



# Etude des effets de l'eau tritiée sur les stades de développement précoces chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) : caractérisation des modes d'action

Caroline Arcanjo

Octobre 2018

N° ISRN/IRSN-2018/212

Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides



# UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement (ED251)

IRSN/Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO)

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Environnement et Santé

Caroline Arcanjo

Etude des effets de l'eau tritiée sur les stades de  
développement précoces chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) :  
caractérisation des modes d'action

Study of tritiated water effects on zebrafish (*Danio rerio*) early life  
stages: characterization of modes of action

Soutenue le 30/10/2018 devant le jury composé de :

Dr. Xavier COUSIN	Inra/Ifremer - l'Houmeau	Rapporteur
Pr. Awadhesh JHA	Université de Plymouth	Rapporteur
Pr. Rémi CHAPPAZ	Université Aix-Marseille	Examinateur
Dr. Davide DEGLI-ESPOSTI	Irstea - Villeurbanne	Examinateur
Dr. Christine GRANOTIER	CEA - Paris-Saclay	Examinatrice
Pr. Christelle ADAM-GUILLERMIN	IRSN - Cadarache	Directrice de thèse

Membre invité :

Dr. Béatrice GAGNAIRE	IRSN - Cadarache	Tutrice de thèse
-----------------------	------------------	------------------



# Remerciements

---

Je tiens dans un premier temps à remercier l'IRSN et EDF pour avoir financé ces travaux de thèse. Merci également à François Paquet, chef du SRTE pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de ce projet de thèse.

Je remercie également Christelle Adam-Guillermin et Béatrice Gagnaire pour leur encadrement. Christelle, d'abord merci de m'avoir accueilli au sein du LECO. Merci pour ta disponibilité, car en tant que chef de labo ce n'est pas toujours facile, et merci de m'avoir apporté le recul nécessaire sur mes données. Béatrice, merci beaucoup pour ton soutien sans faille qui m'a beaucoup aidé dans des moments un peu difficiles et merci de ta disponibilité pendant ces trois ans. Merci également de votre confiance, de m'avoir laissé libre dans mes choix tout au long de cette thèse.

Je remercie maintenant les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci à Xavier Cousin et Awadhesh Jha pour leur travail de rapporteur. Je remercie également Rémi Chappaz, Davide Degli-Esposti ainsi que Christine Granotier d'avoir été présent dans ce jury de thèse.

Je tiens bien sûr à remercier toutes les personnes du LECO, du L2BT et du LRTA pour leur accueil sur le site de Cadarache. Je remercie plus particulièrement toutes les personnes de l'équipe « zebrafish » pour leur implication. Isabelle Cavalié et Virginie Camilleri, merci pour votre bonne humeur lors des manip tritium. Merci également de m'avoir formé à la manipulation en BAG et à l'élevage. Merci également pour tout le travail que vous avez fourni du début à la toute fin de cette thèse, je sais que ça n'a pas toujours été facile. Un grand merci également à Olivier Armant qui m'a été d'une aide précieuse non seulement pour les manip de laboratoires, mais également pour les analyses transcriptomiques et l'interprétation des données. Merci d'avoir toujours pris sur ton temps pour m'aider. Je tiens également à remercier Olivier Simon d'avoir suivi mon travail avec attention, merci pour ton aide surtout en première année. Je remercie également Magali Floriani pour son travail de microscopie, tant au MET que sur les coupes histologiques sur ces petits organismes. Je tiens également à remercier Daniel Orjollet et Loïc Carasco du L2BT pour les analyses métrologiques tant sur le

tritium que sur l'hydrogène. Un grand merci également à Claire Della-Vedova pour son aide précieuse avec les statistiques. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et surtout ta disponibilité.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon comité de pilotage. Plus particulièrement Denis Maro qui a suivi mon travail de près et qui m'a beaucoup aidé pour la partie internalisation de cette thèse. Merci pour ta disponibilité et ta réactivité tout au long de ces trois ans. Merci également à André Gilles, Alain Devaux, Adeline Bourgeault et Véronique Malard d'avoir accepté de faire partie de ce comité, merci pour vos conseils lors de ces réunions.

Je tiens maintenant à remercier tous les thésards et les post-doc que j'ai pu rencontrer lors de ces trois ans. Un merci particulier à Sophia Murat El Houdigui, merci pour ta bonne humeur lors de toutes ces heures passées au labo, surtout pour monter le dispositif de comportement. C'était vraiment un plaisir de travailler avec toi en biomol, au comportement et avec les stats. Un grand merci à Rémi Guédon pour sa gentillesse et surtout sa positivité qui m'a vraiment aidé dans des moments difficiles. Je tiens aussi à remercier Marie Trijau ma super co-bureau, merci pour ton soutien et ton sens de l'humour. Merci pour tes petites attentions (allumer mon ordi le matin, les origamis, j'en passe et des meilleurs) et merci pour tout le thé que tu ne voulais pas boire et que tu as gentiment apporté au bureau, il y est encore. En parlant de co-bureau, merci à Léa Beaumelle pour son accueil plus que chaleureux lors de mon arrivée en thèse. Merci pour ta gentillesse et ton soutien. Merci également pour ton aide précieuse avec R, et pour les « pauses orange » qui faisaient vraiment du bien. Un grand merci également à Cécile Dubois, merci pour ta bonne humeur et ton GRAND sourire. Merci également pour ta franchise, maintenant je sais que les plots en couleur dans les publi ce n'est : « pas très professionnel ». Pour en finir avec le LECO, un grand merci à Audrey Souloumiac, je pense que j'ai rarement rencontré quelqu'un d'aussi gentil. Je te souhaite bon courage pour ta thèse, ce n'est pas toujours facile, tu le sais déjà, mais tu y arriveras quand même je n'en doute pas une seconde. Je tiens aussi à remercier Marine Roulier, je suis assez contente que tu aies pu faire la fin de ta thèse à Cadarache, c'était vraiment un plaisir de pouvoir compter les jours avant le rendu du manuscrit avec toi. Merci pour ton soutien et ta gentillesse c'était indispensable pendant la rédaction. Merci à Alexandre Flouret pour tous les débats enflammés sur je ne sais quel sujet lors de la pause-café du midi. Merci également de m'avoir initié à la découpe du

canard, si je ne trouve pas de post doc j'irai vivre dans le Gers. Un grand merci également à Hamza Chaif, merci pour ton extrême gentillesse, et surtout merci d'avoir persévéré lors des pause-café, surtout au début car je sais que ça n'a pas toujours été facile pour toi de suivre nos conversations puisque l'on parle toujours tous en même temps et certain plus rapidement que d'autre. Merci également à Vanessa Tormos pour sa bonne humeur et sa gentillesse pendant ces presque 3 ans que l'on a passé ensemble. Enfin merci à Peter Donnel pour sa gentillesse. Merci d'avoir parfois aidé Sophia, j'en ai aussi largement profité.

Pour finir un grand merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien même si mon sujet était parfois un peu nébuleux pour eux. Un merci particulier à Frèd et Agathe qui m'ont si souvent hébergé pendant ces 3 ans, merci pour tous ces bons moments, surtout les karaokés, qui m'ont permis de déconnecter.

# Sommaire

---

Liste des figures .....	v
Liste des tableaux .....	vi
Liste des annexes.....	vii
Introduction générale .....	8
Partie A - état de l'art .....	12
1. Généralités sur les rayonnements ionisants .....	14
1.1. Types de rayonnements ionisants.....	14
1.2. Origines des radionucléides dans l'environnement .....	16
1.2.1. Origines naturelles.....	16
1.2.2. Origines artificielles .....	16
1.3. Voies d'exposition .....	17
1.4. Unités de radioprotection.....	17
1.5. La radioprotection de l'environnement .....	18
2. Généralités sur le tritium.....	19
2.1. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques .....	19
2.2. Origines du tritium dans l'environnement.....	21
2.2.1. Origines naturelles.....	21
2.2.2. Origines artificielles .....	21
2.3. Transfert et incorporation du tritium dans l'environnement .....	22
2.4. Métrologie du tritium.....	24
3. La toxicité du tritium chez les organismes aquatiques .....	25
3.1. Impact sur le développement.....	26
3.2. Impact sur la reproduction .....	27
3.3. Impact sur la cellule : cytogénotoxicité.....	29
3.4. Synthèse sur la toxicité du tritium chez les organismes aquatiques .....	31
Partie B - objectifs et choix expérimentaux .....	33
1. Objectifs.....	35
1.1. Axe 1 : incorporation du tritium et calcul des débits de dose .....	35
1.2. Axe 2 : Évaluation des effets biologiques.....	35
2. Choix expérimentaux .....	35



2.1.	Forme du tritium et modèle biologique.....	35
2.2.	Les débits de dose .....	39
2.3.	Terminologie.....	40
2.4.	Choix des marqueurs à différents niveaux d'organisation biologique .....	41
Partie C - internalisation du tritium et calcul des débits de dose .....		44
1.	Résumé de l'article scientifique .....	46
1.1.	Objectifs.....	46
1.2.	Matériels et méthodes.....	46
1.2.1.	Production des œufs et contamination.....	46
1.2.2.	Mesure du tritium dans les organismes .....	47
1.2.3.	Mesure des poids frais et secs .....	48
1.2.4.	Calcul des débits de dose .....	48
1.3.	Principaux résultats et discussion.....	49
2.	Article : « Assessing tritium internalization and absorbed dose rate in zebrafish early life stages: importance of rapid isotopic exchange » .....	51
Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit .....		79
1.	Résumé de l'article scientifique .....	81
1.1.	Objectifs.....	81
1.2.	Matériels et méthodes.....	81
1.3.	Principaux résultats et discussion.....	82
2.	Article : « Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages » .....	85
Partie E - comprendre les liens entre les compartiments biologiques : analyses à l'échelle de l'organe et de l'individu au regard des effets moléculaires .....		113
1.	Résumé de l'article scientifique .....	115
1.1.	Objectifs.....	115
1.2.	Matériels et méthodes.....	115
1.3.	Principaux résultats et discussion.....	116
2.	Article : « From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure ».....	118
Conclusion générale et perspectives de recherche.....		142
1.	Conclusion générale.....	144

1.1. La caractérisation de la dose absorbée : donnée indispensable pour l'évaluation du risque environnemental.....	144
1.2. Faire le lien entre les échelles biologiques : une étude intégrative de la molécule à l'individu .....	146
1.3. La radiotoxicité du tritium .....	147
1.3.1. Comparaison entre contamination à l'HTO et irradiation gamma : intérêt pour l'évaluation du risque .....	147
1.3.2. Les relations non-monotones après exposition à l'HTO.....	149
1.3.3. Comparaison entre les effets d'une contamination à l'HTO et d'une forme liée à la matière organique.....	151
2. Perspectives de recherche.....	154
2.1. Améliorer les connaissances sur le comportement du tritium .....	154
2.2. Compléter les données acquises sur les effets et explorer de nouvelles voies de signalisation .....	155
Valorisation scientifique.....	157
Références .....	158
Annexes.....	166

# Liste des figures

---

**Figure A-1 :** Représentation schématique du pouvoir pénétrant des différents types de rayonnements ionisants

**Figure A-2 :** Représentation schématique de l'hydrogène ( $1\text{H}$ ) et de son isotope radioactif le tritium ( $3\text{H}$ )

**Figure A-3 :** Schéma représentant les étapes de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse du tritium sous ses différentes formes

**Figure A-4 :** Schéma représentant les différents types de dommages à l'ADN radio-induits

**Figure B-1 :** Schéma du cycle de développement du poisson zèbre (*Danio rerio*)

**Figure B-2 :** Schéma représentant les gammes de débit de dose pouvant induire des effets délétères en prenant la truite comme animal de référence. Les débits de dose (mGy/h) en rouge représentent ceux choisis pour notre étude avec leur activité en Bq/mL associée.

Figure B-3 : (A) Concept général de l'AOP d'après (Ankley et al., 2010; Villeneuve et al., 2014). (B) Schéma des liens entre les échelles biologiques et leur pertinence écologique et écotoxicologique ainsi que la précocité des réponses observées

# Liste des tableaux

---

**Tableau 1** : Principaux stades de développement précoce chez le poisson zèbre et les effets toxiques (propanol, malathion et cadmium) correspondant pouvant y être observés. D'après (Fraysse et al., 2006)

**Tableau 2** : Comparaison des résultats obtenus après exposition à l'HTO à 0,04 ; 0,4 et 4 mGy/h chez les œufs et les larves de poisson zèbre

# Liste des annexes

---

**Annexe 1** : Protocole de reproduction

**Annexe 2** : Scintillation liquide

**Annexe 3** : Préparation du milieu embryon et des milieux de contamination

**Annexe 4** : Protocole de préparation des organismes pour retirer le milieu adsorbé

**Annexe 5** : Calcul des coefficients de dose via le logiciel EDEN v3

**Annexe 6** : Protocole d'extraction des ARN totaux (24 hpf et 96 hpf)

**Annexe 7** : Protocole comportement

**Annexe 8** : Protocole immunomarquage gamma-H2AX

---

## Introduction générale

---

Les écosystèmes, terrestres ou aquatiques, sont exposés aux rayonnements ionisants provenant des éléments radioactifs naturellement présents dans les sols ou l'atmosphère. A cette radioactivité naturelle vient s'ajouter celle provenant des éléments radioactifs issus des activités anthropiques notamment de production d'électricité, de médecine nucléaire ou encore provenant de l'armement. Ces rejets, bien que très réglementés et surveillés, contribuent à augmenter l'exposition des écosystèmes aux rayonnements ionisants notamment lors de rejets accidentels suite, par exemple, aux accidents de Tchernobyl en 1986 et plus récemment Fukushima-Daiichi en 2011. L'étude des effets sur les organismes vivants d'une exposition à des rayonnements ionisants, en conditions de fonctionnement normales ou accidentelles, semble donc primordiale dans le contexte de la radioprotection de l'environnement. Historiquement, l'Homme était la cible à protéger et l'écosystème n'était considéré qu'en tant que le vecteur de l'exposition humaine. Protéger de façon adéquate l'Homme revenait à protéger les autres espèces vivantes (ICRP, 1977). Depuis une dizaine d'années, un certain nombre de recommandations concernant la radioprotection de l'environnement ont été émises (IRSN, 2009). C'est dans cet objectif que des projets de recherches ont été menés afin d'établir une base de données issue de la littérature scientifique et portant sur les effets des rayonnements ionisants sur un ensemble d'espèces animales et végétales (Coppelstone et al., 2008; Howard and Larsson, 2008; Larsson, 2004). L'exploitation de cette base de données a permis de dériver un débit de dose pour lequel aucun effet n'est attendu (PNEDR : « Predicted No-Effect Dose Rate ») sur les espèces considérées, notamment pour les écosystèmes terrestres et aquatiques avec une valeur de  $10^{-2}$  mGy/h (Garnier-Laplace et al., 2010).

L'évaluation des effets d'un polluant ou d'un rayonnement ionisant peut être réalisée à différents niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la population. En radio-écotoxicologie, il est plus pertinent d'évaluer les effets des rayonnements ionisants à l'échelle moléculaire qu'à des échelles supérieures comme la population ou les écosystèmes, notamment via l'étude des modifications d'expression de gènes qui sont des réponses souvent plus sensibles, plus spécifiques et plus précoces (Corvi, 2002). En effet, bien que l'évaluation

des effets à l'échelle des populations ou des écosystèmes soit plus pertinente d'un point de vue écologique, les réponses observées sont souvent plus tardives.

Le tritium ( $^3\text{H}$ ) fait partie des éléments radioactifs que l'on retrouve dans l'environnement, il y est présent naturellement mais également via les rejets contrôlés issus des activités humaines (ASN, 2010). Cet isotope radioactif de l'hydrogène émet, en se désintégrant selon une période radioactive de 12,3 ans, un rayonnement  $\beta^-$  de faible énergie (moyenne = 5,7 keV) (ASN, 2010). Ce rayonnement est donc peu pénétrant mais très ionisant, c'est pourquoi les effets du tritium sont souvent considérés comme négligeables lors d'une exposition externe (Mathur-De Vre and Binet, 1984). Cependant, une fois intégré à l'organisme, il est capable d'atteindre tous les compartiments, jusqu'à l'ADN, et ainsi produire des effets potentiellement délétères en fonction de la dose absorbée.

Les effets de l'exposition au tritium, qu'il soit sous forme libre ou lié à la matière organique, ont été étudiés sur un certain nombre d'espèces non-humaines, vertébrées et invertébrées, via des études *in vitro*, *in vivo* ou *in situ*. Cependant, il a été mis en évidence la nécessité de diversifier les modèles d'étude, les stades de vie et les effets déterministes considérés dans ces études (ASN, 2010). De plus, un certain nombre d'études sur les vertébrés portent sur les effets sur la reproduction et les paramètres développementaux, alors que peu d'entre elles s'intéressent aux effets moléculaires, bien que plus pertinents pour évaluer les modes d'actions d'un polluant (Adam-Guillermin et al., 2012b).

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse qui ont pour objectif principal d'évaluer les modes d'actions toxiques d'une exposition à de l'eau tritiée (HTO) via l'utilisation des stades embryo-larvaires du poisson zèbre, *Danio rerio*. Le poisson zèbre est un modèle couramment utilisé en écotoxicologie, il est recommandé pour les tests de toxicité des produits chimiques, notamment les stades embryo-larvaires (OECD, 2013). Son cycle de vie est relativement court et la reproduction ainsi que le maintien de cette espèce est facile en laboratoire (Scholz et al., 2008). De plus, le génome de ce poisson est intégralement séquencé, ce qui facilite les analyses à l'échelle moléculaire. Cette thèse s'articule également au sein d'un projet en collaboration entre l'IRSN et EDF (GGP-Environnement) qui vise quant à lui à évaluer la sensibilité, la spécificité et la représentativité de biomarqueurs pour l'analyse des effets des radionucléides, dont le tritium.



Pour répondre à cet objectif principal, deux axes de travail ont été choisis. Le premier axe a eu pour objectif de caractériser l'internalisation du tritium dans les organismes, des œufs à 24 hpf (heures post-fécondation) et des larves à 96 hpf, dans le but de calculer les débits de dose absorbés afin de les lier aux potentiels effets observés. Ce premier axe de travail a consisté à : (i) identifier les verrous méthodologiques pour la mesure de l'internalisation du tritium, (ii) mettre au point un protocole robuste et reproductible pour réaliser cette mesure et (iii) calculer les doses absorbées par les organismes. Le second axe de ce travail de thèse visait quant à lui à évaluer les modes d'actions du tritium à différents niveaux d'organisation biologique. Pour ce faire, une analyse au niveau moléculaire du transcriptome par la méthode de mRNAseq a été réalisée. Cette analyse sans *a priori* a permis d'identifier des réponses précoces à la suite de l'exposition des larves de poisson zèbre à l'HTO. La prise en compte de niveaux d'organisation supérieurs est indispensable pour faire le lien entre les réponses précoces observées à l'échelle moléculaire et les réponses plus tardives observées au niveau des tissus ou des organismes. C'est pourquoi, suite à l'analyse des données transcriptomiques, des expérimentations ont été menées à des niveaux d'organisation biologique, notamment cellulaire (réparation des dommages à l'ADN), tissulaire (histologie du muscle et de l'œil) ou encore individuel (analyse comportementale).

Ce document s'articule en cinq parties. La première partie correspond à un bilan de l'état des connaissances sur les rayonnements ionisants de façon générale et du tritium en particulier. La seconde partie présente les objectifs et les choix expérimentaux, notamment le modèle biologique, les marqueurs choisis ainsi que les débits de dose étudiés. La troisième partie correspond à l'axe 1 de cette thèse sur l'internalisation du tritium dans les organismes et le calcul des débits de dose. La quatrième partie correspond à l'axe 2 de ces travaux de thèse et plus particulièrement les analyses à l'échelle moléculaire. La cinquième partie correspond également à l'axe 2 de cette thèse et aborde les effets à des niveaux d'organisation supérieurs à la molécule, notamment tissulaires et individuels. Enfin, ce document se termine sur une conclusion générale mettant notamment en lumière les résultats majeurs de ce travail, ses limites ainsi que les perspectives de recherches qui en découlent.

---

## Partie A - état de l'art

---



## 1. Généralités sur les rayonnements ionisants

### 1.1. Types de rayonnements ionisants

Tous les éléments qui forment l'Univers sont constitués d'atomes. Un atome possède un noyau contenant des protons (charge positive) et des neutrons (charge neutre) autour duquel gravitent des électrons. Naturellement, un atome peut être stable ou instable, les atomes instables sont les radionucléides. L'instabilité peut être due à un excès ou un déséquilibre entre les constituants du noyau. Les atomes instables recherchent la stabilité. Pour y parvenir, ils vont se désintégrer et émettre un rayonnement sous forme d'émission d'énergie ou de particules. Les atomes nouvellement formés après désintégration peuvent être eux aussi instables, ils vont donc se désintégrer et *in fine* donner un élément stable.

Certains rayonnements émis lors du phénomène de désintégration sont dits "ionisants" car capables de déposer suffisamment d'énergie lors de leur pénétration dans la matière pour en arracher des électrons. Les atomes qui constituent cette matière ne sont donc plus neutres électriquement, ils sont alors appelés des "ions".

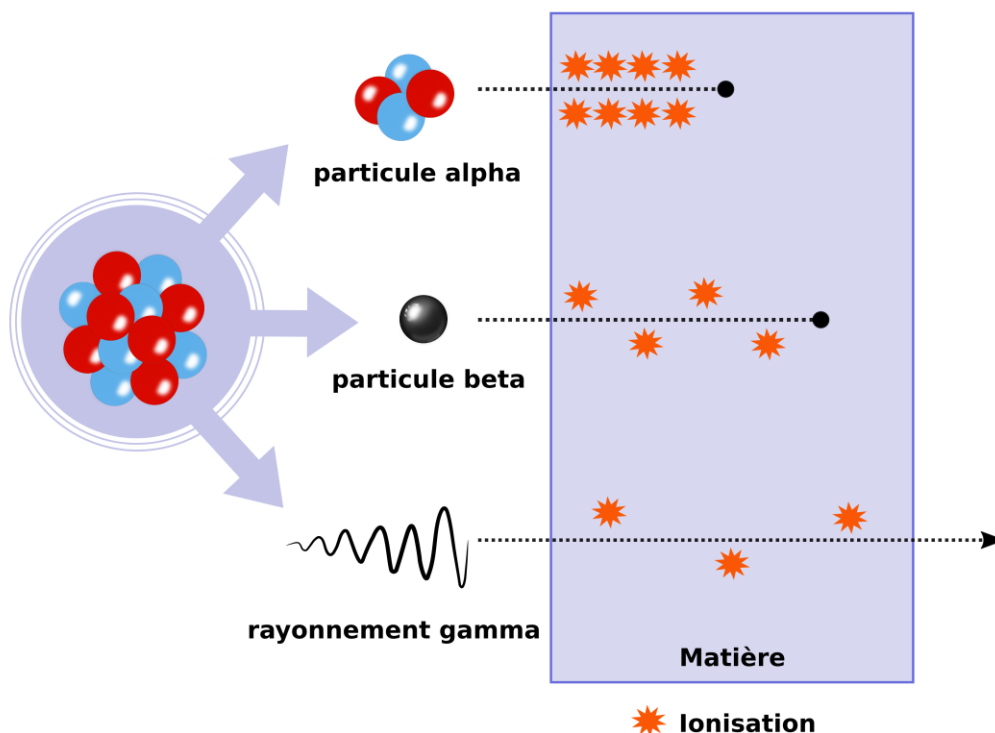
Le pouvoir pénétrant d'un rayonnement dépend de sa perte d'énergie lorsqu'il traverse la matière. Cette perte d'énergie est définie par la notion de transfert d'énergie linéique (TEL) qui s'exprime en  $\text{KeV}/\mu\text{m}$ . Plus la perte d'énergie est importante, plus la distance parcourue dans la matière est courte. Dans ce cas, le dépôt d'énergie se fait de façon localisée dans la matière. En d'autres termes, un rayonnement avec TEL important dépose une grande quantité d'énergie localement alors qu'un rayonnement avec un TEL plus faible dépose moins d'énergie sur son passage mais sur une distance plus importante.

Il existe deux grands types de rayonnements : particuliers (particules  $\alpha$  et  $\beta$ ) et électromagnétiques (rayons  $\gamma$  et X). Ces différents types de rayonnements diffèrent par leur manière d'interagir avec la matière qu'ils traversent ([Figure A-1](#)).

- Le rayonnement particulaire alpha ( $\alpha$ ) est émis par des atomes possédant une trop grande quantité de protons ou de neutrons dans leur noyau. Lors de leur désintégration, ils émettent un atome d'hélium constitué de deux protons et de deux neutrons : la particule  $\alpha$ . Ces particules interagissent fortement avec la matière (fort TEL) ce qui les rend peu pénétrantes

mais très ionisantes. Les particules  $\alpha$  sont émises notamment par l'Uranium-238 ( $^{238}\text{U}$ ) ou l'Américium-241 ( $^{241}\text{Am}$ ).

- Le rayonnement particulaire beta ( $\beta$ ) est émis par des atomes ayant un écart important entre le nombre de protons et de neutrons dans leur noyau. Lors de leur désintégration, ils émettent soit un électron (particule  $\beta^-$ ) soit un positron (particule  $\beta^+$ ). Ces particules interagissent moins avec la matière par rapport aux particules  $\alpha$ , elles sont donc plus pénétrantes. Les particules  $\beta$  sont émises notamment par le Tritium ( $^3\text{H}$ ) ou le Nickel-60 ( $^{60}\text{Ni}$ ).
- Le rayonnement électromagnétique gamma ( $\gamma$ ) est émis par des atomes possédant trop d'énergie. Lors de leur désintégration, ils émettent une onde électromagnétique de même nature que la lumière ou les rayons X, mais plus énergétique. Le rayonnement  $\gamma$  est plus ionisant que les autres types de rayonnements ce qui lui confère un faible pouvoir pénétrant. Les rayonnements  $\gamma$  sont émis notamment par le Césium-137 ( $^{137}\text{Cs}$ ) ou le Cobalt-60 ( $^{60}\text{Co}$ ).



**Figure A-1 :** Représentation schématique du pouvoir pénétrant des différents types de rayonnements ionisants

## 1.2. Origines des radionucléides dans l'environnement

### 1.2.1. Origines naturelles

Comme vu précédemment, un atome peut être naturellement instable. La radioactivité est donc un phénomène naturel et ce depuis l'apparition de la Terre. Les principales sources de cette radioactivité d'origine naturelle peuvent être (CEA, 2002; IRSN, 2012) :

- **Cosmiques** : rayonnements de forte énergie en haute atmosphère dont l'importance augmente avec l'altitude (doublent tous les 1500 m).
- **Telluriques** : rayonnements émis par des éléments constitutifs de la croûte terrestre comme l'uranium. Cette radioactivité diffère en fonction du type de sol.
- **Atmosphériques** : radioactivité essentiellement due aux émissions de radon-222 sous forme gazeuse via le sol.
- **Aquatiques** : eaux radioactives en raison du lessivage des sols en surface.
- **Intrinsèque** au vivant : par ingestion d'aliments contenant des éléments radioactifs qui vont ensuite se fixer dans les tissus et les os, c'est par exemple le cas du potassium-40 et du carbone-14.

### 1.2.2. Origines artificielles

Depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle, la radioactivité liée aux activités anthropiques vient s'ajouter à celle présente naturellement. La radioactivité d'origine artificielle peut provenir de deux phénomènes distincts : les rejets réglementés et contrôlés et les rejets à caractère exceptionnel.

Les centrales de production d'électricité et de retraitement des combustibles font partie de la première catégorie, les rejets réglementés et contrôlés. A l'instar des centrales de production et de retraitement, les activités médicales font également partie de cette première catégorie. Ces rejets de radionucléides se font dans le cadre du fonctionnement normal en ce qui concerne les activités précédemment décrites.

Contrairement à la première catégorie, la seconde, les rejets à caractère exceptionnel, englobe notamment les retombées provenant des essais militaires nucléaires réalisés entre

1945 et 1980. Il faut ajouter à ces rejets ceux associés aux accidents de Tchernobyl en 1986 et plus récemment celui de Fukushima-Daiichi en 2011 (CEA, 2002; IRSN, 2012).

### 1.3. Voies d'exposition

Il existe deux voies d'exposition qui sont définies en fonction du type de rayonnement : interne ou externe.

- L'exposition **interne**, aussi appelée contamination interne, survient lorsque le radionucléide est incorporé dans l'organisme. Cette incorporation peut se faire par trois voies différentes : l'inhalation, l'ingestion ou le transfert via la peau par exemple. Cette voie d'exposition est particulièrement dangereuse pour les éléments possédant un faible pouvoir pénétrant ( $\alpha$  et  $\beta$ ), qui auront un impact faible en exposition externe.
- L'exposition **externe** quant à elle survient par contact, lors de la manipulation d'une source par exemple ou à distance. Ce type d'exposition est particulièrement dangereux lorsque l'élément possède un fort pouvoir pénétrant ( $\gamma$ ). En effet, ce type de rayonnement ne peut être atténué que par la distance et la traversée de la matière se trouvant sur sa trajectoire et va impacter tous les organes qui s'y trouveront ([Figure A-1](#)).

### 1.4. Unités de radioprotection

Dans le but de quantifier la radioactivité et de mesurer les effets sur les êtres vivants, plusieurs unités de mesure sont utilisées en radioprotection de l'environnement :

- **L'activité** : cette grandeur correspond au nombre de désintégrations d'un élément radioactif par unité de temps. Elle s'exprime en Becquerel (Bq). Un Becquerel correspond à une désintégration par seconde et remplace l'ancienne unité de radioactivité le Curie (Ci,  $1 \text{ Bq} = 23.07 \text{ pCi}$ ). L'activité peut être rapportée à une masse (Bq/kg), un volume (Bq/L ou Bq/m<sup>3</sup>) ou encore à une surface (Bq/m<sup>2</sup>).

- **La dose absorbée** : elle correspond à la quantité d'énergie cédée par unité de masse et s'exprime en Gray (Gy). Un Gray correspond à un Joule d'énergie absorbée par kilogramme de matière (1 J/kg). Cette unité remplace le rad (1 Gy = 100 rad).
- **Le débit de dose absorbée** : cette dernière unité correspond à la dose absorbée (Gy) par unité de temps. Elle peut être exprimée en heure (Gy/h), en jour (Gy/j) ou encore en année (Gy/an).

Les effets d'un rayonnement ionisant dépendent du type de rayonnement ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ), de la dose absorbée, du temps d'exposition mais également de la sensibilité de l'organisme ou de l'organe exposé. Il est donc nécessaire de prendre en compte ces variations d'efficacité biologique lors de l'évaluation du risque environnemental lié à l'exposition à ces différents types de rayonnements. Pour cela, le concept d'Efficacité Biologique Relative (EBR) est couramment utilisé. L'EBR correspond au rapport entre la dose du rayonnement de référence ( $\gamma$  ou X) nécessaire pour produire un niveau d'effet et la dose du rayonnement étudié ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) nécessaire pour produire le même niveau d'effet.

## 1.5. La radioprotection de l'environnement

La radioprotection de l'environnement est un domaine qui a énormément évolué ces vingt dernières années. Historiquement, l'Homme était la cible à protéger et l'écosystème n'était que le vecteur de l'exposition. En 1977, la CIPR<sup>1</sup> publie ses recommandations en matière de radioprotection. Dans cette publication, les normes en termes de radioprotection de l'environnement stipulaient : « [...] if man is adequately protected then other living things are also likely to be sufficiently protect. » (ICRP, 1977) .

Par la suite, à partir des années 90, le postulat selon lequel l'Homme est l'espèce la plus sensible et que le protéger revient à protéger toutes les autres espèces sera de plus en plus discuté sans être fondamentalement remis en cause. Sur la base de ces discussions, un consensus au niveau international (CIPR, AIEA<sup>2</sup>, UNSCEAR<sup>3</sup> etc.) sur la nécessité de mettre en place un système de protection de l'environnement contre les effets des rayonnements

---

<sup>1</sup> Commission internationale de la radioprotection

<sup>2</sup> Agence internationale de l'énergie atomique

<sup>3</sup> Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants



ionisants est apparu. C'est dans cet objectif que des projets de recherche comme les projets FASSET<sup>4</sup> (Larsson, 2004) et par la suite ERICA<sup>5</sup> (Howard and Larsson, 2008) ont vu le jour. Ces deux projets ont permis de créer une base de données FREDERICA qui regroupe des données issues de la littérature scientifique portant sur les effets des rayonnements ionisants sur un ensemble d'espèces animales et végétales (Coppelstone et al., 2008). Depuis, l'exploitation de cette base de données a permis de dériver une PNEDR (Predicted No-Effect Dose Rate) de  $10^{-2}$  mGy/h pour les écosystèmes terrestres et aquatiques (Garnier-Laplace et al., 2010).

Cependant, il a été mis en évidence, notamment par le projet FASSET, un manque de données concernant le transfert des radionucléides dans l'environnement mais également un manque de données sur les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur des espèces clés pour des doses pertinentes dans l'environnement (Larsson, 2004). Il est donc maintenant admis que l'évaluation du risque liée à la présence de radionucléides dans l'environnement doit être appréhendée à des débits de dose et des temps d'exposition pertinents pour des espèces écologiques pertinentes par l'utilisation d'études théoriques et expérimentales (Alonzo et al., 2011).

## 2. Généralités sur le tritium

### 2.1. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques

Le tritium (<sup>3</sup>H) est l'un des isotopes radioactifs de l'hydrogène (<sup>1</sup>H). Il possède donc dans son noyau le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent par rapport à un noyau d'hydrogène (Figure A-2). Etant un isotope de l'hydrogène, le tritium possède les mêmes propriétés chimiques, il est donc capable d'intégrer le cycle de l'eau, ce qui le rend ubiquiste et extrêmement mobile dans l'environnement (ASN, 2010). Ces propriétés physiques sont néanmoins différentes de celles de l'hydrogène. En effet, le tritium est un émetteur  $\beta^-$  possédant une période de demi-vie radioactive d'environ 12,32 ans. Sa désintégration va produire un isotope stable de l'hélium (<sup>3</sup>He<sup>+</sup>). Le rayonnement émis lors de sa désintégration est de faible énergie (max = 18,6 KeV) ce qui le rend peu pénétrant (distance moyenne dans

---

<sup>4</sup> Framework for assessing the impact of ionising radiation on non-human biota

<sup>5</sup> Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management

l'eau égale à 0,56  $\mu\text{m}$ , (HPA, 2007). Ce faible pouvoir pénétrant implique que le dépôt d'énergie dans la matière traversée se fera de manière localisée, de ce fait, l'exposition par voie externe est souvent considérée comme négligeable pour ce radionucléide (Mathur-De Vre and Binet, 1984). En revanche l'exposition interne au tritium est plus dommageable en raison de son fort pouvoir d'ionisation (ASN, 2010).

