (2010). "Sex-Specific Parent-of-Origin Allelic expression in the Mouse Brain." Science (New York, N.Y.) **329**(5992): 682-685.
- Groth, A., et al. (2007). "Chromatin challenges during DNA replication and repair." Cell **128**(4): 721-733.
- Gruenbaum, Y., et al. (1982). "Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase." Nature **295**(5850): 620-622.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., Song, H. (2011). "Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain." Cell **145**(3): 423-434.
- Haberle, V., et al. (2014). "Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters." Nature **507**(7492): 381-385.
- Hackett, J. A. and M. A. Surani (2013). "Beyond DNA: Programming and Inheritance of Parental Methylomes." Cell **153**(4): 737-739.
- Hala, D., et al. (2014). "Environmental stressors and the epigenome." Drug Discovery Today: Technol. **12**(0): e3-e8.
- Halkidou, K., et al. (2004). "Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer." Prostate **59**(2): 177-189.
- Hashimoto, H., et al. (2008). "The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix." Nature **455**(7214): 826-829.
- Head J.A., et al. (2012). "Epigenetics for ecotoxicologists." Environ Toxicol Chem **31**(2): 221-227.
- Heard, E. and R. A. Martienssen (2014). "Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms." Cell **157**(1): 95-109.
- Herlory, O., et al. (2013). "Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the Ritord watershed (Center-West France)." Ecotoxicology **22**(8): 1186-1199.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." N Engl J Med **349**(21): 2042-2054.
- Hermann, A., et al. (2004). "The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites." J Biol Chem **279**(46): 48350-48359.



- Hiyama, A., et al. (2012). "The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly." Scientific Reports **2**: 570.
- Hiyama, A., et al. (2013). "The Fukushima nuclear accident and the pale grass blue butterfly: evaluating biological effects of long-term low-dose exposures." BMC Evol Biol **13**(168): 1471-2148.
- Hiyama, A., et al. (2015). "Spatiotemporal abnormality dynamics of the pale grass blue butterfly: three years of monitoring (2011–2013) after the Fukushima nuclear accident." BMC Evolutionary Biology **15**(1): 15.
- Hochedlinger, K. and K. Plath (2009). "Epigenetic reprogramming and induced pluripotency." Development **136**(4): 509-523.
- Holliday, R. (1990). "DNA methylation and epigenetic inheritance." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **326**(1235): 329-338.
- Holliday, R. (1994). "Epigenetics: an overview." Dev. Genet. **15**(6): 453-457.
- Holliday, R. and J. E. Pugh (1975). "DNA modification mechanisms and gene activity during development." Science **187**(4173): 226-232.
- Howard, G., et al. (2008). "Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice." Oncogene **27**(3): 404-408.
- Huang, D., et al. (2008). "Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation." Toxicol Lett **179**(1): 43-47.
- Huang da, W., et al. (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc **4**(1): 44-57.
- Hunter, S. E., et al. (2010). "The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number." Methods **51**(4): 444-451.
- IAEA (1992). "Effects of ionising radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards." Technical Reports Series No. 332. Vienna: International Atomic Energy Agency.
- IAEA, O. N. a. (2012). "*Uranium 2011: Resources, Production and Demand*; ISBN 978-92-64-17803-8." <http://www.oecd-nea.org/ndd/pubs/2012/7059-uranium-2011.pdf>.
- INERIS (2008). "Uranium. Toxicological and environmental data sheets of chemicals." <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/cas/7440-61-1>.
- ISO (1996a). "Norme ISO 7346-1 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 1: Méthode statique."
- ISO (1996b). "Norme ISO 7346-2 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 2: Méthode semi-statique."
- ISO (1996c). "Norme ISO 7346-3 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 3: Méthode avec renouvellement continu."
- Iwata, M., et al. (2013). "System-dependent regulations of colour-pattern development: a mutagenesis study of the pale grass blue butterfly." Scientific Reports **3**: 2379.
- Jablonka, E. and M. J. Lamb (1998). "Epigenetic inheritance in evolution." Journal of Evolutionary Biology **11**(2): 159-183.
- Jablonka, E. and G. Raz (2009). "Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution." The Quarterly review of biology **84**(2): 131-176.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-356.

- James, S. J., et al. (2003). "Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis." J Nutr **133**(11 Suppl 1): 3740S-3747S.
- Jeffrey, R. A., et al. (2014). "Diminished metal accumulation in riverine fishes exposed to acid mine drainage over five decades." PLoS One **9**(3).
- Jiang, G., et al. (2008). "Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells." Toxicology **244**(1): 49-55.
- Jiang, L., et al. (2013). "Sperm, but Not Oocyte, DNA Methylome Is Inherited by Zebrafish Early Embryos." Cell **153**(4): 773-784.
- Jones, P. A. (2003). "Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer Prevention." Annals of the New York Academy of Sciences **983**(1): 213-219.
- Joubert, A., Zimmerman, K.M., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C.F., Foray, N. (2008). "DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?" Int J Radiat Biol **84**(2): 107-125.
- Kamstra, J. H., et al. (2015). "Dynamics of DNA hydroxymethylation in zebrafish." Zebrafish **12**(3): 230-237.
- Kimura, H. and P. R. Cook (2001). "Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B." J Cell Biol **153**(7): 1341-1353.
- Kluiver, J., et al. (2006). "The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies." Leukemia **20**(11): 1931-1936.
- Kondo, Y., et al. (2007). "Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas." Hepatol Res **37**(11): 974-983.
- Kosmehl, T., et al. (2006). "A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(8): 2097-2106.
- Kovalchuk, I., et al. (2004). "Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone." Plant Physiol **135**(1): 357-363.
- Kovalchuk, O., et al. (2003). "Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl--a mechanism for radiation adaptation?" Mutat Res **529**(1-2): 13-20.
- Kovalchuk, O., et al. (2004). "Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation." Mutat Res **548**(1-2): 75-84.
- Lange, U. C. and R. Schneider (2010). "What an epigenome remembers." Bioessays **32**(8): 659-668.
- Larsson, C. M. (2004). "The FASSET Framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems—an overview." Journal of Radiological Protection **24**(4A): A1.
- Lee, J. S., et al. (2010). "The language of histone crosstalk." Cell **142**(5): 682-685.
- Lerebours, A. (2009). "Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* Mécanismes de stress, neurotoxicité et métabolisme mitochondrial." In. Université de Provence Aix Marseille I.
- Lerebours, A., et al. (2010b). "Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium." Aquat Toxicol **100**(1): 66-74.
- Lerebours, A., et al. (2010a). "Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain; transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure." Environ. Sci. Technol **44**: 1438-1443.
- Lerebours, A., et al. (2013). "Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **755**(1): 55-60.

- Lerebours, A., et al. (2009). "Comparative analysis of gene expression in brain liver skeletal muscles and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations." *Environ. Toxicol. Chem.* **28**: 1271-1278.
- Levenson, J. M. and J. D. Sweatt (2005). "Epigenetic mechanisms in memory formation." *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 108-118.
- Li, B., et al. (2007). "The role of chromatin during transcription." *Cell* **128**(4): 707-719.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* **3**(9): 662-673.
- Lisanti, S., et al. (2013). "Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues." *PLoS One* **8**(11).
- Lobel, P. B., et al. (1991). "A major factor contributing to the high degree of unexplained variability of some elements concentrations in biological tissue: 27 elements in 5 organs of the mussel *Mytilus* as a model." *Arch Environ Contam Toxicol* **21**(1): 118-125.
- Lu, J. and D. M. Gilbert (2007). "Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin." *J Cell Biol* **179**(3): 411-421.
- Lyon, M. F. (1974). "Symposium No. 6: Gene and chromosome inactivation. Introduction by the Chairman." *Genetics* **78**(1): 305-309.
- Manikkam, M., et al. (2013). "Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations." *PLoS One* **8**(1).
- Margueron, R. and D. Reinberg (2010). "Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information." *Nat Rev Genet* **11**(4): 285-296.
- Marson, A., et al. (2008). "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells." *Cell* **134**(3): 521-533.
- Martinez-Zamudio, R. and H. C. Ha (2011). "Environmental epigenetics in metal exposure." *Epigenetics* **6**(7): 820-827.
- Matsushima, N., et al. (2015). "Assessment of radiocesium contamination in frogs 18 months after the Fukushima Daiichi nuclear disaster." *Scientific Reports* **5**.
- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2005). "Small regulatory RNAs in mammals." *Hum Mol Genet*(1): R121-132.
- McGeer, J. C., et al. (2003). "Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment." *Environ Toxicol Chem* **22**(5): 1017-1037.
- Melton, C., et al. (2010). "Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells." *Nature* **463**(7281): 621-626.
- Meshorer, E., et al. (2006). "Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells." *Dev Cell* **10**(1): 105-116.
- Mhanni, A. A., McGowan, R.A. (2004). "Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo." *Dev Genes Evol* **214**(8): 412-417.
- Miller, A. C., et al. (2009). "DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia." *Biochimie* **91**(10): 1328-1330.
- Mizuguchi, G., et al. (2004). "ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex." *Science* **303**(5656): 343-348.
- Moldovan, G. L., et al. (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* **129**(4): 665-679.
- Møller, A. P. and T. A. Mousseau (2006). "Biological consequences of Chernobyl: 20 years on." *Trends in ecology & evolution* **21**(4): 200-207.
- Møller, A. P. and T. A. Mousseau (2015c). "Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates." *Scientific Reports* **5**.
- Møller, A. P., et al. (2015a). "Ecological differences in response of bird species to radioactivity from Chernobyl and Fukushima." *Journal of Ornithology*: 1-10.