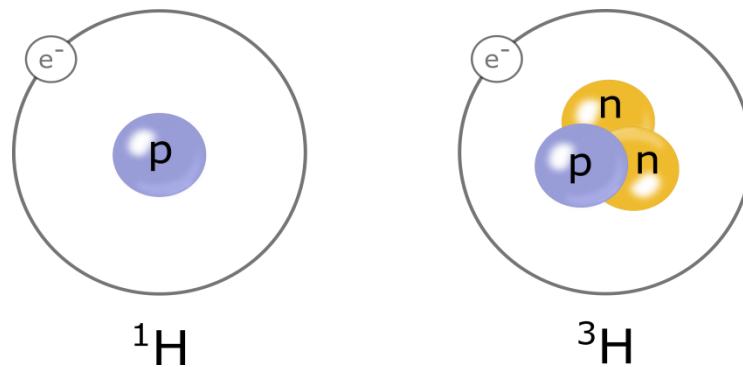


Figure A-2 : Représentation schématique de l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) et de son isotope radioactif le tritium ( $^3\text{H}$ )

Dans l'environnement, on retrouve le tritium sous différentes formes, dont les trois principales sont :

- **L'eau tritiée (HTO)** : c'est la forme dite « libre » du tritium. C'est également la forme la plus abondante dans l'environnement et les êtres vivants (ASN, 2010).
- **Le tritium gazeux (HT)** : cette forme ne représente qu'une fraction du tritium dans l'environnement. Cependant, elle est susceptible de prendre de l'importance avec le développement des recherches sur les réacteurs de nouvelles générations (ex. EPR<sup>6</sup> et ITER<sup>7</sup>). Le tritium sous forme gazeuse va rapidement se transformer en HTO sous l'effet de l'oxydation (ASN, 2010).
- **Le tritium lié à la matière organique (TOL)** : l'hydrogène étant un constituant indispensable de la matière vivante, le tritium est capable de se lier à la matière organique (ASN, 2010). On distingue néanmoins deux formes de TOL, échangeable (TOLe) et non-échangeable (TOLne). Le TOLe correspond au tritium lié à des acides organiques et pouvant être retiré par lavage de la matière avec de l'eau pauvre en

<sup>6</sup> Evolutionary Power Reactor

<sup>7</sup> International Thermonuclear Experimental Reactor

tritium. Le TOLne quant à lui correspond au tritium lié par des liaisons covalentes au carbone (ASN, 2010; Kim et al., 2013a).

Cependant, en 2017, une actualisation des connaissances sur le tritium a été publiée par l'IRSN (IRSN, 2017). Il en ressort que, concernant la nomenclature du tritium sous sa forme liée à la matière organique, « [...] dans le cas des molécules organiques d'origine naturelle, par définition biodégradables, il n'existe pas au sens strict de tritium organiquement lié non échangeable ». Ce rapport préconise l'utilisation de deux nouveaux termes, le TOL-QE (quickly échangeable) et le TOL-SE (slowly échangeable) prenant en compte le caractère plus ou moins dégradé de la matière organique.

## 2.2. Origines du tritium dans l'environnement

### 2.2.1. Origines naturelles

Le tritium produit de façon naturelle provient pour sa grande majorité de l'effet des rayonnements cosmiques sur l'azote, l'oxygène et l'argon présents dans l'air. La quasi-totalité du tritium ainsi formé va se retrouver sous forme libre (HTO) et intégrer le cycle de l'eau (ASN, 2010). En 2000, un rapport de l'UNSCEAR évaluait l'inventaire de tritium au niveau planétaire à  $1,3 \cdot 10^{18}$  Bq (UNSCEAR, 2000).

Le tritium naturellement formé a également une origine tellurique. Il provient de l'activation neutronique sur le lithium-6 présent dans les roches. L'inventaire de ce tritium ayant une origine tellurique est difficile à estimer, mais la production est minime par rapport au tritium d'origine cosmique (Belot et al., 1996).

### 2.2.2. Origines artificielles

En France, le tritium d'origine artificielle provient en grande majorité des essais nucléaires atmosphériques et de l'industrie nucléaire. D'autres activités industrielles produisent du tritium mais en moindre quantité.

- **Les essais nucléaires atmosphériques** réalisés entre 1945 et 1963 ont libéré environ  $2,4 \cdot 10^{20}$  Bq de tritium dans l'atmosphère, soit environ 650 kg. Du fait de l'arrêt des tirs aériens et de la décroissance rapide du tritium, il resterait actuellement environ 30 kg de tritium issus de ces essais répartis pour une grande partie dans les océans.

Les essais nucléaires souterrains s'ajoutent également aux sources de tritium d'origines artificielles, cependant les quantités ainsi rejetées sont considérées comme négligeables par rapport aux rejets issus des essais aériens (ASN, 2010).

- **L'industrie nucléaire** constitue également une source importante de production et de rejet du tritium dans l'environnement. Dans les centres de production d'électricité (CNPE), le tritium est rejeté sous forme liquide et gazeuse, mais il est également piégé dans le combustible après avoir été formé. En France, en fonctionnement normal, il est usuellement mesuré dans les effluents des CNPE 400 à 500 Bq/m<sup>3</sup> de tritium gazeux et 6.10<sup>5</sup> à 4.10<sup>6</sup> Bq/L d'HTO (ASN, 2010). Les centres de traitement des combustibles rejettent quant à eux une plus grande quantité de tritium. Ces rejets se font pour une grande partie dans le milieu aquatique. A titre d'exemple, les activités volumiques usuellement mesurées dans les effluents du centre de traitement des combustibles d'AREVA La Hague sont de 4.10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> Bq/m<sup>3</sup> pour le tritium gazeux et de 1,08.10<sup>2</sup> Bq/mL pour l'eau tritiée (ASN, 2010). Les projets de recherche actuellement en cours autour de la fusion thermonucléaire contrôlée (ex. projet ITER<sup>8</sup>) vont être susceptibles d'accroître les rejets de tritium dans l'environnement. En effet le tritium est un des éléments qui permet la réaction de fusion.

D'autres activités humaines sont susceptibles de rejeter du tritium dans l'environnement. C'est notamment le cas des activités médicales, de la recherche scientifique ou encore des activités industrielles qui utilisent les propriétés luminescentes du tritium, en horlogerie par exemple.

### 2.3. Transfert et incorporation du tritium dans l'environnement

Etant un isotope de l'hydrogène, le tritium se comporte comme ce dernier et peut donc facilement s'incorporer dans le cycle de l'eau mais aussi dans les molécules qui constituent le vivant.

---

<sup>8</sup> International Thermonuclear Experimental Reactor

Dans l'atmosphère, on le retrouve sous la forme HTO la plus abondante, puis HT et enfin le méthane tritié. On ne connaît pas encore très bien les mécanismes de transfert du méthane tritié dans les différents compartiments. Concernant l'HT, cette forme n'est pas incorporée par les végétaux via l'atmosphère. Une fois déposée sur le sol, elle est rapidement oxydée en HTO par l'action des micro-organismes. L'eau tritiée ainsi formée va soit être réémise dans l'atmosphère, soit être incorporée dans les végétaux, soit va migrer vers les horizons profonds. L'eau tritiée contenue dans l'atmosphère se dépose sur le sol essentiellement par des dépôts humides. Une fois dans le sol, elle suit les mêmes voies que citées auparavant. La fraction TOL dans le sol n'est pas bien connue et est souvent décrite comme négligeable. Les hydrosystèmes sont en revanche d'importants réservoirs de tritium. Les apports de tritium sous sa forme HTO dans ces systèmes se font par l'amont, par les rejets liquides et atmosphériques des installations nucléaires mais également par échanges interstitiels (ASN, 2010).

Comme dit précédemment, les végétaux incorporent le tritium uniquement sous sa forme HTO. Cette absorption se fait par les racines mais également par les feuilles. Une partie du tritium absorbé par la plante est ensuite incorporé à la matière organique (TOL) par la réaction de photosynthèse. La plante relargue également du tritium dans l'atmosphère via l'évapotranspiration et la respiration (ASN, 2010).

Chez les animaux terrestres, le tritium sous sa forme HTO est incorporé via l'atmosphère par inhalation et absorption cutanée et y est réémise par transpiration. Le tritium contenu dans l'eau est incorporé dans l'organisme par abreuvement. Le tritium sous sa forme organique TOL peut également être incorporé lors de l'ingestion de végétaux. Il sera majoritairement transformé en HTO. La forme HTO diffuse très rapidement dans l'organisme et s'équilibre en quelques minutes avec les fluides corporels. Elle est réémise dans l'environnement par l'excrétion. L'incorporation de tritium par les animaux de cheptel est ensuite retrouvée tout le long de la chaîne alimentaire puisqu'on peut retrouver du tritium dans les denrées (lait, viande etc) (ASN, 2010; IRSN, 2015).

Concernant les organismes aquatiques, il existe deux voies de transfert du tritium vers l'animal. La première par transfert direct à partir de l'eau par les phénomènes de respiration et d'osmorégulation. Ce type de transfert mène à un équilibre rapide entre le tritium contenu dans l'eau du milieu et le tritium contenu dans l'eau constitutive de l'organisme (TFWT). La

seconde voie passe par un transfert via la chaîne trophique. En effet, lors de l'alimentation, le tritium sous ses formes TOL et HTO peut être incorporé dans l'organisme. Une fois dans l'organisme, une grande partie du tritium sous sa forme TOL est métabolisée en HTO (ASN, 2010).

## 2.4. Métrologie du tritium

La très grande mobilité du tritium rend les étapes d'échantillonnage et de préparation des échantillons très délicates. Lors de prélèvements sur le terrain ou en laboratoire, un soin tout particulier doit être apporté au conditionnement des échantillons dans le but de prévenir la mise à l'équilibre du tritium contenu dans les échantillons et le milieu ambiant (Belot et al., 1996).

Une fois la collecte et le conditionnement optimisés, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour discriminer les différentes formes du tritium et évaluer son activité dans les échantillons. La [Figure A-3](#) schématise les différentes étapes de préparation de l'échantillon avant la mesure de l'activité. Le tritium sous sa forme libre dans les tissus (TFWT) peut être récupéré via une lyophilisation. La matière sèche en résultant peut soit subir une étape de combustion pour la mesure du tritium organiquement lié total (TOL total) soit servir à la discrimination des formes à cinétique lente et rapide (ASN, 2010).

Une fois les échantillons préparés, la mesure de l'activité peut être réalisée. La technique de mesure usuellement utilisée est la scintillation liquide. Elle est simple et rapide à mettre en œuvre et permet d'obtenir des limites de détection de 6 Bq/L avec un liquide scintillant standard. Cette limite peut être divisée par un facteur cinq avec l'utilisation de liquide scintillant à bas bruit de fond. Une seconde technique de mesure peut être utilisée pour la mesure de l'activité dans les échantillons, la mesure de l'hélium-3, descendant stable du tritium, par spectrométrie de masse. Cette technique est moins utilisée que la scintillation liquide car plus coûteuse et demandant des délais plus longs. Cependant, elle permet d'obtenir une limite de détection plus basse que la scintillation liquide, 0,003 Bq/L, mais sur un temps beaucoup plus long (environ 6 mois pour un échantillon de 0,5 L) (ASN, 2010).

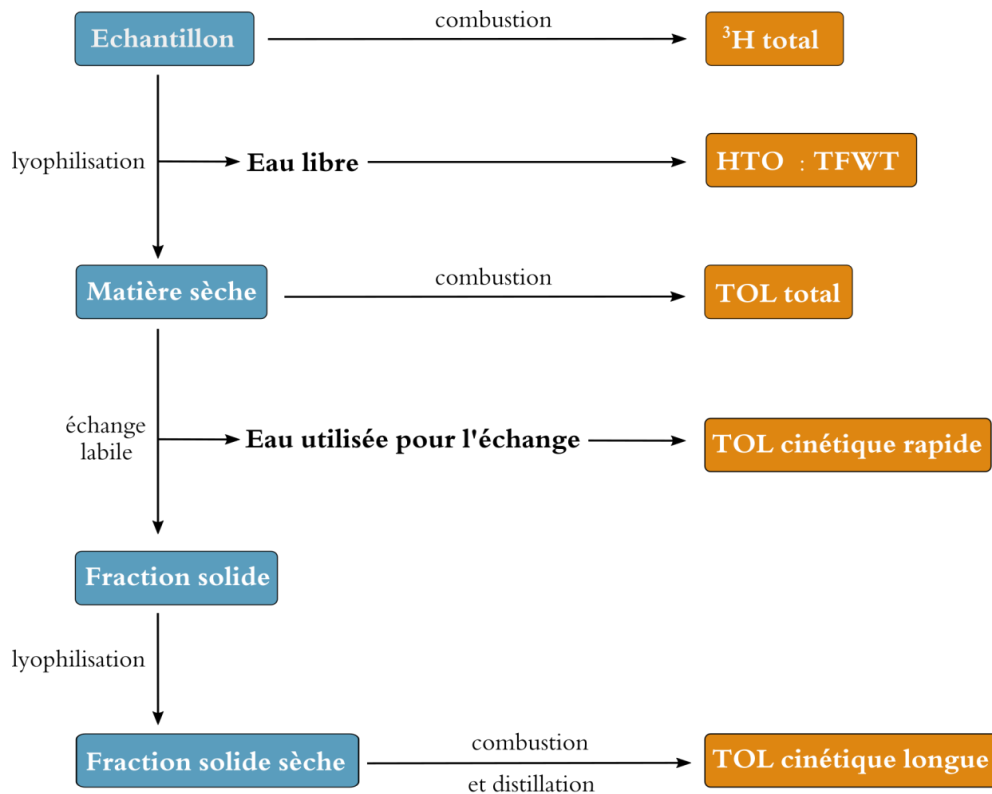


Figure A-3 : Schéma représentant les étapes de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse du tritium sous ses différentes formes

### 3. La toxicité du tritium chez les organismes aquatiques

On trouve dans la littérature scientifique un certain nombre d'études portant sur les effets d'une exposition au tritium sur les organismes. En 2010, l'ASN a publié un rapport sur le tritium. Concernant l'évaluation de sa toxicité sur les espèces non-humaines, les conclusions de ce rapport mettent en avant le peu d'espèces étudiées mais aussi le peu de stades de vie et d'effets déterministes considérés (ASN, 2010). Une revue portant sur les effets du tritium chez les organismes aquatiques va également dans le sens des conclusions de l'ASN sur le manque de connaissances concernant les effets d'une exposition au tritium, quelle que soit sa forme (Adam-Guillermin et al., 2012b). Cet article met également en avant qu'une grande partie des études publiées portent sur les effets concernant le développement et la reproduction, alors que les effets génotoxiques sont quant à eux plus rarement étudiés.

### 3.1. Impact sur le développement

L'étude du développement des organismes, qu'ils soient invertébrés ou vertébrés, est essentielle pour évaluer les impacts potentiels de l'exposition au tritium sur les individus et les populations.

Chez les invertébrés, il a été mis en évidence chez des larves de pouce-pied, *Pollicipes polymerus*, une diminution de l'indice de mue après exposition à l'HTO dès  $6,67 \cdot 10^{-4}$  mGy/h (Abbot and Mix, 1979). Pour des débits de dose plus importants, supérieurs à 60,84 et 908,34 mGy/h, il a été mis en évidence chez les artémia, *Artemia salina*, une diminution de la durée de vie et une non maturation des nauplii qui mouraient dans les 24 jours suivant l'exposition à l'HTO (Higuchi et al., 1980). Chez des daphnies, *Daphnia magna*, une étude sur cinq générations a été menée et a mis en évidence une réduction de la durée de vie ainsi que du taux de croissance et de la fécondité semblant augmenter avec la dose (de  $1,6 \cdot 10^{-3}$  à  $1,6 \cdot 10^3$  mGy/h). De plus, des anomalies du développement ont été observées dès le plus faible débit de dose et ces anomalies semblent augmenter avec les générations (Gudkov and Kipnis, 1996). Chez la moule bleue, *Mytilus edulis*, et l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, après exposition à l'HTO, des anomalies chez les larves ont été mises en évidence dès  $2 \cdot 10^{-3}$  et  $1,2 \cdot 10^{-1}$  mGy/h respectivement. Une augmentation de la mortalité a également été observée chez les moules dès  $2 \cdot 10^{-3}$  mGy/h alors qu'aucun effet sur la mortalité n'a été détecté chez les huitres (Hagger et al., 2005; Nelson, 1971).

Il existe également dans la littérature des études portant sur les effets du tritium sous sa forme HTO sur le développement des vertébrés aquatiques. Une diminution du taux d'éclosion a par exemple été montrée chez des fugu, *Fugu niphobles*, après une exposition à 12,2 mGy/h. Des anomalies développementales comme une petite taille, des larves moins pigmentées, un abdomen gonflé ou encore une diminution du diamètre des yeux ont également été mis en évidence chez cette espèce (Ichikawa and Suyama, 1974). Une diminution de la taille des yeux après exposition à de l'HTO a également été observée chez l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, et le carlottin, *Paraphrys vetulus*, avec une diminution de 10% à 121,25 mGy/h et de 20% à 242,54 mGy/h (Walden, 1971). Chez le médaka, *Oryzias latipes*, une exposition de moins de 10 jours à l'HTO induit une diminution de la survie



des larves dans le mois suivant la fin de l'exposition. Des malformations vertébrales ont également été mises en évidence chez cette espèce dès 35,42 mGy/h. Ces malformations se traduisent par la fusion ou la formation incomplète des vertèbres (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993). Un taux important d'anomalies du développement (>30%) a également été mis en évidence après la contamination d'œufs de poisson zèbre, *Danio rerio*, à de la thymidine tritiée. Les larves apparaissaient moins pigmentées, plus fines et tordues à partir d'un débit de dose égal à 0,62 mGy/h. Un retard d'éclosion a également été mis en évidence à partir du même débit de dose (Adam-Guillermin et al., 2012a). Après une exposition à de l'HTO pour un débit de dose de 0,04 mGy/h, un retard d'éclosion a également été montré chez le poisson zèbre. De rares altérations des myofibrilles ont également été observées chez des larves de 96 hpf pour ce même débit de dose ainsi qu'à 0,4 et 4 mGy/h (Gagnaire et al., 2016, 2015b). Pour ces deux derniers débits de dose, des analyses sur des larves âgées de 7 et 10 jours post-fécondation ont révélé d'importantes altérations au niveau des mitochondries localisées au niveau des muscles squelettiques de la queue des larves (Gagnaire et al., 2017b).

### 3.2. Impact sur la reproduction

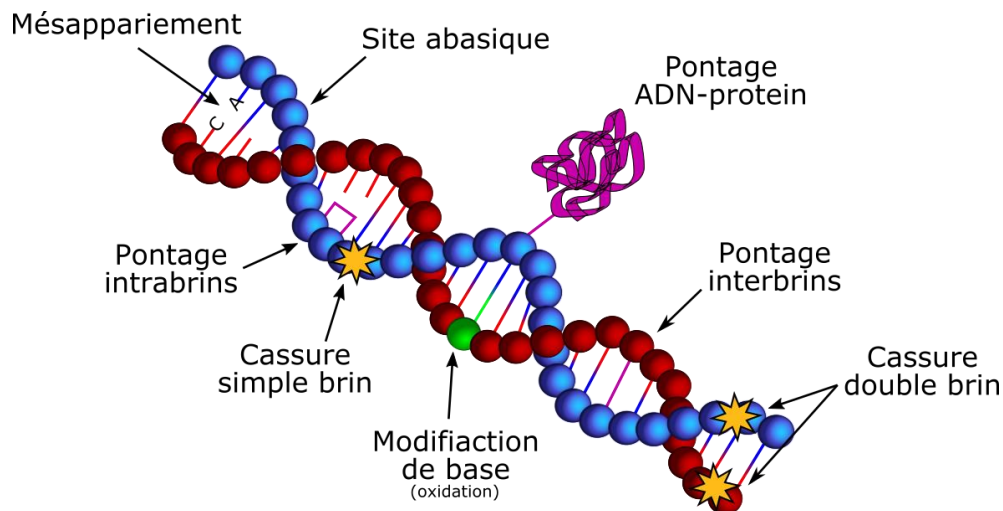
L'évaluation de l'impact du tritium sur les capacités reproductives des organismes, invertébrés comme vertébrés, est une étape importante dans l'évaluation du risque biologique. En effet, le succès reproducteur, c'est à dire la capacité d'un individu à transmettre ses gènes à la génération suivante, est un paramètre essentiel pour évaluer l'impact d'un contaminant sur un individu et par extension sur une population.

En comparaison aux études portant sur le développement, il existe peu d'études sur les effets de l'exposition au tritium sur la reproduction chez les invertébrés. Chez les vers polychètes, *Ophryotrocha diadema*, l'exposition à l'HTO d'œufs à 7,30 mGy/h induit une diminution de la survie des œufs ainsi qu'une diminution du nombre moyen de larves (Knowles and Greenwood, 1997). L'impact de l'exposition à l'HTO a également été étudié chez l'artemia, *A. salina*, dont des œufs ont été contaminés pendant 25 jours. Une diminution du nombre total de nauplii, de la reproduction, des pontes ainsi que du nombre de nauplii par ponte ont été observée dès le plus faible débit de dose testé, 12,12 mGy/h (Higuchi et al., 1980).

Les capacités de reproduction chez les vertébrés ont quant à elles été plus étudiées. Après une contamination à l'HTO, il a été observé chez le guppy, *Poecilia reticulata*, un changement de sexe-ratio avec une augmentation de la proportion de mâles dès 3,04 mGy/h. Une diminution de la fréquence du comportement de cour a également été observée en parallèle avec la diminution du taux de développement des caractéristiques sexuelles chez les mâles exposés (Erickson, 1971). Les effets sur la reproduction de la contamination au tritium ont également été bien caractérisés chez le médaka, *O. latipes*. Les effets de l'exposition à l'HTO ont notamment été évalués après l'exposition de stades embryonnaires sur les cellules germinales (susceptibles de former les gamètes). Une diminution du nombre de ces cellules a été observée dès 14,17 mGy/h ; cependant, pour des débits de doses supérieurs ou égaux à 30 mGy/h ce nombre était constant, suggérant la présence d'une population résistante (Etoh and Hyodo-Taguchi, 1983). Toujours chez le médaka, mais cette fois chez des individus adultes, il a été observé une diminution du poids des testicules après 10 jours de contamination à 8,71 mGy/h. Après 30 jours de contamination, les mêmes effets sur le poids des testicules ont été observés mais pour un débit de dose plus faible, 4,25 mGy/h. Dans cette étude, le nombre de spermatogonie Ib a également été analysée, ces cellules germinales interviennent lors des premiers stades de la spermatogenèse et initient la différenciation en spermatozoïdes. Après 10 jours de contamination, une diminution du nombre de ces cellules a été observée dès 0,84 mGy/h. Une diminution plus drastique a quant à elle été observée après 30 jours d'exposition dès 4,25 mGy/h (Hyodo-taguchi and Egami, 1977). Enfin, une étude croisant femelles contaminées à de l'HTO et mâles témoins et inversement a été réalisée chez le médaka. Après 10 jours de contamination d'œufs à des débits de dose allant de 3,54 à 141,67 mGy/h, les capacités reproductrices des adultes issus de cette contamination ont été analysées. Pour des femelles contaminées croisées avec des mâles témoins, il a été observé une diminution dose dépendante de la capacité à pondre et de la fécondité. Pour des croisements entre femelles témoins et mâles irradiés, il a été mis en évidence une diminution de l'oviposition ainsi qu'une diminution de la capacité à éclore des œufs en fonction de la dose. De plus, pour ce croisement, une augmentation du taux d'infertilité totale chez les mâles a également été observée (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986).

### 3.3. Impact sur la cellule : cytogénotoxicité

Les rayonnements ionisants pouvant provoquer des dommages à l'ADN, il semble indispensable d'évaluer leur impact sur l'intégrité de cette macromolécule. Les dommages induits par les rayonnements ionisants sur l'ADN (Figure A-4) sont de deux grands types : les dommages directs, dus à l'ionisation directe de la molécule par la perte d'électrons, et les dommages indirects, via la production d'espèces réactives par le biais de la radiolyse de l'eau (Ménager et al., 2009). Ces dommages, s'ils ne sont pas correctement réparés, peuvent provoquer des processus de mort cellulaire sur le court terme ou s'accumuler et ainsi être transmis au cours des générations. A terme, cette transmission pourrait engendrer une instabilité génétique et impacter fortement les individus et les populations.



**Figure A-4** : Schéma représentant les différents types de dommages à l'ADN radio-induits

La cytogénotoxicité du tritium a été étudiée chez les invertébrés notamment chez les bivalves marins et la daphnie. Pour cette dernière, chez des juvéniles exposés à de l'HTO, il a été mis en évidence que le nombre de nucléoles, le plus gros compartiment du noyau où sont notamment formés les ribosomes, augmentait avec la dose. Le diamètre des nucléoles augmentait également avec la dose pour atteindre un maximum au plus fort débit de dose testé,  $1,6 \cdot 10^3$  mGy/h (Gudkov and Kipnis, 1996). Chez les bivalves marins, les effets d'une exposition à l'HTO ont été étudiés chez les stades précoces de *M. edulis*. Après 12h de contamination et 1,5 cycles cellulaires, une augmentation des aberrations chromosomiques ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules aberrantes ont été mise en évidence.

Toujours après 12h de contamination mais deux cycles cellulaires, une augmentation dose dépendante des échanges de chromatides sœurs a été observée dès 0,008 mGy/h, alors qu'une diminution de l'index de prolifération des cellules a été observée dès 0,002 mGy/h. Pour ces deux types d'exposition, des altérations dans les profils de l'ADN ont été observées dès la plus faible dose testée, 0,002 mGy/h (Hagger et al., 2005). Chez cette même espèce de moule marine, il a été montré qu'une exposition à de l'HTO et de la glycine tritiée induisait une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules chez les adultes. La comparaison des deux expositions a mis en évidence que la glycine tritiée était environ 15 fois plus génotoxique que l'exposition à l'HTO de par sa différence d'internalisation importante au niveau de l'ADN (Jaeschke et al., 2011). Toujours chez des adultes *M. edulis*, après 96h d'exposition à de l'HTO, il a été observé une augmentation dépendante de la dose du nombre de micronoyaux dans les cellules ainsi qu'une augmentation des cassures de l'ADN dès 0,012 mGy/h (Jha et al., 2005). Enfin, chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, une étude combinant une exposition à de l'HTO (< 0,02 mGy/h) ainsi que des variations de la température suggèrent que, à l'échelle moléculaire, les moules auraient des capacités de défense contre les dommages génotoxiques pouvant être compromises après ce type d'exposition. En effet, pour les deux températures testées, 15 et 20°C, il a été observé respectivement une augmentation des dommages à l'ADN ainsi que des lésions oxydantes de l'ADN après 7 jours et 3 jours de contamination à l'HTO. Ces données ont été croisées avec une analyse d'expression de gènes ayant mis en évidence la sur-expression de gènes impliqués dans la conformation des protéines, la réparation des cassures doubles brins ou encore dans des points de contrôle au niveau du cycle cellulaire dès 3 jours d'exposition à 15°C. Ces mêmes gènes ont été trouvés sous-exprimés à 25°C (Dallas et al., 2016).

Chez les vertébrés aquatiques, peu de données sur les effets de l'exposition au tritium sur l'ADN sont disponibles. Cependant, des études *in vivo* chez le médaka et le poisson zèbre, *in situ* chez le poisson tête de boule ou encore *in vitro* viennent enrichir la littérature à ce sujet. Pour des œufs de médaka, *O. latipes*, exposés à de l'HTO pendant 8h, il a été observé une augmentation des aberrations chromosomiques, sous forme de ponts chromosomiques, pour des débits de dose supérieurs à 23,75 mGy/h (Suyama et al., 1981). Chez le poisson zèbre, *D. rerio*, les dommages à l'ADN ont été évalués via le test des comètes après une exposition d'œufs à de l'HTO (débits de dose de 0,04 ; 0,4 et 4 mGy/h) et à de la thymidine tritiée (débits de dose

de 0,125 ; 0,25 ; 0,625 ; 3,5 mGy/h). Ces études ont mis en évidence une augmentation des dommages après 140h d'exposition à la thymidine tritiée pour le débit de dose maximum (3,5 mGy/h) (Adam-Guillermin et al., 2012a). Pour les expositions à l'HTO, une augmentation significative des cassures a également été observée après 24h et 96h d'exposition à 0,4 mGy/h (Gagnaire et al., 2016). En revanche, une proportion moins importante de cassure a été mise en évidence après 96h d'exposition à 0,04 mGy/h (Gagnaire et al., 2015b). Chez le poisson tête de boule exposé pendant 60 jours, une étude de terrain (5 sites contaminés de 1,6 à 12415 Bq/L) a mis en évidence une augmentation des dommages à l'ADN par rapport au poisson du site témoin. Une analyse des micronoyaux a également mis en évidence une augmentation de leur nombre par rapport au site témoin excepté pour le site avec l'activité la plus faible. Bien que cette étude croise la contamination au tritium et aux métaux, il a été montré que les biomarqueurs "dommage à l'ADN" et "micronoyaux" étaient exclusivement corrélés avec le débit de dose interne en tritium dans les poissons (Gagnaire et al., 2017a). Pour finir, une étude *in vitro* sur des cellules sanguines de poisson chat, *Ictalurus punctatus*, a mis en évidence une augmentation des cassures dès  $1.10^2$  Bq/L d'HTO. L'analyse des micronoyaux avec et sans stress ajouté a montré respectivement une augmentation à  $1.10^2$  et  $1.10^4$  Bq/L et dès 10 Bq/L. De plus, l'activité de réparation via l'analyse des foyers  $\gamma$ -H2AX a mis en évidence une augmentation de ces foyers dans les cellules de 10 à  $1.10^3$  Bq/L d'HTO (Stuart et al., 2016).

### 3.4. Synthèse sur la toxicité du tritium chez les organismes aquatiques

La toxicité du tritium chez les organismes aquatiques, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés, a été étudiée pour des débits de dose allant de  $1,1.10^{-6}$  mGy/h (Ichikawa and Suyama, 1974) à  $9,1.10^2$  mGy/h (Higuchi et al., 1980). La comparaison de ces études a mis en évidence le fait que les invertébrés semblaient plus sensibles que les vertébrés après exposition au tritium (Adam-Guillermin et al., 2012b; ASN, 2010). De plus, il a été mis en avant que les principaux effets biologiques étudiés portaient sur le développement et la reproduction avec moins d'études se focalisant sur les effets génotoxiques bien que l'ADN soit une cible pour les rayonnements ionisants (Adam-Guillermin et al., 2012b). La comparaison de la littérature portant sur les effets du tritium a également mis en évidence le peu de publications s'intéressant aux effets suivants (Adam-Guillermin et al., 2012b) :

- 
- Les cassures doubles brin de l'ADN et les voies de réparations de ces dernières malgré le fait que ce type de dommages semble le plus délétère pour la cellule.
  - Les effets transgénérationnels qui n'ont été évalués, pour le tritium chez les organismes aquatiques, que via l'étude de 5 générations de daphnies ([Gudkov and Kipnis, 1996](#)).
  - Les comportements reproducteurs, étudiés uniquement chez les guppies ([Erickson, 1971](#)). Ce type d'étude peut servir dans l'évaluation du risque associé à l'exposition au tritium notamment sur les populations.
  - L'adaptation/l'acclimatation ou la résistance face aux rayonnements ionisants reste un sujet peu étudié pour l'exposition au tritium. En effet, les études sur la toxicité du tritium ne couvrent que des expositions allant de quelques heures à quelques mois. Des temps d'exposition plus longs permettraient d'étudier des mécanismes adaptatifs sur les organismes.

Dans ce contexte général, le projet de recherche développé dans cette thèse se focalise sur les effets à différents niveaux d'organisations biologiques après une exposition à l'HTO sur les stades de développement précoce d'un vertébré aquatique, le poisson zèbre, *Danio rerio*, ainsi que sur la caractérisation robuste de la dose.

---

## Partie B - objectifs et choix expérimentaux

---





## 1. Objectifs

### 1.1. Axe 1 : incorporation du tritium et calcul des débits de dose

Ce premier axe se découpe en deux grandes parties, (i) caractériser la fraction de tritium incorporée dans les organismes et (ii) calculer les débits de dose associés aux activités utilisées pour la contamination.

La première partie de ce travail se heurte à des difficultés méthodologiques dues principalement aux capacités d'échange isotopique rapide du tritium avec l'hydrogène du milieu ambiant. De plus, les méthodes de préparation des échantillons biologiques décrits dans la partie A (i.e. lyophilisation/combustion) ne sont pas applicables dans notre cas. En effet, au vu de la masse de nos échantillons et de la masse nécessaire pour réaliser cette technique, il n'est pas possible de la mettre en place. Le développement d'un protocole d'échantillonnage robuste et reproductible est donc indispensable pour la caractérisation de l'incorporation. Les données d'incorporation ainsi obtenues serviront par la suite au calcul des débits de dose.

### 1.2. Axe 2 : Évaluation des effets biologiques

L'objectif de ce second axe est de caractériser les modes d'actions toxiques de la contamination à l'HTO sur les stades de développements précoces du poisson zèbre (*Danio rerio*). Un ensemble de biomarqueurs a été sélectionné en amont dans le but de répondre à cet objectif. De plus, différentes échelles biologiques pertinentes d'un point de vue toxicologique et environnemental ont été sélectionnées dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui les lient.

## 2. Choix expérimentaux

### 2.1. Forme du tritium et modèle biologique

En France, le tritium est principalement rejeté sous forme d'HTO dans les effluents liquides des centrales de production d'électricité et des usines de retraitement des combustibles usés. De plus, les projets de recherche concernant les réacteurs de nouvelles générations comme les EPRs et le projet ITER sont susceptibles d'augmenter les rejets de tritium sous forme HTO dans l'environnement (ASN, 2010). Bien qu'il soit considéré qu'une fois rejeté dans ces écosystèmes

l'HTO serait rapidement dilué, il est néanmoins nécessaire d'évaluer les effets toxiques potentiels de cette forme en particulier.

Les écosystèmes aquatiques étant les principaux récepteurs d'HTO, nous avons choisi d'évaluer ses effets sur un vertébré aquatique, le poisson zèbre, *Danio rerio*. Ce poisson d'eau douce de la famille des Cyprinidés se trouve naturellement dans les eaux chaudes du Gange et du Brahmaputra au nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Népal (Spence et al., 2008). Le poisson zèbre est un modèle biologique couramment utilisé. Les adultes sont de petite taille, ils mesurent environ 4 cm de long, ce qui permet un maintien facile en laboratoire. Ce maintien est d'autant plus facile qu'il existe du matériel d'élevage et de reproduction spécialisé pour cette espèce. Le cycle de vie du poisson zèbre est relativement court avec une maturité sexuelle atteinte trois mois après la fécondation (Figure B-1) (Scholz et al., 2008). En laboratoire, la reproduction est elle aussi rapide, une fois les couples en contact, moins de trente minutes suffisent pour obtenir une centaine d'œufs synchronisés et transparents par couple. De plus, les adultes sont en théorie capables de se reproduire deux fois par semaine en donnant une qualité et une quantité d'œufs très satisfaisante pour une expérimentation. Cette qualité n'est pas négligeable dans le cas de cette thèse qui se focalise sur les effets sur les stades embryolairaires du poisson zèbre.

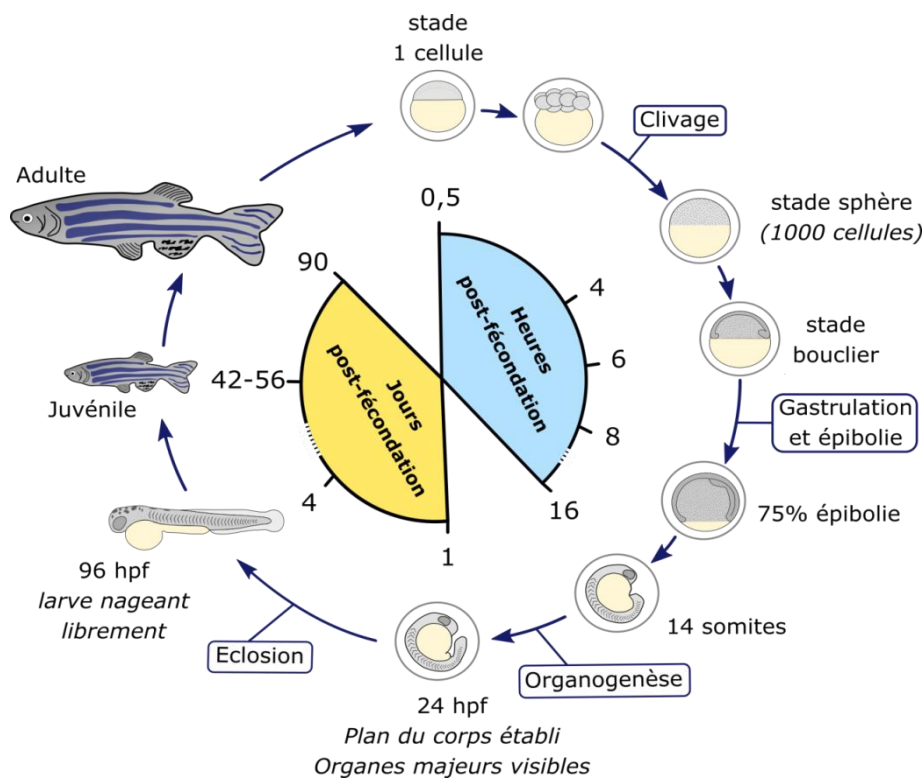


Figure B-1 : Schéma du cycle de développement du poisson zèbre (*Danio rerio*)

Pour cette thèse, nous nous sommes donc concentrés sur les stades embryo-larvaires, plus particulièrement les stades de développement à 24 hpf (heures post-fécondation) et 96 hpf. Le premier stade nous permet d'avoir une idée des effets de l'HTO sur un stade où l'organogenèse des organes majeurs est quasi-complète et le second se place après l'éclosion. Ces deux stades de développement permettent l'évaluation d'un certain nombre d'effets létaux, sublétaux et tératogènes après l'exposition à un stresser que des stades plus précoces ne permettent pas d'évaluer ([Tableau 1](#)). De plus, les stades embryo-larvaires sont considérés comme étant les plus sensibles et de ce fait, sont recommandés par l'OCDE pour les test de produits chimiques ([OECD, 2013](#)).

**Tableau 1** : Principaux stades de développement précoce chez le poisson zèbre et les effets toxiques (propanol, malathion et cadmium) correspondant pouvant y être observés. D'après ([Frayssé et al., 2006](#))

Stade (hpf)	1,5	8	24	48	82
<u>Effets létaux</u>					
Coagulation/embryons morts	+	+	+	+	+
Détachement de la queue	-	-	+	+	+
Battement cardiaque	-	-	+	+	+
<u>Effets sub-létaux</u>					
Retard de développement	-	+	+	+	+
Développement des somites	-	-	+	+	+
Mouvements spontanés	-	-	+	+	-
Développement de l'œil	-	-	+	+	+
Développement de l'otolithe	-	-	+	+	+
Circulation sanguine dans la queue	-	-	-	+	+
Fréquence cardiaque	-	-	-	+	+
Œdème (péricardique et de la réserve vitelline)	-	-	+	+	+
Éclosion	-	-	-	+	+
<u>Effets tératogènes</u>					
Malformation de la queue	-	-	-	+	+
Longueur de la queue	-	-	-	-	+

Chez le poisson zèbre, les œufs sont transparents et se développent à l'extérieur de la mère ce qui facilite les observations ainsi que l'identification de gènes impliqués dans le développement lors d'observations de mutants ([Scholz et al., 2008](#)). De plus, le génome du poisson zèbre est entièrement séquencé et bien annoté ce qui facilite les analyses génétiques sur cette espèce. Un certain nombre de mutants est également disponible, notamment avec des phénotypes proches de maladies humaines, ce qui fait de cette espèce un modèle

émergeant pour l'étude de ces maladies (Barut and Zon, 2000; Dooley and Zon, 2000). Les stades précoces de développement sont également bien décrits dans la littérature. Le développement embryonnaire est rapide et se découpe en sept grandes périodes (Kimmel et al., 1995) :

- **Zygote (0 - 45 min)** : pendant cette période, le chorion se gonfle et se détache de l'œuf nouvellement fécondé. La ségrégation du pôle animal et végétal se met en place. Les œufs fécondés sont dits télolécithes car constitués en grande majorité de vitellus (*i.e.* réserves énergétiques du futur embryon).
- **Clivage (45 min - 2h15)** : cette période comporte 6 clivages du stade deux cellules au stade 16 cellules. Ces clivages résultent de la division du cytoplasme du pôle animal. Ces divisions sont dites méroblastiques car ne divisant pas entièrement l'œuf mais uniquement une partie.
- **Blastula (2h15 - 5h15)** : cette période comprend la « Mid-blastula transition » (MBT) lors de laquelle intervient l'activation de la transcription des gènes du zygote. C'est pendant cette période que commence l'épibolie.
- **Gastrula (5h15 - 10h)** : pendant cette période l'épibolie continue. L'épiblaste, l'hypoblaste ainsi que les axes embryonnaires vont se former.
- **Segmentation (10h - 24h)** : pendant cette période, l'embryon s'allonge et des rudiments d'organes deviennent visibles. De plus, le développement des somites commence, ils donneront les vertèbres, les muscles striés squelettiques, le derme et l'hypoderme.
- **Pharyngula (24h - 48h)** : 24h après la fécondation, l'embryon est dit au stade phylotypique, c'est-à-dire qu'il est semblable aux embryons de taxons différents mais du même embranchement. L'axe du corps se redresse autour du sac vitellin. La circulation, la pigmentation et les nageoires commencent à se former. Le cœur est pour la première fois visible et des mouvements musculaires spontanés commencent. Ces derniers permettront des analyses comportementales.
- **Éclosion (48h - 72h)** : pendant cette période, la morphogenèse des ébauches des organes primaires se termine rapidement. Le cartilage se développe dans la tête et les nageoires pectorales. Les embryons éclosent de façon asynchrone.

Suivant l'éclosion, la vessie natatoire va commencer à se gonfler. Des rudiments de nageoires pectorales, de mâchoires et de branchies se forment. La nage devient active ce qui

annonce la respiration, la recherche de proies et l'alimentation. Les larves deviennent capables de se nourrir de façon exogène entre 5 et 6 jpf. La réserve vitelline disparaîtra aux environs de 7 jours post-fécondation (Lawrence, 2007).

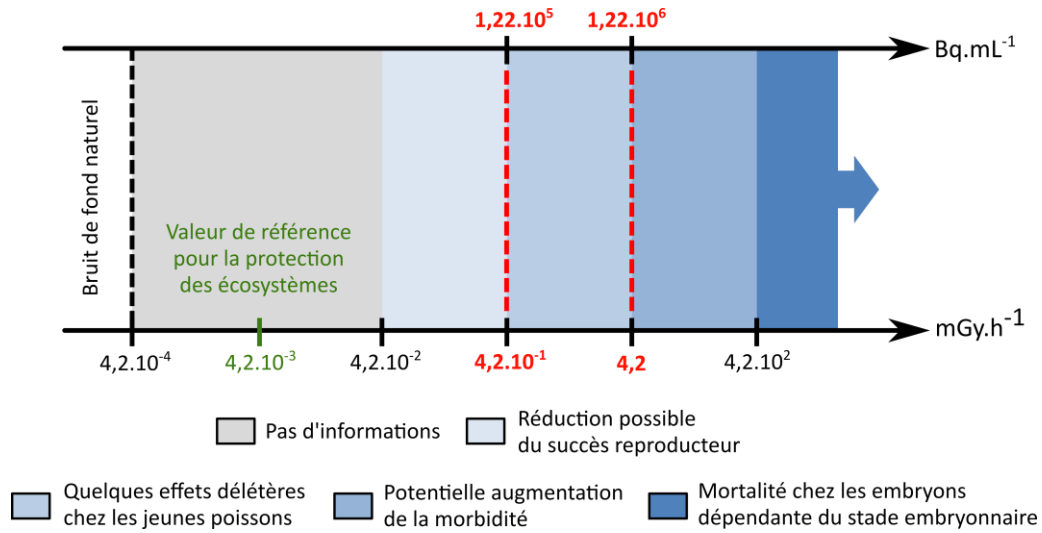
## 2.2. Les débits de dose

Le but de ces travaux étant d'évaluer les modes d'action toxique de l'HTO, nous avons choisi d'exposer des œufs jusqu'à 96 hpf à deux débits de dose : 0,4 et 4 mGy/h (Figure B-2). Ils correspondent aux limites hautes et basses pour lesquelles des effets délétères sont attendus chez les jeunes poissons pour les écosystèmes d'eau douce en prenant la truite comme animal de référence (ICRP, 2012). Ces gammes ont été dérivées de données bibliographiques. A titre de comparaison, ces débits de dose sont bien supérieurs à la valeur de référence pour la protection des écosystèmes de  $10^{-2}$  mGy/h (Garnier-Laplace et al., 2010). Les débits de dose choisis pour cette étude correspondent à des activités en eau tritiée de  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL. Ces activités dépassent largement les activités usuellement mesurées dans les milieux aquatiques et notamment les cours d'eau français. Un certain nombre de données, acquises de 2014 à 2016, ont mis en évidence des teneurs en HTO dans les cours d'eau, hors influence des centres nucléaires de production d'électricité (CNPE), allant de  $1,2 \cdot 10^{-4}$  à  $8,6 \cdot 10^{-4}$  Bq/mL (Ducros et al., 2018). Sous l'influence des CNPE, des données acquises en aval des CNPE ont mis en évidence des teneurs en HTO dans le Rhône et le canal d'Alsace allant de  $1 \cdot 10^{-3}$  à  $6,1 \cdot 10^{-2}$  Bq/mL. Sur des sites comme la Garonne, la Loire, la Vienne, la Meuse, la Moselle et la Seine des teneurs en HTO allant de  $5 \cdot 10^{-3}$  à  $3,5 \cdot 10^{-2}$  ont été mises en évidence (IRSN, 2017). Plus globalement, des teneurs en HTO pouvant aller jusqu'à  $2,3 \cdot 10^4$  Bq/L ont été mesurées sur un site sous l'influence des rejets d'une installation de gestion des déchets nucléaires (Gagnaire et al., 2017a). Après l'accident nucléaire survenu en mars 2011 à Fukushima, des niveaux allant de 0,5 à 1,15 Bq/L de tritium ont été mesurés dans les eaux de surface dans le Nord-Ouest de l'Océan Pacifique quelques mois après l'accident (Povinec et al., 2013). De plus ces activités sont supérieures à la limite dans les eaux de boisson en France et au Canada, 100 Bq/L et 7000 Bq/L respectivement ainsi qu'à la valeur guide de l'OMS<sup>9</sup> de 10000 Bq/L (Canadian Nuclear Safety, 2008; EU, 2013). Il faut rappeler que ces valeurs ne sont pas des limites sanitaires mais plutôt des seuils qui, en cas de dépassement, entraîne une caractérisation de la radioactivité

---

<sup>9</sup> Organisation Mondiale de la Santé

de l'eau. Cependant, l'objectif principal de ce travail de thèse est de mettre en évidence les modes d'action et les effets toxiques d'une exposition au tritium. Pour cela, il est nécessaire de réaliser des études se focalisant sur les mécanismes d'action, ce qui nécessitent des activités et des débits de dose supérieurs à ceux pouvant être mesurés dans l'environnement, car ne produisant souvent que des effets sur le très long terme. De plus, cette étude s'imbrique dans un projet plus vaste utilisant une gamme de débits de dose pour l'évaluation des effets des radionucléides, dont le tritium.



**Figure B-2** : Schéma représentant les gammes de débit de dose pouvant induire des effets délétères en prenant la truite comme animal de référence. Les débits de dose (mGy/h) en rouge représentent ceux choisis pour notre étude avec leur activité en Bq/mL associée.

### 2.3. Terminologie

Tout au long de ce travail, le terme d'internalisation a été préféré à d'autres comme la bioaccumulation ou la bioconcentration pour parler du comportement du tritium. Ces deux termes indiquent le résultat net entre l'absorption d'un contaminant et son excrétion (Arnot and Gobas, 2006), mais sont plutôt applicables aux contaminants chimiques. En effet, la bioaccumulation correspond à l'absorption d'un polluant par un organisme via toutes les voies d'entrée possibles (respiration, contact cutané et consommation de nourriture) (Arnot and Gobas, 2006). Dans le cadre de notre étude, cette définition ne nous a pas semblée adaptée au tritium puisque les organismes ne se nourrissent pas de façon autonome. Le terme de bioconcentration aurait alors pu être utilisé. En effet, ce terme est défini comme l'absorption d'un polluant via l'eau uniquement, ce qui est le cas dans notre étude (Arnot and Gobas, 2006;

Baussant et al., 2001). Cependant, de cette absorption, qu'il s'agisse de bioaccumulation ou de bioconcentration, résulte une augmentation de la concentration en polluant dans l'organisme pouvant dépasser la concentration de ce dernier dans le milieu (Yarsan and Yipel, 2013). Dans le cas du tritium, l'utilisation de ces termes est difficile à justifier. En effet, le tritium libre dans les tissus et le tritium dit « échangeable » vont se mettre rapidement à l'équilibre avec le milieu ambiant (HTO) via des échanges isotopiques rapides. De plus, ces formes vont suivre les variations de concentration en tritium dans le milieu (Baeza et al., 2009) et les valeurs de facteurs de concentrations associées vont tendre vers 1. Dans le cas du tritium dit « non-échangeable », des déséquilibres du rapport TOL/HTO ont été observés. Ce déséquilibre avait été associé à tort au phénomène de bioaccumulation. Or, ce déséquilibre s'explique entre autre par la rémanence du tritium issus des retombées atmosphériques des essais nucléaires (Eyrolle-Boyer et al., 2014; IRSN, 2017). Le terme d'internalisation semble donc, dans le cas du tritium, plus approprié que les termes usuellement utilisé pour des contaminants chimiques.

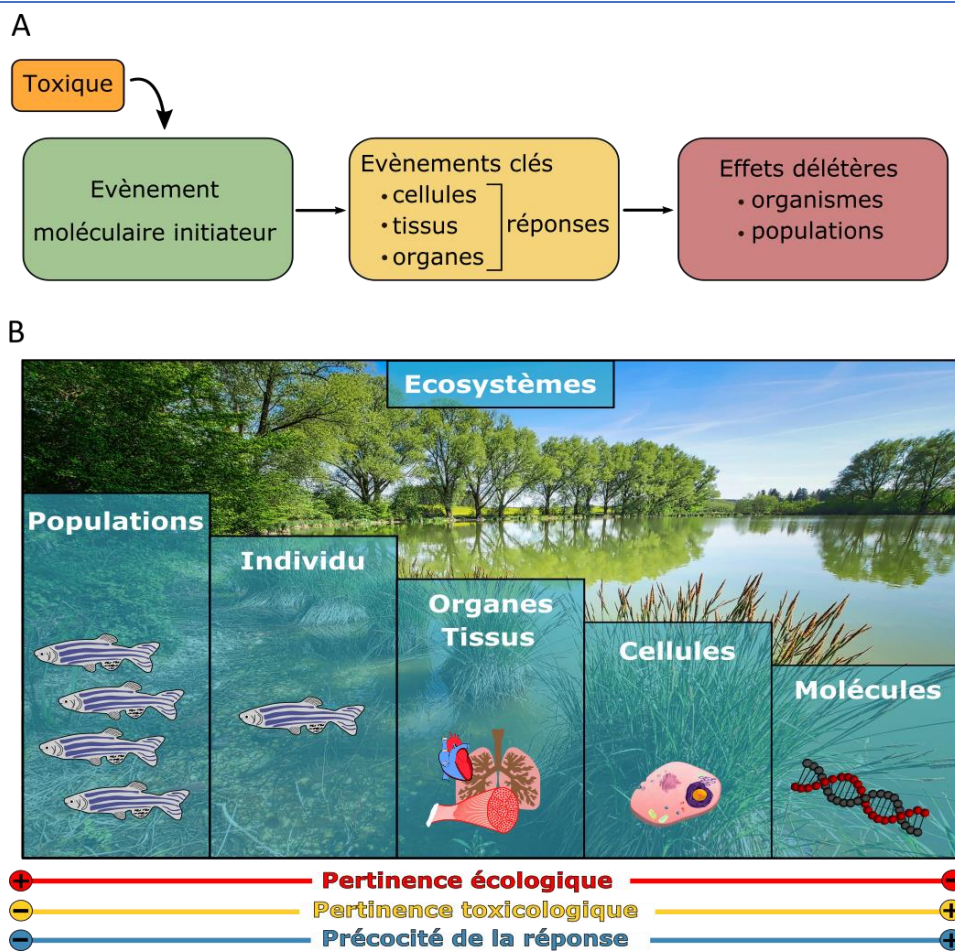
#### 2.4. Choix des marqueurs à différents niveaux d'organisation biologique

Dans le domaine de l'écotoxicologie, une des questions fondamentales est : comment les effets des polluants au niveau des écosystèmes peuvent-ils être prédits par des réponses à des niveaux d'organisation biologique inférieurs ? Depuis les années 70, un effort de recherche a permis de mettre en place de meilleures méthodes d'essais, de sélectionner des espèces pertinentes et indicatrices ainsi que d'identifier des biomarqueurs adéquats pour évaluer la toxicité des polluants sur les espèces non-humaines (Forbes and Forbes, 1997). Les biomarqueurs sont définis comme des changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental. Ils révèlent l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique (Lagadic et al., 1997; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). Malgré le fait que les biomarqueurs couramment utilisés couvrent des niveaux d'organisation biologique allant de la molécule aux populations, ils traduisent souvent la toxicité en elle-même et pas forcément les modes d'action des polluants. C'est pourquoi, en complément des biomarqueurs classiquement utilisés de nouveaux outils comme la toxicogénomique ont fait leur apparition. Ces nouvelles méthodes utilisent des réponses biologiques décrites comme plus précoces et plus sensibles, comme la modification de l'expression des gènes, qui permettront d'améliorer les connaissances sur les

mécanismes toxiques des polluants (Corvi, 2002). Dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental, il est indispensable de prendre en compte toutes les échelles biologiques. En effet, on postule que les effets à l'échelle moléculaire peuvent engendrer des changements au niveau cellulaire qui pourraient se traduire au niveau des organismes voire des populations et des écosystèmes (Garric et al., 2010). C'est dans ce cadre que se développent des concepts comme celui de l'AOP (Adverse Outcome Pathway) qui vise à faire le lien entre un événement initiateur direct au niveau moléculaire après exposition à un toxique et des effets délétères à des niveaux d'organisation pertinent pour l'évaluation du risque environnemental comme les organismes et les populations (Figure B-3) (Ankley et al., 2010). Dans ce contexte, de nouveaux outils tels que la génomique ou la transcriptomique, plus pertinents d'un point de vue toxicologique, sont à coupler avec des études à des niveaux d'organisation supérieurs, qui sont quant à eux plus pertinents d'un point de vue écologique, dans le but d'améliorer l'évaluation du risque associé aux polluants (Figure B-3).

Lors de ce travail de thèse, une analyse transcriptomique globale via le séquençage des ARNm (mRNAseq) a été réalisée. Cette approche a permis d'avoir une vue d'ensemble sur la modulation de l'expression de gènes à la suite de la contamination à l'HTO. Les résultats issus de cette analyse ont été suivis à des niveaux d'organisation supérieure dans le but de faire le lien entre les réponses moléculaires décrites comme précoces et les réponses observées généralement plus tardivement aux échelles cellulaires, tissulaires et individuelles. Notamment, à l'échelle cellulaire, via l'analyse des processus de réparation des cassures doubles brin, les plus délétères pour la cellule, via l'utilisation d'une technique d'immunomarquages des foyers gamma-H2AX. A l'échelle des tissus, des observations des muscles au microscope électronique à transmission ainsi que des analyses histologiques des yeux ont été réalisées. Pour l'échelle individuelle, des analyses comportementales ont été réalisées.





**Figure B-3 :** (A) Concept général de l'AOP d'après (Ankley et al., 2010; Villeneuve et al., 2014). (B) Schéma des liens entre les échelles biologiques et leur pertinence écologique et écotoxicologique ainsi que la précocité des réponses observées

---

Partie C - internalisation du tritium et  
calcul des débits de dose

---



## 1. Résumé de l'article scientifique

### 1.1. Objectifs

Cet article s'inscrit dans l'axe 1 de ce travail de thèse. Cet axe vise à caractériser la part de tritium internalisé dans les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf afin de pouvoir calculer la dose absorbée. Il vise également à relier les effets observés dans l'axe 2 aux deux débits de dose testés de 0,4 et 4 mGy/h. Cette partie de la thèse fait face à un certain nombre de verrous méthodologiques, venant notamment du fait qu'il n'est pas envisageable d'appliquer le protocole classiquement utilisé pour caractériser l'internalisation du tritium. En effet, ce protocole demande des masses d'échantillons biologiques trop importants au vu de la masse des organismes choisis pour cette thèse. De plus, la grande mobilité du tritium via les échanges isotopiques pourrait apporter un biais non négligeable lors de la mesure des échantillons si les étapes de préparations de ces derniers ne sont pas optimisées.

L'objectif de cet article est, dans un premier temps, de développer un protocole robuste et reproductible pour obtenir la mesure de l'activité en tritium dans les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf. La compréhension de l'internalisation est également abordée. Une fois le protocole mis en place, les activités mesurées permettront de calculer les débits de dose réels associés aux expositions.

### 1.2. Matériels et méthodes

#### 1.2.1. Production des œufs et contamination

Des œufs de poisson zèbre (3 hpf) issus de parents non contaminés ([Annexe 1](#)) ont été exposés à deux activités d'eau tritiée :  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL ([Annexe 3](#)). La contamination a été réalisée dans une boîte à gants. Les organismes, témoins et contaminés, ont été placés dans des incubateurs à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pour éviter la contamination du milieu témoin (milieu embryon) par le milieu tritié, les organismes témoins ont été conservés en dehors de la boîte à gants, mais dans la même pièce. Pour éviter la contamination entre les deux activités testées, il a été nécessaire de réaliser des expérimentations séparées pour chaque activité. Des prélèvements d'eau tritiée ont été effectués tout au long des expérimentations pour s'assurer

d'une activité constante en HTO dans le milieu. Les analyses ont été réalisées par scintillation liquide ([Annexe 2](#)).

### 1.2.2. *Mesure du tritium dans les organismes*

- **Optimisation du protocole** : pour pouvoir sortir les organismes de la boîte à gants, il est nécessaire de réaliser une étape de rinçage avec de l'eau pauvre en tritium. Pour évaluer l'impact de cette étape sur la mesure de l'activité dans les organismes, nous avons comparé les activités mesurées dans des œufs à 24 hpf rincés ou non rincés ([Figure 1](#)). Au vu des fortes activités en tritium testées dans cette thèse, il a également été nécessaire d'évaluer l'impact du tritium adsorbé autour des organismes sur la mesure de l'activité. Pour cela, nous avons comparé les activités mesurées dans des œufs à 24 hpf tamponnés sur un filtre, pour retirer le tritium autour du chorion, et non tamponnés ([Figure 1](#) ; [Annexe 4](#)).
- **Mesure du tritium total** : le protocole validé suite à l'étape d'optimisation a été appliqué sur des œufs à 24 hpf et des larves à 96 hpf pour les deux activités testées. Brièvement, les organismes sont dans un premier temps sortis du milieu de contamination et délicatement déposés sur des filtres pour retirer au maximum le tritium adsorbé, qui pourrait biaiser les mesures d'activités. Les organismes sont ensuite placés individuellement dans des flacons de scintillation contenant 1 mL de solvène. Après cette étape, les flacons peuvent être retirés de la boîte à gants pour terminer l'étape de solubilisation et enfin être mesurés par scintillation liquide ([Figure 2](#)). Ce protocole a également été appliqué sur des organismes de 4 hpf à 128 hpf dans le but de réaliser une cinétique d'internalisation du tritium total.
- **Mesure du TOL total** : pour cette mesure, le protocole utilisé pour la mesure du tritium total a été réutilisé. Cependant, avant l'étape de solubilisation avec le solvène, les organismes ont été séchés pendant 48h à 55°C sur une plaque chauffante (pool de 10 individus). Le reste du protocole est le même que décrit précédemment ([Figure 3](#)). Sur la base des activités en TOL en Bq/g de poids sec, une conversion en Bq/mL a été effectuée. Cette conversion est possible via l'utilisation du pourcentage d'hydrogène

dans la masse sèche des organismes, qui a été mesuré sur des échantillons témoins grâce à un compteur CHON. Cette conversion est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats de notre étude avec ceux d'études utilisant le protocole de lyophilisation/combustion qui donne des activités pour le TOL en Bq/mL d'eau de combustion.

- **Calcul du tritium libre dans les tissus (TFWT)** : en connaissant l'activité en tritium total, en TOL total et la teneur en eau des organismes, il est possible de calculer l'activité de TFWT en Bq/mL ([1](#)).

### *1.2.3. Mesure des poids frais et secs*

La mesure des poids des organismes est indispensable au calcul des débits de dose. Pour ces mesures, 30 individus témoins par stade ont été pesés après avoir été délicatement tamponnés sur des filtres pour retirer l'eau adsorbée qui pourrait avoir un impact sur la mesure du poids ([Annexe 4](#)). Ces mesures ont été réalisées sur des organismes témoins uniquement car des expérimentations précédentes pour les mêmes activités et les mêmes stades de développement n'avaient pas mis en évidence d'effet significatif de l'HTO sur la morphologie des individus (Gagnaire et al., données non publiées). Une fois pesés, les individus ont été séchés pendant 48h à 55°C puis pesés de nouveau afin d'obtenir une mesure de poids sec. Ces deux mesures ont permis le calcul du pourcentage en eau dans les organismes.

### *1.2.4. Calcul des débits de dose*

Pour le calcul des débits de dose dans les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf, nous avons utilisé les activités en Bq/g de poids frais obtenues grâce au protocole précédemment décrit pour la mesure du tritium total. Les débits de dose ont été calculés via l'application de coefficients de dose calculés via le logiciel EDEN v3 développé par l'IRSN ([Annexe 5](#)).

### 1.3. Principaux résultats et discussion

Une des premières étapes de ce travail a été d'optimiser un protocole permettant la mesure de l'activité en tritium dans les organismes. Les résultats mettent en évidence un impact significatif du rinçage des œufs par de l'eau pauvre en tritium ainsi qu'un impact significatif du tritium adsorbé sur le chorion. L'étape de rinçage a donc été exclue du protocole car elle sous-estime l'activité en tritium du fait des échanges très rapides entre le tritium des organismes et l'eau pauvre en tritium, et l'étape consistant à tamponner les individus sur un filtre a été conservée car elle permet de s'affranchir du tritium adsorbé.

Une cinétique d'internalisation du tritium total a été réalisée sur des organismes après 1h, 24h, 96h et 168h de contamination à  $1,22 \cdot 10^5$  Bq/mL d'HTO. Les résultats montrent que l'internalisation du tritium total est un processus rapide, en effet, après seulement une heure de contamination, un facteur de concentration de 0,44 a été calculé. Un plateau apparaît ensuite à partir de 24h jusqu'à la fin de l'exposition ([Figure 6](#)). La comparaison des activités calculées pour le TFWT montre également un plateau : les activités calculées ne sont pas différentes après 24h et 96h de contamination. Ces résultats sont en accord avec la littérature portant sur le comportement du tritium notamment chez le médaka, *Oryzias latipes*, pour lequel une internalisation rapide a été mise en évidence avec une activité maximum atteinte en 1 jour pour les adultes et 2 jours pour les œufs après une exposition à de l'HTO uniquement ([Hyodo-taguchi and Egami, 1977](#); [Ueno, 1974](#)). Pour le tritium total, au niveau du plateau, des facteurs de concentrations de 0,62, 0,7 et 0,73 ont été calculés respectivement après 24h, 96h et 168h de contamination ([Figure 6](#)). Pour le TFWT, les facteurs de concentration calculés après 24h et 96h de contamination sont significativement différents (respectivement de 0,65 et 0,87) mais cohérents avec ceux calculés pour le tritium total ([Figure 7](#)). Dans la littérature, pour des organismes exposés uniquement à de l'HTO, des facteurs de concentration du même ordre de grandeur ont été reportés ([Baeza et al., 2009](#); [Hyodo-taguchi and Egami, 1977](#); [Patzner et al., 1973](#); [Ueno, 1974](#)).

Les données issues des mesures de TOL total après 24h et 96h d'exposition à  $1,22 \cdot 10^5$  Bq/mL d'HTO mettent en évidence que le processus d'internalisation pour cette forme organique est bien plus lent que pour la forme libre. En effet, les facteurs de concentrations calculés à partir des activités mesurées sont de 0,055 et 0,075 après respectivement 24h et 96h

de contamination. De plus, le ratio TOL/TFWT calculé pour ces deux temps d'exposition est aux alentours de 8% ([Figure 7](#)). Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, un ratio de 19% a été calculé après 140 jours d'exposition à de l'HTO ([Kim et al., 2013b](#)). Pour des œufs de medaka, *O. latipes*, la proportion de TOL dit « non-échangeable », avec une demi-vie longue dans les tissus biologiques, était de 1% par rapport au tritium libre après 9 jours d'exposition à de l'HTO ([Ueno, 1974](#)).

Dans leur ensemble, ces données montrent que l'internalisation du tritium total ou du TFWT est un phénomène rapide, alors que la formation de TOL dans les organismes est un phénomène plus long. En effet, le TOL se forme dans l'organisme via le métabolisme impliquant de tritium libre. Cependant, il apparaît dans la littérature que cette formation est bien plus lente lorsque les organismes sont uniquement exposés à de l'HTO que lorsqu'ils sont également exposés à du TOL, via la nourriture par exemple ([Jaeschke et al., 2011](#); [Jaeschke and Bradshaw, 2013](#); [Kim et al., 2015](#)). Pour aller plus loin, il serait intéressant de compléter les cinétiques pour le tritium total et pour le TOL. En ajoutant des temps entre 4h et 24h de contamination pour le tritium total, il serait possible de mieux définir le début du plateau, et l'analyse de temps plus précoces et plus tardifs permettrait de mieux comprendre les processus de formation du TOL.

Un des objectifs de ce travail était de réaliser une mesure précise de l'activité en tritium dans les œufs (24 hpf) et les larves (96 hpf) de poisson zèbre dans le but de calculer le plus précisément possible les débits de dose associés à des expositions à  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL. Cette étape est indispensable dans la démarche d'évaluation du risque lié à l'exposition aux radionucléides pour pouvoir relier des effets observés à une dose absorbée par les organismes. Grâce au protocole mis en place lors de ce travail, des mesures d'activités en tritium total ont pu être réalisées pour les deux stades et les deux activités d'HTO. Les débits de dose calculés via ces activités mesurées sont proches des débits de dose théoriques de 0,4 et 4 mGy/h ([Table 1](#)), ce qui confirme la robustesse du protocole mis en place. Cependant, il est important de prendre en compte que le calcul des débits de dose effectué dans ce travail se fait sous l'hypothèse que le tritium est réparti de façon homogène dans les tissus. Or, cette hypothèse semble plus adaptée pour le tritium libre que pour le tritium organiquement lié, qui a une demi-vie biologique dans les tissus plus longue ([Adam-Guillermin et al., 2012b](#); [ASN, 2010](#)). De plus, pour le calcul du débit de dose, un facteur de pondération de 3 a été appliqué pour le tritium afin de prendre en compte son efficacité biologique relative ([ASN, 2010](#)). Cependant, il n'existe



pour l'heure pas de consensus quant à la valeur du facteur à appliquer pour le tritium, sachant que ce facteur de pondération a été initialement dérivé pour des effets stochastiques dans le but de protéger l'Homme. Pour la protection de l'environnement, la prise en compte des effets déterministes semblerait plus pertinent (Higley et al., 2012).

## 2. Article : « Assessing tritium internalization and absorbed dose rate in zebrafish early life stages: importance of rapid isotopic exchange »

Article à soumettre.

**Assessing tritium internalization and absorbed dose rate in zebrafish early life stages:  
importance of rapid isotopic exchange**

Caroline Arcanjo<sup>1</sup>, Denis Maro<sup>2</sup>, Olivier Simon<sup>1</sup>, Karine Beaugelin-Seiller<sup>1</sup>, Isabelle Cavalié<sup>1</sup>,  
Virginie Camilleri<sup>1</sup>, Loïc Carasco<sup>3</sup>, Daniel Orjollet<sup>3</sup>, Christelle Adam-Guillermin<sup>1</sup>, Béatrice  
Gagnaire<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SRTE/LRC,  
Cherbourg-Octeville, 50130, France

<sup>3</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SRTE/LR2T,  
Cadarache, 13115, Saint-Paul-lez-Durance, France

## Abstract

Tritium ( $^3\text{H}$ ) is mainly released into the environment in the form of tritiated water (HTO) by nuclear power plants and nuclear fuel reprocessing plants. To better understand how organisms may be affected by contamination to  $^3\text{H}$  it is essential to link observed effects to a correct estimation of absorbed dose rates. Due to quick isotopic exchanges between  $^3\text{H}$  and hydrogen,  $^3\text{H}$  measurement is difficult in small organisms such as zebrafish embryo, a model in ecotoxicological assay. This work aimed to optimize tritium measurement protocol to better characterize internalization by early life stages of zebrafish. Zebrafish eggs were exposed at one HTO activity concentration of  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL. This activity was calculated to correspond to theoretical dose rates of 0.4 mGy/h, where some deleterious effects are expected on young fish. A protocol for the preparation of biological samples was adapted from the method classically used to segregate the different forms of tritium in organisms. To deal with very quick isotopic exchanges of  $^3\text{H}$  with hydrogen, the impacts of washing by non-tritiated water as well as the bias induced by absorbed tritium around organisms on the measured activity concentration were studied. We managed to develop protocols to perform total tritium and total organically bound tritium (OBT) activity concentrations measurements in zebrafish eggs and larvae. The measurement of these both forms allowed the calculation of tissue-free-water-tritium (TFWT). To better understand total tritium internalization, a study of total tritium kinetics from 4 hpf (hour post-fertilization) to 168 hpf was performed. OBT and TFWT were also assessed to complete the total tritium internalization kinetics. The internalization is a rapid phenomenon reaching a steady-state around 24h after the beginning of contamination for total tritium and TFWT, with concentration factors and TFWT/HTO close to the unit. OBT formation seemed to be slower. It appeared that OBT content in organisms was low with an OBT/TFWT ratio of about 8% for both stages (24 hpf and 96 hpf). To verify absorbed dose rates at key developmental stages (24-hour post-fertilization (hpf) eggs and 96 hpf larvae), they were calculated from total tritium activity concentrations after exposure at  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL, as these two activity concentrations were used to assess effects of tritium in another part of the study. Dose rates calculated from total tritium activity concentrations measured in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were consistent with the nominal ones, which validates the robustness of the protocol developed in the present study.