- Møller, A. P., et al. (2015b). "Cumulative effects of radioactivity from Fukushima on the abundance and biodiversity of birds." *Journal of Ornithology*: 1-9.
- Nan, X. and A. Bird (2001). "The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome." *Brain Dev* **23**(1): S32-37.
- NCRP (1990). "Effects of Ionizing Radiation on Aquatic Organisms." (NCRP Report No.109). Washington DC: NCRP.
- NERH (2011). Government of Japan: Report of the Japanese Government to the IAEA Ministerial Conference on Nuclear Safety–The accident at TEPCO's Fukushima Nuclear Power Stations, 7 June.
- Ng, R. K. and J. B. Gurdon (2008). "Epigenetic inheritance of cell differentiation status." *Cell Cycle* **7**(9): 1173-1177.
- Nguyen, C. T., et al. (2002). "Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Res* **62**(22): 6456-6461.
- Niehrs, C. and A. Schäfer (2012). "Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair." *Trends in Cell Biology* **22**(4): 220-227.
- Nohara, C., et al. (2014). "Ingestion of radioactively contaminated diets for two generations in the pale grass blue butterfly." *BMC Evolutionary Biology* **14**: 193.
- Noonan, E. J., et al. (2009). "miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer." *Oncogene* **28**(14): 1714-1724.
- O'Hagan, H. M. (2014). "Chromatin modifications during repair of environmental exposure-induced DNA damage: A potential mechanism for stable epigenetic alterations." *Environ. Mol. Mutagen.* **55**(3): 278-291.
- OCDE (2004a). "OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 203: Fish, acute toxicity test.*" *OCDE/ed.*
- OCDE (2004b). "OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 204: Fish, prolonged toxicity tes: 14 day study.*" *OCDE/ed.*
- OCDE (2004c). "OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 210: Fish, earl- life stage toxicity test.*" *OCDE/ed.*
- Pardoux, R., et al. (2012). "Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation." *PLoS One* **7**(8): e41922.
- Pardoux, R., et al. (2012). "Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation." *PLoS One* **7**(8): e41922.
- Park, Y. J., et al. (2005). "Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding." *Journal of Biological Chemistry* **280**(3): 1817-1825.
- Pauli, A., et al. (2012). "Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis." *Genome Res* **22**(3): 577-591.
- Pereira, S., et al. (2014). "Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells." *PLoS One* **9**(3): e92974.
- Pfluger, J. and D. Wagner (2007). "Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants." *Curr Opin Plant Biol* **10**(6): 645-652.
- Pible, O., et al. (2010). "Predicting the disruption by UO<sub>2</sub>(2+) of a protein-ligand interaction." *Protein Sci* **19**(11): 2219-2230.
- Pierron, F., et al. (2014). "Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel." *Environ. Sci. Technol.* **48**(1): 797-803.
- Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P. (2014). "Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel." *Environ. Sci. Technol.* **48**(1): 797-803.

- Pilsner, J. R., et al. (2010). "Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains *via* the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife." Mol. Ecol. **19**(2): 307-314.
- Pilsner, J. R., Lazarus, A.L., Nam, D.H., Letcher, R.J., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N. (2010). "Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife." Mol. Ecol. **19**(2): 307-314.
- Pogribny, I., et al. (2004). "Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1253-1261.
- Pomerantseva, M. D., et al. (1997). "Genetic disorders in house mouse germ cells after the Chernobyl catastrophe." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **381**(1): 97-103.
- Pontier, D. B. and J. Gribnau (2011). "Xist regulation and function explored." Hum Genet **130**(2): 223-236.
- Popp, C., et al. (2010). "Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency." Nature **463**(7284): 1101-1105.
- Potok, M. E., et al. (2013). "Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern." Cell **153**(4): 759-772.
- Rai, K., et al. (2008). "DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45." Cell **135**(7): 1201-1212.
- Raiche, J., et al. (2004). "Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice." Biochem Biophys Res Commun **325**(1): 39-47.
- Rando, O. J. and K. J. Verstrepen (2007). "Timescales of genetic and epigenetic inheritance." Cell **128**(4): 655-668.
- Rasmussen, T. P. (2003). "Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective." Reprod Biol Endocrinol **1**: 100.
- Ravanat, J. L., et al. (2002). "Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up." Carcinogenesis **23**(11): 1911-1918.
- Razin, A. and A. D. Riggs (1980). "DNA methylation and gene function." Science **210**(4470): 604-610.
- Rechtsteiner, A., et al. (2010). "The histone H3K36 methyltransferase MES-4 acts epigenetically to transmit the memory of germline gene expression to progeny." PLoS Genet **6**(9): 1001091.
- Riggs, A. D. (1975). "X inactivation, differentiation, and DNA methylation." Cytogenet Cell Genet **14**(1): 9-25.
- Robertson, K. D. (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." Oncogene **21**(35): 5361-5379.
- Robertson, K. D. and P. A. Jones (2000). "DNA methylation: past, present and future directions." Carcinogenesis **21**(3): 461-467.
- Roudier, F., et al. (2009). "Chromatin indexing in Arabidopsis: an epigenomic tale of tails and more." Trends Genet **25**(11): 511-517.
- Russo, V. E., et al. (1996). "Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ryabokon, N. I. and R. I. Goncharova (2006). "Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout." Radiation and environmental biophysics **45**(3): 167-177.
- Salonen, L. (1994). "238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock." IAHS **222**: 71-148.

- Santos, J. H., et al. (2006). Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. DNA Repair Protocols. D. Henderson, Humana Press. **314**: 183-199.
- Santoyo, M. M., et al. (2011). "Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments." Environ Pollut **159**(10): 2387-2392.
- Savchenko, V. K. (1995). "The ecology of the Chernobyl catastrophe. Scientific outlines of an international programme of collaborative research."
- Schrey, A. W., et al. (2013). "Ecological Epigenetics: Beyond MS-AFLP." Integr Comp Biol **53**(2): 340-350.
- Sharif, J., et al. (2007). "The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA." Nature **450**(7171): 908-912.
- Shibahara, K. and B. Stillman (1999). "Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin." Cell **96**(4): 575-585.
- Singh, N. P., et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res **175**(1): 184-191.
- Skinner, M. K., et al. (2013). "Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity." BMC Medicine **11**(1).
- Somers, C. M., et al. (2002). "Air pollution induces heritable DNA mutations." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(25): 15904-15907.
- Song, J., et al. (2005). "Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer." APMIS **113**(4): 264-268.
- Spitz, D. R., et al. (2004). "Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology." Cancer and Metastasis Reviews **23**(3): 311-322.
- Su, S., et al. (2006). "Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine." J Occup Health **48**(4): 261-266.
- Su, S., et al. (2006). "Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine." Occupational Health **48**(261-266).
- Su, Z., et al. (2011). "Functional complementation between transcriptional methylation regulation and post-transcriptional microRNA regulation in the human genome." BMC Genomics **23**(12): 1471-2164.
- Sugg, D. W., et al. (1996). "DNA damage and radiocesium in channel catfish from chernobyl." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(7): 1057-1063.
- Szyf, M. (2015). "Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics." Trends in Molecular Medicine **21**(2): 134-144.
- Taira, W., et al. (2014). "Fukushima's biological impacts: the case of the pale grass blue butterfly." J Hered **105**(5): 710-722.
- Takiguchi, M., et al. (2003). "Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation." Experimental cell research **286**(2): 355-365.
- Taulan, M., et al. (2004). "Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice." Environmental Health Perspectives: 1628-1635.
- Taylor, S. M., et al. (1984). "5-Azacytidine, DNA methylation, and differentiation." Curr Top Microbiol Immunol **108**: 115-127.
- Tollervey, J. R. and V. V. Lunyak (2012). "Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate." Epigenetics **7**(8): 823-840.

- Tracey, R., et al. (2013). "Hydrocarbons (jet fuel JP-8) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations." Reproductive Toxicology **36**: 104-116.
- Tran, D., et al. (2005). "Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues." Environ Toxicol Chem **24**(9): 2278-2284.
- Uren Webster, T. M., et al. (2013). "Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout." Environmental science & technology **47**(15): 8869-8877.
- Van Horn, J. D. and H. Huang (2006). "Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data." Coordination Chemistry Reviews **250** 765-775.
- Vandegheuchte, M. B., et al. (2009b). "Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **150**(3): 343-348.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper M., Zabeau, M. (1995). "AFLP a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Research **23**(21): 4407-4414.
- Waddington, C. H. (1942). "The epigenotype." Endeavour **1**: 18-20.
- Waddington, C. H. (1957). "The strategy of the genes: A discussion of some aspects of theoretical biology."
- Waddington, C. H. (1966). "New patterns in genetics and development."
- Wang, K. C. and H. Y. Chang (2011). "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs." Mol Cell **43**(6): 904-914.
- Wang, Y., et al. (2008). "Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation." Nat Genet **40**(12): 1478-1483.
- Watanabe, T., et al. (2011). "Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus." Science **332**(6031): 848-852.
- Weaver, I. C. G., et al. (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." Nat Neurosci **7**(8): 847-854.
- Weaver, I. C. G., et al. (2006). "Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(9): 3480-3485.
- Whitehead, J., et al. (2009). "Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs." Biochim Biophys Acta **9**: 936-947.
- WHO (2012). "*Uranium in Drinking-water*." WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO/SDE/WSH/03.04/118/Rev/1.
- Wickliffe, J. K., et al. (2002). "Assessing the genotoxicity of chronic environmental irradiation by using mitochondrial dna heteroplasmy in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) at Chernobyl, Ukraine." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(6): 1249-1254.
- Wickliffe, J. K., et al. (2003). "Mitochondrial DNA heteroplasmy in laboratory mice experimentally enclosed in the radioactive Chernobyl environment." Radiation research **159**(4): 458-464.
- Xu, M., et al. (2000). "AFLP-Based detection of DNA Methylation." Plant Mol. Biol. Rep. **18**: 361-368.
- Xu, M., Li, X., Korban, S.S. (2000). "AFLP-Based detection of DNA Methylation." Plant Mol. Biol. Rep. **18**: 361-368.
- Yablokov, A. V., et al. (2009). "Atmospheric, water, and soil contamination after Chernobyl." Chernobyl: Consequences of the Catastrophe for People and the Environment: 223-236.
- Yamanaka, S. (2009). "A fresh look at iPS cells." Cell **137**(1): 13-17.
- Zhang, B., et al. (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." Dev Biol **302**(1): 1-12.
- Zhang, M., et al. (2010). "DNA cytosine methylation in plant development." J Genet Genomics **37**(1): 1-12.