**Keywords :** Tritium ; Internalization ; *Danio rerio* ; early life stages; Protocol optimization ;  
Dose rate calculation

## 1. Introduction

Tritium ( $^3\text{H}$ ) is a radioactive isotope of hydrogen. It decays, with a half-life of 12.3 years, by emitting  $\beta$  particles. Tritium is mainly discharged into the aquatic environment as controlled releases by nuclear power plants and nuclear fuel reprocessing plants in the form of tritiated water (HTO). Being an hydrogen isotope, tritium follows the hydrogen cycle and hence is highly mobile and ubiquitous in abiotic and biotic compartments (ASN, 2010). In the organisms, tritium is incorporated as Tissue Free-Water Tritium (TFWT) which can be converted into Organically Bound Tritium (OBT) through metabolic processes (Galeriu et al., 2005). As these two forms have different biological half-time, longer for OBT than TFWT, they should be considered separately in radiological risk assessment studies (Diabate and Strack, 1993; Galeriu et al., 2008).

Tritium activity, as a component of water molecules, is expected to reach equilibrium quickly with the constitutive water of organisms and, therefore, its concentration factor is theoretically close to the unit. This assumption is supported by studies investigating TFWT dynamic incorporation in different species of fish (Baeza et al., 2009; Kim et al., 2015, 2013b; Kirchmann et al., 1979; Ueno, 1974). However, there is a lack of data concerning early life stages of fish and contamination at high dose rates.

Understanding the risk of tritium exposure is of growing concern as research projects on thermonuclear fusion reactor are expected to increase tritium releases in the environment (ASN, 2010). The present study integrates within a more general project aiming to assess HTO effect on embryonic development (Arcanjo et al., 2018). The chosen biological model for this project is zebrafish, *Danio rerio*. The early developmental stages of this tropical fish are very well described (Kimmel et al., 1995) and its genome is fully sequenced, which is a useful tool to help our understanding of tritium modes of action. In this context, a reliable tritium measurement in organisms is necessary to determine as accurately as possible the absorbed dose that could be linked to effects in organisms, an essential step with regard to the environmental risk assessment. The study presented here focuses on tritium internalization by

zebrafish early life stages, up to 168 hours post fertilization (hpf), by taking into account some uncertainty sources due to the quick isotopic exchanges between  $^3\text{H}$  and hydrogen.

Isotopic exchanges between tritium and hydrogen requires special care during the preparation of samples for analyses, in order to avoid, or at least minimize,  $^3\text{H}$  equilibration with the ambient medium (Belot et al., 1996). This process could lead to over- or under-estimation of  $^3\text{H}$ -internalization in function of  $^3\text{H}$  background levels. Classically, the segregation of the different forms of tritium in biological samples is made using a freeze-drying and combustion method (ASN, 2010), [Figure S1](#)). Liquid scintillation technique is then applied to measure tritium activity in samples. However, with the case of zebrafish embryo-larvae, it was not possible to use the classical technique of freeze-drying and combustion to measure tritium activity due to the low masses of organisms. Indeed, this technique requires too many organisms to obtain a sufficient mass of biological samples. For instance, this technique required 50 g of muscle in carp, *Caprinus carpio* (Baeza et al., 2009), 50 g of viscera to 200 g of muscle in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Kim et al., 2015, 2013b), or carcasses of ten fathead minnows, *Pimephales promelas* (Gagnaire et al., 2017a). Regarding the size and the mass of zebrafish eggs and larvae, it would take more than 40.000 24 hpf eggs and 200.000 96 hpf larvae to have about 50 g of fresh matter and this was not in good agreement with the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) principle of Russell and Burch (Russell et al., 1959). Consequently, we needed to set up a protocol that correspond to our biological model.

In this context, the objective of the present work was to develop a repeatable and robust protocol to measure total tritium activity concentration in zebrafish embryo-larvae. In order to better characterize the total tritium internalization in organisms, kinetics of internalization was performed. To go further into the dynamics of internalization, OBT was measured and TFWT was calculated based on total tritium and OBT measurements.

To reach this main objective, 3 hpf zebrafish eggs were exposed at a nominal activity concentration of  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL. This activity concentration was calculated to correspond to a dose rate of 0.4 mGy/h by the application of non-weighted dose coefficient related to internal exposure of  $3.25 \times 10^{-6}$   $\mu\text{Gy/h}$  per Bq/kg to convert the dose rate to activity concentrations under the assumption of the homogeneity of the distribution of HTO inside the organisms and at equilibrium (FC=1) (Adam-Guillermin et al, unpublished data). This activity concentration of  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL, together with another activity concentration of  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL, were used to

assess the effects of HTO on 24 hpf and 96 hpf eggs in the effects' part of the general project within which the present work is integrated. That is why it was essential to verify that the exposure at these both activity concentrations led to dose rates close to 0.4 and 4 mGy/h, for which some deleterious effects are expected on young fish in order to link observed effects to accurate dos rates (ICRP, 2012).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Adult fish maintenance and production of eggs

Adult wild-type zebrafish (AB genetic background) were provided by AMAGEN platform (UMS AMAGEN, Gif-sur-Yvette, France) and maintained in a Techniplast© ZebTEC system. Temperature of tanks was kept at  $27\pm 1^\circ\text{C}$  and a photoperiod of 12h/12h dark-light cycle was applied. Eggs were produced by mating 20 couples of adult zebrafish in Breeding Tank - Beach Style Design (Techniplast ©) in a  $27^\circ\text{C}$ -heated room. Synchronised eggs were obtained after 30 min of mating, they were then pooled together, sorted, counted and kept in squared petri dish with embryo medium (60 mg/L of Instant Ocean© sea salt diluted in ultrapure water (Westerfield, 1995)) at  $27^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  until the beginning of the experimentation.

### 2.2. Tritiated water contamination

Tritiated water sources (97% purity, 185 MBq, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) were diluted in embryo medium to obtain final activities of  $1.22\times 10^5$  and  $1.22\times 10^6$  Bq/mL. In order to avoid cross-contamination between the two sources of HTO, experiments were conducted separately. During experiments, contaminated water was sampled several times to monitor HTO activity concentration in water.

For each tritium activity and experiment, eggs were contaminated at 3 hpf. They were placed in glass crystallizers at density of 5 eggs per 2 mL of HTO solution. Eggs were kept in the dark at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  in a thermo-regulated incubator confined inside a glove box. Control eggs were placed in embryo medium and kept in the same manner as contaminated organism, in the same room outside the glove box. Water (50%) in contaminated and control experimental units was renewed once at 72h to ensure water quality for organisms and constant HTO activity concentration.

### **2.3. Measurement of tritium activity concentration in organisms**

#### *2.3.1. Optimization of sampling and sample preparation for the activity concentration measurements*

Optimization experiments were performed on 3 hpf eggs exposed to  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of HTO over 24h. These experiments were achieved to optimize the sampling and the sample preparation steps to have the most accurate measure of total tritium activity concentration in organisms. To assess the impact of a washing step, eggs were washed three times (15 sec each) in 50 mL of tritium-free water (Les Abatilles water, Arcachon, France). Five pools of 10 eggs were used to measure total tritium activity concentration by liquid scintillation. To evaluate the impact of adsorbed HTO, 24 hpf eggs were sampled using a micro spoon spatula (Sigma-Aldrich), placed on a 2  $\mu$ m pore size disc filter (Glass Fiber Filter, Merck-Millipore) and gently wiped on a 2  $\mu$ m pore size disc filter (Glass Fiber Filter, Merck-Millipore) in order to remove, as much as possible, HTO adsorbed around egg chorion. They were then placed individually in scintillation vial to perform the activity concentration. Comparison was made using 24 hpf eggs which had not undergone the washing and the drying steps. They were placed individually in 20 mL scintillation vial (PerkinElmer) and then removed from the glove box to perform the activity concentration measurement. One milliliter of Soluene-350 (PerkinElmer) was then added to each vial and organisms were solubilized at 55°C for 48h. The next step was to stop the solubilisation reaction by adding 35  $\mu$ L of glacial acetic acid (Sigma-Aldrich) and 19 mL of liquid scintillation cocktail (Low Level Tritium, PerkinElmer) and the results were expressed in Bq/g of fresh weight. The methodology is illustrated in [Figure 1](#).

#### *2.3.2. Total tritium*

Due to the large number of organisms required for the evaluation of tritium internalization and for the dose rate calculation, two experiments were performed separately in time, one for the internalization and one for the dose rate calculation. For the study of total tritium kinetics, four life stages (i.e. 4, 24, 96 and 168 hpf) were sampled for the measurement of total tritium activity concentration after an exposure at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of HTO. For the experiment dedicated to the dose rate verification, 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were sampled after an exposure at  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL of HTO. For both experiments, fifteen organisms were sampled at each stage following the protocol below.

In order to evaluate the kinetics of total tritium internalisation and to allow the verification of dose rate, organisms were sampled for total tritium measurement. In the glove box, eggs (4 and 24 hpf) were individually removed from HTO and gently wiped as previously described. This step allowed the removal of adsorbed HTO around the chorion which could bias the measurement of activity. Organisms were placed in 20 mL scintillation vial (PerkinElmer) containing 1 mL of Soluene-350 (PerkinElmer) and taken out of the glove box. Tissue solubilisation was then performed as previously described. The same protocol was applied to larvae (96 hpf and 1638 hpf), except that organisms were lightly wiped on superimposed 0.45  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  filters (Merck-Millipore) before being placed in the scintillation vial with Soluene-350. Control organisms were processed with the same treatment as contaminated ones. Blank samples without organisms were made to measure tritium activity in solutions. Samples were kept at 4°C until their analysis with a liquid scintillation counter with detection limit of 5 Bq/L (Quantulus 1220, PerkinElmer, WinQ software). Spectrums were analysed using EasyView software and the results were expressed in Bq/g of fresh mass. The methodology is illustrated in [Figure 2](#).

### *2.3.3. Total organically bound tritium*

As previously said (see Introduction), OBT has a longer residence time than HTO in organisms. It could be bound to proteins and DNA and therefore promote more detrimental effects than non-bound tritium. Therefore, to be consistent with the effects part of the project, we choose to performed total OBT activity measurements in 24 hpf eggs and in 96 hpf larvae. The same protocol applied excepted that organisms were dried in an oven at 55°C during 48h after the wiping step. Results obtained after the liquid scintillation counting were expressed in Bq/g of fresh and dry mass. The methodology is illustrated in [Figure 3](#).

On the basis of measurements of total OBT activity concentration in Bq/g of dry mass, it was possible to convert this activity concentration in Bq/mL in tissue water using the percentage of hydrogen in the dry matter of organisms. This percentage was assessed using a Vario EL Cube Analyzer (Elementar) in CHN mode. Briefly, 6 pools of at least two hundreds of 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were placed in squared tin foil (D1116, Elemental Microanalysis) and dried 48h at 55°C in an oven. Dried pools were placed in the Vario EL Cube analyzer sample carousel and a mix of gases ( $\text{O}_2+\text{He}$ ) was added as carrier gases. Samples were burned in a



combustion tube at 900°C, and the resulting gases pass through a reduction tube. The mixture is separated into successively; H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub>. Hydrogen content (%) in each sample were then calculated (uncertainty = 12%). It allowed the calculation of a conversion factor ([Figure S1](#)) to convert activity concentration in Bq/g (dry mass) in Bq/mL of water in organism. This conversion was necessary to compare our data with those obtained with the classical methodology ([Figure S1](#)), using combustion water to determine the OBT activity concentration in Bq/mL.

#### 2.3.4. Tissue free-water tritium

As previously said, it was not possible in this study to segregate TFWT and OBT forms using the classical freeze-drying protocol due to the low mass of organisms. However, knowing the total tritium activity concentration (Bq/g fresh mass), the total OBT activity concentration (Bq/g fresh mass) and the water content in life stages of interest, it is possible to calculate the activity concentration of TFWT in Bq/mL following the equation:

$$A_{TFWT} = \frac{A_{tot} - A_{OBT}}{water\ content}, \quad (1)$$

with  $A_{TFWT}$  the activity concentration of TFWT in Bq/mL,  $A_{tot}$  the total tritium activity concentration in Bq/g (fresh mass),  $A_{OBT}$  the total OBT activity concentration in Bq/g (fresh mass) and *water content* the water content in organisms in mL/g (fresh mass).

#### 2.4. Measurement of tritium in water

During the exposure periods, water was sampled every day to monitor HTO activity concentration. Contaminated medium samples (10 µL) were diluted with tritium-free water to obtain a one millilitre sample and were mixed with 19 mL of liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer, DL = 5 Bq/L) and analysed by liquid scintillation counting. Results are expressed in Bq/mL.

### 2.5. Fresh and dry weight measurement

Organism's fresh masses were measured using 30 control organisms for each stage addressed in this study (4, 24, 96 and 168 hpf). Fish were individually removed from embryo medium and gently wiped as previously described (see section [2.3.2. Total tritium](#)). They were then placed in aluminium micro weighing dishes (VWR) previously dried and weighed empty. Organisms' masses were measured using an ultra-microbalance (Sartorius SE2, capacity 2 g to 0.1 µg). Dishes were then identified and placed in an oven during 48h at 55°C, dry masses were weighted using the same ultra-microbalance. The water content for each stage was calculated from the difference between fresh and dry mass.

### 2.6. Dose rates and concentration factors calculation

Dose rates were calculated using the following equation:

$$DR = (DC_{ext} \times Aw) + (DC_{int} \times Ao), \quad (2)$$

where  $DR$  is the total dose rate in µGy/h;  $DC_{ext}$  is the calculated dose coefficient related to external exposure in the medium (water) in µGy/h per Bq/g;  $Aw$  is the measured activity concentration of the HTO in the contaminated medium in Bq/mL;  $DC_{int}$  is the calculated dose coefficient related to internal exposure in µGy/h per Bq/g and  $Ao$  is the measured activity of tritium in the organisms in Bq/g (fresh mass). DCs were calculated using the EDEN v3 software (developed by IRSN ([Beaugelin-Seiller et al., 2006](#))) on the assumption that tritium was uniformly distributed within the organism over the exposure period and using a weighting factor of 3 ([Table S2](#)). These DCs were calculated for each stage used in this study considering the geometry of organisms. Shapes and composition of the organisms and medium as well as considered radiation source were described in the EDEN v3 software ([Table S3](#)). One external media for the exposure was chosen (i.e. water and the position of organisms inside the water column). DCs were then calculated using a Monte-Carlo method.

Concentration factors were calculated using the following equation:

$$CF = (Ao)/(Aw), \quad (3)$$

where  $CF$  is the concentration factor (mL/g);  $Ao$  is the measured activity of total tritium in the organisms at a given time in Bq/g (fresh mass) and  $Aw$  is the measured activity concentration

in contaminated water at a given time in Bq/mL. The internalization of OBT and TFWT in organisms is estimate via the ratio between the activity concentration in contaminated water (Bq/mL) and the activity concentration in organisms (Bq/mL) was also calculated (TFWT/HTO and OBT/HTO).

### **2.7. Statistical analysis**

All statistical analysis were performed using the *stats v3.4.3* package in the R software (R Core Team, 2017). Data normality and homogeneity were assessed using the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test. If needed, data were log-transformed to satisfy the previous hypothesis. Log transformation was applied only to compare activity measured in contaminated water between the experiment performed for the total tritium kinetic and the experiment performed for the verification of dose rates. Comparison of mean were made using ANOVA followed by a pairwise comparison (Tuckey) between groups. A non-parametric test (Kruskal-Wallis) was applied when data, even transformed, did not satisfy the assumption of ANOVA application. This test was followed by a pairwise comparison between groups. Groups were considered significantly different when tests give a p-value < 0.05.

## **3. Results**

All experiments were conducted with a percentage of mortality lower than 20% (data not shown). No difference was noted between controls and contaminated organisms in terms of morphology and hatching rate (data not shown).

### **3.1. Fresh and dry weight measurements**

Given that fresh masses of organisms were needed to calculate activity concentrations in organisms in Bq/g of fresh mass, which will then be used for the calculation of TFWT activity, dose rates and concentration factors (see equations (1), (2) and (3)), measurements were made on the four stages addressed in this work (4, 24, 96 and 168 hpf). Dry masses were also measured to calculate the water content in life stages used for the calculation of the TFWT activity (see equation (1)). Measurements of fresh and dry masses were reported in [Figure 4](#) as

well as water contents (%). Fresh mass in 96 and 168 hpf larvae was about 4 times lower than those measured in 4 and 24 hpf eggs. A slighter decrease (1.4 times) was found for the dry mass considering the same stages as above.

### ***3.2. Impact of washing on the total tritium measured activity concentration***

To get insight into the impact of washing with tritium-free water on activity concentration measured on 24 hpf eggs, we performed an experiment where eggs were washed or not before the measurement by liquid scintillation. The activity concentration in non-washed organisms was significantly higher than activity concentration in washed organisms ( $p$ -value  $< 1.10^{-9}$ , [Figure 5A](#)). Concerning the impact of the tritium adsorbed around the 24 hpf eggs, we compared eggs with and without the wiping step to remove adsorbed HTO. The non-wipe samples presented a higher activity concentration than those with the wiping step ( $p$ -value  $< 1.10^{-11}$ , [Figure 5B](#)). These results indicate that the washing step could lead to a large under-estimation, about 94%, of the activity concentration as almost all the tritium was removed. The wiping step seemed to remove absorbed HTO around the chorion; which could lead, if not removed, to an over-estimation of about 72% on the measured activity concentration. Therefore, the wiping step was added in the protocols for the rest of the study.

### ***3.3. Tritium internalization kinetics at $1.22 \times 10^5$ Bq/mL***

#### ***3.3.1. Total tritium***

To better understand the dynamics of tritium internalization in zebrafish embryo-larvae model, we studied total tritium internalization from 1h to 168h after the beginning of the contamination. The activity of the contamination medium was monitored during the whole experiment (from T+1h to T+168h) and did not show large variations from the nominal activity,  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL ([Table S4](#)). Results of measured activity concentrations in wiped organisms showed that, after 1h of contamination, the activity concentration in 4 hpf eggs was of  $5.54 \times 10^4$  ( $\pm 1.13 \times 10^4$ ) Bq/g of fresh mass, leading to a concentration factor of 0.44 ([Figure 6](#)). On later exposure times, i.e. 24h to 168h, there were no significant differences between the activity concentration in organisms and in concentration factors (from 0.62 to 0.73) ([Figure 6](#)). Measured activity concentration after 1h of contamination was significantly lower than measured activity concentrations for later exposure times meaning that a steady state appears

between 1h and 24h of contamination ([Figure 6](#)).

### 3.3.2. OBT and TFWT

After exposure to  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL, total OBT activity concentration in 24 hpf eggs,  $5.59 \times 10^3$  ( $\pm 7.81 \times 10^2$ ), was significantly lower than that in 96 hpf larvae,  $7.48 \times 10^3$  ( $\pm 1.05 \times 10^3$ ) Bq/mL ([Figure 7A](#)). No significant difference was found between TFWT activity concentration in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae ([Figure 7A](#)).

The OBT/TFWT ratio was also calculated based on total OBT and TFWT activity concentration (Bq/mL). This ratio was 7.25% and 8.33% in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae, respectively ([Figure 7A](#)).

The TFWT/HTO and OBT/HTO ratios were calculated and were significantly different from each other for both tritium forms ([Figure 7B](#)). Ratios were of 0.055 ( $\pm 0.008$ ) and 0.075 ( $\pm 0.011$ ) for total OBT after 24h and 96h of HTO contamination, respectively ([Figure 7B](#)). The TFWT/HTO ratios were of 0.65 ( $\pm 0.13$ ) and 0.87 ( $\pm 0.12$ ) after 24h and 96h of HTO contamination, respectively ([Figure 7B](#)).

### 3.4. Dose rate calculation for both activity concentrations

To calculate the absorbed dose rates, an essential step consisted in measuring activity concentration in the targeted stages for this study (i.e. 24 hpf eggs and 96 hpf larvae). The total tritium activity concentrations were  $7.62 \times 10^4$  ( $\pm 7.05 \times 10^3$ ) and  $6.83 \times 10^4$  ( $\pm 7.68 \times 10^3$ ) Bq/g (fresh mass) in 24 hpf eggs and in 96 hpf larvae, respectively, after a contamination at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of HTO ([Table 1](#)). These activity concentrations were not significantly different from those measured in the study of internalization kinetics experiment for the same stages (ANOVA, [Figure 6](#)) and led to an absorbed dose rate equal to 0.52 ( $\pm 0.047$ ) and 0.47 ( $\pm 0.052$ ) mGy/h in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae, respectively ([Table 1](#)). For the highest activity concentration of HTO tested ( $1.22 \times 10^6$  Bq/mL), activity concentrations measured in organisms were of  $5.57 \times 10^5$  ( $\pm 8.84 \times 10^4$ ) and  $4.82 \times 10^5$  ( $\pm 8.1 \times 10^4$ ) Bq/g (fresh mass) in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae, respectively. Absorbed dose rate corresponding to these activities were 3.75 ( $\pm 0.9$ ) and 3.24 ( $\pm 0.54$ ) mGy/h in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae, respectively ([Table 1](#)). These results were in good agreement with the nominal absorbed dose rates of 0.4 and 4 mGy/h.

The activity concentration in the contaminated medium was monitored. A significant decrease (about 30%, Student test,  $p\text{value} < 1 \times 10^{-5}$ ) in activity concentrations was observed after 96h of contamination compared to activity concentration after 24h of contamination for the highest activity concentration tested ([Table 1](#)). No such decrease was found for the contaminated medium at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL ([Table 1](#)).

## 4. Discussion

### 4.1. Fresh and dry weight measurements

A minimum of 30 embryos or larvae were used to measure fresh and dry masses. Results showed that the mean mass of hatched stages (96 and 168 hpf) was about 4.5 times lower than the mean mass of non-hatched stages (i.e. 4 and 24 hpf). This difference in mass could be explained by the mass of the water contained in the chorion, which cannot be considered negligible at those stages and that is added to the weight of the embryo alone. However, the measurement of the embryos alone, i.e. without chorion, in 4 and 24 hpf, was not possible, the embryo being too fragile to be collected on his own and cannot support the wiping step.

To validate our protocol for the measurement of masses, those of 96 and 168 hpf larvae were compared to those obtained using the allometric relationship proposed by McHenry and Lauder ([McHenry and Lauder, 2006](#)) which was:  $\text{mass}(\text{g}) = 4.14 \times 10^{-6} \times \text{lenght}(\text{mm})^{3.17}$ . Calculated masses were consistent to those measured in our study (data not shown). The mass of 96 hpf larvae obtained in this study ([Figure 4](#)) was also consistent to those measured by Bagatto et al. ([Bagatto et al., 2001](#)), i.e. about 0.33 mg of fresh mass, where four days larvae were processed with a protocol similar to that of this study. These results confirmed that the protocol used in the present work for the measurement of fresh and dry masses was robust and that the obtained masses could be used for the calculation of activity concentration in organisms.

### 4.2. Effects of washing and wiping steps on 24 hpf eggs

The optimizations performed in this study aimed to get insight into the effects of the washing and the wiping steps on the measurement of tritium activity concentration in 24 hpf eggs exposed to HTO. The activity concentration was significantly higher in organisms that where

not washed with tritium-free water. This difference was probably due to the rapid isotopic exchanges between tritium in organisms and hydrogen in tritium-free washing medium. However, it seems that the loss of the internalized tritium due to the washing step was faster than the internalization (CF=0.44 after 1h of contamination, [Figure 6](#)). After the washing step eggs were not wiped, the non-tritiated water around the egg chorion could lead to an under-estimation of the activity measured. However, as no depuration kinetic was performed in this study, it is not possible to ascertain that the washing step performed remove the internalized tritium faster than the internalization or if the differences between non-washed and washed organisms is due to non-tritiated water around the chorion. To go further, it would be interesting to perform a depuration kinetic in zebrafish eggs and larvae. When organisms were wiped, the activity concentration was significantly lower than in non-wiped organisms. These results suggested that HTO adsorbed around organisms cannot be considered negligible even considering the high tritium activity in medium ( $1.22 \times 10^5$  Bq/mL). It was therefore chosen to add a wiping step in the protocol of sampling preparation in order to decrease the bias due to absorbed HTO on activity concentration measurement.

Together, the present results showed that the tritium ability to quickly exchange with hydrogen and the layer around the chorion (tritiated or not) can lead to over- or under-estimation of activity in organisms. These two biases must be considered carefully when addressing tritium internalization in small organisms like zebrafish early life stages. These results validate the protocol that permit the measurement of tritium activity in zebrafish eggs and larvae that cannot be done using a classical methodology of freeze-drying. Indeed, due to the small size of eggs at 24 hpf and larvae at 96 hpf, it was not possible to use this methodology to segregate TFWT and OBT, as it requires enough mass of biological samples to be performed.

### ***4.3. Tritium internalization kinetics***

#### *4.3.1. Total tritium and Tissue Free-Water Tritium internalization*

As expected, results from the kinetic experiment showed internalization in organisms which we consider to be rapid for total tritium. Indeed, after 1h in HTO, the concentration factor was of 0.44 in zebrafish 4 hpf eggs ([Figure 6](#)). The steady state of total tritium activity concentrations in organisms was reached from 24 hours of exposure. This result was also found for TFWT as no significant differences in activity in organisms were found after 24 and 96 h of

exposure. These results are consistent with studies already published on tritium internalization in fish. In adult and medaka eggs, *Oryzias latipes*, a rapid internalization of tritium after HTO exposure was observed during the first days of exposure with a steady state obtained in one day in adult and 2 days in eggs (Hyodo-taguchi and Egami, 1977; Ueno, 1974). This steady state activity was maintained until the end of the experiment (30 days and 6 days for adults and eggs, respectively). In tilapia, it was observed that TFWT reached 70% of the concentration in medium after 1h of exposure to HTO (Kirchmann et al., 1979).

At equilibrium, our results showed mean concentration factors for total tritium of 0.68 (Figure 6). For TFWT, the TFWT/HTO ratio in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were higher (0.65 and 0.87, respectively, Figure 7B) but consistent with those calculated for the total tritium. These results are in good agreement with concentration factors found in the literature for fish exposed to tritium as HTO only. In adult medaka, *Oryzias latipes*, when activity concentration in fish remained constant until the end of exposure, activity concentrations in fish were 73% and 70% of the activity in the culture media after exposure at  $3.7 \times 10^4$  and  $3.7 \times 10^6$  Bq/mL (Hyodo-taguchi and Egami, 1977). For the same species, it was observed that at equilibrium, concentration factor in eggs was of 0.6 for an exposure to  $3.7 \times 10^5$  Bq/mL of HTO (Ueno, 1974). Concentration factors about 0.5 at equilibrium was measured in mosquito fish, *Gambusia affinis*, and gila topminnow, *Poeciliopsis occidentalis*, for both fish born in HTO or exposed to HTO as adults (Patzer et al., 1973). A field study was performed on carp, *Cyprinus carpio*, in the Arrocampo reservoir used for cooling the Almaraz nuclear power plant (Spain). Results highlighted a mean concentration factor for TFWT from 2002 to 2005 of 0.8 from measurement in carp muscles (Baeza et al., 2009).

The results obtained during the kinetic experiment performed in this study showed good agreement with literature. They highlighted that the internalization of tritium in zebrafish eggs and larvae is a rapid phenomenon with activity concentration reaching a steady-state from about 24h after the beginning of the contamination and concentration factors close to the unit. However, samples could be taken between 4 and 24 hpf to ascertain that equilibrium begin between 1 and 24h of contamination. Furthermore, although the activity concentration seemed to reach equilibrium from about 24h, the TFWT/HTO ratio showed that the internalization is still ongoing as they are statistically different. As concentration factors are dependent on the activity concentration in contaminated water, the kinetic could be expanded



to stages beyond 168 hpf larvae to explore if this difference is due to variation in activity concentration in contaminated water or because the internalization is not at equilibrium.

#### 4.3.2. Organically Bound Tritium internalization

In this study, the OBT/TFWT ratio was of the order of 0.08, with a percentage of 0.072 in 24 hpf eggs and 0.083 in 96 hpf larvae, meaning that the steady state is not reached, otherwise the ratio would be of 1. The OBT/HTO ratio in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were of 0.055 and 0.075, respectively. These ratios are significantly different, meaning that the internalization was still ongoing. These results suggested that formation of total OBT is slow when organisms are only exposed to HTO.

This assumption is consistent with literature dealing with tritium internalization. In rainbow trout exposed only to HTO (7 Bq/mL) at juvenile stage, a ratio OBT/TFWT of 19% was calculated after 140 days of exposure (Kim et al., 2013b). In medaka, *O. latipes*, neOBT (non-exchangeable OBT with a long biological half-time) activity concentration in dry eggs were found to be about 1% of activity concentration in fresh eggs after 9 days of HTO exposure at  $3.7 \times 10^5$  Bq/mL (Ueno, 1974). This difference in the percentage could be explained by the fact that medaka eggs were washed with tritium-free water to remove absorbed tritium around eggs and eOBT (exchangeable OBT, with a shorter biological half-time), whereas in the present study, total OBT (eOBT + neOBT) was measured. In adult mussels, *M. edulis*, concentration factors based on dry mass in different tissues was of the order of 0.1 after 7 days exposure at  $3.7 \times 10^4$  Bq/mL and 14 days exposure at  $2.4 \times 10^4$  Bq/mL (Jaeschke et al., 2011). Concentration factors based on dry mass in the present study were of 0.025 in 24 hpf eggs and 0.04 in 96 hpf larvae. The difference in organisms considered, life stages and exposure time could explain the differences in concentration factor.

It is assumed that OBT is formed through metabolism involving HTO. It was already shown that OBT formation occurred in mollusk only exposed to HTO (Jaeschke et al., 2011). Furthermore, in the same study, it was showed that the rate of OBT formation was much higher when organisms were fed with organically bound tritium than exposed to HTO only. Moreover, the same internalization rate was found in rainbow trout feed with OBT-spiked food only or exposed to HTO and feed with OBT-spiked food (Kim et al., 2015). In the blue mussel, *M. edulis*, fed with tritiated phytoplankton (OBT), the activity concentration of tritium in different mussel's tissues increase with the number of feedings (Jaeschke and Bradshaw, 2013).

Therefore, in the present study, as no OBT were given to organisms it is not surprising to measure low levels of OBT in organisms and to calculate low OBT/TFWT ratio ([Figure 7A](#)).

Together, our results confirmed previous findings that OBT formation is a quite long process, when organisms are only exposed to HTO. It would be interesting to add sampling times to the experiment of kinetics of total OBT formation in early life stages of zebrafish to improve our knowledge of organically bound tritium dynamic. From the point of view of effects on organisms, it would be interesting to discriminate the OBT forms. As eOBT is expected to exchange quickly with HTO, it could be considered as a part of HTO pool, while neOBT with its longer residence time and its ability to bind to biomolecules as DNA or proteins, could have more detrimental effects than eOBT and TFWT ([Galeriu et al., 2008](#)).

#### **4.4. Verification of absorbed dose rate after exposure at $1.22 \times 10^5$ and $1.22 \times 10^6$ Bq/mL**

##### *4.4.1. Variations in measured activity in water*

Tritiated water activity was monitored throughout the experiments for both activity concentrations tested in this study. Despite the renewal, there was a decrease of 30% in activity concentration for the experiment at  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL. As one of the particularities of HTO is its ability to exchange very quickly with hydrogen ([ASN, 2010](#)), this variation could be due to uncontrolled isotopic exchanges between HTO in contamination medium and ambient medium inside the glove box. A non-significant decrease (5%) was observed for the experiment at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL. Such a decrease has already been documented during 96h of HTO contamination of adult mussels, *Mytilus edulis*, with activities of  $3.7 \times 10^3$ ,  $3.7 \times 10^4$  and  $1.48 \times 10^5$  Bq/mL ([Jha et al., 2005](#)). Authors observed decrease of 0.4, 3.1 and 6.3% from T0 to T+96h in HTO contamination medium. As in the present study, the decrease in activity concentration in contaminated medium follows the increase in nominal concentration in the same medium. However, this decrease has no incidence on concentration factors as they took into account this decrease as it was calculated using the measured activity concentration in water at the time of the sampling.

##### *4.4.1. Absorbed dose rate verification*

One of the objectives of this study was to measure activity concentrations in 24 hpf eggs

and 96 hpf larvae to be able to verify the theoretical absorbed dose rates of 0.4 and 4 mGy/h. In a risk assessment context, this verification is essential to link the observed effects to a relevant absorbed dose rate in organisms. With the validation of the protocol to measure activity concentration, it was possible to achieve this objective. Activity concentrations obtained allowed calculation of absorbed dose rates of 0.5 and 3.5 mGy/h (both stages pooled) after exposure to nominal activity concentrations of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL of HTO, respectively ([Table 1](#)). These calculated dose rates are consistent with theoretical ones of 0.4 and 4 mGy/h. As already said, the activity concentration used in the present study, and in the effect part of the general project, were calculated to correspond to dose rates of 0.4 and 4 mGy/h by the application of a dose coefficient related to internal exposure of  $3.25 \times 10^{-6}$   $\mu\text{Gy/h}$  per Bq/kg and under the assumption on equilibrium (FC=1). However, in the present study, dose coefficients related to external and internal exposures were used in the calculation of dose rate (see equation [\(2\)](#)) and are different from the unique dose coefficient used in the original calculation of activity concentration ([Table S2](#)). One explanation for founding dose rate so close to the theoretical ones despite the difference in dose coefficients used could be that the original calculation was made under the assumption of equilibrium (FC=1). In our study, equilibrium seems to be reached around 24 h after the beginning of contamination. However, concentration factors were about 0.68 which could explain dose rate close to 0.4 and 4 mGy/h.

It must be noted that the calculation of dose rates in this study was performed using several assumptions (see [2. Materials and methods](#)). Dose coefficients applied to convert tritium activity concentrations in Bq/g of fresh mass to dose rate in mGy/h were obtained under the assumption that tritium is homogeneously distributed in tissues. It seems that this assumption is more suitable for the dose calculation in the case of HTO than for OBT, that could be incorporated into DNA for example, with a longer residence time ([Adam-Guillermin et al., 2012b](#); [ASN, 2010](#)). Studies on mussels reported tissue-specific distribution of OBT dependent on activity concentration, exposure time or intake of tritiated food ([Jaeschke et al., 2011](#); [Jaeschke and Bradshaw, 2013](#); [Jha et al., 2005](#)). The reliability of an average dose rate to organisms could be questioned for OBT and method used to calculate dose rate for this form could be improved using experimental data to know if a refinement of the calculation methods is required ([Adam-Guillermin et al., 2012b](#); [ASN, 2010](#)).

A weighting factor of 3 was applied to integrate the relative biological effectiveness of tritium radiation (ASN, 2010). However, there is not a consensus concerning the value of weighting factor in the scientific community. Weighting factors were firstly derived from stochastic effects for human protection. However, endpoints for biota protection focused mainly on determinists effects, which are more relevant for population protection (Higley et al., 2012). We should keep in mind that weighting factor are essential for the risk assessment, however, to compare effects between tritium beta radiation and other ionizing radiation, such as gamma rays, it would be necessary to remove this weighting factor.

## Conclusion

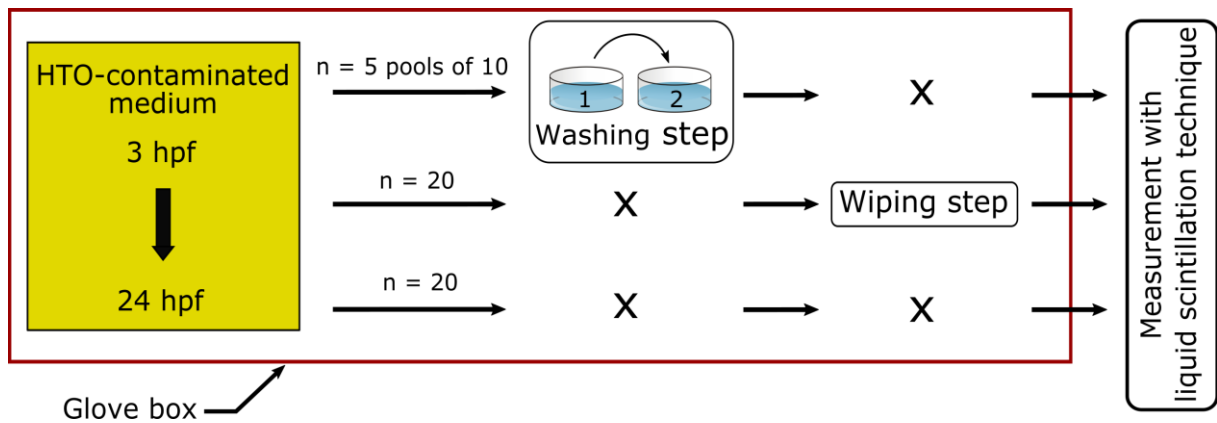
The present work focused on the internalization of tritium and the dose calculation following HTO exposure using a vertebrate model, the zebrafish early life stages. The first step consisted in addressing methodological issues, as quick isotopic exchanges that could bias activity concentration measurement in organisms. We adapted and optimized the sampling and preparation of the samples to measure, as accurately as possible, activity concentrations in our organisms. Results were in good agreement with already published data dealing with tritium internalization obtained with classical protocols which validate our method. Our study showed that the internalization of total tritium by organisms is a rapid phenomenon as after only 1h of HTO contamination, the concentration factor was of 0.44. Results of the internalization kinetic experiment also highlighted that a steady-state was reached, as activity concentrations measured in 24 hpf eggs remained constant until the end of experiment for total tritium and TFWT. In the same way, results concerning the OBT content in our organisms were in good agreement with the literature. We confirmed that OBT formation is a slow process. It would be interesting to go further in the study of kinetics internalization of TFWT and OBT to confirm the timing of equilibrium for the TFWT and to better understand the internalization for OBT. The present work also aimed at verifying absorbed dose rates after exposure at activity concentration used in the part of the project assessing the effects of tritium in order to be able to link observed biological effects to an absorbed dose rate. Values calculated were close to nominal ones for both activity concentrations tested. To conclude, the present work provided tools to measure total tritium and OBT activity concentrations in small size organisms as zebrafish eggs and larvae when the classical protocol of freeze-drying cannot be applied. It also

underlined the importance of dilution or concentration of tritium due to the very quick isotopic exchanges. It provided a better understanding of tritium internalization in zebrafish early life stages and allowed the verification of absorbed dose rate that could be linked to biological effects, which is an important step in the environmental risk assessment.

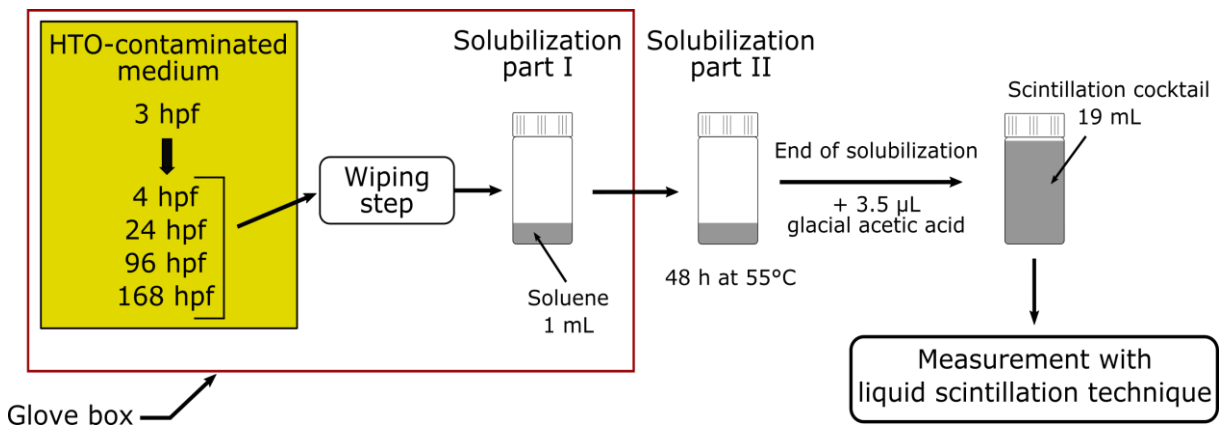
### **Acknowledgments**

This work was supported by the GGP research program supported by IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) and EDF (Electricité de France).

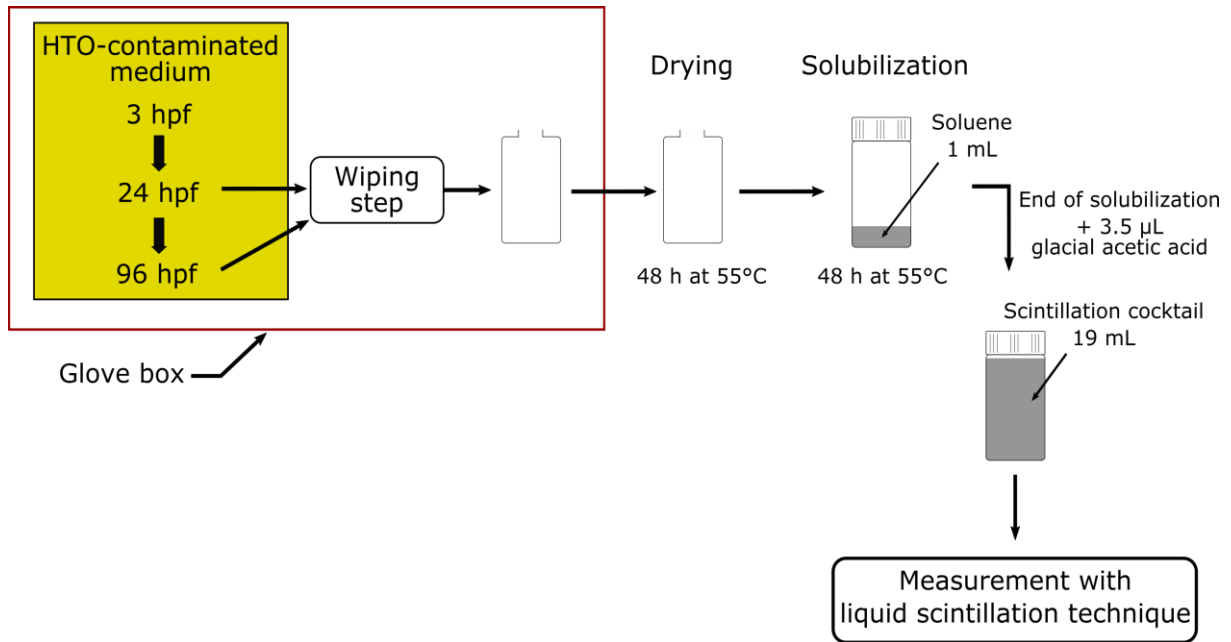
Figures



**Figure 1:** Methodology used to measure total tritium and assess the effects of rinsing and wiping steps on activity concentrations in 24 hpf eggs. Red line represents the limits of the glove box and crosses mean that samples did not undergo the washing step, the wiping step or both.



**Figure 2:** Methodology used to measure total tritium activity concentration in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae. Red line represents the limits of the glove box.

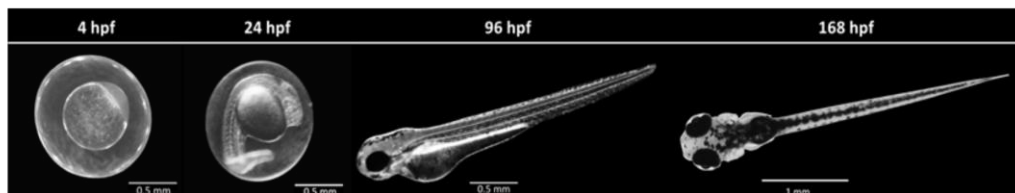


**Figure 3:** Methodology used to measure total OBT activity concentration in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae. Red line represents the limits of the glove box.

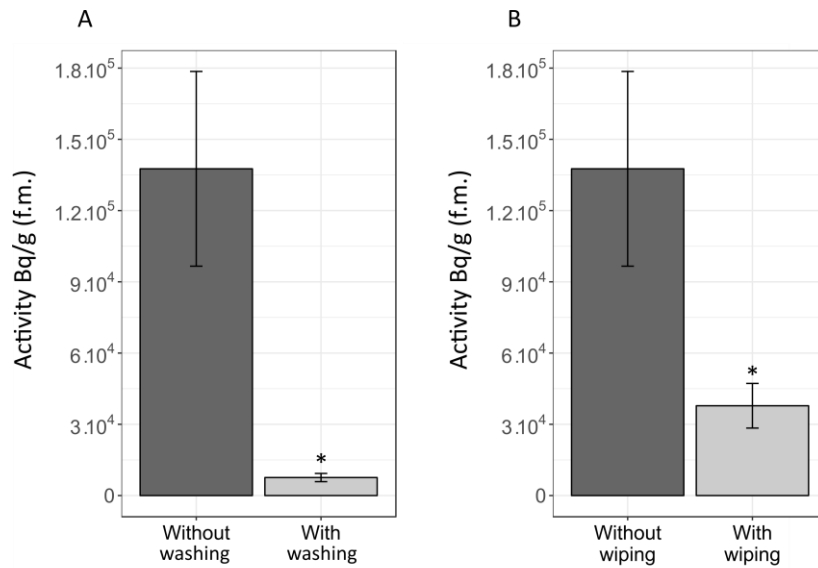
A

Stages	4 hpf (n=30)	24 hpf (n=28)	96 hpf (n=30)	168 hpf (n=30)
Fresh mass (mg)	1.15 ( $\pm 0.09$ )	1.18 ( $\pm 0.11$ )	0.25 ( $\pm 0.03$ )	0.28 ( $\pm 0.02$ )
Dry mass (mg)	0.072 ( $\pm 0.004$ )	0.07 ( $\pm 0.003$ )	0.053 ( $\pm 0.008$ )	0.048 ( $\pm 0.003$ )
Water content (%)	93.72 ( $\pm 0.43$ )	94.05 ( $\pm 0.47$ )	78.7 ( $\pm 1.72$ )	82.79 ( $\pm 0.4$ )

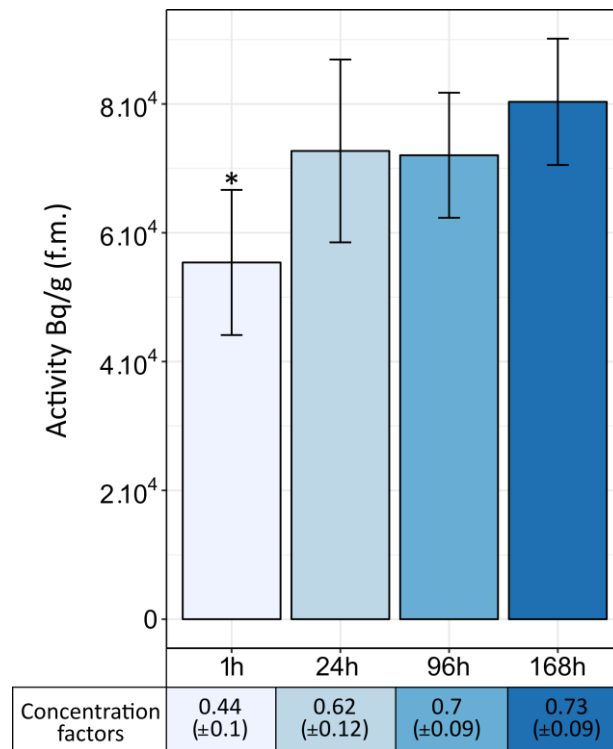
B



**Figure 4:** (A) Measured fresh and dry mass (mg) and calculation of water content (%) in 4 and 24 hpf eggs and in 96 and 168 hpf zebrafish larvae ( $\pm$  sd) and (B) Pictures corresponding to life stages used in this study.

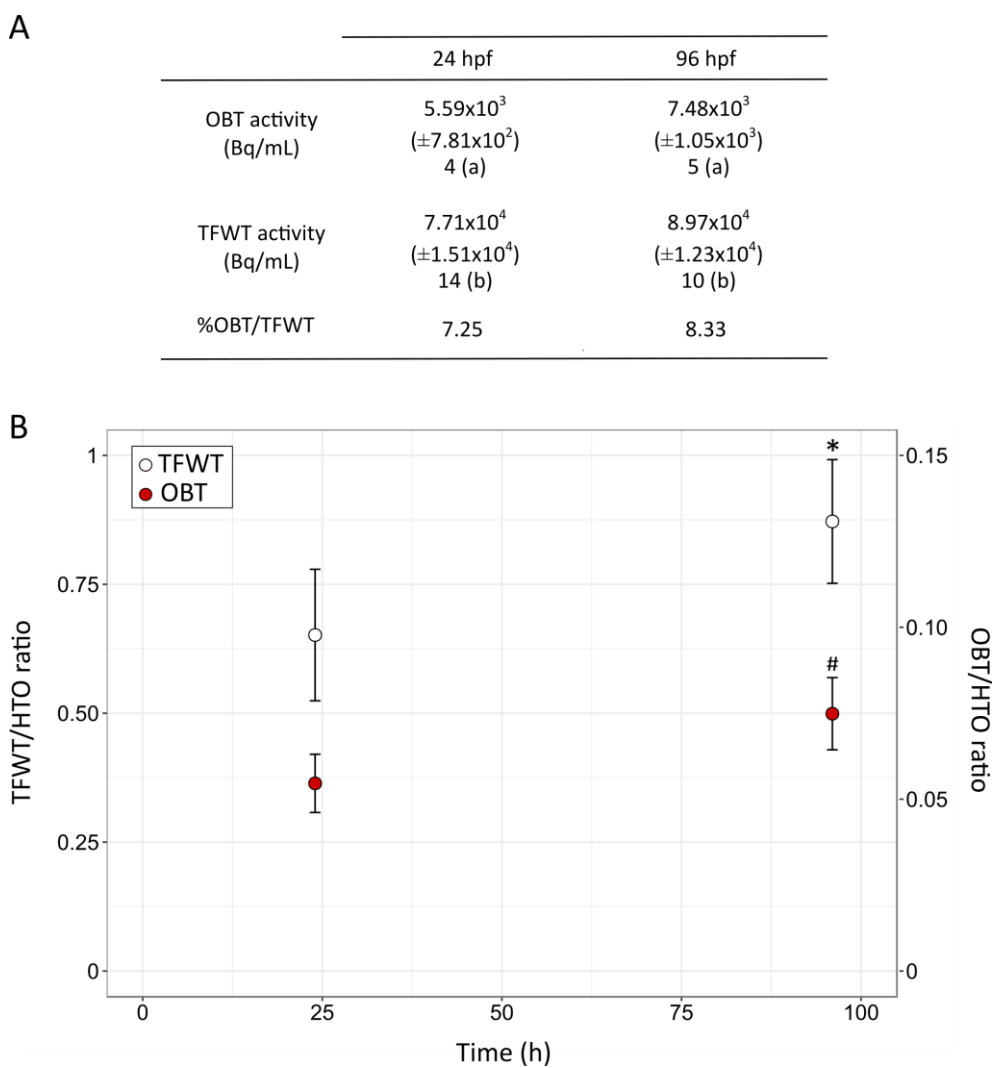


**Figure 5:** Mean total tritium activity concentration (Bq/g of fresh mass) ( $\pm$ sd) in 24 hpf eggs exposed at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of of tritiated water. (A) Without or with washing and (B) without or with wiping before the measurement of activity. \* indicates statistical difference between groups (Kruskal-Wallis, pairwise t.test,  $\alpha = 0.05$ )



**Figure 6:** Total tritium activity concentration (Bq/g of fresh mass) and related concentration factors in zebrafish from 1h to 168h after the beginning of contamination with  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of tritiated water ( $\pm$ sd). \* indicates statistical differences between groups (ANOVA, pairwise t.test,  $\alpha=0.05$ )



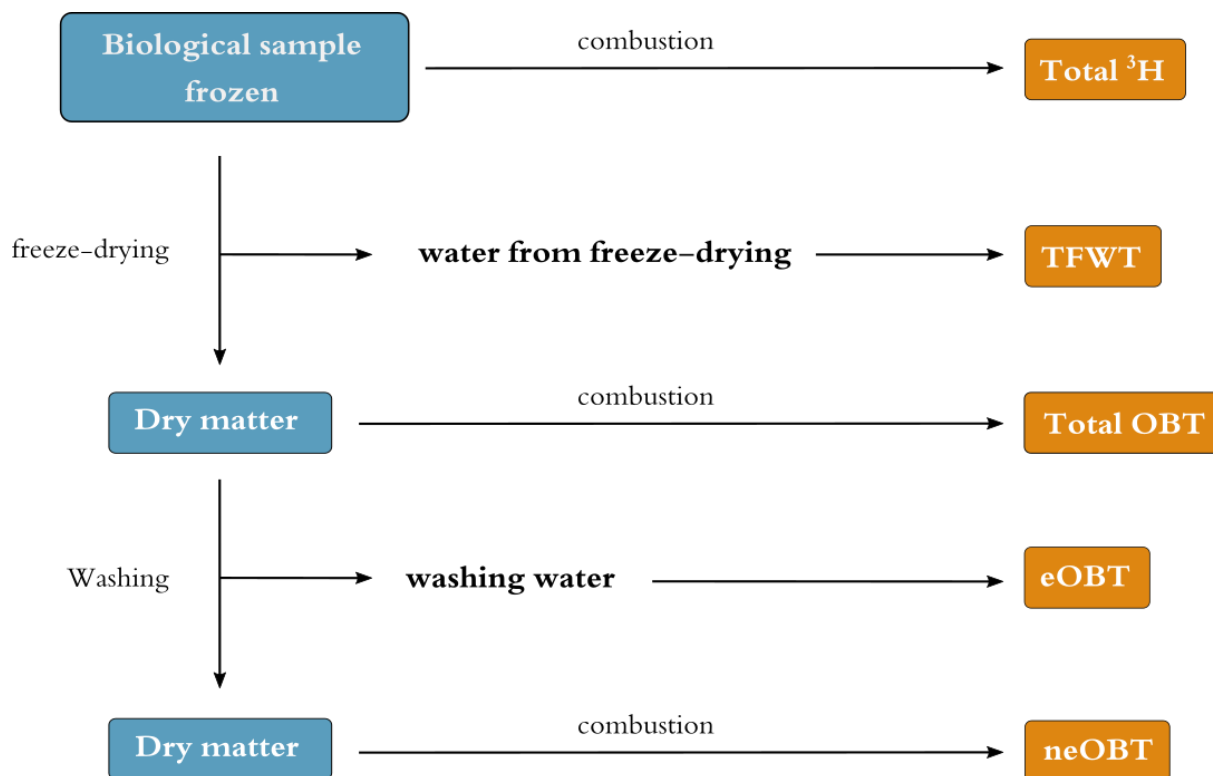


**Figure 7:** (A) OBT and TFWT activity concentrations ( $\pm$  sd) in 24 and 96 hpf organisms and corresponding OBT/TFWT ratio (%) after exposure at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of tritiated water. (a) Number of pools of 10 organisms and (b) Number of individuals. (B) TFWT/HTO and OBT/HTO ratios ( $\pm$  sd) in 24 and 96 hpf organisms after exposure at  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of tritiated water. \* and # indicate statistical differences between stages for TFWT/HTO and OBT/HTO ratios (ANOVA, pairwise t.test,  $\alpha=0.05$ ).

**Table 1:** Measured total tritium activity concentration ( $\pm$ sd) in water and in 24 hpf eggs and 96 hpf larvae, concentration factors ( $\pm$ sd) and calculated absorbed dose rates after exposure at  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL of tritiated water ( $\pm$  sd).

	$1.22 \times 10^5$ Bq/mL		$1.22 \times 10^6$ Bq/mL	
	24 hpf (n=14)	96 hpf (n=15)	24 hpf (n=15)	96 hpf (n=14)
Measured activity in water (Bq/mL)	$1.15 \times 10^5$ ( $\pm 2.03 \times 10^3$ )	$1.13 \times 10^5$ ( $\pm 2.28 \times 10^3$ )	$1.21 \times 10^6$ ( $\pm 8.88 \times 10^3$ )	$8.23 \times 10^5$ ( $\pm 3.23 \times 10^4$ )
Measured activity in organisms (Bq/g fresh mass)	$7.62 \times 10^4$ ( $\pm 7.05 \times 10^3$ )	$6.83 \times 10^4$ ( $\pm 7.68 \times 10^3$ )	$5.57 \times 10^5$ ( $\pm 8.84 \times 10^4$ )	$4.82 \times 10^5$ ( $\pm 8.1 \times 10^4$ )
Concentration factor	0,66 ( $\pm 0,06$ )	0,61 ( $\pm 0,07$ )	0,46 ( $\pm 0,07$ )	0,59 ( $\pm 0,1$ )
Calculated absorbed dose rate (mGy/h)	0.52 ( $\pm 0.047$ )	0.47 ( $\pm 0.052$ )	3.75 ( $\pm 0.9$ )	3.24 ( $\pm 0.54$ )

## Supplementary informations



**Figure S1:** Classical methodology used to segregate HTO and OBT from biological samples. Figure adapted from (ASN, 2010; Kim and Korolevych, 2013)

**Table S1:** Mean percentage of hydrogen and conversion factors from Bq/g of dry mass to Bq/mL in 24 and 96 hpf organisms. Numbers in brackets represent the number of pool containing about 200 organisms ( $\approx 10$  mg) used to calculate the mean percentage of hydrogen for each stages.

	24 hpf	96 hpf
$^1\text{H}$ (%)	5.45 (4)	6 (3)
Bq/g (d.m.) to Bq/mL conversion factor	2.04*	1.85

\*Calculation details for 24 hpf eggs:

$^1\text{H}$  percentage = 5.45 %

$\Leftrightarrow$  5.45 mg of  $^1\text{H}$  for 100 mg of dry mass

$\Leftrightarrow$  0.0545 g of  $^1\text{H}$  for 1 g of dry mass

$\Leftrightarrow$  0.49 g of  $\text{H}_2\text{O}$  for 1 g of dry mass (as 1 g of  $^1\text{H}$  = 9 g of  $\text{H}_2\text{O}$ )

$\text{Bq/mL} = \text{Bq/gH}_2\text{O} = \text{Bq/g (d.m.)} \times \text{g (d.m.)/gH}_2\text{O}$

So, 1 Bq/g (d.m.) = 2.04 Bq/g $\text{H}_2\text{O}$

**Table S2:** Weighted internal and external dose coefficient (DCint and DCext) calculated for 24 hpf embryos and 96 hpf larvae using the EDEN v3 software

	24 hpf	96 hpf
weighted DCint ( $\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g)	$6.71 \times 10^{-3}$	$6.71 \times 10^{-3}$
weighted DCext ( $\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g)	$3.77 \times 10^{-5}$	$5.21 \times 10^{-5}$

**Table S3:** Values used to determine the scenario of exposure for the 24 hpf eggs and 96 hpf larvae in EDEN v3 software

	24 hpf	96 hpf
Dimensions of organisms	Sphere radius a=0.067cm; b=0.067cm; c=0.067cm	Ellipsoid a=0.330cm; b=0.038cm; c=0.038cm
Composition (organism)	Mass= $1.6 \times 10^{-4}$ g	Mass= $2.48 \times 10^{-4}$ g
Composition (environment)	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Source	<sup>3</sup> H	<sup>3</sup> H

**Table S4:** Mean measured activity concentration in water (three replicates) for the kinetic experiment with nominal activity concentration of  $1.22 \times 10^5$  Bq/mL of HTO. ( $\pm$ sd)

	T+1h	T+24h	T+48h	T+72h	T+96h	T+168h
Measured activity in water (Bq/mL)	$1.27 \times 10^5$ ( $\pm 9.7 \times 10^3$ )	$1.18 \times 10^5$ ( $\pm 1.47 \times 10^3$ )	$1.21 \times 10^5$ ( $\pm 4.04 \times 10^3$ )	$1.24 \times 10^5$ ( $\pm 5.37 \times 10^3$ )	$1.03 \times 10^5$ ( $\pm 6.01 \times 10^3$ )	$1.1 \times 10^5$ ( $\pm 4.62 \times 10^3$ )

---

Partie D - évaluation de l'expression des gènes  
après exposition à l'HTO via une méthode haut  
débit

---



## 1. Résumé de l'article scientifique

### 1.1. Objectifs

Cet article s'inscrit dans l'axe 2 de ce projet de thèse qui vise à évaluer les effets ainsi que les modes d'actions de l'eau tritiée sur les stades embryon-larvaires du poisson zèbre, *Danio rerio*, à différents niveaux d'organisation biologique. Dans cet article, l'échelle moléculaire a été particulièrement étudiée dans le but d'identifier des effets précoces après l'exposition à l'HTO via une analyse du transcriptome. Cette analyse globale et sans *a priori* a permis de mettre en évidence des effets au niveau de l'expression des gènes à la suite de l'exposition à l'HTO. Le cas échéant, ces effets précoces ont pu être reliés à des effets observés à un niveau d'organisation biologique supérieur dans le but de faire le lien entre les échelles biologiques.

### 1.2. Matériels et méthodes

Des œufs de poisson zèbre (3 hpf) issus de parents non contaminés ([Annexe 1](#)) ont été exposés à deux activités d'eau tritiée :  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL ([Annexe 3](#)). La contamination a été réalisée dans une boîte à gants. Les organismes, témoins et contaminés, ont été placés dans des incubateurs à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pour éviter la contamination du milieu témoin (milieu embryon) par le milieu tritié, les organismes témoins ont été conservés dans un autre incubateur en dehors de la boîte à gants mais dans la même pièce. Pour éviter la contamination entre les deux activités testées et afin de relier les effets observés au débit de dose absorbé, les expérimentations ont été réalisées séparément.

Concernant la partie sur le calcul des débits de dose absorbés chez les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf, nous avons utilisé le protocole décrit précédemment (*Cf.* Partie C). Une fois les mesures d'activité dans les œufs et les larves réalisées, nous avons pu calculer les débits de dose en appliquant des coefficients de dose déterminés via le logiciel EDEN v3 développé par l'IRSN ([Annexe 5](#)).

Pour l'analyse transcriptomique, des triplicats biologiques ont été utilisés pour les deux activités d'exposition et les deux stades de développement. Pour les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf, des pools respectivement de 20 et 15 individus ont été constitués. Les ARNs ont été

extraits via un protocole Trizol/chloroforme ([Annexe 5](#)). Les ADN complémentaires ont par la suite été synthétisés à partir d'1 µg de ces ARNs par l'utilisation d'un kit (TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, Illumina) en suivant les indications du fabricant. Le séquençage a été réalisé par l'IGBMC (Illkirch, France) pour donner des séquences (« reads ») de 50 paires de bases. A l'issue du séquençage, environ 125 millions de séquences ont été produites par échantillon. Un contrôle de la qualité des séquences ainsi que leur alignement sur le génome du poisson zèbre (Zv10) a ensuite été réalisé. La normalisation des données et l'analyse de l'expression des gènes ont été réalisées avec le logiciel R ([R Core Team, 2017](#)) via le package DESeq2 ([Love et al., 2014](#)). Les gènes avec un  $\log_2(\text{différence d'expression HTO/Ctrl}) \geq \pm 1$  et une p-value ajustée  $\leq 0,01$  ont été considérés comme significativement différentiellement exprimés. Enfin, pour lier les gènes différentiellement exprimés avec les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, une analyse via le package topGO ([Alexa and Rahnenführer, 2015](#)) a été réalisée.

Pour terminer, dans le but de faire le lien entre les niveaux d'organisation biologique, des observations du muscle squelettique de la queue des larves à 96 hpf ont été réalisées au microscope électronique à transmission.

### 1.3. Principaux résultats et discussion

La première étape de ce travail a consisté à calculer les doses absorbées par les œufs à 24 hpf et les larves à 96 hpf. Les débits de dose calculés à partir des activités mesurées dans les organismes étaient cohérents avec les débits de dose théoriques de 0,4 et 4 mGy/h attendus après exposition à de l'HTO à des activités de  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL.

L'analyse du transcriptome a, dans un premier temps, mis en évidence que peu de gènes différentiellement exprimés étaient communs aux stades 24 hpf et 96 hpf (environ 5%), et ce quel que soit le débit de dose ([Fig. 3](#)). Ces résultats pourraient être expliqués par la différence entre les stades de développement. En effet, un certain nombre de changements, notamment morphologiques, interviennent entre les stades 24 hpf et 96 hpf ([Kimmel et al., 1995](#)).

Les rayonnements ionisants pouvant induire des espèces réactives de l'oxygène et des dommages à l'ADN, nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans les processus de protection face au stress oxydant et de réparation de l'ADN. Peu de gènes impliqués dans l'un ou l'autre de ces processus ont été mis en évidence par l'analyse de l'expression différentielle (contaminés par rapport aux témoins). En effet, *gpx*, *sod2* et *mpx* ont été sur-exprimés



uniquement après une exposition à 0,4 mGy/h par rapport aux témoins chez les œufs à 24 hpf. Cependant, on ne peut pas exclure que des processus de défense contre le stress oxydatif aient été mis en place avant l'échantillonnage à 96 hpf pour le même débit de dose et aux deux stades à 4 mGy/h. Concernant les dommages à l'ADN, *h2afx*, impliqué dans la réparation des cassures double brin (Rogakou et al., 1998), et *ddb2*, impliqué dans le système de réparation par excision de nucléotide (Pei and Strauss, 2013), sont significativement sur-exprimés chez les organismes exposés par rapport aux témoins (Fig. 6). Pour aller plus loin, une analyse des foyers gamma-H2AX, marqueurs précoces des mécanismes de réparation des cassures double brins, a été réalisée (Cf. Partie E).

La comparaison de toutes les conditions entre elles ont mis en évidence un nombre important de gènes partagés par les stades œufs à 24 hpf pour les deux débits de dose (n=104 ; 32,6% ; Fig. 4B). Des gènes codant pour des troponines T et I, essentielles dans l'organisation du muscle et des sarcomères, les unités contractiles du muscle, ont notamment été retrouvés (Burkeen et al., 2004; Ferrante et al., 2011; Huang et al., 2009; Sehnert et al., 2002). D'autres gènes comme *capn3a* et *capn3b*, impliqués dans la protection des fibres musculaires (Richard et al., 2000), *tcap* et *obscna*, impliqués respectivement dans l'organisation des sarcomères (Zhang et al., 2009) et des fibres musculaires (Raeker and Russell, 2011), ont été mis en évidence par cette analyse. Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'HTO pourrait impacter l'organisation des sarcomères et l'organisation des fibres musculaire plus généralement pour les stades à 24 hpf via la modulation de l'expression de gènes clés impliqués dans ces processus biologiques. Pour aller plus loin dans cette analyse et pour tenter de faire le lien entre les échelles biologiques, nous avons réalisé des observations au microscope électronique à transmission sur les muscles squelettiques de la queue des larves à 96 hpf (Fig. 7). Ces observations ont montré de rares altérations au niveau des filaments d'actine et de myosine qui composent les sarcomères. Bien que ces altérations soient observées ponctuellement, il reste probable que la modulation des gènes impliqués dans l'organisation des sarcomères après la contamination puisse expliquer en partie ces observations.

Parmi les 104 gènes communs entre les débits de dose pour les stades œufs à 24 hpf, environ 23% sont impliqués, entre autres, dans le développement de l'œil, tels que les gènes *mipb*, *lim2.3*, *lim2.4* ou des gènes codant notamment pour les protéines du cristallin (Fig. 5). Il semblerait que ces gènes soient impliqués dans la transparence de l'œil. En effet, il a été observé un développement de cataracte dès 72 hpf chez des poissons zèbre KO-*mipb* (Froger

et al., 2010). Toujours chez le poisson zèbre, chez le mutant *cloche*, il a été décrit que la cataracte observée était due à l'insolubilité des protéines gamma-cristallin (Goishi et al., 2006). Chez des souris homozygotes déficientes pour le gène *lim2*, il a été observé une opacité de l'œil (Shiels et al., 2007). De plus, chez l'Homme, le développement de la cataracte est l'une des complications observées après des thérapies utilisant des rayons beta (Barron et al., 1970). Enfin, à Tchernobyl, une augmentation de l'incidence des cataractes avec le bruit de fond radioactif a été observé chez des oiseaux (Mousseau and Møller, 2013). Pour aller plus loin, et voir si la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la transparence de l'œil pourrait avoir un impact à une échelle d'organisation biologique plus importante, des observations histologiques des yeux des organismes à différents stades de développement a été réalisée (Cf. Partie E).

La comparaison de toutes les conditions entre elles a également permis de mettre en évidence un nombre important de gènes sur-exprimés partagés au sein des stades larvaires à 96 hpf (n=126 ; 39,5% ; Fig. 4B). L'analyse des processus biologiques sur ces 126 gènes a mis notamment en évidence leur implication dans le cycle circadien et la réponse au stress oxydant, notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quelques-uns de ces gènes, comme *cry1aa*, *cry5*, *per2* et *per1a*, sont communs entre ces deux processus biologiques. Dans la littérature, des liens entre ces deux processus biologiques ont été avancés, notamment via le fait que des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant montraient des oscillations journalières (Wilking et al., 2013). De plus, des études sur des souris et des drosophiles mutantes pour certains gènes du cycle circadien ont mis en évidence une sensibilité face au stress oxydant plus importante chez ces organismes (Jang et al., 2011; Krishnan et al., 2008). Également, pour des cultures cellulaires de poisson zèbre, un traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a induit l'expression de gènes impliqués dans le cycle circadien (Hirayama et al., 2007). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le stress oxydant pouvant être induit après l'exposition à l'HTO pourrait impacter l'expression de *cry1aa*, *cry5*, *per2* et *per1a*.

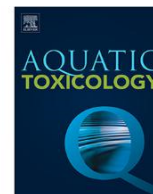
Pour terminer, il est intéressant de souligner que chez les œufs à 24 hpf, un certain nombre de gènes a montré une expression différentielle opposée en fonction du débit de dose entre larves témoins et contaminées. C'est notamment le cas pour les gènes impliqués dans la contraction musculaire et la transparence de l'œil, qui sont sur-exprimés à 0,4 mGy/h mais sous-exprimés à 4 mGy/h (Fig. 5 et Fig. 8). Ces résultats pourraient suggérer des effets

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit  
compensatoires via la sur-expression de gènes et de protection via la sous-expression de gènes  
en fonction de dose.

2. Article : « Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages »

Article soumis le 13 mars 2018, accepté le 20 avril 2018 et publié dans le journal « Aquatic toxicology ».