Zhang, R., et al. (2012). "Genome-wide expression of non-coding RNA and global chromatin modification." Acta Biochim Biophys Sin **44**(1): 40-47.

Zhang, Z., et al. (2000). "PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast." Nature **408**(6809): 221-225.







---

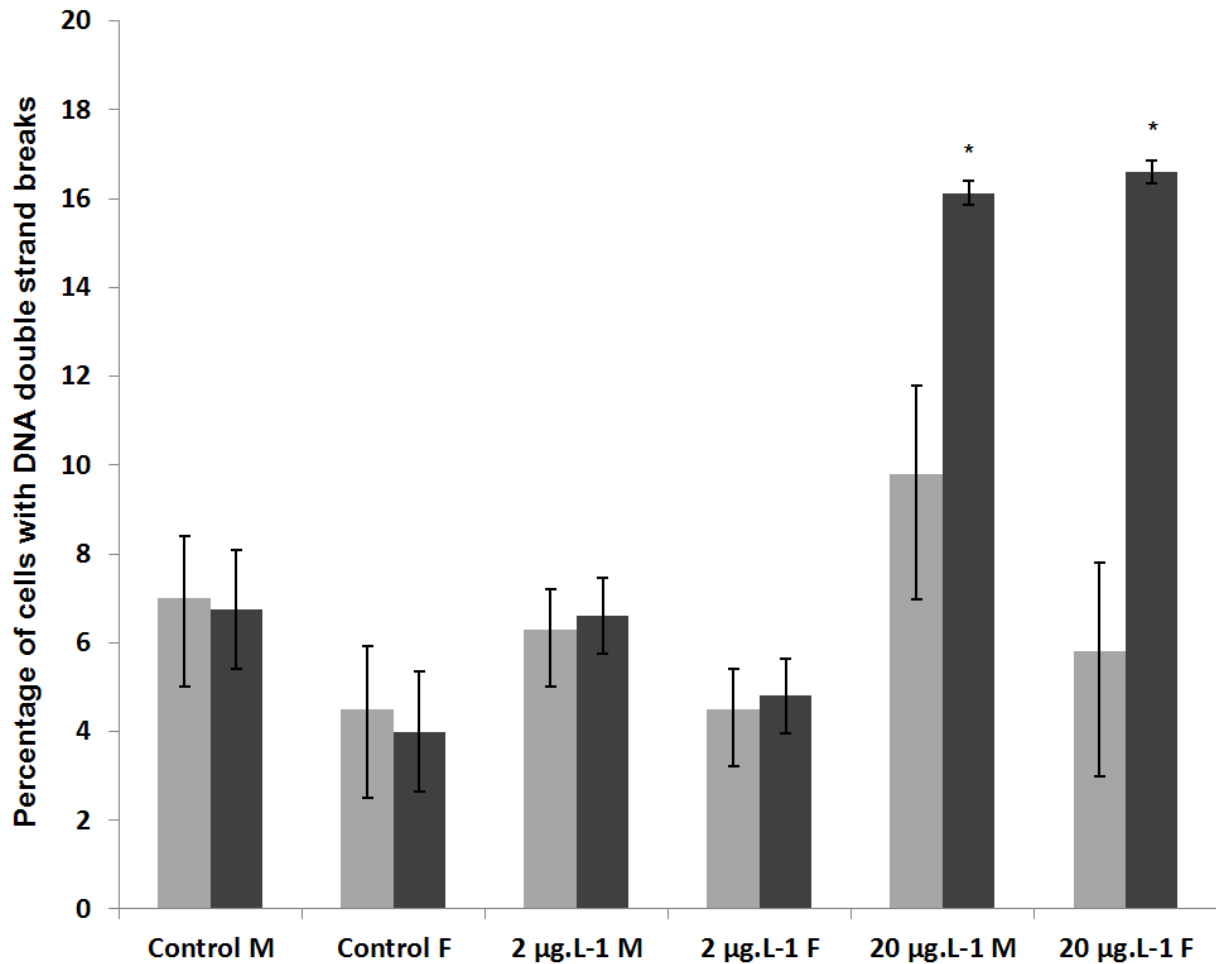
---

# Annexes

---

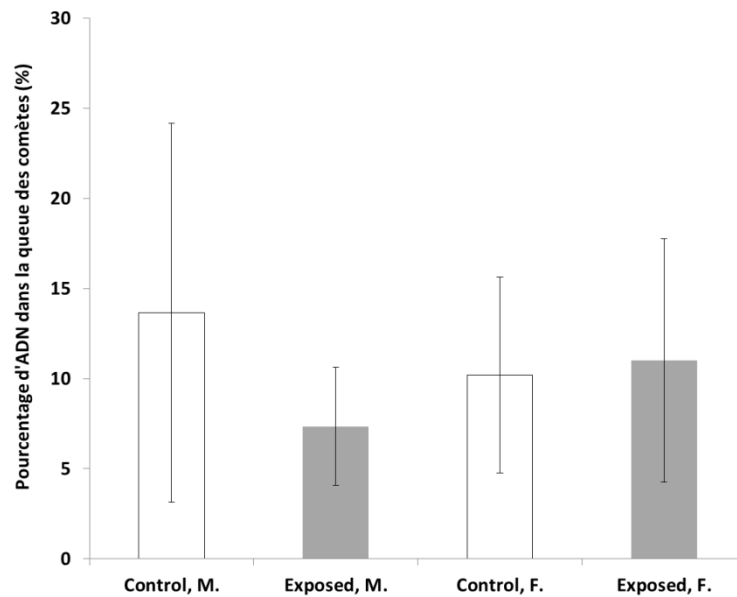


## 1. Résultats du test gamma-H2AX au cours de la première expérience d'exposition au laboratoire



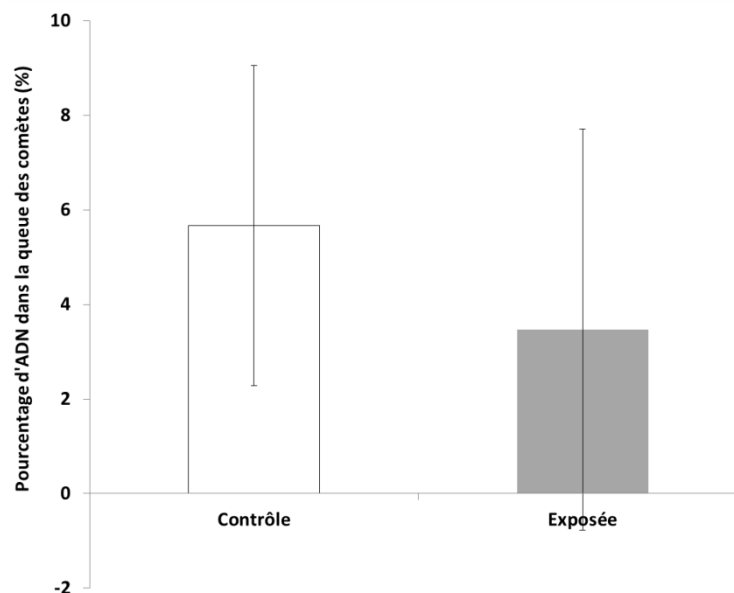
Pourcentage de cellules extraites de la rate des poissons zèbre portant des cassures double-brin mesuré par le test gamma-H2AX. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$  avec 200 noyaux analysés par réplicas; M = Mâle, F = Femelle). Les barres grises correspondent aux données mesurées après 7 jours d'exposition, et noires après 24 jours d'expositions. \* Différence significative en comparaison aux données mesurées chez les témoins (\*  $p < 0,05$ ).

## 2. Résultats du test des comètes au cours de la seconde expérience



### d'exposition au laboratoire

Pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes des nucléides obtenus à partir des échantillons de sang des poissons zèbre adultes. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  SS ( $n = 10$  ; M = Mâle, F = Femelle).



Pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes des nucléides obtenus à partir des larves de 96 heures issues de parents contrôles ou exposés ( $n = 10$ ).