Informations supplémentaires : <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.012>



## Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages



Caroline Arcanjo<sup>a</sup>, Olivier Armant<sup>a</sup>, Magali Floriani<sup>a</sup>, Isabelle Cavalie<sup>a</sup>, Virginie Camilleri<sup>a</sup>, Olivier Simon<sup>a</sup>, Daniel Orjolle<sup>b</sup>, Christelle Adam-Guillermin<sup>a</sup>, Béatrice Gagnaire<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SRTE/LR2T, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Zebrafish  
Tritiated water  
RNA sequencing  
Muscle contraction  
Eye opacity  
Genotoxicity

### ABSTRACT

Tritium (<sup>3</sup>H) is a radioactive isotope of hydrogen. In the environment, the most common form of tritium is tritiated water (HTO). The present study aimed to identify early biomarkers of HTO contamination through the use of an aquatic model, the zebrafish (*Danio rerio*). We used the zebrafish embryo-larvae model to investigate the modes of action of HTO exposure at dose rates of 0.4 and 4 mGy/h, dose rates expected to induce deleterious effects on fish. Zebrafish were exposed to HTO from 3 hpf (hours post fertilization) to 96 hpf. The transcriptomic effects were investigated 24 h and 96 h after the beginning of the contamination, using mRNAseq. Results suggested an impact of HTO contamination, regardless of the dose rate, on genes involved in muscle contraction (*mnt2d*, *tnni2a.4*, *slc6a1a* or *atp2a1l*) and eye opacity (*crygm2d9*, *crygm11*, *mipb* or *lim2.3*) after 24 h of contamination. Interestingly, an opposite differential expression was highlighted in genes playing a role in muscle contraction and eye opacity in 24 hpf embryos when comparing dose rates, suggesting an onset of DNA protective mechanisms. The expression of *h2afx* and *ddb2* involved in DNA repair was enhanced in response to HTO exposure. The entrainment of circadian clock and the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling pathways were enriched at 96 hpf at 0.4 mGy/h and in both stages after 4 mGy/h. Genes involved in ROS scavenging were differentially expressed only after 24 h of exposure for the lowest dose rate, suggesting the onset of early protective mechanisms against oxidative stress. Effects highlighted on muscle at the molecular scale were confirmed at a higher biological scale, as electron microscopy observations revealed sarcomere impairments in 96 hpf larvae for both dose rates. Together with other studies, the present work provides useful data to better understand modes of action of tritium on zebrafish embryos-larvae.

### 1. Introduction

Tritium (<sup>3</sup>H) is a radioactive isotope of hydrogen, its decay emits beta rays of low average energy (5.7 KeV) and short penetration range (average track length in water of 0.56 μm) (HPA, 2007). The energy released by tritium radioactive decay is therefore deposited in a small volume, which results in a high ionization density. Thus, <sup>3</sup>H energy deposition is very localized and the dose due to external exposure can be considered negligible compared to the internal exposure (Mathur-De Vre and Binet, 1984). In France, <sup>3</sup>H is mainly discharged in aquatic environment as controlled releases in the form of tritiated water (HTO) by nuclear power plants and nuclear fuel reprocessing plants. Furthermore, future use of controlled thermonuclear fusion reactor, e.g. ITER, is expected to increase its discharge to ecosystems (ASN, 2010). In 2010, the French Nuclear Safety Authority published a report pointing out the

small species diversity, life stages considered and determinist effects used to assess the effects of tritium exposure. They highlighted the need to better understand tritium effects and particularly its toxic modes of action (ASN, 2010). The toxicity of HTO has been studied on aquatic invertebrates and vertebrates (reviewed in Adam-Guillermin et al., 2012). Indeed, an increase of cytotoxic effects together with increase of developmental abnormalities was observed in embryo-larvae of marine mussel (*Mytilus edulis*) after HTO exposure (LOEDR = 1.2×10<sup>-3</sup> mGy/h) (Hagger et al., 2005). Another study on adult marine mussels (Jha et al., 2005) showed an increase of micronuclei and DNA strand breaks after HTO exposure (LOEDR = 12×10<sup>-3</sup> mGy/h). Developmental study of the goose barnacle, *Pollicipes polymerus*, embryos showed a dose-dependent decrease of the molting index starting at 6.2×10<sup>-4</sup> mGy/h (Abbott and Mix, 1979). Finally, a multigenerational (5 generations) study using daphnids, *Daphnia magna*, showed a decrease of fecundity, life

Corresponding author.

E-mail addresses: [arcanjo.caroline@hotmail.fr](mailto:arcanjo.caroline@hotmail.fr) (C. Arcanjo), [beatrice.gagnaire@irsn.fr](mailto:beatrice.gagnaire@irsn.fr) (B. Gagnaire).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.012>

Received 13 March 2018; Received in revised form 16 April 2018; Accepted 20 April 2018

Available online 27 April 2018

0166-445X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

span and growth rate and an increase of abnormal eggs with the increase of HTO dose rate (from  $1.6 \times 10^{-6}$  to 1.6 mGy/h) (Gudkov and Kipnis, 1996). Studies using aquatic vertebrates were also conducted to assess the effects of HTO exposure. A suppression of the primary immune response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to HTO during embryogenesis was reported in juvenile at dose rate as low as  $8.3 \times 10^{-2}$  mGy/h. In yearling fish, this suppression was equal or exceeded that found in juvenile fish (Strand et al., 1977, 1982). Reprotoxic and developmental effect of HTO were also investigated using medaka (*Orizias latipes*) embryos and adults. The number of germ cells was impacted in embryos up to 14.17 mGy/h (Etoh and Hyodo-Taguchi, 1983) and the number of primary spermatogonia Ib (i.e. producing spermatozoa after differentiation) from 0.84 mGy/h in adult fish (Hyodo-Taguchi and Egami, 1977). Reproductive capacities of medaka males and females exposed to HTO during embryogenesis were also impacted, following a dose-dependent trend with dose rates ranging from 3.54 to 141.67 mGy/h (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986). Furthermore, vertebral malformations were reported from 35.42 mGy/h with a decrease of survival in young medaka, while no effects on hatching were reported (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993). Ichikawa and Suyama (1974), on the other hand, reported negative impact of HTO on hatchability at 12.2 mGy/h and on developmental parameters at 120 mGy/h in the puffer fish, *Fugu niphobles*. The most studied effects focused on reproduction and development for both aquatic invertebrates and vertebrates, revealing a lack of studies focusing on molecular effects. However, studies combining results obtained at the molecular scale in connection to higher hierarchical levels are very useful to better understand the mode of action of contaminants (Gagnaire et al., 2015) and identify potential biomarkers of exposure and effects.

The present study aimed to identify early biomarkers of HTO contamination through the use of an aquatic model, the zebrafish (*Danio rerio*). Indeed, the early life stages of this tropical fish are very well described (Kimmel et al., 1995), its genome is fully sequenced and the zebrafish is recommended by OECD guidelines for testing of chemicals (OECD, 2013). Furthermore, this fish is an emerging model for the investigation of human diseases, as several of the zebrafish mutant phenotypes known by now demonstrate similarity to human disease state (Barut and Zon, 2000; Dooley and Zon, 2000).

In the present study, 3 hpf (hours post-fertilization) zebrafish eggs were exposed at two dose rates of 0.4 and 4 mGy/h (corresponding to nominal concentration of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL of HTO) during 24 h and 96 h. These two dose rates corresponded to the lower and upper limits of the DCRL (Derived Consideration Reference Levels) in which deleterious effects are expected on young fish using the trout as the reference animal (CIPR, 2012). Activities used to reach these dose rates are above the French limit of tritium in water intended for human consumption of 100 Bq/L (EU, 2013) and above the proposed benchmark for the protection of ecosystems of  $10^{-2}$  mGy/h (Garnier-Laplace et al., 2010). A global analysis of the transcriptomic changes was performed after 24 h and 96 h of HTO exposure. As previous studies highlighted genotoxic effect on both invertebrates and vertebrates after HTO exposure (Gagnaire et al., 2017; Hagger et al., 2005; Jaeschke et al., 2011; Jha et al., 2005, 2006; Stuart et al., 2016), genes involved in response to DNA damage pathway were investigated. A functional analysis by gene ontology (GO) enrichment was performed. An analysis of muscle using the transmission electron microscopy was also performed in order to relate effects observed at different scales of analysis (molecular and tissue levels). The entrainment of circadian clock and the response to  $H_2O_2$  were also affected in 96 hpf larvae. Interestingly, many genes are regulated in opposite directions at the two dose rates suggesting compensatory effects at 0.4 mGy/h and DNA protection mechanisms, possibly by targeted chromatin compaction at 4 mGy/h.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fish maintenance and eggs production

Six-month-old adult wild type zebrafish (AB genetic background) were provided by AMAGEN platform (UMS AMAGEN, Gif-sur-Yvette, France) and maintained in a Tecniplast© ZebTEC system in 8L tanks (20 adults per tank), keeping males and females apart. Tank (half tap water/half osmosis water) was kept at  $27 \pm 1$  °C; fish were fed three times a day with TetraMin© tropical fish food flakes (Tetra Werke, Melle, Germany). A photoperiod of 12/12 h dark-light cycles was used. Eggs were produced by mating 20 couples of adult zebrafish kept in 1.7-liter Breeding Tank – Beach Style Design (Tecniplast©) at  $27 \pm 1$  °C. Males and females were kept apart in the same breeding tank during the night before the mating. After a change of water, couples were allowed to mate and eggs were sampled 30 min after the beginning of the mating in order to synchronise eggs. All eggs were pooled together, sorted, counted and kept in square petri dish with embryo medium (60 mg/L of Instant Ocean© sea salt diluted in ultrapure water (Westerfield, 1995)) at  $27 \pm 1$  °C until the beginning of the experiments.

### 2.2. HTO contamination and sampling

Experiments for the two dose rates were conducted separately in order to avoid cross contaminations between the two HTO activities. Tritiated water source (97% purity, 185 MBq, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) was diluted in embryo medium to obtain final concentrations of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL.

At 3 hpf (hours post-fertilization), eggs were placed in glass crystalliser at a density of 5 eggs per 2 mL of HTO solution. The eggs were kept in the dark at  $27 \pm 1$  °C in a thermo-regulated incubator confined inside a glove box. Control eggs were placed in embryo medium and kept in the same manner as contaminated organisms in the same room outside the glove box. Water in contaminated and control experimental units was renewed once (at 72 h) during the experiment to ensure water quality and tritiated water activity. Pools of 20 and 15 organisms were sampled for each condition in triplicate for the mRNAseq after, respectively, 24 h and 96 h of HTO contamination. For the transmission electron microscopy, five 96 hpf larvae were sampled per condition. Three successive washes in clean embryo medium were required to remove the samples from the glove box because of the high tritium activity.

### 2.3. HTO activity in water and organisms

Due to the large number of organisms required for mRNAseq analysis and tritium activity in organisms, these two analyses were performed in distinct pools of embryos for each stage and each condition of exposures.

During the exposure period, water was sampled several times to monitor HTO activity. HTO samples were diluted with tritium-free water to obtain a one millilitre sample and were mixed with 19 mL of liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer) and analysed in a liquid scintillation counter with a detection limit of 5 Bq/L (Quantulus 1220, PerkinElmer, WinQ software). Spectrums were analysed using EasyView software and the results were expressed in Bq/mL.

Tritium activity in organisms was assessed after 24 h and 96 h of contamination on 15 organisms. First, organisms were placed on microfilter (Millipore) in order to remove the  $^3\text{H}$  adsorbed on the surface of the animal, which could bias the measurement of activity. Then samples were placed individually in scintillation vial, solubilized in 1 mL of Soluene-350 (PerkinElmer) for 48 h at 55 °C and finally mixed with 35  $\mu\text{L}$  of glacial acetic acid and 19 mL of liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer). The counting and the spectrum analysis were made as previously described and results were expressed in Bq/g of wet weight.

#### 2.4. Dose rates calculation in organisms

Dose rates were calculated using the following equation:

$$DR = (DC_{ext} \times A_w) + (DC_{int} \times A_o), \quad (1)$$

where DR is the dose rate in  $\mu\text{Gy/h}$ ;  $DC_{ext}$  is the calculated external dose coefficient in the medium (water) in  $\mu\text{Gy/h}$  per Bq/g;  $A_w$  is the measured activity of the tritiated water in Bq/mL;  $DC_{int}$  is the calculated internal dose coefficient in  $\mu\text{Gy/h}$  per Bq/g and  $A_o$  is the measured activity of tritium in the organisms in Bq/g of wet weight. DCs were calculated for each stage considered using the EDEN v2 software (developed by IRSN) on the assumption that tritium was uniformly distributed within the organism over the exposure period and using a weighting factor of 3 (Table S1).

#### 2.5. mRNAseq analysis

All mRNAseq analysis steps were performed as described by Armant et al. (Armant et al., 2017). Briefly, total RNA extraction was performed on the triplicates for both conditions (control and contaminated) and for both stages (i.e. after 24 h and 96 h of contamination) using a TRIzol/chloroform extraction (Life Technologies). RNA integrity, quality and concentration were assessed using RNA Nano Chips (Bioanalyser 2011, Agilent). cDNA synthesis and sequencing libraries were prepared from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) following manufacturer's instructions. cDNA integrity, quality and concentration were assessed on DNA 1000 Chips (Bioanalyser 2011, Agilent). Libraries were sequenced using Illumina Hiseq 4000 sequencer as paired-end 50 base reads at the IGBMC Microarray and Sequencing platform (Illkirch, France) generating an average of 125 million reads per sample with high quality score (% of base above Q30 higher than 93% for all samples) (Table S2). Reads were then mapped against the Zv10 zebrafish reference genome using RNA-STAR (Dobin et al., 2013), with the exon–exon junctions from Ensembl (release 85). Heatmap of the Euclidian distance was performed using the *dist* function in the R software (R Core Team, 2017) and showed a good correlation between biological replicates except for one control sample, probably due to biological variation, that was removed for the subsequent analysis (Fig. S1). Normalization and differential expression analysis were performed using the DESeq2 v1.10.1 R package (Love et al., 2014). Genes with a  $\log_2(\text{fold change HTO/Ctrl}) \geq \pm 1$  and adjusted p-value  $\leq 0.01$  (False Discovery Rate, FDR) were considered as significantly mis-regulated.

Table 1

Measured tritium activity concentration in water and in organisms. Nominal tritium activity in water corresponds to the expected tritium activity in water producing dose rates of 0.4 and 4 mGy/h. Measured tritium activity in contaminated water was assessed along the experiment from T0 to T + 96 h of contamination. Measured tritium activity in organisms was assessed after 24 h and 96 h of HTO contamination. ( $\pm$  Standard deviation).

Nominal $^3\text{H}$ activity in water (Bq/mL)		1.22 $\times 10^5$	1.22 $\times 10^6$
Measured $^3\text{H}$ activity in water (Bq/mL)		1.16 $\times 10^5$ ( $\pm 3.23 \times 10^3$ )	1.02 $\times 10^6$ $\pm 1.70 \times 10^5$
Measured $^3\text{H}$ activity in organisms (Bq/g of w.w.)	24 hpf	7.62 $\times 10^4$ $\pm 7.05 \times 10^3$ (n = 14)	5.57 $\times 10^5$ $\pm 8.84 \times 10^4$ (n = 15)
	96 hpf	6.83 $\times 10^4$ $\pm 7.68 \times 10^3$ (n = 15)	4.82 $\times 10^5$ $\pm 8.10 \times 10^4$ (n = 15)

To assess the enrichment of biological process within sets of misregulated genes, we performed a gene ontology (GO) analysis using the topGO v2.22.0 R package (Alexa and Rahnenführer, 2009). GO terms with p-value  $\leq 0.01$  were considered significantly enriched. MA-plots and heatmaps were produced with the ggplot2 v2.2.1 R package (Wickham, 2010), the four-way Venn diagrams were computed with the VennDiagram v1.6.17 R package (Chen, 2016).

#### 2.6. Microscopic analysis

After sampling, 96 hpf larvae were immediately fixed in 2.5% (w/v) glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH7.4) and kept at 4 °C for 24 h. They were then washed in this same buffer and post-fixed one hour with 1% (w/v) of osmium tetroxide in cacodylate buffer. Larvae were then dehydrated with successive baths of ethanol with increasing concentrations and finally embedded in a monomeric resin (Epon 812). All chemicals used for histological preparation were purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA). Sections (500 nm) of whole 96 hpf larvae were made using ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and stained with blue toluidine for the histological observation with the optic microscope (DM750, Leica) equipped with ICC50 camera (Leica) and the LAS EZ software. These sections allowed for the observation of the whole larvae in order to select the area for the transmission electron microscopy (TEM). Subsections (80 nm thick and 3 mm long) were made with the ultramicrotome for the TEM observation (Tecnai 12 G<sup>2</sup> Biotwin, FEI Company, Eindhoven, the Netherlands) equipped with a CCD camera (Megaview III, Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) with an accelerating voltage of 100 KeV. For each replicate, at least 20 micrographs of local detailed structures were taken, analysed and compared for each condition.

### 3. Results

All experiments were conducted with a percentage of mortality under 20%. No differences were noted between controls and contaminated organisms in any experiment (data not shown).

#### 3.1. Tritium activity in water and organisms and dose rates calculation

Tritium activity was measured in the contamination water and in organisms in order to calculate the dose rates (see Eq. (1)). Tritium activity in water and organisms are reported in Table 1. With these measures, we calculated the dose rate for each stage and each tritium concentration. Dose rates obtained were of 0.52 ( $\pm 0.047$ ) and 3.75 ( $\pm 0.9$ ) mGy/h after 24 h of HTO exposure and of 0.47 ( $\pm 0.052$ ) and 3.24 ( $\pm 0.54$ ) mGy/h after 96 h of HTO exposure. Overall, these data showed that the calculated dose rates were consistent with the nominal dose rates. Results indicated a higher variability in tritiated water measurement for the highest activity of 1.22 $\times 10^6$  Bq/mL. To ensure that the activity was consistent throughout the mRNAseq experiments, the activity in water was also followed. Water activity concentrations were 1.22 $\times 10^5$  ( $\pm 4.17 \times 10^3$ ) Bq/mL and 1.05 $\times 10^6$  ( $\pm 1.26 \times 10^5$ ) Bq/mL for the

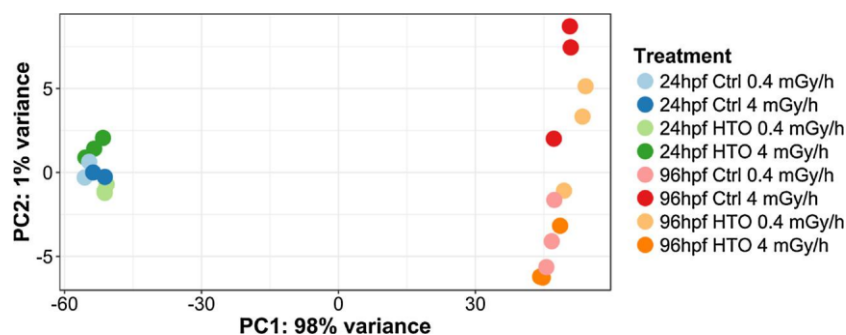


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) using all genes for all replicates and all treatments.

nominal concentrations of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL, respectively. Alike what was previously mentioned, we measured a higher variability for the highest activity.

### 3.2. Differential gene expression after HTO exposure and corresponding signalling pathways

To highlight HTO effects at the molecular scale, the differential gene expression between contaminated and control organisms was investigated. A principal component analysis (PCA) was performed with the regularized log transformed count data for all treatments and stages. The first principal component, which explained 98% of the variance, segregated the samples based on the developmental stage (Fig. 1). A global analysis of the transcriptome was then performed after 24 h and 96 h of HTO contamination. 24 h after the start of HTO exposure at 0.4 mGy/h, 471 genes were mis-regulated, with the majority 406 (86.19%) up-regulated and 65 (13.8%) down-regulated (Fig. S2A). After 96 h, for the same dose rate, 448 genes were mis-regulated, with 386 (86.16%) up-regulated and 62 (13.84%) down-regulated (Fig. S2B). HTO exposure at 4 mGy/h induced the up-regulation of 283 (56.3%,  $n = 503$ ) genes in 24 hpf embryos and 260 (58.6%,  $n = 444$ ) genes in 96 hpf larvae, while 220 (43.7%,  $n = 503$ ) genes and 184 (41.4%,  $n = 444$ ) genes were downregulated respectively (Fig. S2C–D).

In order to assess the signalling pathways differentially regulated after HTO exposure, a gene ontology (GO) enrichment was performed. After 24 h of exposure at 0.4 mGy/h, up-regulated genes were mostly involved in the regulation of muscle contraction ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ), response to oxidative stress ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ), ion transport ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ) and sarcomere organization ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ) (Fig. 2). The down-regulated genes were involved in somite specification ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ), myoblast fusion ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ) and paraxial mesodermal cell differentiation ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ). Later in development (96 hpf), the same dose rate induced the up-regulation of genes involved in circadian rhythm ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-6}$ ), response to light stimulus ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ), transmembrane transport ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ) and response to hydrogen peroxide ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ). Down-regulated genes after 96 h HTO exposure were involved in mast cell migration ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ) or regulation of osteoclast differentiation ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ).

The developmental effects of exposure to 4 mGy/h HTO were then investigated at 24 hpf. The up-regulated genes were mostly involved in nucleosome assembly ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-8}$ ), entrainment of circadian clock ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ), response to hydrogen peroxide ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ) and regulation of DNA methylation ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ). Down-regulated genes after 24 h HTO exposure were involved in muscle contraction ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ), sarcomere organization ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ), oxidation reduction process ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ) and peripheral nervous system axonogenesis ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ). Following 96 h of exposure, up-regulated

genes were involved in response to hydrogen peroxide ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ), nucleosome assembly ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ) or entrainment of circadian clock ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ). Down-regulated genes after the same exposure were involved in proteolysis ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-11}$ ), oxidation/reduction process ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ) and visual learning ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-2}$ ) (Fig. 2; Table S3).

### 3.3. Differentially expressed genes shared between stages and dose rates

To get insights into potential similarities in the gene response to HTO contamination, a search on genes regulated in common on 24 hpf embryos and 96 hpf larvae was performed. Only 48 genes (4.5%,  $n = 871$ ) were shared following 24 h and 96 h of HTO contamination at 0.4 mGy/h (Fig. 3A). Similarly, after 4 mGy/h exposure to HTO, only 41 genes (5.51%,  $n = 906$ ) were regulated in common at both stages compared to the control (Fig. 3B). Most of these genes were up-regulated for both dose rates (44 genes at 0.4 mGy/h and 32 genes at 4 mGy/h, Table S4).

We then compared the genes mis-regulated between the two dose rates (irrespective of being up- or down-regulated). Within the 919 differentially expressed genes after 0.4 mGy/h exposure and the 947 differentially expressed genes after 4 mGy/h, 319 (21.9%,  $n = 1547$ ) were shared (Fig. 4A). Among these 319 shared genes, 104 (32.6%) were regulated in opposite direction in 24 hpf embryos (Table S3, Fig. 4B). The GO enrichment performed on this group of genes highlighted that pathways involved in myofibril assembly ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-5}$ ), muscle contraction ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ) and ion transport ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-3}$ ) were significantly enriched (Table S3). To complete the GO enrichment analysis, the lists of the 104 genes were examined. About 23% of them were involved in eye development. Genes encoding crystallin gamma and beta family (e.g. *crygm2d9*, *crygm2d15* and *cryba1b*), lens intrinsic membrane protein (e.g. *lim2.5* and *lim2.3*) and major intrinsic protein of lens fibre (*mipb*) were significantly up-regulated after 0.4 mGy/h but down-regulated after 4 mGy/h, with highly significant  $p$ -values (Fig. 5, Table S5). Furthermore, another group of 126 (39.5%) genes were up-regulated in 96 hpf larvae for both dose rates (Fig. 4C). Pathways as response to  $H_2O_2$  ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-5}$ ) and entrainment of circadian clock ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-4}$ ) were enriched in this group of genes (Table S3). Interestingly, when genes involved in these two pathways were extracted from the dataset, it appears that genes *per2*, *per1a*, *cry1aa* and *cry5* involved in the feedback loop of the circadian clock, were shared.

### 3.4. DNA damage response after HTO exposure

As HTO exposure has known genotoxic effects, genes involved in response to DNA damage were investigated. Only *h2afx* and *ddb2*, two

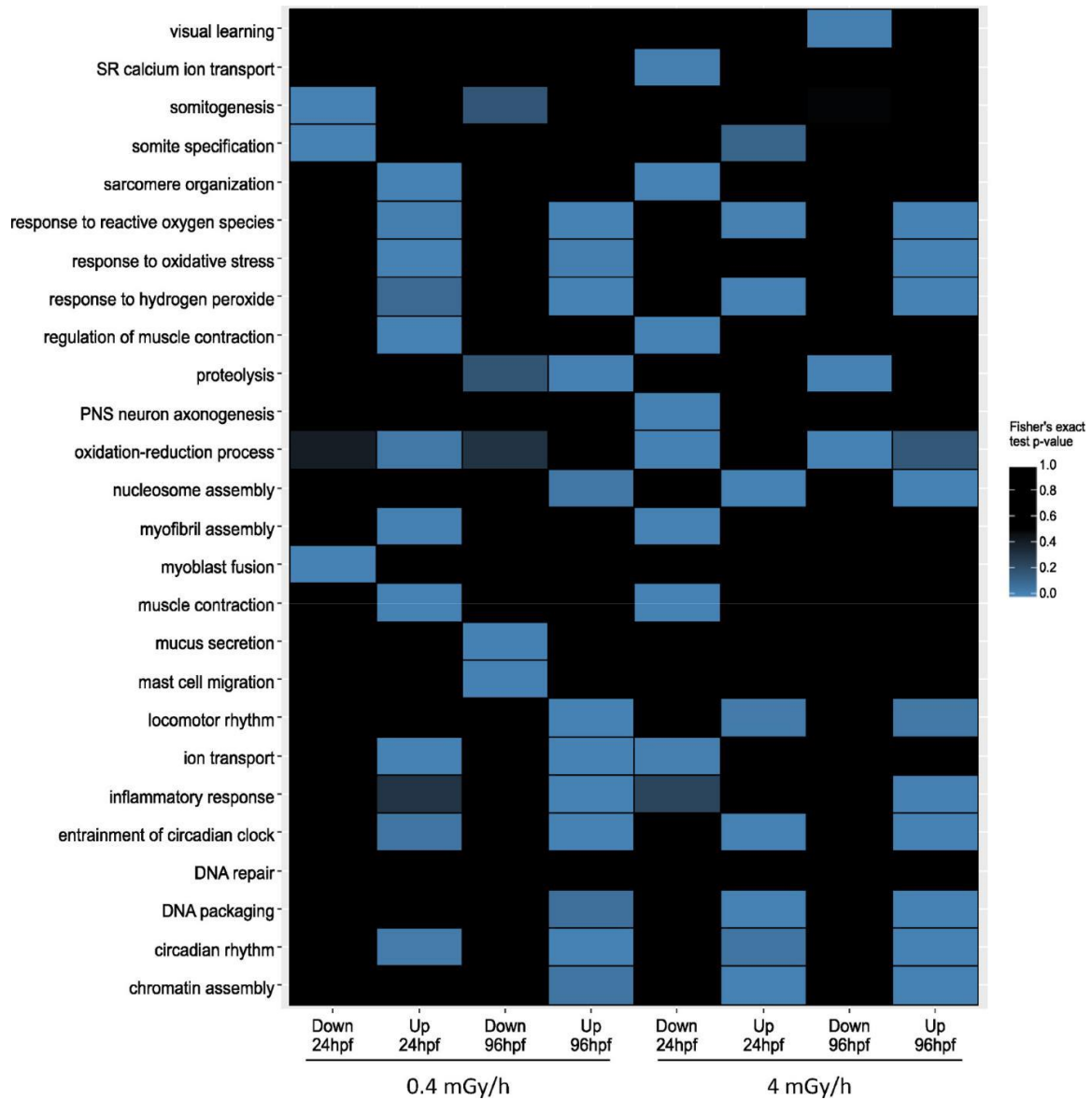


Fig. 2. Heatmap of selected up- and downregulated GO terms enriched after HTO exposure in 24 hpf embryos and 96 hpf larvae. Fisher's exact test p-value is indicated as a color with blue indicating significant ( $\leq 0.01$ ) and black nonsignificant p-value. The x axis shows the differential expression of genes involved in selected GO term for 24 hpf and 96 hpf embryos for both dose rates. The y axis shows the GO term chosen for building this heatmap. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

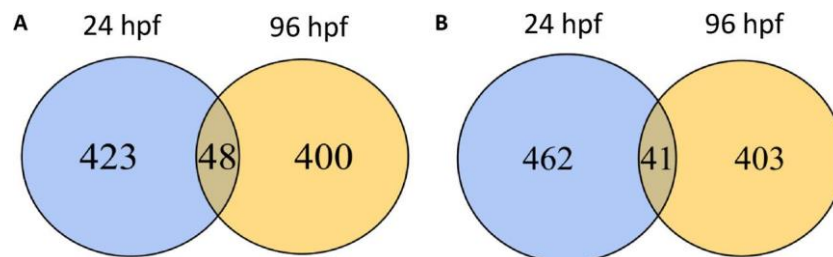


Fig. 3. Two way Venn diagram of mis-regulated genes (up or downregulated) between 24 hpf embryos and 96 hpf larvae after 0.4 mGy/h (A) and 4 mGy/h (B) of HTO exposure. The overlaps between two conditions represent the number of shared genes within these conditions.



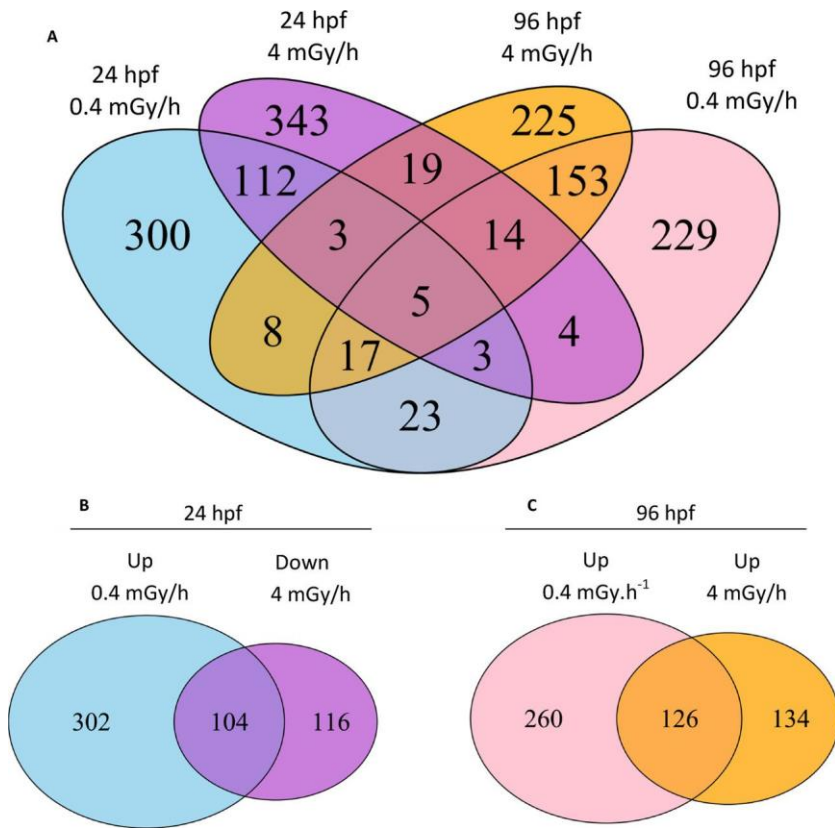


Fig. 4. Differentially expressed genes shared between the two dose rates. (A) Four way Venn diagram of total mis-regulated genes (up or down) for both stages and the two dose rates. The overlaps between two conditions represent the number of shared genes within these conditions. (B) Two way Venn diagram of shared genes up-regulated at 0.4 mGy/h and down-regulated at 4 mGy/h in 24 hpf embryos. (C) Two way Venn diagram of shared genes up-regulated at both dose rates in 96 hpf larvae. The link between two conditions represents the number of genes shared between these two conditions.

genes encoding proteins playing a role in DNA damage repair, were significantly up-regulated (Fig. 6). Up-regulation of *h2afx* was significant in 24 hpf embryos after 4 mGy/h and of *ddb2* in 96 hpf embryos for both dose rates.

Other genes such as *bbc3* or *casp9*, involved in pro-apoptotic process were moderately up-regulated in 24 hpf embryos after 0.4 mGy/h, while genes playing anti-apoptotic and DNA repair roles (e.g. *bcl2l1*, *xpc*, *gadd45bb* or *xrcc1*) were also moderately up-regulated in the three other conditions. However, these genes were observed at levels that did not meet

our criteria for significance concerning the fold change values (Fig. 6, Table S6).

### 3.5. HTO exposure effects on muscle structure and genes expression

The transmission electron microscopy observations performed on tail skeletal muscle of 96 hpf larvae for both dose rates revealed a disorganization of the skeletal muscles. Indeed, analysis at high resolution showed that, compared to controls, sarcomeres exhibited

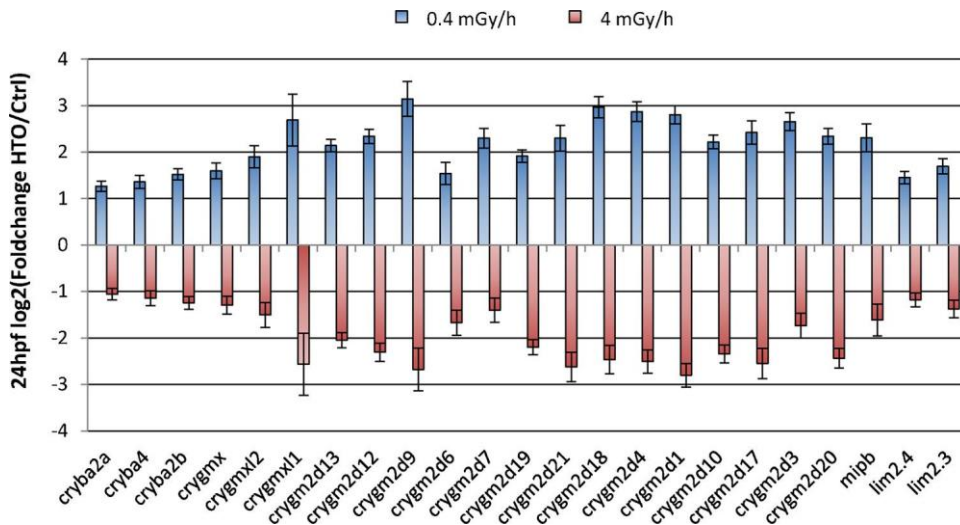


Fig. 5. Bar plot of significant (all adjusted p-value < 0.01) differential expression of genes involved in eye development after 24 h of HTO exposure at 0.4 mGy/h (blue) and 4 mGy/h (red). The y axis represents the log<sub>2</sub>(fold change HTO/Ctrl) for each gene presented on the x axis. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

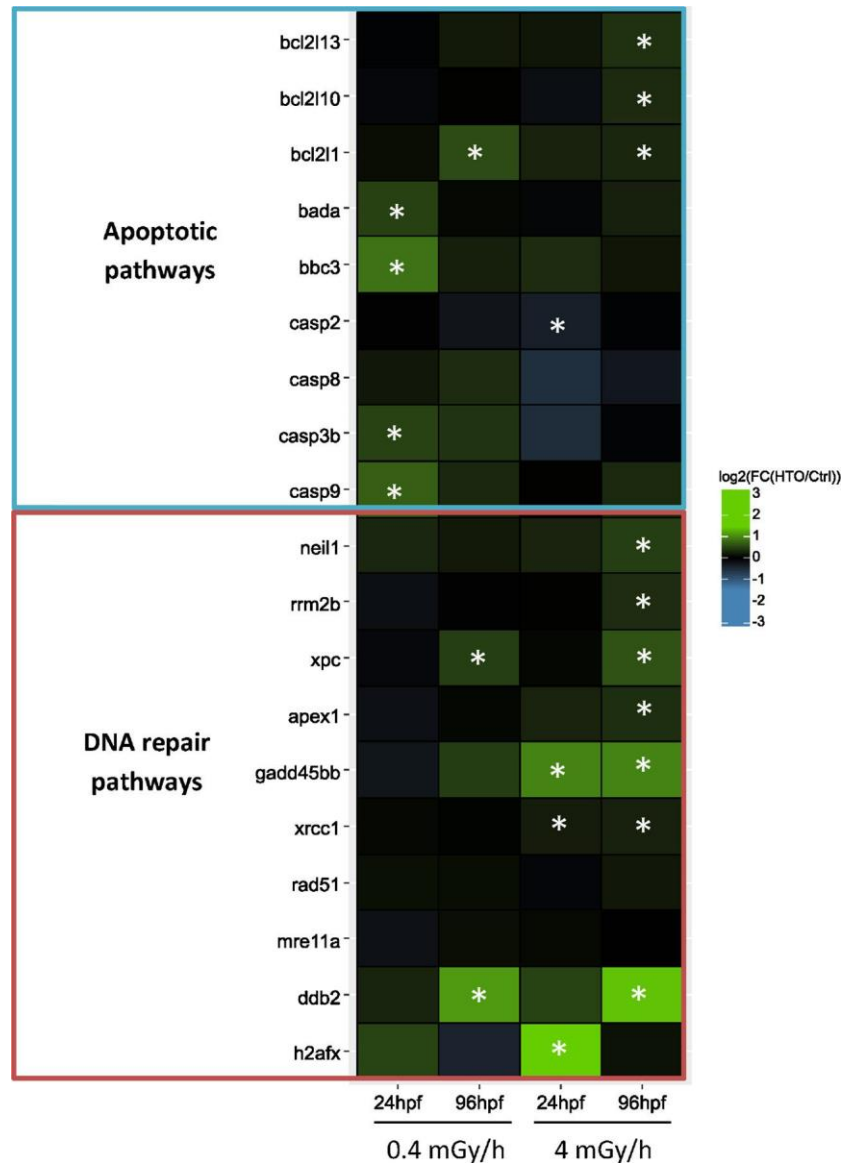


Fig. 6. Heatmap of up- and downregulated genes involved in DNA damage response signalling pathway in 24 hpf embryos and 96 hpf larvae exposed at 0.4 and 4 mGy/h. Green areas represent up-regulated genes and blue areas down-regulated genes ( $\log_2(\text{Fold change HTO/Ctrl})$ ). White asterisks represent genes with adjusted p-value < 0.01. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

detachment of myofilament from the Z-band resulting in a disorganization of these myofilaments (Fig. 7B–B’–D–D’), that are not distinguished at a lower resolution (Fig. 7A–A’–C–C’).