### 3. Liste des amorces déterminées pour chaque gène étudié en RT-PCR.

Nom du gène	Symbole	Numéro d'accession	Amorce (5'-3')
Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1b	<i>cyp19a1b</i>	NM_131642.1	F: TTCAGTACCTGGCAGACGG R: AGCTCTGTTGCGAAGTCCAT
Androgen receptor	<i>ar</i>	NM_001083123.1	F: TTCCTCATACTTGGGCGCTG R: GGAAAACCTCCCTGCTCTGCT
Estrogen receptor 1	<i>esr1</i>	NM_152959.1	F: GAACATTTTGACCAGCGGAGAG R: TTGACAGAGGAGCTGATGCC
Follicle stimulating hormone, beta polypeptide	<i>fshb</i>	NM_205624.1	F: AGGATGCGTGTGCTTGTCT R: TAAACTCGATCCATTGTCCAGCA
Luteinizing hormone, beta polypeptide	<i>lhb</i>	NM_205622.2	F: AACAAAGGGATCCCGTTTACAAGA R: TGGTGCAGTCGGAAGTGTTT
Amyloid beta (A4) precursor protein a	<i>appa</i>	NM_131564.1	F: AACGACAAGAAGGCCGTGAT R: AGGCTGAACACATGACGAGG
Glial fibrillary acidic protein	<i>gfap</i>	NM_131373.2	F: AGAAGGTCCATGAGGAGGAGAT R: TGCATCCGTCAGATCAGCAA
Acetylcholinesterase	<i>ache</i>	NM_131846.1	F: ATTTCCGCCGACTGGTAATC R: GTTAAGCAGACGAGGCAGGA
Choline O-acetyltransferase a	<i>chata</i>	NM_001130719.1	F: GAGTTGCTCTGGACTGCCAT R: GTGGTAGGAACCTGGCTTGT
steroidogenic acute regulatory protein	<i>star</i>	NM_131663.1	F: TCGGCTGAAACACCAGGAAA R: CTCAGCCCTTACAAATCCCTTCT
follicle stimulating hormone receptor	<i>fshr</i>	NM_001001812.1	F: TCGCTCTTTGCTGTCTGTGG R: CCGTTCTCGGACACCACTATTC
cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	<i>cyp11a1</i>	NM_152953.2	F: TGCTTTTGCCGAAGTTGCAG R: AACACAGCACTCACCGATTC
cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a	<i>cyp19a1a</i>	NM_131154.2	F: TGGACAGTGTTTTAGCTGGC R: GGATCTGTGCATTCGACCCA
piwi-like RNA-mediated gene silencing 1	<i>piwil1</i>	NM_183338.1	F: TACCGCTGCTGGAAAAAGGT R: ATGACCCCTTCAGTGCATCG
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	<i>ddx4</i>	NM_131057.1	F: GGCTTCGGAAGAGGAGGTTT R: TTTGGAGGATTGCTGCCACT
Synaptonemal complex protein 3	<i>sycp3</i>	NM_001040350.1	F: GCGTTTTGACTTCACCGTTC R: GCTGATGTCCGCACCAAATC
Zinc finger and BTB domain containing 16a	<i>zbtb16a</i>	NM_199635.1	F: TGAACGATGGTGGCACAGAA R: TGCTCATTAGGCTGTCCACG
Cyclin B3	<i>ccnb3</i>	NM_001076719.1	F: GCCAAGTGTGTGAATGCAGG R: TAAACTGCGTCCATCTCTCC
Anti-Mullerian hormone	<i>amh</i>	NM_001007779.1	F: CCTCCACGCCGACTGTATTT R: TGGTCCTTAGTAGCTGCTTAC
SRY (sex determining region Y)-box 9a	<i>sox9a</i>	NM_131643.1	F: AAAACAAGCCGCACGTCAAG R: CCACCTCGTTCAGTAATCTCCAA

### Annexes 3

Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	<i>lhcg</i>	NM_205625.1	F: TTTGACGGCCTGAAAGGAG R: AGTGTGGAGATGCTCAGGT
Transforming growth factor, beta 1a	<i>tgfb1a</i>	NM_182873.1	F: TGGGAACTCGCTTTGTCTCC R: CTCTGCTTGTCTAGCCCTGA
Growth differentiation factor 9	<i>gdf9</i>	NM_001012383.1	F: ACACACCGAACCAACCTGA R: TCTTGCATGAAGAATTCTCTGTTT
POU domain, class 5, transcription factor 1	<i>pou5f1</i>	BC049295.1	F: CGACAATCTGCCGCTTTGAG R: TGTCGACAAAACCCGTTCA
Guanylyl cyclase 2	<i>gc2</i>	NM_001109695.1	F: CCGTGGAGGCGTGAATCTTT R: AGGCTTCGCTCTGAAATGCT
Guanylate cyclase 2F, retinal	<i>gucy2f</i>	NM_131864.2	F: GGAAACGGCCAGACCAACTA R: ATCCACACCTCCAGTGCAGA
Guanylyl cyclase 3	<i>gc3</i>	NM_131866.1	F: CCACAGGGTTGCCTTACAGAA R: AGGAGTAAGGTCTGGCGGTA
Tyrosinase	<i>tyr</i>	NM_131013.1	F: ATCTGCCAACGACCCCATTT R: ACAAACCGCTGACCTGGAT
LIM homeobox 2b	<i>lhx2b</i>	NM_001040010.3	F: TTGGTTGCAGATCTGACGG R: AGGCATGTTCTGCTCTGTTT
Laminin, beta 1a	<i>lamb1a</i>	NM_173275.1	F: GTTAAAGCCTGCCAGTGTGAC R: CCGTCCATAAGCTCCAGCAA
Laminin, gamma 1	<i>lamc1</i>	NM_173277.1	F: AGTAGACCGACAGACAGCCT R: TTGCATCGTTCACAGCCCTT
Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	<i>pdhb</i>	NM_213154.1	F: CATGGAGGGTCTGCTTTCAA R: ACCGATGCAGAAACGGAAGA
Glial cell derived neurotrophic factor a	<i>gdnfa</i>	NM_131732.1	F: ACACGTCCCCTTTCCACAA R: ACAGTCCCGTTAGGTCATATTGTT
Actin, beta 1	<i>actb1</i>	NM_131031.1	F: GATCAAGATCATTGCTCCCC R: AATGCGCCATACAGAGCAGA
Glutathione peroxidase 1a	<i>gpx1a</i>	NM_001007281.2	F: TTGAAAATGTGGCGTCGCTT R: ATTCTTGCAATTCTCTGGTGC
Glutathione S-transferase pi 1	<i>gstp1</i>	NM_131734.3	F: TACTTCGAGTCAAAGGCAG R: GCGTTGGACTGAAACAGCAC
Catalase	<i>cat</i>	NM_130912.1	F: TCTCTGATGTGGCCCGATA R: TTTTGCACCATGCGTTTCTGG
Superoxide dismutase 1, soluble	<i>sod1</i>	NM_131294.1	F: TGACCGCACCGTCTATTTTC R: ATGCAGCCGTTTGTGTTGTC
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>sod2</i>	NM_199976.1	F: ACCACAGGTCTCATCCCACT R: GGAAACGCTCGCTGACATTC
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, a	<i>gadd45aa</i>	NM_200576.2	F: TGTGGCGCTTCCAGATTCCT R: TGTGGAACCGTGACCAGAAT
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, b	<i>gadd45ab</i>	NM_001002216.1	F: AACGTGGTCTTGTGTCTGCT R: TGGATGACTGAGGATTGGTGAC
Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta a	<i>gadd45ba</i>	NM_213031.3	F: ACATTGCGCTGCAGATTCAC R: AGGCTGGCATTGAGAGTTAGTG
Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta b	<i>gadd45bb</i>	NM_001012386.2	F: ACATTGCGCTGCAGATTCAC R: AGGCTGGCATTGAGAGTTAGTG
Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	<i>gadd45g</i>	NM_205691.1	F: AATGTTGACCCAGACAGCGT R: ATCATCATTGGGGCGGTTA
RAD51 recombinase	<i>rad51</i>	NM_213206.2	F: TTTGCGACAGGAAAGACGCA R: AGACCATACCGTTCAGCCAC



### Annexes 3

Jun proto-oncogene	<i>jun</i>	NM_199987.1	F: CCGTGACACTGGCGATAACT R: AGCAGTCTTTTAGGCGCTGT
Bcl2-associated X protein, a	<i>baxa</i>	NM_131562.2	F: GTGTTTG CAGCAGATCGGAG R: ACCCTGGTTGAAATAGCCTTG
Danio rerio vitellogenin 6 (vtg6), mRNA	<i>vtg6</i>	NM_001122610.2	F: AGTGCTGCAGCTAGCTTTGA R: ACTTGGCAGTGACTTTGTGC
Danio rerio vitellogenin 2 (vtg2), transcript variant 2, mRNA	<i>vtg2</i>	NM_001110384.1	F: TGATGGAAGCAACGCAAAGC R: AGTGTCTTTAGTGTGGCGG
Activation-induced cytidine deaminase	<i>aicda</i>	NM_001008403.1	F: TTCTGCAGCCTTGCGAAACT R: CAGCACCATTTCTCTTCATCCC
Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 2a	<i>apobec2a</i>	NM_001013314.2	F: GAAAAGCCCAACAGAAGCGG R: ATGCGATCCCCTGTGATGGT
Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2b	<i>apobec2b</i>	NM_001168463.1	F: TTGTAGGAGACCGAATGAACCC R: TTCGGCATGTGAGCCTGAAT
Thymine-DNA glycosylase	<i>tdg</i>	NM_001020751.1	F: GGAGAATGCTAACACAGCCGA R: AGGAAGAAACCACCAACGCT
Methyl-CpG binding domain protein 1	<i>mbd1</i>	NM_001044753.1	F: TGTTCTAGGGAGAGGGGTT R: ACTTTCACATGAACGGCGA
Methyl-CpG binding domain protein 2	<i>mbd2</i>	NM_212768.1	F: AAATCTGACCTGCAGAGGGC R: TTGCAGAGTGGTTGTGTGGT
Methyl-CpG binding domain protein 3a	<i>mbd3a</i>	NM_212769.1	F: AGCCAGAACAAGGGTAAACCG R: CTCAACAGCTTTCTGGGGGT
Methyl-CpG binding domain protein 3b	<i>mbd3b</i>	NM_212580.1	F: AAAACGACCCACAGGAAAGA R: TGACTGGCTGTTGTTGTCGT
Methyl CpG binding protein 2	<i>mecp2</i>	NM_212736.1	F: TTTACGCAGAGGGATGTCGG R: TCCCTTCTGGGTTGATAAGGT
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	<i>dnmt1</i>	NM_131189.1	F: GGCTTCACTACAGCCTTTGC R: TCCAGCCTCATCGTAGCTCT
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3	<i>dnmt3</i>	NM_131386.1	F: ATTTAGGCGTCGGTTTCGGT R: TCCTCAGCTCTGTTTGCCAG
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	<i>dnmt3b</i>	NM_001020476.1	F: AGGTGCATGTTTTGCCAGC R: CGTTCACAGGAAGTGGCTCT
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha b	<i>dnmt3ab</i>	NM_001018140.1	F: TCAGAATACGAGGATGGCCG R: AAAGTGGCCATCGCCAAACC
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha a	<i>dnmt3aa</i>	NM_001018134.1	F: GCAAAGACCAGCACTACCCT R: AGCAAAGAGGTGGCGAATGA
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 4	<i>dnmt4</i>	NM_001025450.1	F: TCTGTGGGCGATGGATTGTC R: CTCAGCCTTTTCCTCGCTGT
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 5	<i>dnmt5</i>	NM_001020479.1	F: TTTGGGGGAACATACCTGGC R: GGCTGTCATCTTTGCCGTTT
Methylcytosine dioxygenase TET1-like	<i>tet1l</i>	XM_005156709.1	F: TTCCACAACCAAGTGGAGCA R: ACTGCGCGTTATCTTCCTT
Methylcytosine dioxygenase TET2-like	<i>tet2l</i>	XM_005159903.1	F: TAAGCGTGTGTTTACGGGCT R: AGGCTGCCCTTGTTTCAAGT
Tet methylcytosine dioxygenase 3	<i>tet3</i>	NM_001293563.1	F: CCAACCACCAACCTTACCTT R: TTTCAATGCGAACGGCTTCC

## 4. Résultats obtenus sur l'expression des gènes étudiés au cours de la seconde expérience

Tableau récapitulatif de l'expression relative de multiples gènes communs aux tissus étudiés. \* Différence significative relativement aux témoins (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01). † Significativement différent de la valeur mesurée chez les femelles de la même condition d'exposition († p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001).

	Mâles contrôles	Femelles contrôles	Mâles exposés	Femelles exposées
<b>Cerveau</b>				
<i>gpx1a</i>	1,8E-01 ± 7,7E-02	2,1E-01 ± 7,5E-02	1,6E-01 ± 4,3E-02	1,7E-01 ± 1,2E-01
<i>gstp1</i>	4,6E-01 ± 6,9E-02	5,6E-01 ± 6,2E-02	5,2E-01 ± 9,9E-02	5,2E-01 ± 2,7E-01
<i>cat</i>	1,9E-01 ± 3,8E-02	1,4E-01 ± 3,0E-02	1,7E-01 ± 3,0E-02	1,6E-01 ± 3,5E-02
<i>sod1</i>	3,7E-01 ± 5,6E-02	4,0E-01 ± 5,3E-02	5,1E-01 ± 1,6E-01	4,7E-01 ± 1,7E-01
<i>sod2</i>	4,9E-01 ± 4,7E-02	4,1E-01 ± 1,1E-01	6,0E-01 ± 1,1E-01	5,5E-01 ± 2,5E-01
<i>gadd45aa</i>	1,7E-02 ± 3,3E-03	1,7E-02 ± 1,0E-02	1,7E-02 ± 1,0E-02	1,4E-02 ± 6,7E-03
<i>gadd45ab</i>	2,6E-02 ± 2,9E-03	2,1E-02 ± 6,6E-03	2,7E-02 ± 8,3E-03	2,7E-02 ± 7,1E-03
<i>gadd45ba</i>	1,6E-02 ± 4,5E-03	1,5E-02 ± 7,3E-03	1,4E-02 ± 1,7E-03	1,9E-02 ± 8,2E-03
<i>gadd45bb</i>	2,7E-02 ± 6,1E-03	1,9E-02 ± 1,2E-02	1,9E-02 ± 6,3E-03	2,2E-02 ± 1,0E-02
<i>gadd45g</i>	3,1E-02 ± 6,4E-03	2,4E-02 ± 7,1E-03	3,1E-02 ± 8,4E-03	3,2E-02 ± 1,4E-02
<i>rad51</i>	5,1E-02 ± 1,8E-02	4,3E-02 ± 2,1E-02	7,2E-02 ± 2,0E-02	4,2E-02 ± 1,5E-02
<i>jun</i>	4,2E-02 ± 1,0E-02	2,9E-02 ± 7,2E-03	5,0E-02 ± 1,6E-02	3,7E-02 ± 1,2E-02
<i>baxa</i>	2,6E-02 ± 4,6E-03	3,1E-02 ± 8,4E-03	3,3E-02 ± 5,0E-03	2,6E-02 ± 9,6E-03
<i>vtg6</i>	9,3E-03 ± 4,3E-03	1,5E-02 ± 7,0E-03	1,1E-02 ± 4,0E-03	1,3E-02 ± 1,2E-02
<i>vtg2</i>	1,5E-02 ± 4,3E-03	1,4E-02 ± 6,8E-03	1,7E-02 ± 6,3E-03	2,1E-02 ± 1,0E-02
<b>Gonades</b>				
<i>gpx1a</i>	5,1E-02 ± 1,2E-02	2,7E-02 ± 2,5E-02	4,9E-02 ± 8,4E-03 ††	1,3E-02 ± 6,8E-03
<i>gstp1</i>	1,7E-01 ± 6,7E-02	4,5E-01 ± 4,6E-01	2,4E-01 ± 5,0E-02	1,2E-01 ± 3,9E-02
<i>cat</i>	5,7E-02 ± 1,4E-02	4,4E-02 ± 2,1E-02	6,3E-02 ± 1,1E-02	6,3E-02 ± 1,5E-02
<i>sod1</i>	3,0E-01 ± 7,9E-02	1,7E-01 ± 1,9E-01	4,4E-01 ± 1,0E-01 †††*	5,1E-02 ± 1,6E-02
<i>sod2</i>	1,5E-01 ± 1,5E-02	8,1E-02 ± 5,4E-02	1,8E-01 ± 5,4E-02 †††	4,8E-02 ± 2,2E-02
<i>gadd45aa</i>	7,9E-03 ± 2,1E-03 †††	2,0E-03 ± 2,3E-03	1,0E-02 ± 2,2E-03 ††††	4,7E-04 ± 3,5E-04
<i>gadd45ab</i>	7,5E-02 ± 3,6E-02	3,6E-02 ± 4,0E-02	1,1E-01 ± 1,8E-02 ††††	6,8E-03 ± 3,5E-03
<i>gadd45ba</i>	3,2E-03 ± 1,1E-03 ††††	5,6E-04 ± 2,4E-04	2,4E-03 ± 6,9E-04 †††	7,1E-04 ± 4,0E-04
<i>gadd45bb</i>	8,9E-03 ± 2,3E-03 †	1,3E-03 ± 3,1E-04	6,2E-03 ± 9,5E-04 †††*	1,4E-03 ± 6,1E-04
<i>gadd45g</i>	1,8E-03 ± 6,7E-04 ††††	5,0E-03 ± 1,3E-03	2,5E-03 ± 5,3E-04	3,9E-03 ± 1,1E-03
<i>rad51</i>	9,8E-02 ± 4,5E-02 †††	3,0E-02 ± 2,2E-02	1,4E-01 ± 2,4E-02 †††	1,3E-02 ± 1,7E-03
<i>jun</i>	8,0E-03 ± 2,1E-03	3,5E-03 ± 4,8E-03	1,1E-02 ± 2,3E-03 †††	1,1E-03 ± 3,7E-04
<i>baxa</i>	2,2E-02 ± 4,9E-03 ††††	7,9E-03 ± 2,2E-03	3,2E-02 ± 5,6E-03 ††††**	5,6E-03 ± 9,7E-04
<i>vtg6</i>	5,2E-03 ± 2,3E-03	1,3E-02 ± 2,3E-02	4,7E-03 ± 1,9E-03	1,2E+00 ± 1,0E+00 †††*
<i>vtg2</i>	4,2E-03 ± 1,2E-03	4,2E-03 ± 3,5E-03	5,8E-03 ± 5,8E-04	1,6E-02 ± 1,3E-02
<b>Yeux</b>				
<i>gpx1a</i>	8,2E-02 ± 4,0E-02	1,1E-01 ± 6,0E-02	6,4E-02 ± 1,9E-02	7,9E-02 ± 3,0E-02
<i>gstp1</i>	3,0E-01 ± 1,5E-01	3,4E-01 ± 9,5E-02	3,6E-01 ± 9,6E-02	3,0E-01 ± 4,3E-02
<i>cat</i>	2,3E-02 ± 6,4E-03	2,9E-02 ± 7,7E-03	2,5E-02 ± 4,6E-03	3,1E-02 ± 4,7E-03
<i>sod1</i>	1,5E-01 ± 5,3E-02	1,9E-01 ± 3,2E-02	1,8E-01 ± 3,8E-02	1,5E-01 ± 1,5E-02
<i>sod2</i>	1,6E-01 ± 7,2E-02	1,7E-01 ± 2,6E-02	1,8E-01 ± 4,4E-02	1,8E-01 ± 2,7E-02
<i>gadd45aa</i>	1,5E-02 ± 5,1E-03	1,8E-02 ± 3,8E-03	1,7E-02 ± 3,3E-03	1,7E-02 ± 2,2E-03
<i>gadd45ab</i>	1,2E-02 ± 6,0E-03	1,1E-02 ± 4,0E-03	1,5E-02 ± 3,1E-03	1,1E-02 ± 2,6E-03
<i>gadd45ba</i>	1,4E-02 ± 6,5E-03	1,3E-02 ± 9,5E-03	6,0E-03 ± 1,9E-03	9,7E-03 ± 4,5E-03
<i>gadd45bb</i>	2,3E-02 ± 1,1E-02	2,6E-02 ± 2,1E-02	1,1E-02 ± 3,6E-03	1,7E-02 ± 5,7E-03
<i>gadd45g</i>	1,2E-02 ± 7,9E-03	2,1E-02 ± 7,8E-03	7,5E-03 ± 2,6E-03	9,6E-03 ± 2,1E-03 *
<i>rad51</i>	8,8E-03 ± 5,3E-03	9,9E-03 ± 6,2E-03	1,6E-02 ± 2,4E-03	9,9E-03 ± 2,3E-03
<i>jun</i>	1,1E-02 ± 3,6E-03	1,2E-02 ± 3,9E-03	1,1E-02 ± 1,4E-03	1,2E-02 ± 4,0E-03
<i>baxa</i>	5,6E-03 ± 1,2E-03 †	8,1E-03 ± 1,1E-03	8,6E-03 ± 7,7E-04 **	7,3E-03 ± 1,6E-03
<i>vtg6</i>	2,6E-03 ± 8,8E-04	4,5E-03 ± 1,6E-03	2,6E-03 ± 1,0E-03	3,5E-03 ± 3,1E-03
<i>vtg2</i>	6,1E-03 ± 2,5E-03	6,2E-03 ± 1,6E-03	5,7E-03 ± 1,5E-03	6,3E-03 ± 1,2E-03

## Annexes 4

Expression différentielle des gènes chez les mâles (rouge) ou chez les organismes exposés (bleu).