As previously described, the transcriptomic analysis highlighted that pathways related to muscle contraction were significantly enriched in 24 hpf embryos for both dose rates. A more detailed analysis showed that pathways involved in skeletal and cardiac muscle contraction, muscle cell development or sarcomere assembly were affected by HTO contamination (Fig. 8A). When looking at genes involved in these pathways, genes coding for protein involved in sarcomere assembly (*tnnt2d*, *tnnt2e*, *tnnt3b*, *tnni2a.4*, *tnni2b.2*, *capn3a*, *capn3b* and *tcap*) and muscarinic cholinergic receptors (*chrm3a* and *chrm2a*) were up-regulated at 0.4 mGy/h. At 4 mGy/h, genes coding for protein involved in sarcomere assembly (*tnnt2d*, *tnnt2e*, *tnnt3b*, *tnni2a.4*, *tnni2b.2*, *capn3a*, *capn3b* and *obsrna*) were also differentially expressed but were down-regulated (Fig. 8B).

As chaperone proteins are known to be involved in muscle development and maintenance (Smith et al., 2014), a research for genes encoding chaperone proteins was performed for 24 hpf embryos at both dose rates. With the applied cut-off, *hsp70.2* was down-regulated at 0.4 mGy/h but up-regulated at 4mGy/h (Fig. S3). Furthermore, small heat shock protein (sHSP) gene family (*hspb2*, *hspb3* and *hspb9*) were up-regulated in 24 hpf embryos at 0.4 mGy/h but down-regulated in the same stages at 4 mGy/h (*hspb2* and *hspb3*) (Fig. S3). Other genes such as *hsp90aa1.1*, *hsp90aa1.2*, and *unc45b* were moderately differentially expressed in 24 hpf embryos at both dose rates but with levels that did not meet our criteria for significance concerning the fold change values (Table S6).

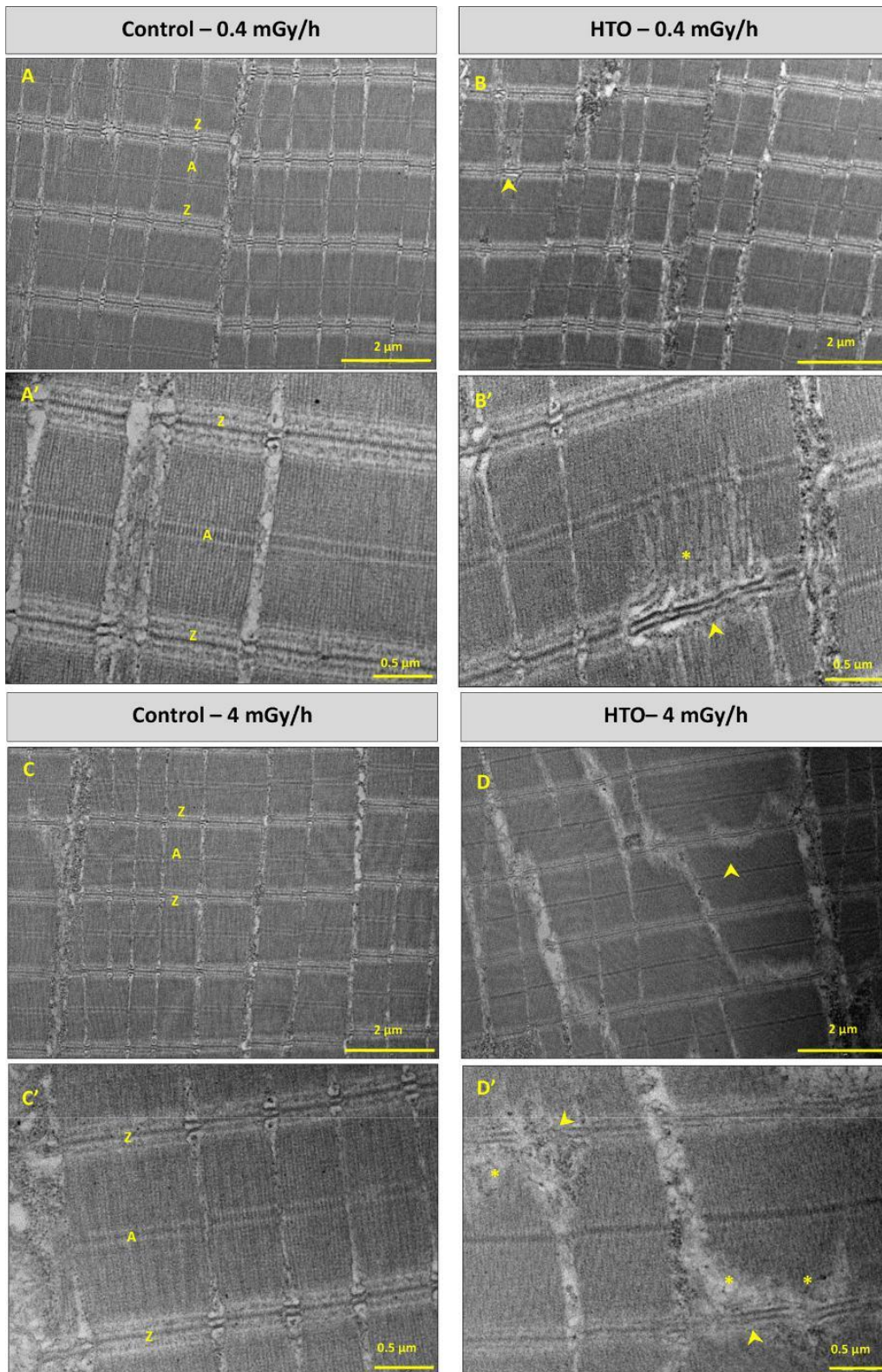


Fig. 7. Tail muscle observations by transmission electron microscopy of 96 hpf larvae exposed to 0.4 and 4 mGy/h of HTO compared to the corresponding controls. Control 96 hpf larvae corresponding to (A–A') 0.4 mGy/h and (C–C') 4 mGy/h exposure. Sarcomere organization delimited by the two Z-band seems regular as myofibril organization. Contaminated 96 hpf larvae corresponding to (B–B') 0.4 mGy/h and (D–D') 4 mGy/h exposure. At low scale no differences in sarcomere organization were visible compared to the controls for either dose rate. At higher resolution, myofibrils seemed detached from the Z-band (yellow arrow head) and were disorganized within the sarcomere (yellow asterisks). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

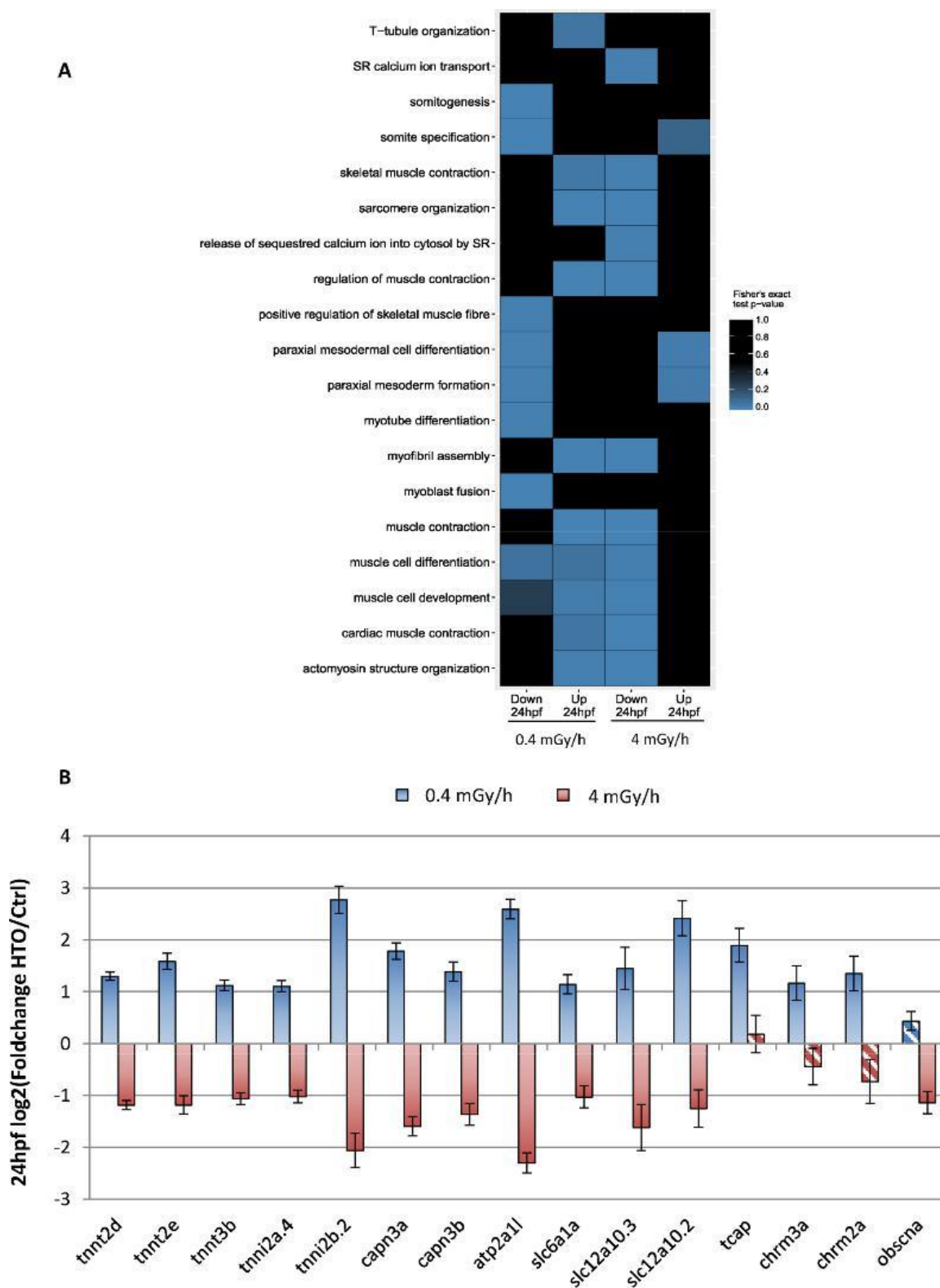


Fig. 8. Up- and down-regulated genes related to muscle contraction after 24 h of HTO exposure at 0.4 and 4 mGy/h. (A) Heatmap of selected GO terms related to muscle contraction pathway. Fisher’s exact test p-value is indicated as a color with blue indicating significant ( $\leq 0.01$ ) and black nonsignificant p-value. The x axis shows differential expression of genes involved in selected GO terms at the two dose rates after 24 h of contamination only. The y axis shows the GO term. (B) Barplot of significant mis-regulated genes related to muscle contraction. The y axis represents the  $\log_2(\text{fold change HTO/Ctrl})$  for each gene presented on the x axis. Dotted bars represent genes with  $\log_2(\text{fold change HTO/Ctrl}) \geq \pm 1$  and adjusted p-value  $\geq 0.01$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 4. Discussion

This study aimed to highlight the effects of HTO exposure on zebrafish early stages by the use of a global mRNAseq analysis. At 3 hpf, zebrafish eggs were exposed at two HTO activities corresponding to dose rates of 0.4 mGy/h and 4 mGy/h. These dose rates were chosen on the basis of the lower and upper limits of the Derived Consideration Reference Levels in which deleterious effects, as reduction in resistance to infection and reduced reproductive success, are expected on young fish using the trout as the reference animal (CIPR, 2012).

##### 4.1. Tritiated water activity variability but constant absorbed doses

Tritiated water activity was monitored during the experiments in order to ensure constant exposure of the organisms. We found a higher variability in tritium activity measurement in water for the highest activity ( $1.22 \times 10^6$  Bq/mL), despite the tritiated water renewal during experiments (Table 1). This higher variability in measurement could be due to a faster and uncontrolled isotopic exchange between HTO in our contamination medium and hydrogen in the ambient medium. Indeed, one of the particularities of tritium as tritiated water is its ability to exchange with hydrogen very rapidly (ASN, 2010). However, this variability in tritiated water activity along the experiments did not influence the dose rate, resulting in a constant absorbed dose by organisms along the experiments. Indeed, at the highest activity tested ( $1.22 \times 10^6$  Bq/mL), calculated dose rates of  $3.75 (\pm 0.9)$  mGy/h and  $3.24 (\pm 0.54)$  mGy/h in 24 hpf embryos and in 96 hpf larvae, respectively, were consistent with the nominal dose rate of 4 mGy/h.

##### 4.2. Effects of the embryos stages on differential expressed genes

The transcriptomic differential analysis performed in this study showed that, regardless of the exposure dose rate, only few genes were shared between stages after 24 h and 96 h of contamination. Indeed, after 0.4 mGy/h, only 4.5% of significant differentially expressed genes were shared between stages and only 5.51% after 4 mGy/h. It could suggest different molecular response of HTO in the two stages considered. However, when performing a principal component analysis (PCA) with the log transformed count data for all treatments and stages (Fig. 1), the first principal component, which explains 98% of the variance, segregated the samples based on the stage of development and not on HTO exposure. This result suggests that the weak overlap between differentially expressed genes obtain when comparing stages in both dose rates could be explain by the differences in these biological stages. Indeed, many developmental and genetic changes occur in zebrafish embryos from 24 hpf, the early pharyngula period, to 96 hpf, the early larval stage, as fin development, hatching and swimming (Kimmel et al., 1995). To go further, it would be interesting to study the dynamics of gene expression on other stages of development, before 24 hpf and between 24 and 96 hpf.

##### 4.3. Possible link between entrainment of circadian clock and response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after HTO exposure

The GO enrichment analysis performed on significantly differentially expressed genes in all conditions highlighted that, except after 24 h at 0.4 mGy/h, entrainment of circadian clock and response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pathways were enriched. After 96 h at 0.4 mGy/h and in both stages at 4 mGy/h, these pathways were up-regulated and interestingly, *cry1aa*, *cry5*, *per2* and *per1a* genes were shared between them. Possible links between circadian rhythm and response to oxidative stress has already been described in the literature. Indeed, many antioxidants such as SOD, CAT and GSTs exhibit a daily oscillation of their expression and activity level (Wilking et al., 2013). Studies on circadian gene mutant mice and fruit flies showed an increased susceptibility to oxidative stress (Jang et al., 2011; Krishnan et al., 2008). Zebrafish circadian clock shares similarities between those described in fruit

flies and mice (Vatine et al., 2011). Hirayama et al. (2007) showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of zebrafish Z3 cells promoted the induction of *cry1a*, *per2* and *per1*. These results suggest that oxidative stress or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced after HTO contamination could disrupt expression of *cry1aa*, *per2* and *per1a*.

##### 4.4. Onset of protective mechanism against oxidative stress in 0.4 mGy/h 24 hpf embryos

After 96 h at 0.4 mGy/h and in both stages at 4 mGy/h, there is no difference in expression of genes involved in defence against oxidative stress (e.g. *sod*, *cat*, *gstp*, *mpx*). Furthermore, a reactive oxygen species induction assay was performed after 96 h contamination with both dose rates and no difference between control and exposed organisms was found (Gagnaire et al., unpublished data). This result may indicate a balance between the reactive oxygen species and the antioxidant system. Interestingly, after 24 h at 0.4 mGy/h, *gpx3*, *sod2* and *mpx* were significantly up-regulated. Together, these results suggest the onset of early protective mechanisms against oxidative stress since stimulation of antioxidative responses found after 24 h of 0.4 mGy/h HTO exposure and not found after 96 h of exposure for the same dose rate and in both stages at 4 mGy/h. However, it is not excluded that protection mechanisms against the stress applied by HTO exposure were implemented before the sampling times.

##### 4.5. Muscular impairments after 24 h of HTO exposure: from gene expression to muscle ultra-structure damages

The comparisons between all conditions showed a significant overlap in 24 hpf embryos between genes up-regulated at 0.4 mGy/h and down-regulated at 4 mGy/h. The GO enrichment performed on these genes highlighted that muscle contraction, myofibril assembly and ion transport pathway were significantly impacted by HTO.

Regarding the genes shared between muscle contraction and myofibril assembly pathways, it appeared that troponin T and I were mis-regulated in both pathways. These two troponin types are part of the troponin protein complex on the thin muscle filament. Troponin T anchors the complex on the thin filament and troponin I inhibits the actin-myosin interaction until the binding of Ca<sup>2+</sup> on troponin C allowing actin-myosin interaction (Ferrante et al., 2011). In our study, the mis-regulated genes encoding troponin are expressed in cardiac muscle (*tnt2d* and *tnt2e*) and in fast skeletal muscle (*tnt3b*, *tnti2a.4* and *tnti2b.2*). Studies performed on genes encoding troponin T and I on zebrafish and *C. elegans* mutants showed sarcomere disorganization, showing their essential role in muscle organization (Burkeen et al., 2004; Ferrante et al., 2011; Huang et al., 2009; Sehnert et al., 2002).

Another family of genes involved in protection of myocytes against apoptotic signals, *capn3a* and *capn3b* (Richard et al., 2000), were differentially expressed. In addition to these shared genes, *tcap* and *obsrna*, genes involved, respectively, in sarcomere organization (Zhang et al., 2009) and myocyte organization (Raeker and Russell, 2011), were differentially expressed. Taken together, these results suggest that HTO exposure could involve skeletal and cardiac muscle impairments in zebrafish embryos. Regarding our results, these impairments could be compensated at the lowest dose rate by the up-regulation of genes playing an essential role in muscle organization.

Furthermore, previous studies investigated the role of human orthologues of some genes found mis-regulated in our study (troponin T and I, *capn3* and *tcap*). They highlighted that these orthologous genes are involved in human muscular diseases as hypertrophic cardiomyopathies, distal arthrogryposis type 2 B or limb girdle muscular dystrophies (LGMD) (Ferrante et al., 2011; Sehnert et al., 2002; Steffen et al., 2007). As the use of the zebrafish model to investigate human diseases is of growing interest, it would be interesting to study the effect of HTO exposure on other human orthologous genes involved in human muscular dystrophies.

In our study, *hsp70.2* and genes encoding small heat shock proteins were significantly differentially expressed in both dose rates in 24 hpf embryos. Heat shock proteins (HSPs) are chaperone proteins that help folding of other proteins, and they are indicators of cellular stress. In skeletal muscle, HSP70 may be the most abundant heat shock protein produced in response to stress and studies reported that mRNA of the gene encoding muscle HSP70 is rapidly up-regulated when stress occurs (reviewed in Liu et al., 2006). Small heat shock proteins (sHSPs) are known to be abundant in cardiac muscle cells (Smith et al., 2014) and in zebrafish, most sHSPs are expressed during embryogenesis and larval development (Elicker and Hutson, 2007). Other genes encoding chaperone proteins required for skeletal and cardiac muscle organization and function in zebrafish (Du et al., 2008) (such as *hsp90aa1.1*, *hsp90aa1.2* and *unc45b*) were moderately differentially expressed in 24 hpf embryos for both dose rates. As chaperone proteins play an important role in muscle development, maintenance and function, mis-regulation of genes encoding HSP and sHSP in our study suggests the implementation of cellular response to stress induced by the HTO contamination in 24 hpf zebrafish embryos.

As previously discussed, the ion transport pathway was also enriched after the GO enrichment analysis performed on shared genes between dose rates in 24 hpf embryos. Genes involved in neuro-transmitter transport (*slc6a1a*), Na-K-Cl<sup>-</sup> transport (*slc12a10.2* and *slc12a10.3*) and Ca<sup>2+</sup> transport (*atp2a1l*) were mis-regulated. These genes play an important role in the induction of muscle contraction and relaxation (Hirata et al., 2004). Other genes involved in ion transport were found to be mis-regulated in our study. After 24 h at 0.4 mGy/h, genes encoding for muscarinic receptors (*chrm2a* and *chrm3a*) were up-regulated. Gene involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, encoding histidine-rich calcium-binding protein (Arvanitis et al., 2011), was down-regulated. These results suggest an effect of HTO exposure on the events leading to the muscle contraction, as neurotransmitter release, sarcolemma depolarization and calcium homeostasis.

The TEM observations performed after 96 h of exposure at the two dose rates seemed to confirm our finding on 24 hpf embryos gene expression. Indeed, impairment of sarcomere structures seemed to be more severe after an exposure to 4 mGy/h, in which genes were down-regulated. On the contrary, at 0.4 mGy/h, the up-regulation of genes involved in muscle contraction and myofibril assembly was probably a sign of compensatory response on muscle development after HTO exposure. Indeed, at this dose rate, genes involved in somite specification were down-regulated. As somite gives rise to axial skeleton and skeletal muscle (Stickney et al., 2000), it is not excluded that up-regulation of genes involved in muscle contraction might be a compensatory response against down-regulation of genes involved in somatogenesis. Our finding on muscle structure and somite development are in agreement with the literature in which exposure to HTO from 35.42 mGy/h and exposure to <sup>137</sup>Cs gamma radiation from 18.3 mGy/h lead to vertebral malformations in medaka exposed during embryonic stages (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993). Deformities in the form of spinal curvature were reported in non-irradiated and irradiated (9.6 mGy/h of <sup>60</sup>Co) F1 72 hpf zebrafish after parental exposure to 8.7 mGy/h of gamma rays (<sup>60</sup>Co) (Hurem et al., 2017). Furthermore, skeletal striated muscle alterations were also observed in 96 hpf zebrafish larvae after 0.03 and 23.75 mGy/h of gamma rays (<sup>137</sup>Cs) (Gagnaire et al., 2015). However, no deformities were observed using dose rates tested in this study (Gagnaire et al., unpublished data).

Together with the result on muscle fibre organization, HTO exposure might lead to cardiac and skeletal muscle dysfunction and might lead to locomotor impairment in zebrafish larvae. In order to complete this finding, it could be interesting to perform a histological analysis on zebrafish heart and investigate the locomotor behaviour of larvae.

#### 4.6. Potential eye transparency impairments after 24 h of HTO exposure

Our study revealed over representation of genes involved in eye

opacity (genes encoding crystallin  $\beta$  and  $\gamma$  family proteins, *lim2.3*, *lim2.4* and *mipb*) after 24 h for both dose rates (Fig. 5). These genes were up-regulated after 0.4 mGy/h and down-regulated after 4 mGy/h. Previous studies performed on zebrafish showed that *mipb* knockout fish develop cataract by 72 hpf (Froger et al., 2010). In zebrafish *cloche* mutant, it has been shown that cataract is due to  $\gamma$ -crystallin insolubility, and normal vision is restored after over-expression of exogenous  $\alpha$ -A crystallin (Goishi et al., 2006), a molecular chaperone of the group of small heat shock proteins (Posner et al., 2013). Moreover, homozygous *lim2*-deficient mice develop lens with abnormal reflective properties and opacity (Shiels et al., 2007). Furthermore, cataract is one of the complications observed in human after eye beta radiation therapy with total dose ranging from  $7.5 \times 10^4$  to  $8.6 \times 10^5$  mGy (Barron et al., 1970) and cataract incidence was found to increase with the level of background radiation in free-living Chernobyl birds (Mousseau and Møller, 2013).

In our analysis, genes playing a role in eye opacity were up or down regulated depending on the dose rate after 24 h of exposure, suggesting that HTO exposure of 0.4 and 4 mGy/h might lead to cataract in zebrafish embryos. Indeed, an up-regulation of these genes might have the effect of protein accumulation in lens and might lead to increased opacity if their solubilisation is not well-done. As already showed on zebrafish and mice mutant, a down-regulation of these genes might lead to a cataract formation in zebrafish embryos. The down-regulation of some of the genes found in our study caused cataract due to  $\gamma$ -crystallin insolubility and a lack of lens fibre differentiation during development. Further studies could investigate if exposure to HTO could lead to a deficiency of eye transparency in developing zebrafish.

#### 4.7. Protective response against DNA damage: possible implication of DNA repair genes and chromatin compaction

As tritiated water exposure is known to promote genotoxic effects in aquatic invertebrates such as marine mussel (Hagger et al., 2005; Jaeschke et al., 2011; Jha et al., 2005, 2006), vertebrates as fathead minnow (Gagnaire et al., 2017) and medaka (Suyama et al., 1981) and fish cells (Stuart et al., 2016), genes involved in response to DNA damage were investigated. Using our cut-off, *h2afx* and *ddb2* were up-regulated in 24 hpf embryos at 4 mGy/h and in 96 hpf larvae for both dose rates (Fig. 5A). These two genes are involved in the response to DNA damages; as *h2afx* codes for histone H2A variant, H2AX is rapidly phosphorylated ( $\gamma$ -H2AX) in response to DNA double-strand breaks (Rogakou et al., 1998) and *ddb2* is involved in the nucleotide excision repair pathway (Pei and Strauss, 2013). In addition to these significantly over-expressed genes, genes involved in the anti-apoptotic pathway and DNA repair (e.g. *bcl2l1*, *xpc*, *gadd45bb* or *xrcc1*) were moderately up-regulated in 96 hpf larvae after 0.4 mGy/h and in both stages at 4mGy/h (Fig. 5A). These results suggest the establishment of defence against DNA damage by over-expression of anti-apoptotic and DNA repair genes, starting in late stages for the 0.4 mGy/h dose rate, while an earlier response, before 24 h, could be established for the highest dose rate (4 mGy/h). This hypothesis is supported by the results obtained at the cellular scale using the comet assay. Indeed, a significant increase of DNA strand breaks was reported for both stages after 0.4 mGy/h, while no differences in terms of DNA damages were observed at 4 mGy/h (Gagnaire et al., unpublished data). Another cellular mechanism could explain the results obtained with the comet assay, the targeted chromatin compaction. Indeed, the GO enrichment analysis performed in this study revealed that DNA packaging signalling pathway was significantly up-regulated in both stages after 4 mGy/h (Fig. 2). Genes (such as *h2afx*, *histh1l* or *h1f0*) coding for histone proteins were significantly up-regulated in this analysis. Many studies reviewed in Lavelle and Foray, (2014) showed that accessibility of DNA damaging agent is reduced with the chromatin compaction, as well as accessibility of DNA repair enzyme. This fact is not in agreement with our hypothesis of establishment of DNA repair mechanisms by the over-expression of DNA repair genes. Further investigations will be necessary to

figure out which mechanism is involved in DNA damage response between the up-regulation of DNA repair genes, the targeted chromatin compaction or, more likely, a combination of both.

#### 4.8. Opposite differential expression between dose rates after 24 h of HTO contamination: possible implication of the chromatin compaction

In this study, it is interesting to note that after 24 h of HTO exposure, the differential expression of genes playing a role in eye opacity (Fig. 5) and muscle contraction (Fig. 8B) were, for a large majority, up-regulated after 0.4 mGy/h but down-regulated after 4 mGy/h. These results suggested the onset of compensatory effects after 0.4 mGy/h by the enhancement of gene expression and protection mechanisms after 4mGy/h by a targeted DNA packaging. Protection mechanisms against ionizing radiation by chromatin compactness was already studied by Hurem et al. (2017) in zebrafish offspring obtained from exposed parents one year post-irradiation ( $^{60}\text{Co}$  for 27 days). In this study, 50% epiboly offspring showed more down-regulated genes when spawned from 8.7 mGy/h exposed parents one year post-irradiation than those spawned from 53 mGy/h exposed parents one month post-irradiation. Furthermore, the transcriptomic analysis revealed many differentially expressed genes involved in post-translational modifications of histones (e.g. *kdm4*, *setd3* or gene encoding histone deacetylase), suggesting more chromatin compactness. In our study, genes involved in post-translational modifications of histones were observed at levels that did not meet our criteria for significance concerning the fold-change values. However, genes encoding lysine-specific demethylase were mostly down-regulated but few effects on histone deacetylase were found. However, the GO enrichment revealed that the nucleosome assembly and regulation of DNA methylation pathways were significantly enriched in 24 hpf embryos exposed at 4 mGy/h, with over-expression of genes as *histH1* or *h2afx* coding for histone proteins. As it is now well established that chromatin dynamics plays an important role in DNA accessibility and gene transcription (Armant et al., 2013; Lavelle and Foray, 2014), it would be interesting to investigate if opposite differential gene expression in our study could be related to targeted changes in chromatin remodelling after HTO contamination.

#### 5. Conclusion

This study provided a global gene expression analysis of the effects of tritiated water exposure at dose rates expected to have detrimental effects. It appeared that genes involved in skeletal and cardiac muscle contraction and eye opacity were differentially expressed after 24 h of HTO contamination for both dose rates. As these genes showed an opposite pattern of differential expression depending on dose rate, it could suggest compensatory mechanisms implemented in response to HTO contamination for the lowest dose rate. Down-regulation of these genes at the highest dose rate suggests a cellular response mechanism against the stress induced by HTO by the potential implementation of targeted chromatin remodelling. As muscle impairments found at the molecular level were also found at a higher biological level of organization as TEM observations showed sarcomere disorganization, muscle integrity could be considered as a good indicator of HTO contamination in early developmental stages of zebrafish. The circadian clock genes, key components of rhythmic processes in organisms, were affected by HTO contamination. This could be linked to a response to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a reactive oxygen species also described as a circadian light-driven gene regulator. In our study, ROS scavengers were up-regulated only after 24 h of HTO contamination at 0.4 mGy/h. This finding suggests the onset of early protective mechanisms against oxidative stress. We also investigated the DNA damages and repair pathways, as DNA damages are classically observed after ionizing radiation exposure. Few genes involved in this pathway were significantly differentially expressed after HTO exposure at both dose rates and life stages. However, many of the genes playing a role in

DNA defence mechanisms were moderately up-regulated, especially at 4 mGy/h for both stages. The present study provides a wide data set on HTO exposure effects at the molecular scale. Together with other studies on developmental, reprotoxic and genotoxic effects of tritium, it provides tools to better understand modes of actions of tritiated water on a vertebrate model.

#### Contributors

Experiments: CA IC VC.  
 Metrology: CA IC OD.  
 Data analysis: CA OA.  
 Microscopy: MF.  
 Visualization: CA MF.  
 Supervision: BG CAG.  
 Writing – original draft: CA.  
 Writing – review and editing: CA OA BG CAG OS MF IC VC OD.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Karine Beaugelin-Seiller (IRSN, France) for the calculation of the dose coefficients required for the dose rates calculation. We also thank the IGBMC Microarray and Sequencing platform (Illkirch, France) for the NGS libraries sequencing. This work was supported by the GGP research program supported by IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) and EDF (Electricité de France).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.012>.

#### References

- ASN, 2010. Livre Blanc Du Tritium.
- Abbott, D.T., Mix, M., 1979. Radiation effects of tritiated seawater on development of the goose barnacle, *Pollicipes polymerus*. *Health Phys.* 36, 283–287.
- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 67–103.
- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2009. Gene Set Enrichment Analysis with TopGO. Available.
- Armant, O., März, M., Schmidt, R., Ferg, M., Diotel, N., Ertzer, R., Bryne, J.C., Yang, L., Baader, I., Reischl, M., 2013. Genome-wide, whole mount in situ analysis of transcriptional regulators in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 380, 351–362.
- Armant, O., Gombau, K., El Houdigui, S.M., Floriani, M., Camilleri, V., Cavale, I., Adam-Guillermin, C., 2017. Zebrafish exposure to environmentally relevant concentration of depleted uranium impairs progeny development at the molecular and histological levels. *PLoS One* 12, e0177932.
- Arvanitis, D.A., Vafiadaki, E., Sanoudou, D., Kranias, E.G., 2011. Histidine-rich calcium binding protein: the new regulator of sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 43–49.
- Barron, A., McDonald, J., Hughes, W., 1970. Long-term complications of beta-radiation therapy in ophthalmology. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 68, 112.
- Barut, B.A., Zon, L.I., 2000. Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease. *Physiol. Genomics* 2, 49–51.
- Burke, A., Maday, S., Rybicka, K., Sulcove, J., Ward, J., Huang, M., Barstead, R., Franzini-Armstrong, C., Allen, T.S., 2004. Disruption of *Caenorhabditis elegans* muscle structure and function caused by mutation of troponin I. *Biophys. J.* 86, 991–1001.
- CIPR, 2012. Protection of the Environment Under Different Exposure Situations. CIPR Publication, pp. 114.
- Chen, H., 2016. VennDiagram: Generate High-resolution Venn and Euler Plots R Package Version 1.6. pp. 17.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Dooley, K., Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 252–256.
- Du, S.J., Li, H., Bian, Y., Zhong, Y., 2008. Heat-shock protein 90 $\alpha$ 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 554–559.
- EU, 2013. COUNCIL DIRECTIVE 2013/51/EURATOM of 22 October 2013 Laying down Requirements for the Protection of the Health of the General Public with Regard to Radioactive Substances in Water Intended for Human Consumption.