	<u>Mâles contrôles</u>	<u>Femelles contrôles</u>	<u>Mâles exposés</u>	<u>Femelles exposées</u>
<u>Cerveau</u>				
<i>gpx1a</i>				
<i>gstp1</i>				
<i>cat</i>				
<i>sod1</i>				
<i>sod2</i>				
<i>gadd45aa</i>				
<i>gadd45ab</i>				
<i>gadd45ba</i>				
<i>gadd45bb</i>				
<i>gadd45g</i>				
<i>rad51</i>				
<i>jun</i>				
<i>baxa</i>				
<i>vtg6</i>				
<i>vtg2</i>				
<u>Gonades</u>				
<i>gpx1a</i>			3,6	
<i>gstp1</i>				
<i>cat</i>				
<i>sod1</i>			1,5	8,8
<i>sod2</i>				3,8
<i>gadd45aa</i>	3,9			21,0
<i>gadd45ab</i>				16,4
<i>gadd45ba</i>	5,6			3,4
<i>gadd45bb</i>	7,0		0,7	4,5
<i>gadd45g</i>	0,4			
<i>rad51</i>	3,3			11,0
<i>jun</i>				10,1
<i>baxa</i>	2,8		1,5	5,7
<i>vtg6</i>				258,3
<i>vtg2</i>				91,7
<u>Yeux</u>				
<i>gpx1a</i>				
<i>gstp1</i>				
<i>cat</i>				
<i>sod1</i>				
<i>sod2</i>				
<i>gadd45aa</i>				
<i>gadd45ab</i>				
<i>gadd45ba</i>				
<i>gadd45bb</i>				
<i>gadd45g</i>				0,5
<i>rad51</i>				
<i>jun</i>				
<i>baxa</i>	0,7		1,5	
<i>vtg6</i>				
<i>vtg2</i>				

## Annexes 4

Tableau récapitulatif de l'expression relative de multiples gènes impliqués dans la fonction de méthylation. \* Différence significative relativement aux témoins (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01). x Significativement différent de la valeur mesurée chez les femelles de la même condition d'exposition (x p < 0,05; xxx p < 0,01; xxxp p < 0,001).

	Mâles contrôles	Femelles contrôles	Mâles exposés	Femelles exposées
<b>Cerveau</b>				
<i>aicda</i>	1,8E-03 ± 2,9E-04	1,1E-03 ± 4,5E-04	1,6E-03 ± 4,4E-04	1,3E-03 ± 3,3E-04
<i>apobec2a</i>	1,3E-02 ± 2,3E-03	1,0E-02 ± 4,0E-03	1,5E-02 ± 3,1E-03	1,2E-02 ± 5,3E-03
<i>apobec2b</i>	1,8E-02 ± 6,3E-03	1,5E-02 ± 2,9E-03	2,2E-02 ± 5,1E-03	1,7E-02 ± 5,7E-03
<i>tdg</i>	1,8E-02 ± 8,8E-03	1,4E-02 ± 2,8E-03	2,6E-02 ± 7,6E-03	1,9E-02 ± 7,3E-03
<i>mbd1</i>	2,3E-02 ± 1,9E-03	2,5E-02 ± 6,8E-03	3,2E-02 ± 5,8E-03	2,8E-02 ± 7,7E-03
<i>mbd2</i>	4,1E-02 ± 8,2E-03	2,9E-02 ± 8,8E-03	4,2E-02 ± 1,2E-02	3,1E-02 ± 1,2E-02
<i>mbd3a</i>	1,3E-02 ± 3,4E-03	9,5E-03 ± 1,7E-03	1,3E-02 ± 5,6E-03	7,5E-03 ± 3,4E-03
<i>mbd3b</i>	8,3E-02 ± 2,2E-02	5,8E-02 ± 1,6E-02	1,0E-01 ± 3,8E-02	1,1E-01 ± 3,6E-02
<i>mecp2</i>	3,6E-02 ± 8,8E-03	2,0E-02 ± 9,4E-03	2,4E-02 ± 1,3E-02	3,0E-02 ± 1,3E-02
<i>dnmt1</i>	1,4E-02 ± 2,7E-03	1,1E-02 ± 5,0E-03	1,0E-02 ± 3,5E-03	8,7E-03 ± 4,6E-03
<i>dnmt3</i>	1,0E-02 ± 2,2E-03	8,9E-03 ± 3,8E-03	9,6E-03 ± 2,5E-03	8,6E-03 ± 3,4E-03
<i>dnmt3b</i>	1,7E-02 ± 4,1E-03	1,6E-02 ± 7,5E-03	1,4E-02 ± 3,3E-03	1,4E-02 ± 7,6E-03
<i>dnmt3ab</i>	9,6E-02 ± 2,5E-02	8,6E-02 ± 3,0E-02	9,1E-02 ± 3,3E-02	9,6E-02 ± 3,4E-02
<i>dnmt3aa</i>	6,9E-02 ± 2,6E-02	4,8E-02 ± 1,2E-02	4,8E-02 ± 2,1E-02	4,0E-02 ± 1,7E-02
<i>dnmt4</i>	8,5E-03 ± 9,7E-04	7,6E-03 ± 3,0E-03	7,8E-03 ± 2,1E-03	6,9E-03 ± 2,5E-03
<i>dnmt5</i>	9,9E-02 ± 1,0E-02	1,0E-01 ± 4,7E-02	1,1E-01 ± 4,2E-02	8,9E-02 ± 4,0E-02
<i>tet1l</i>	7,9E-03 ± 2,5E-03	5,7E-03 ± 1,8E-03	7,3E-03 ± 2,9E-03	5,1E-03 ± 1,9E-03
<i>tet2l</i>	1,4E-03 ± 6,0E-04	8,6E-04 ± 3,4E-04	1,1E-03 ± 2,8E-04	8,7E-04 ± 6,2E-04
<i>tet3</i>	3,8E-03 ± 5,0E-04	2,9E-03 ± 1,4E-03	3,9E-03 ± 1,5E-03	2,7E-03 ± 1,3E-03
<b>Gonades</b>				
<i>aicda</i>	7,8E-04 ± 3,1E-04 x	2,0E-04 ± 2,0E-04	7,0E-04 ± 3,4E-04 xxx	1,1E-04 ± 3,4E-05
<i>apobec2a</i>	4,4E-03 ± 1,7E-03	2,0E-03 ± 1,7E-03	5,2E-03 ± 7,4E-04 xxx	9,7E-04 ± 3,3E-04
<i>apobec2b</i>	9,7E-03 ± 2,5E-03	5,9E-03 ± 4,6E-03	9,9E-03 ± 2,6E-03 x	3,9E-03 ± 1,5E-03
<i>tdg</i>	1,0E-02 ± 4,5E-03	4,8E-03 ± 3,8E-03	1,3E-02 ± 2,0E-03 xxx	1,5E-03 ± 8,0E-04
<i>mbd1</i>	2,3E-02 ± 7,3E-03 x	9,2E-03 ± 5,8E-03	2,9E-02 ± 1,1E-02 xxx	1,1E-02 ± 2,0E-03
<i>mbd2</i>	3,1E-02 ± 1,5E-02 xxx	1,0E-02 ± 7,1E-03	4,6E-02 ± 9,1E-03 xxx	4,7E-03 ± 1,9E-03
<i>mbd3a</i>	1,0E-02 ± 2,8E-03	4,8E-03 ± 2,2E-03	1,3E-02 ± 3,3E-03 xxx,*	5,1E-03 ± 1,6E-03
<i>mbd3b</i>	4,2E-02 ± 1,8E-02 xxx	3,6E-03 ± 1,5E-03	6,5E-02 ± 1,3E-02 xxx	1,7E-03 ± 6,9E-04 *
<i>mecp2</i>	4,3E-03 ± 1,3E-03 xxx	4,6E-04 ± 1,9E-04	6,5E-03 ± 9,1E-04 xxx,**	6,2E-04 ± 8,3E-05
<i>dnmt1</i>	1,5E-02 ± 4,7E-03	1,7E-02 ± 1,3E-02	1,5E-02 ± 3,9E-03	2,0E-02 ± 3,4E-03
<i>dnmt3</i>	2,6E-02 ± 6,9E-03 x	1,1E-02 ± 5,5E-03	3,6E-02 ± 9,5E-03 xxx	1,2E-02 ± 2,1E-03
<i>dnmt3b</i>	8,4E-03 ± 3,6E-03	3,8E-03 ± 2,6E-03	1,1E-02 ± 3,3E-03 xxx	1,8E-03 ± 4,6E-04
<i>dnmt3ab</i>	1,2E-02 ± 4,2E-03 xxx	2,9E-03 ± 2,7E-03	1,6E-02 ± 4,7E-03 xxx	1,6E-03 ± 5,0E-04
<i>dnmt3aa</i>	5,0E-03 ± 2,9E-03 x	6,0E-04 ± 3,8E-04	7,5E-03 ± 1,3E-03 x	4,2E-04 ± 1,3E-04
<i>dnmt4</i>	2,9E-03 ± 1,1E-03 xxx	8,8E-04 ± 3,6E-04	2,8E-03 ± 4,9E-04 xxx	8,8E-04 ± 3,5E-04
<i>dnmt5</i>	1,2E-01 ± 3,8E-02 xxx	2,0E-02 ± 6,9E-03	1,3E-01 ± 3,4E-02 xxx	1,9E-02 ± 4,6E-03
<i>tet1l</i>	1,1E-03 ± 2,6E-04 xxx	2,0E-04 ± 1,4E-04	1,4E-03 ± 2,7E-04 xxx	1,5E-04 ± 6,1E-05
<i>tet2l</i>	1,8E-04 ± 3,7E-05	2,2E-04 ± 4,4E-04	1,5E-04 ± 3,9E-05 xxx	2,6E-05 ± 1,0E-05
<i>tet3</i>	1,8E-03 ± 1,0E-03	8,1E-04 ± 1,3E-03	1,4E-03 ± 7,4E-04 x	2,3E-04 ± 9,5E-05
<b>Yeux</b>				
<i>aicda</i>	4,3E-04 ± 3,2E-04	4,6E-04 ± 2,0E-04	5,9E-04 ± 7,7E-05	7,0E-04 ± 2,7E-04
<i>apobec2a</i>	2,8E-03 ± 2,0E-03	2,7E-03 ± 1,8E-03	3,5E-03 ± 8,3E-04	3,0E-03 ± 9,1E-04
<i>apobec2b</i>	7,1E-03 ± 2,4E-03	1,1E-02 ± 5,0E-03	1,0E-02 ± 3,4E-03	8,3E-03 ± 2,0E-03
<i>tdg</i>	5,5E-03 ± 4,3E-03	6,3E-03 ± 1,2E-03	7,7E-03 ± 2,4E-03	7,0E-03 ± 1,8E-03
<i>mbd1</i>	8,3E-03 ± 4,0E-03	9,1E-03 ± 2,9E-03	9,4E-03 ± 3,4E-03	1,0E-02 ± 2,0E-03
<i>mbd2</i>	1,6E-02 ± 7,0E-03	1,9E-02 ± 5,6E-03	1,9E-02 ± 4,2E-03	2,0E-02 ± 1,9E-03
<i>mbd3a</i>	9,5E-03 ± 3,9E-03	1,1E-02 ± 3,0E-03	1,1E-02 ± 2,7E-03	1,1E-02 ± 3,0E-03
<i>mbd3b</i>	1,6E-02 ± 6,6E-03	2,0E-02 ± 6,1E-03	1,9E-02 ± 5,3E-03	2,2E-02 ± 3,6E-03
<i>mecp2</i>	6,3E-03 ± 2,1E-03	7,6E-03 ± 8,8E-04	7,2E-03 ± 1,4E-03	8,1E-03 ± 1,2E-03
<i>dnmt1</i>	2,7E-03 ± 6,9E-04	3,5E-03 ± 1,4E-03	2,5E-03 ± 9,0E-04	2,2E-03 ± 3,9E-04
<i>dnmt3</i>	2,8E-03 ± 1,2E-03	3,1E-03 ± 8,4E-04	2,9E-03 ± 8,8E-04	3,6E-03 ± 7,2E-04
<i>dnmt3b</i>	5,5E-03 ± 2,2E-03	6,2E-03 ± 2,8E-03	5,6E-03 ± 9,6E-04	5,7E-03 ± 5,8E-04
<i>dnmt3ab</i>	1,8E-02 ± 7,7E-03	2,1E-02 ± 7,6E-03	2,0E-02 ± 6,2E-03	2,2E-02 ± 2,0E-03
<i>dnmt3aa</i>	4,7E-03 ± 2,1E-03	4,4E-03 ± 1,8E-03	5,0E-03 ± 2,0E-03	4,9E-03 ± 2,4E-03
<i>dnmt4</i>	1,6E-03 ± 8,3E-04	1,9E-03 ± 2,1E-04	1,7E-03 ± 5,7E-04	1,5E-03 ± 6,3E-04
<i>dnmt5</i>	3,9E-02 ± 1,4E-02	3,7E-02 ± 1,7E-02	4,3E-02 ± 1,1E-02	4,7E-02 ± 1,8E-02
<i>tet1l</i>	2,0E-03 ± 7,9E-04	2,4E-03 ± 1,0E-03	2,6E-03 ± 6,0E-04	2,5E-03 ± 4,0E-04
<i>tet2l</i>	2,8E-04 ± 5,7E-05	3,3E-04 ± 2,2E-04	3,1E-04 ± 6,8E-05	3,1E-04 ± 9,7E-05
<i>tet3</i>	1,4E-03 ± 8,8E-04	1,1E-03 ± 2,0E-04	1,3E-03 ± 6,4E-04	1,2E-03 ± 4,0E-04

## Annexes 4

Expression différentielle des gènes chez les mâles (rouge) ou chez les organismes exposés (bleu).

	<u>Mâles contrôles</u>	<u>Femelles contrôles</u>	<u>Mâles exposés</u>	<u>Femelles exposées</u>
<u>Cerveau</u>				
<i>aicda</i>				
<i>apobec2a</i>				
<i>apobec2b</i>				
<i>tdg</i>				1,3
<i>mbd1</i>			1,4	
<i>mbd2</i>				
<i>mbd3a</i>				
<i>mbd3b</i>				1,8
<i>mecp2</i>				
<i>dnmt1</i>				
<i>dnmt3</i>				
<i>dnmt3b</i>				
<i>dnmt3ab</i>				
<i>dnmt3aa</i>				
<i>dnmt4</i>				
<i>dnmt5</i>				
<i>tet1l</i>				
<i>tet2l</i>				
<i>tet3</i>				
<u>Gonades</u>				
<i>aicda</i>	3,9		6,2	
<i>apobec2a</i>	2,2		5,4	
<i>apobec2b</i>	1,7		2,5	
<i>tdg</i>	2,1		8,8	0,3
<i>mbd1</i>	2,5		2,6	
<i>mbd2</i>	3,0		1,5 9,8	
<i>mbd3a</i>	2,1		2,7	
<i>mbd3b</i>	11,7		1,6 38,9	0,5
<i>mecp2</i>	9,5		1,5 10,5	
<i>dnmt1</i>				
<i>dnmt3</i>	2,3		2,9	
<i>dnmt3b</i>	2,2		6,3	
<i>dnmt3ab</i>	4,0		10,2	
<i>dnmt3aa</i>	8,3		17,9	
<i>dnmt4</i>	3,2		3,1	
<i>dnmt5</i>	5,9		7,0	
<i>tet1l</i>	5,5		9,7	
<i>tet2l</i>			5,5	
<i>tet3</i>			6,2	
<u>Yeux</u>				
<i>aicda</i>				
<i>apobec2a</i>				
<i>apobec2b</i>				
<i>tdg</i>				
<i>mbd1</i>				
<i>mbd2</i>				
<i>mbd3a</i>				
<i>mbd3b</i>				
<i>mecp2</i>				
<i>dnmt1</i>				
<i>dnmt3</i>				
<i>dnmt3b</i>				
<i>dnmt3ab</i>				
<i>dnmt3aa</i>				
<i>dnmt4</i>				
<i>dnmt5</i>				
<i>tet1l</i>				
<i>tet2l</i>				
<i>tet3</i>				

## Annexes 4

Tableau récapitulatif de l'expression relative de multiples gènes liés à la fonction des tissus étudiés. FS Femelles spécifiques. MS Mâles spécifiques. \* Différence significative relativement aux témoins (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).  $\alpha$  Significativement différent de la valeur mesurée chez les femelles de la même condition d'exposition ( $\alpha$  p < 0,05;  $\alpha\alpha$  p < 0,01;  $\alpha\alpha\alpha$  p < 0,001).

	Mâles contrôles		Femelles contrôles		Mâles exposés		Femelles exposées	
<b>Cerveau</b>								
<i>cyp19a1b</i>	1,9E-01	± 5,1E-02	2,2E-01	± 1,9E-01	2,1E-01	± 2,9E-02	1,4E-01	± 7,0E-02
<i>ar</i>	2,3E-01	± 6,1E-02	2,4E-01	± 1,8E-01	2,6E-01	± 8,2E-02	1,8E-01	± 6,5E-02
<i>esr1</i>	9,6E-02	± 3,3E-02	9,4E-02	± 8,4E-02	9,8E-02	± 4,2E-02	8,9E-02	± 5,4E-02
<i>fshb</i>	1,7E-02	± 1,0E-02	2,6E-02	± 1,7E-02	1,1E-01	± 3,5E-02	1,3E-01	± 5,4E-02
<i>lhb</i>	2,5E-03	± 1,9E-03	6,9E-03	± 1,1E-02	3,7E-03	± 8,4E-04	7,9E-02	± 9,7E-02
<i>appa</i>	7,5E-02	± 5,1E-02	1,4E-01	± 1,7E-01	1,4E-01	± 4,6E-02	7,1E-02	± 5,9E-02
<i>gfap</i>	6,5E-02	± 5,0E-02	5,7E-02	± 3,6E-02	3,3E-02	± 1,1E-02	6,9E-02	± 4,4E-02
<i>ache</i>	3,4E-01	± 1,2E-01	2,1E-01	± 1,7E-01	2,0E-01	± 8,2E-02	1,3E-01	± 6,4E-02
<i>chata</i>	8,1E-02	± 1,4E-02	6,0E-02	± 5,1E-02	6,8E-02	± 4,8E-02	8,2E-02	± 3,4E-02
<b>Gonades</b>								
<i>star</i>	3,6E-01	± 1,7E-01	$\alpha\alpha\alpha$ 2,5E-03	± 2,7E-03	3,0E-01	± 1,2E-01	$\alpha\alpha\alpha$ 6,0E-04	± 1,4E-04
<i>fshr</i>	1,1E-02	± 5,1E-03	$\alpha\alpha\alpha$ 8,8E-04	± 6,9E-04	9,0E-03	± 4,3E-03	$\alpha\alpha\alpha$ 6,2E-04	± 1,9E-04
<i>cyp11a1</i>	2,0E-02	± 1,2E-02	$\alpha$ 1,1E-01	± 1,4E-01	2,1E-02	± 7,1E-03	$\alpha$ 4,0E-02	± 2,2E-02
<i>cyp19a1a</i>	7,1E-03	± 3,8E-03	6,1E-03	± 5,9E-03	6,2E-03	± 2,1E-03	$\alpha$ 3,5E-03	± 1,7E-03
<i>piwil1</i>	4,6E-01	± 1,1E-01	$\alpha\alpha\alpha$ 7,1E-03	± 3,0E-03	4,9E-01	± 7,5E-02	$\alpha\alpha\alpha$ 7,5E-03	± 3,3E-03
<i>ddx4</i>	1,0E-01	± 2,1E-02	$\alpha\alpha\alpha$ 1,7E-02	± 1,7E-02	1,1E-01	± 4,8E-02	$\alpha\alpha\alpha$ 2,0E-02	± 1,4E-02
<i>sycp3</i>	4,6E-01	± 1,9E-01	MS	± MS	5,3E-01	± 1,7E-01	MS	± MS
<i>zbtb16a</i>	2,0E-02	± 6,0E-03	MS	± MS	2,6E-02	± 2,3E-02	MS	± MS
<i>ccnb3</i>	2,5E-01	± 8,2E-02	MS	± MS	3,2E-01	± 1,4E-01	MS	± MS
<i>amh</i>	1,7E-01	± 6,7E-02	MS	± MS	9,6E-02	± 3,5E-02	MS	± MS
<i>sox9a</i>	2,8E-03	± 7,1E-04	MS	± MS	2,2E-03	± 7,6E-04	MS	± MS
<i>lhcgr</i>	FS	± FS	9,1E-03	± 1,1E-02	FS	± FS	5,1E-03	± 3,0E-03
<i>tgfb1a</i>	FS	± FS	6,5E-03	± 4,0E-03	FS	± FS	2,9E-03	± 1,4E-03
<i>gdf9</i>	FS	± FS	2,5E-03	± 1,1E-03	FS	± FS	3,0E-03	± 7,0E-04
<i>pou5f1</i>	FS	± FS	3,5E-02	± 2,4E-02	FS	± FS	3,8E-02	± 6,9E-03
<b>Yeux</b>								
<i>gc2</i>	3,1E-02	± 7,4E-03	3,4E-02	± 1,1E-02	3,4E-02	± 1,0E-02	3,1E-02	± 4,2E-03
<i>gucy2f</i>	1,5E-02	± 5,8E-03	1,8E-02	± 7,1E-03	1,6E-02	± 2,1E-03	1,4E-02	± 3,3E-03
<i>gc3</i>	1,4E-01	± 5,8E-02	1,8E-01	± 2,1E-02	1,3E-01	± 3,7E-02	1,5E-01	± 5,1E-02
<i>tyr</i>	3,1E-03	± 9,5E-04	5,2E-03	± 3,9E-03	5,9E-03	± 1,3E-03	6,3E-03	± 1,2E-03
<i>lhx2b</i>	8,0E-03	± 2,4E-03	8,8E-03	± 2,7E-03	1,0E-02	± 2,1E-03	1,1E-02	± 1,6E-03
<i>lamb1a</i>	5,4E-02	± 6,3E-02	4,7E-02	± 3,4E-02	6,1E-02	± 5,4E-02	6,1E-02	± 5,4E-02
<i>lamc1</i>	5,8E-02	± 1,5E-02	5,3E-02	± 1,7E-02	8,2E-02	± 2,9E-02	1,1E-01	± 3,4E-02
<i>pdhb</i>	1,1E-01	± 3,7E-02	9,0E-02	± 1,0E-02	1,3E-01	± 3,7E-02	9,5E-02	± 2,4E-02

## Annexes 4

Expression différentielle des gènes chez les mâles (rouge) ou chez les organismes exposés (bleu).

	<u>Mâles contrôles</u>	<u>Femelles contrôles</u>	<u>Mâles exposés</u>	<u>Femelles exposées</u>
<u>Cerveau</u>				
<i>cyp19a1b</i>				
<i>ar</i>				
<i>esr1</i>				
<i>fshb</i>			6,3	4,9
<i>lhb</i>				
<i>appa</i>				
<i>gfap</i>				
<i>ache</i>				
<i>chata</i>				
<u>Gonades</u>				
<i>star</i>	145,2		503,9	
<i>fshr</i>	12,1		14,5	
<i>cyp11a1</i>	0,2		0,5	
<i>cyp19a1a</i>			1,8	
<i>piwil1</i>	64,6		65,5	
<i>cdx4</i>	6,0		5,5	
<i>sycp3</i>				
<i>zbtb16a</i>				
<i>ccnb3</i>				
<i>amh</i>			0,5	
<i>sox9a</i>				
<i>lhgr</i>				
<i>tgfb1a</i>				
<i>gdf9</i>				
<i>pou5f1</i>				
<u>Yeux</u>				
<i>gc2</i>				
<i>gucy2f</i>				
<i>gc3</i>				
<i>tyr</i>			1,9	
<i>lhx2b</i>				
<i>lamb1a</i>				
<i>lamc1</i>				2,0
<i>pdhb</i>				

## RESUME

Ce travail s'intègre dans le cadre du programme européen COMET (7ième PCRD EURATOM) et vise à évaluer les réponses épigénétiques, et particulièrement la méthylation de l'ADN, lors d'expositions chroniques à de faibles niveaux de substances radioactives, dans deux contextes particulièrement représentatifs des problématiques en radioécologie (e.g. sites miniers uranifères et contexte post-accidentel à Fukushima).

Lors d'une première expérience, les poissons zèbres (*Danio rerio*) ont été exposés au laboratoire à des concentrations environnementales d'uranium appauvri : 2 et 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Cette expérimentation a permis de mettre en évidence un impact sur la méthylation de l'ADN génomique, majoritairement chez les mâles exposés, et croissant avec la durée et le niveau d'exposition. Lors d'une seconde expérience, nous avons observé un impact sur les profils de méthylation de la descendance issue de parents exposés, ainsi qu'une perturbation du statut transcriptomique (e.g. processus épigénétiques, signalisation et réparation des dommages à l'ADN, embryogénèse) et des dommages histologiques dans le muscle squelettique des larves issues de parents exposés.

Les outils développés ont pu être appliqués à la seconde problématique qui s'intéresse à l'étude des effets biologiques induits par les radionucléides émis lors de l'accident de la centrale nucléaire de Fukushima Daiichi. Les analyses réalisées sur la grenouille arboricole Japonaise (*Hyla japonica*) ont révélé une corrélation positive entre la dose totale de radioactivité absorbée par ces grenouilles (corrélée au  $^{137}\text{Cs}$  internalisé), l'hyperméthylation de l'ADN génomique ainsi que l'augmentation des dommages à l'ADN mitochondrial.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence la sensibilité des réponses épigénétiques chez différents organismes soumis à de faibles doses de radionucléides. Outre cette sensibilité, ces effets épigénétiques sont stables dans le temps et sont impliqués dans le transfert parental de la toxicité de l'uranium appauvri. A ce titre, les marques épigénétiques pourraient permettre de mieux caractériser les mécanismes d'adaptation et les potentiels effets transgénérationnels induits par les radionucléides.

Mots-clés: poisson zèbre *Danio rerio*, uranium, méthylation de l'ADN, transcriptomique, transfert générationnel, radionucléides, débit de dose, *Hyla japonica*.

## ABSTRACT

This work integrates within the general framework of the European program COMET (7th Framework Programme EURATOM) and aims to assess the epigenetic responses, and particularly DNA methylation, during chronic exposure to low levels of radioactive materials within two particularly representative contexts of radioecological issues (i.e. uranium mining area and Fukushima post-accidental context).

During a first experiment, zebrafish (*Danio rerio*) were exposed in laboratory controlled conditions to environmentally relevant concentrations of depleted uranium: 2 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . This experiment allowed an impact on the genomic DNA methylation to be demonstrated, mainly in exposed males, which increased with the duration and level of exposure. In a second experiment, we observed an impact on DNA methylation patterns in the progeny of exposed parents, as well as a perturbation of transcriptomic (i.e. epigenetic processes, DNA damage signaling and repair pathways, embryogenesis) and histological damage in larvae skeletal muscle from exposed parents.

The methods developed were applied to the second context focusing on the study of biological effects induced by radionuclides emitted following the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident. The analyses performed on the Japanese tree frog (*Hyla japonica*) revealed a positive correlation between the total dose of radiation absorbed by these frogs (correlated to  $^{137}\text{Cs}$  accumulation), hypermethylation of genomic DNA as well as increasing damage to mitochondrial DNA.

This work highlighted the sensitivity of epigenetic responses in different biological models exposed to low levels of radionuclides. Additionally, these epigenetic modifications are stable over the time and involved in the transfer of the parental toxicity of depleted uranium. As such, the epigenetic marks could be used to further characterize adaptation mechanisms and potential transgenerational effects induced by radionuclides.

Key words: zebrafish *Danio rerio*, uranium, DNA methylation, transcriptomic, generational transfer, radionuclides, dose rate, *Hyla japonica*.