- Elicker, K.S., Hutson, L.D., 2007. Genome-wide analysis and expression profiling of the small heat shock proteins in zebrafish. *Gene* 403, 60–69.
- Etoh, H., Hyodo-Taguchi, Y., 1983. Effects of tritiated water on germ cells in medaka embryos. *Radiat. Res.* 93, 332–339.
- Ferrante, M.I., Kiff, R.M., Goulding, D.A., Stemple, D.L., 2011. Troponin T is essential for sarcomere assembly in zebrafish skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 124, 565–577.
- Froger, A., Clemens, D., Kalman, K., Németh-Cahalan, K.L., Schilling, T.F., Hall, J.E., 2010. Two distinct aquaporin 0 s required for development and transparency of the zebrafish lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6582–6592.
- Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermín, C., 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 169, 69–78.
- Gagnaire, B., Adam-Guillermín, C., Festarini, A., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Shultz, C., Kim, S., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., 2017. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Sci. Total Environ.* 599, 597–611.
- Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailles, C., Beresford, N., Howard, B., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J. Radiol. Prot.* 30, 215.
- Goishi, K., Shimizu, A., Najarro, G., Watanabe, S., Rogers, R., Zon, L.I., Klagsbrun, M., 2006.  $\alpha$ -crystallin expression prevents  $\gamma$ -crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens. *Development* 133, 2585–2593.
- Gudkov, D., Kipnis, L., 1996. Long-term effect of tritiated water on the biological indicators of *Daphnia magna*. *Hydrobiol. J.* 32, 1–10.
- HPA, 2007. Review on risks from tritium. Report from the independent advisory group on ionizing radiations. Documents of the Health Protection Agency Radiation Chemical and Environmental Hazards. RCE-4.
- Hagger, J., Atienzar, F., Jha, A., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217.
- Hirata, H., Saint-Amant, L., Waterbury, J., Cui, W., Zhou, W., Li, Q., Goldman, D., Granato, M., Kuwada, J.Y., 2004. Accordion, a zebrafish behavioral mutant, has a muscle relaxation defect due to a mutation in the ATPase Ca<sup>2+</sup> pump SERCA1. *Development* 131, 5457–5468.
- Hirayama, J., Cho, S., Sassone-Corsi, P., 2007. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15747–15752.
- Huang, W., Zhang, R., Xu, X., 2009. Myofibrillogenesis in the developing zebrafish heart: a functional study of *tnt2*. *Dev. Biol.* 331, 237–249.
- Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Hansen, E.L., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.-K., 2017. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Res.* 159, 564–578.
- Hyodo-Taguchi, Y., Egami, N., 1977. Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated water. *Radiat. Res.* 71, 641–652.
- Hyodo-Taguchi, Y., Etoh, H., 1986. Effects of tritiated water on germ cells in medaka: II: diminished reproductive capacity following embryonic exposure. *Radiat. Res.* 106, 321–330.
- Hyodo-Taguchi, Y., Etoh, H., 1993. Vertebral malformations in medaka (teleost fish) after exposure to tritiated water in the embryonic stage. *Radiat. Res.* 135, 400–404.
- Ichikawa, R., Suyama, I., 1974. Effects of tritiated water on the embryonic development of two marine teleosts. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 40 (8), 819–882.
- Jaeschke, B., Millward, G., Moody, A., Jha, A., 2011. Tissue-specific incorporation and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 159, 274–280.
- Jang, Y.-S., Lee, M.-H., Lee, S.-H., Bae, K., 2011. Cu/Zn superoxide dismutase is differentially regulated in period gene-mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 22–27.
- Jha, A., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat. Res.* 556, 47–57.
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2006. Are low doses of tritium genotoxic to *Mytilus edulis*? *Mar. Environ. Res.* 62, S297–S300.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Krishnan, N., Davis, A.J., Giebultowicz, J.M., 2008. Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 299–303.
- Lavelle, C., Foray, N., 2014. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 49, 84–97.
- Liu, Y., Gampert, L., Nething, K., Steinacker, J.M., 2006. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front. Biosci.* 11, 2802–2827.
- Love, M., Anders, S., Huber, W., 2014. Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol.* 15, 550.
- Mathur-De Vre, R., Binet, J., 1984. Molecular aspects of tritiated water and natural water in radiation biology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 43, 161–193.
- Mousseau, T.A., Møller, A.P., 2013. Elevated frequency of cataracts in birds from Chernobyl. *PLoS One* 8, e66939.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing, Pei, D.-S., Strauss, P.R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 743, 151–159.
- Posner, M., Skiba, J., Brown, M., Liang, J.O., Nussbaum, J., Prior, H., 2013. Loss of the small heat shock protein  $\alpha$ -crystallin does not lead to detectable defects in early zebrafish lens development. *Exp. Eye Res.* 116, 227–233.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raeker, M.Ö., Russell, M.W., 2011. Obscurin depletion impairs organization of skeletal muscle in developing zebrafish embryos. *BioMed Res. Int.* 2011.
- Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., 2000. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /nuclear factor  $\kappa\text{B}$  pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.* 151, 1583–1590.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Sehnert, A.J., Huq, A., Weinstein, B.M., Walker, C., Fishman, M., Stainier, D.Y., 2002. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat. Genet.* 31, 106–110.
- Shiels, A., King, J.M., Mackay, D.S., Bassnett, S., 2007. Refractive defects and cataracts in mice lacking lens intrinsic membrane protein-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 500–508.
- Smith, D.A., Carland, C.R., Guo, Y., Bernstein, S.I., 2014. Getting folded: chaperone proteins in muscle development, maintenance and disease. *Anat. Rec.* 297, 1637–1649.
- Steffen, L.S., Guyon, J.R., Vogel, E.D., Beltre, R., Pusack, T.J., Zhou, Y., Zon, L.I., Kunkel, L.M., 2007. Zebrafish orthologs of human muscular dystrophy genes. *BMC Genomics* 8, 79.
- Stickney, H.L., Barresi, M.J., Devoto, S.H., 2000. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 219, 287–303.
- Strand, J.A., Fujihara, M., Burdett, R., Poston, T., 1977. Suppression of the primary immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. *J. Fish. Board Can.* 34, 1293–1304.
- Strand, J., Fujihara, M., Poston, T., Abernethy, C., 1982. Permanence of suppression of the primary immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. *Radiat. Res.* 91, 533–541.
- Stuart, M., Festarini, A., Schleicher, K., Tan, E., Kim, S.B., Wen, K., Gawlik, J., Ulsh, B., 2016. Biological effects of tritium on fish cells in the concentration range of international drinking water standards. *Int. J. Radiat. Biol.* 92, 563–571.
- Suyama, I., Etoh, H., Maruyama, T., Kato, Y., Ichikawa, R., 1981. Effects of ionizing radiation on the early development of *Oryzias* eggs. *J. Radiat. Res.* 22, 125–133.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S., 2011. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1485–1494.
- Westerfield, M., 1995. *The Zebrafish Book*. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- Wickham, H., 2010. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *J. Stat. Softw.* 35, 65–88.
- Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., Ahmad, N., 2013. Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 192–208.
- Zhang, R., Yang, J., Zhu, J., Xu, X., 2009. Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere–membrane interaction, not sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4130–4140.



Supplementary data

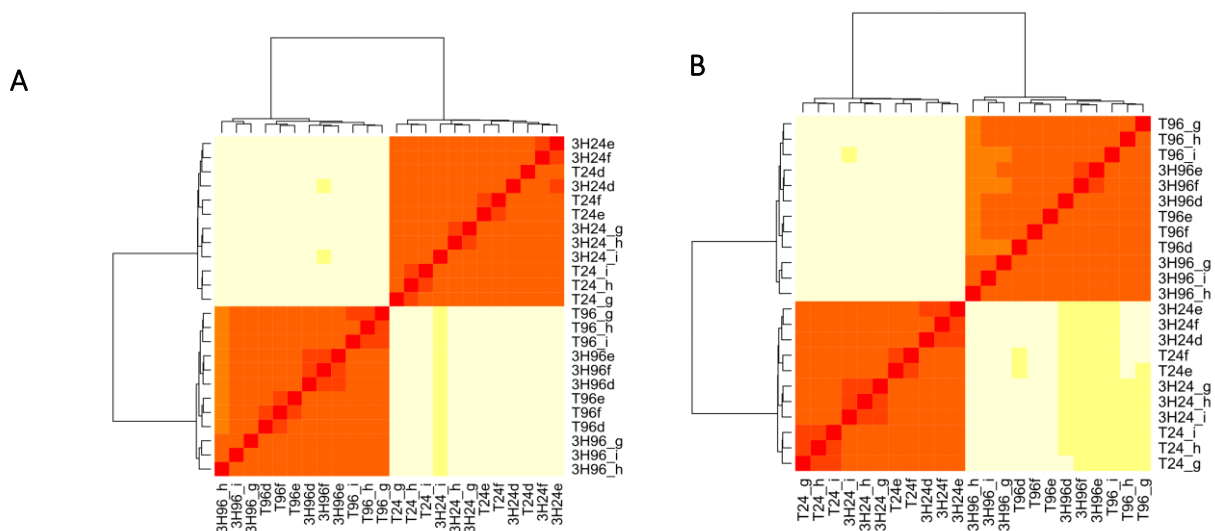


Fig S1: Heatmap of euclidian distance between normalized samples (A) with T24d outlier sample (B) without T24d outlier sample.

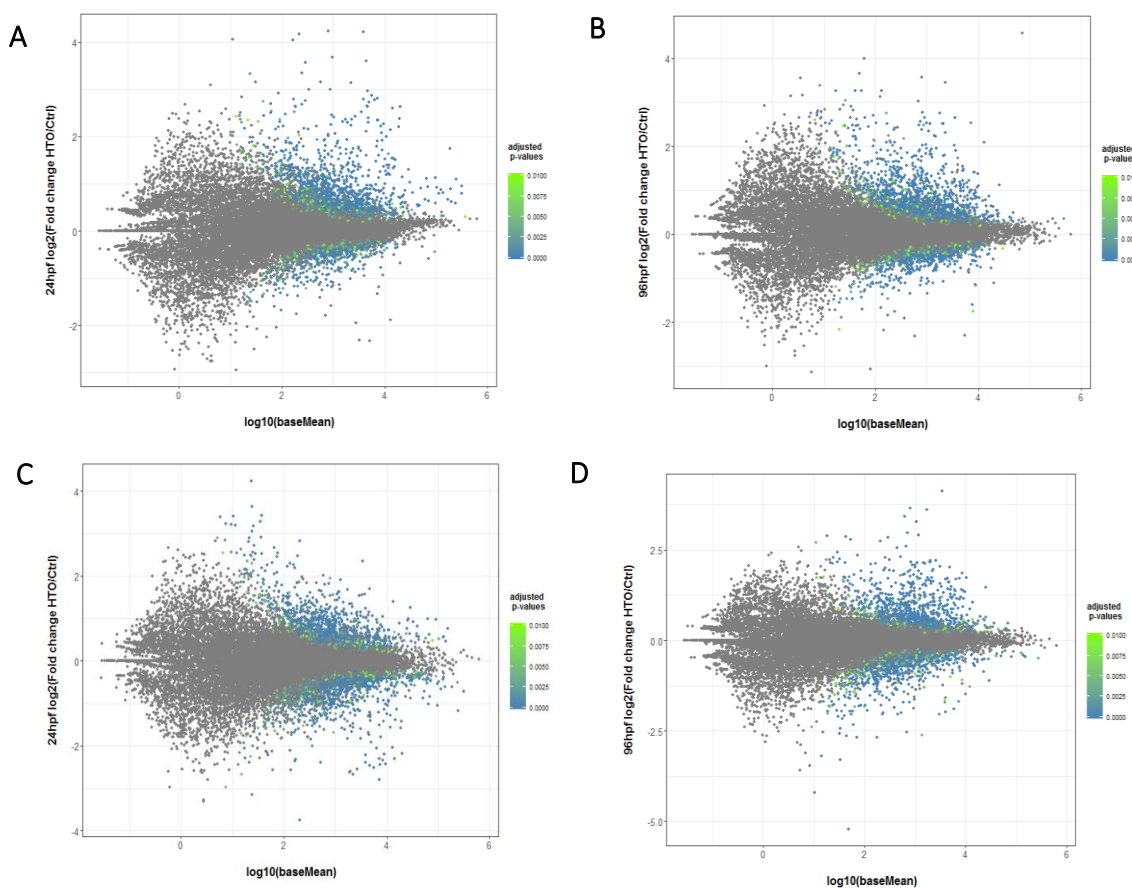


Fig S2: MA-plot from the differential analysis after HTO exposure at 0.4 mGy/h in 24 hpf embryos (A) and in 96 hpf larvae (B), and at 4 mGy/h in 24 hpf embryos (C) and 96 hpf larvae (D). The differential expression of genes is reported on the y-axis as the  $\log_2(\text{fold change HTO/Ctrl})$  and on the x-axis as the  $\log_{10}$  mean normalized expression. The adjusted p-value for each gene is showed as green (high) and blue (low), and no significant genes are plotted in grey.

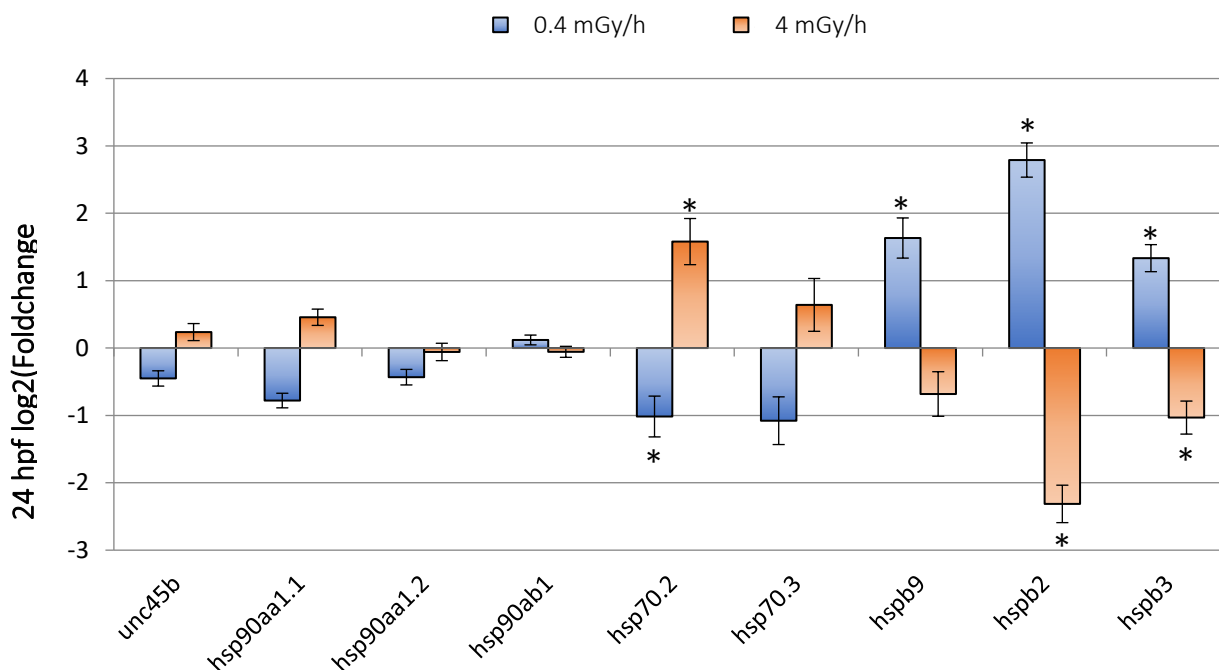


Fig S3: Bar plot of chaperone protein mis-regulated after 24h of HTO exposure at 0.4 mGy/h (blue) and 4 mGy/h (red). Asterisks (\*) represent genes with a log2(fold change Ctrl/HTO) ≥ ± 1 and adjusted p-value ≤ 0.01.

**Table S1:** Weighted internal and external dose coefficient (DCint and DCext) calculated for 24 hpf embryos and 96 hpf larvae using the EDEN v2 software

	24 hpf	96 hpf
<b>weighted DCint (μGy/h per Bq/g)</b>	6.71x10 <sup>-3</sup>	6.71x10 <sup>-3</sup>
<b>weighted DCext (μGy/h per Bq/g)</b>	3.77x10 <sup>-5</sup>	5.21x10 <sup>-5</sup>

**Table S2:** Total read and quality control of reads generated by mRNAseq for each samples

Experiment	Sample name	ID	Total read	% of base above Q30	Read length
1	Control 24 hpf - replicat 1	T24 g	181 138 240	95.42	50
1	Control 24 hpf - replicat 2	T24 h	124 644 552	95.59	50
1	Control 24 hpf - replicat 3	T24 i	120 311 528	95.24	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 24 hpf - replicat 1	3H24 g	134 997 032	95.44	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 24 hpf - replicat 2	3H24 h	112 704 676	95.66	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 24 hpf - replicat 3	3H24 i	107 090 154	95.67	50
1	Control 96 hpf - replicat 1	T96 g	125 806 606	94.14	50
1	Control 96 hpf - replicat 2	T96 h	108 664 132	94.51	50
1	Control 96 hpf - replicat 3	T96 i	108 775 414	94.52	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 96 hpf - replicat 1	3H96 g	106 008 138	94.67	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 96 hpf - replicat 2	3H96 h	164 224 836	94.5	50
1	HTO (0.4 mGy/h) 96 hpf - replicat 3	3H96 i	151 539 570	93.89	50
2	Control 24 hpf - replicat 1	T24 d	131 985 292	96.19	50
2	Control 24 hpf - replicat 2	T24 e	87 799 110	94.61	50
2	Control 24 hpf - replicat 3	T24 f	190 074 068	94.38	50
2	HTO (4 mGy/h) 24 hpf - replicat 1	3H24 d	64 009 396	95.27	50
2	HTO (4 mGy/h) 24 hpf - replicat 2	3H24 e	176 233 942	96.21	50
2	HTO (4 mGy/h) 24 hpf - replicat 3	3H24 f	91 170 794	96.04	50
2	Control 96 hpf - replicat 1	T96 d	66 648 878	96.1	50
2	Control 96 hpf - replicat 2	T96 e	130 272 890	95.97	50
2	Control 96 hpf - replicat 3	T96 f	114 069 346	95.58	50
2	HTO (4 mGy/h) 96 hpf - replicat 1	3H96 d	127 567 710	96.1	50
2	HTO (4 mGy/h) 96 hpf - replicat 2	3H96 e	154 336 802	94.2	50
2	HTO (4 mGy/h) 96 hpf - replicat 3	3H96 f	124 023 330	95.91	50

**Table S3:** Gene Ontology terms in 24 hpf embryos and 96 hpf larvae at 0.4 and 4 mGy.h-1.

<b>Down in 24 hpf embryos at 0.4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0001757 ; GO:0007379 ; GO:0007520 ; GO:0000768 ; GO:0006949 ; GO:0048646 ; GO:0001756 ; GO:0035282 ; GO:0009299 ; GO:0042789 ; GO:0045026 ; GO:0001101 ; GO:0061053 ; GO:0001707 ; GO:0033552 ; GO:0048342 ; GO:0048332 ; GO:0009880 ; GO:0014902 ; GO:0007584 ; GO:0017144 ; GO:0033273 ; GO:0048340 ; GO:0048341 ; GO:0048743 ; GO:0097499 ; GO:0097500 ; GO:1903546 ; GO:0009952 ; GO:0009653 ; GO:0001704 ; GO:0048643 ; GO:1903441	somite specification ; segment specification ; myoblast fusion ; syncytium formation by plasma membrane fusion ; syncytium formation ; anatomical structure formation involved in morphogenesis ; somitogenesis ; segmentation ; mRNA transcription ; mRNA transcription from RNA polymerase II ; plasma membrane fusion ; response to acid chemical ; somite development ; mesoderm formation ; response to vitamin B3 ; paraxial mesodermal cell differentiation ; mesoderm morphogenesis ; embryonic pattern specification ; myotube differentiation ; response to nutrient ; drug metabolic process ; response to vitamin ; paraxial mesoderm morphogenesis ; paraxial mesoderm formation ; positive regulation of skeletal muscle fiber development ; protein localization to nonmotile primary cilium ; receptor localization to nonmotile primary cilium ; protein localization to photoreceptor outer segment ; anterior/posterior pattern specification ; anatomical structure morphogenesis ; formation of primary germ layer ; positive regulation of skeletal muscle tissue development ; protein localization to ciliary membrane	3,40E-04 ; 3,40E-04 ; 6,60E-04 ; 8,20E-04 ; 8,20E-04 ; 8,40E-04 ; 1,29E-03 ; 1,82E-03 ; 2,14E-03 ; 2,14E-03 ; 2,14E-03 ; 2,25E-03 ; 2,32E-03 ; 3,13E-03 ; 4,28E-03 ; 4,28E-03 ; 4,52E-03 ; 5,30E-03 ; 6,36E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,41E-03 ; 6,69E-03 ; 7,58E-03 ; 7,99E-03 ; 8,54E-03 ; 8,54E-03
<b>Up in 24 hpf embryos at 0.4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0006937 ; GO:0090257 ; GO:0006979 ; GO:0006936 ; GO:0003012 ; GO:0044057 ; GO:0006811 ; GO:0050886 ; GO:0044765 ; GO:0045214 ; GO:0006814 ; GO:1902578 ; GO:0007218 ; GO:0008207 ; GO:0034694 ; GO:0070542 ; GO:0030239 ; GO:1901700 ; GO:0003008 ; GO:0003013 ; GO:0008015 ; GO:0006810 ; GO:0006694 ; GO:0008202 ; GO:0031032 ; GO:0051234 ; GO:0007197 ; GO:0007207 ; GO:0009725 ; GO:0001990 ; GO:0005978 ; GO:0009250 ; GO:0042752 ; GO:0044550 ; GO:0006821	regulation of muscle contraction ; regulation of muscle system process ; response to oxidative stress ; muscle contraction ; muscle system process ; regulation of system process ; ion transport ; endocrine process ; single-organism transport ; sarcomere organization ; sodium ion transport ; single-organism localization ; neuropeptide signaling pathway ; C21-steroid hormone metabolic process ; response to prostaglandin ; response to fatty acid ; myofibril assembly ; response to oxygen-containing compound system process ; circulatory system process ; blood circulation ; transport ; steroid biosynthetic process ; steroid metabolic process ; actomyosin structure organization ; establishment of localization ; denylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway ; phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway ; response to hormone ; regulation of systemic arterial blood pressure by hormone ; glycogen biosynthetic process ; glucan biosynthetic process ; regulation of circadian rhythm ; secondary metabolite biosynthetic process ; chloride transport	2,50E-05 ; 3,80E-05 ; 1,30E-04 ; 1,40E-04 ; 1,90E-04 ; 2,00E-04 ; 4,20E-04 ; 6,80E-04 ; 8,30E-04 ; 1,16E-03 ; 1,60E-03 ; 1,82E-03 ; 2,10E-03 ; 2,21E-03 ; 2,21E-03 ; 2,21E-03 ; 2,99E-03 ; 3,21E-03 ; 3,21E-03 ; 3,54E-03 ; 3,54E-03 ; 4,84E-03 ; 5,46E-03 ; 5,85E-03 ; 6,52E-03 ; 7,01E-03 ; 7,64E-03 ; 7,64E-03 ; 8,37E-03 ; 9,45E-03 ; 9,45E-03 ; 9,45E-03 ; 9,45E-03 ; 9,45E-03 ; 9,50E-03
<b>Down in 96 hpf larvae at 0.4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0097531 ; GO:0000083 ; GO:0070254 ; GO:0070255 ; GO:0070257 ; GO:0051046 ; GO:0032941 ; GO:0035188 ; GO:0045670 ; GO:0071684 ; GO:0007589	mast cell migration ; regulation of transcription involved in G1/S transition of mitotic cell cycle ; mucus secretion ; regulation of mucus secretion ; positive regulation of mucus secretion ; regulation of secretion ; secretion by tissue ; hatching ; regulation of osteoclast differentiation ; organism emergence from protective structure ; body fluid secretion	3,50E-03 ; 5,20E-03 ; 5,20E-03 ; 5,20E-03 ; 5,20E-03 ; 6,00E-03 ; 6,90E-03 ; 6,90E-03 ; 6,90E-03 ; 6,90E-03 ; 8,70E-03
<b>Up in 96 hpf larvae at 0.4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0007623 ; GO:0048511 ; GO:0032922 ; GO:0009416 ; GO:0006030 ; GO:0042752 ; GO:0055085 ; GO:0009314 ; GO:1901071 ; GO:0071804 ; GO:0071805 ; GO:0042542 ;	circadian rhythm ; rhythmic process ; circadian regulation of gene expression ; response to light stimulus ; chitin metabolic process ; regulation of circadian rhythm ; transmembrane transport ; response to radiation ; glucosamine-containing compound metabolic process ; cellular potassium ion transport ; potassium ion transmembrane transport ; response to hydrogen peroxide ; monovalent inorganic cation transport ; response to abiotic stimulus ; potassium	1,40E-07 ; 9,10E-07 ; 7,90E-06 ; 1,20E-05 ; 1,30E-05 ; 1,30E-05 ; 2,20E-05 ; 2,30E-05 ; 5,90E-05 ; 7,50E-05 ; 7,50E-05 ; 8,10E-05 ; 1,00E-04 ; 1,40E-04 ; 1,50E-04 ; 2,60E-04 ;

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

<p>GO:0015672 ; GO:0009628 ; GO:0010107 ;          GO:0030574 ; GO:0044243 ; GO:0006032 ;          GO:0033993 ; GO:0006631 ; GO:1901072 ;          GO:0019369 ; GO:0000302 ; GO:0009648 ;          GO:0046348 ; GO:0006040 ; GO:1901565 ;          GO:0001676 ; GO:0009649 ; GO:0045475 ;          GO:1902475 ; GO:0043269 ; GO:0002028 ;          GO:0006954 ; GO:0030001 ; GO:0006811 ;          GO:0032496 ; GO:0006812 ; GO:0006813 ;          GO:0006952 ; GO:1901700 ; GO:0006857 ;          GO:0032963 ; GO:0044236 ; GO:0044259 ;          GO:0006026 ; GO:0006883 ; GO:0006690 ;          GO:1901568 ; GO:0002237 ; GO:0044765 ;          GO:0033559 ; GO:0006814 ; GO:1902578 ;          GO:0010765 ; GO:0010959 ; GO:0043207 ;          GO:0051707 ; GO:0009308 ; GO:0006508 ;          GO:0007622 ; GO:0048512 ; GO:0050900 ;          GO:0034220 ; GO:0009617 ; GO:0009607 ;          GO:0098660 ; GO:0055078 ; GO:0006000 ;          GO:0006805 ; GO:0008210 ; GO:0032411 ;          GO:0098655 ; GO:0043401 ; GO:0098662 ;          GO:0042127 ; GO:0019318 ; GO:0006022 ;          GO:0006003 ; GO:0006584 ; GO:0009712 ;          GO:0043270 ; GO:0043567 ; GO:0014070 ;          GO:0006979 ; GO:0019882 ; GO:1901136</p>	<p>ion import ; collagen catabolic process ; multicellular organismal catabolic process ; chitin catabolic process ; response to lipid ; fatty acid metabolic process ; glucosamine-containing compound catabolic process ; arachidonic acid metabolic process ; response to reactive oxygen species ; photoperiodism ; amino sugar catabolic process ; amino sugar metabolic process ; organonitrogen compound catabolic process ; long-chain fatty acid metabolic process ; entrainment of circadian clock ; locomotor rhythm ; L-alpha-amino acid transmembrane transport ; regulation of ion transport ; regulation of sodium ion transport ; inflammatory response ; metal ion transport ; ion transport ; response to lipopolysaccharide ; cation transport ; potassium ion transport ; defense response ; response to oxygen-containing compound ; oligopeptide transport ; collagen metabolic process ; multicellular organismal metabolic process ; multicellular organismal ; acromolecule metabolic process ; aminoglycan catabolic process ; cellular sodium ion homeostasis ; icosanoid metabolic process ; fatty acid derivative metabolic process ; response to molecule of bacterial origin ; single-organism transport ; unsaturated fatty acid metabolic process ; sodium ion transport ; single-organism localization ; positive regulation of sodium ion transport ; regulation of metal ion transport ; response to external biotic stimulus ; response to other organism ; amine metabolic process ; proteolysis ; rhythmic behavior ; circadian behavior ; leukocyte migration ; ion transmembrane transport ; response to bacterium ; response to biotic stimulus ; inorganic ion transmembrane transport ; sodium ion homeostasis ; fructose metabolic process ; xenobiotic metabolic process ; estrogen metabolic process ; positive regulation of transporter activity ; cation transmembrane transport ; steroid hormone mediated signaling pathway ; inorganic cation transmembrane transport ; regulation of cell proliferation ; hexose metabolic process ; aminoglycan metabolic process ; fructose 2,6-bisphosphate metabolic process ; catecholamine metabolic process ; catechol-containing compound metabolic process ; positive regulation of ion transport ; regulation of insulin-like growth factor ; receptors signaling pathway ; response to organic cyclic compound ; response to oxidative stress ; antigen processing and presentation ; carbohydrate derivative catabolic process</p>	<p>2,60E-04 ; 3,30E-04 ; 4,10E-04 ; 4,20E-04 ;          4,60E-04 ; 4,70E-04 ; 6,30E-04 ; 6,30E-04 ;          6,30E-04 ; 6,50E-04 ; 7,40E-04 ; 7,60E-04 ;          7,70E-04 ; 7,70E-04 ; 7,70E-04 ; 7,90E-04 ;          8,30E-04 ; 1,08E-03 ; 1,08E-03 ; 1,17E-03 ;          1,25E-03 ; 1,30E-03 ; 1,38E-03 ; 1,44E-03 ;          1,46E-03 ; 1,53E-03 ; 1,53E-03 ; 1,53E-03 ;          1,53E-03 ; 1,65E-03 ; 1,65E-03 ; 1,69E-03 ;          1,69E-03 ; 1,77E-03 ; 1,88E-03 ; 1,90E-03 ;          2,26E-03 ; 2,31E-03 ; 2,53E-03 ; 2,91E-03 ;          3,06E-03 ; 3,06E-03 ; 3,21E-03 ; 3,73E-03 ;          3,75E-03 ; 3,75E-03 ; 4,00E-03 ; 4,02E-03 ;          4,07E-03 ; 4,47E-03 ; 4,61E-03 ; 5,14E-03 ;          5,20E-03 ; 5,20E-03 ; 5,20E-03 ; 5,20E-03 ;          5,42E-03 ; 6,19E-03 ; 7,27E-03 ; 7,97E-03 ;          8,03E-03 ; 8,62E-03 ; 8,72E-03 ; 8,72E-03 ;          8,72E-03 ; 8,72E-03 ; 8,72E-03 ; 9,66E-03 ;          9,88E-03 ; 9,88E-03 ; 9,88E-03</p>
<p><b>UP in 24 hpf embryos and 96 hpf larvae at 0.4 mGy/h</b></p>		
GO.ID	Term	classicFisher
<p>GO:0002432 ; GO:0002544 ; GO:0002631 ;          GO:0002633 ; GO:0002676 ; GO:0002678 ;          GO:0019442 ; GO:0030574 ; GO:0044243 ;          GO:0050900 ; GO:0009649 ; GO:0019441 ;          GO:0033292 ; GO:0050729 ; GO:0002949 ;          GO:0032963 ; GO:0044236 ; GO:0044259 ;          GO:0070189 ; GO:0006450 ; GO:0042537 ;          GO:0009416 ; GO:0006569 ; GO:0042436 ;          GO:0042542 ; GO:0046218 ; GO:0070525</p>	<p>granuloma formation ; chronic inflammatory response ; regulation of granuloma formation ; positive regulation of granuloma formation ; regulation of chronic inflammatory response ; positive regulation of chronic inflammatory response ; tryptophan catabolic process to acetyl-CoA ; collagen catabolic process ; multicellular organismal catabolic process ; leukocyte migration ; entrainment of circadian clock ; tryptophan catabolic process to kynurenine ; T-tubule organization ; positive regulation of inflammatory response ; tRNA threonylcarbamoyladenosine modification ; collagen metabolic process          multicellular organismal metabolic process ; multicellular organismal macromolecule metabolic process ; kynurenine metabolic process ; regulation of translational fidelity ; benzene-containing compound ; metabolic process ; response to light stimulus ; tryptophan catabolic process ; indole-containing compound catabolic process ; response to hydrogen peroxide ; indolalkylamine catabolic process ; tRNA threonylcarbamoyladenosine metabolic process</p>	<p>1,50E-03 ; 1,50E-03 ; 1,50E-03 ; 1,50E-03 ;          1,50E-03 ; 1,50E-03 ; 3,10E-03 ; 3,10E-03 ;          3,10E-03 ; 4,40E-03 ; 4,60E-03 ; 4,60E-03 ;          4,60E-03 ; 4,60E-03 ; 6,10E-03 ; 6,10E-03 ;          6,10E-03 ; 6,10E-03 ; 6,10E-03 ; 7,70E-03 ;          7,70E-03 ; 8,00E-03 ; 9,20E-03 ; 9,20E-03 ;          9,20E-03 ; 9,20E-03 ; 9,20E-03</p>
<p><b>Down in 24 hpf embryos at 4 mGy/h</b></p>		
GO.ID	Term	classicFisher
<p>GO:0006936 ; GO:0003012 ; GO:0006937 ;          GO:0090257 ; GO:0045214 ; GO:0006941 ;          GO:0030239 ; GO:0031032 ; GO:0060048 ;          GO:0006942 ; GO:0055114 ; GO:0055002 ;          GO:0055001 ; GO:0048936 ; GO:0051146 ;</p>	<p>muscle contraction ; muscle system process ; regulation of muscle contraction ; regulation of muscle system process ; sarcomere organization ; striated muscle contraction ; myofibril assembly ; actomyosin structure organization ; cardiac muscle contraction ; regulation of striated muscle contraction ; oxidation-reduction process ; striated muscle cell development ; muscle cell development ; peripheral nervous system neuron axonogenesis ; striated muscle cell differentiation ; ion transport ; regulation of system process ; hypochlorous acid metabolic process ; hypochlorous acid</p>	<p>1,60E-05 ; 2,10E-05 ; 2,40E-05 ; 3,30E-05 ;          6,70E-05 ; 9,80E-05 ; 1,00E-04 ; 2,40E-04 ;          5,00E-04 ; 1,38E-03 ; 2,01E-03 ; 2,41E-03 ;          3,42E-03 ; 5,02E-03 ; 5,84E-03 ; 6,99E-03 ;          7,05E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ;</p>

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

GO:0006811 ; GO:0044057 ; GO:0002148 ; GO:0002149 ; GO:0010310 ; GO:0010880 ; GO:0010881 ; GO:0014808 ; GO:0055064 ; GO:0070296 ; GO:1903514 ; GO:0003009 ; GO:0042692 ; GO:0061061	biosynthetic process ; regulation of hydrogen peroxide metabolic process ; regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum ; regulation of cardiac muscle contraction by regulation of the release of sequestered calcium ion ; release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum ; chloride ion homeostasis ; sarcoplasmic reticulum calcium ion transport ; calcium ion transport from endoplasmic reticulum ; skeletal muscle contraction ; muscle cell differentiation ; muscle structure development	7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 7,16E-03 ; 8,87E-03 ; 9,48E-03 ; 9,85E-03
<b>Up in 24 hpf embryos at 4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0006334 ; GO:0031497 ; GO:0006333 ; GO:0034728 ; GO:0006323 ; GO:0065004 ; GO:0071103 ; GO:0071824 ; GO:0034622 ; GO:0006325 ; GO:0006461 ; GO:0070271 ; GO:0009649 ; GO:0071822 ; GO:0065003 ; GO:0060255 ; GO:0080090 ; GO:0051276 ; GO:0006259 ; GO:0042542 ; GO:0044030 ; GO:0019222 ; GO:0031323 ; GO:0042752 ; GO:0043933 ; GO:0040029 ; GO:0022607 ; GO:0000302 ; GO:0006355 ; GO:1903506 ; GO:2001141 ; GO:2000112 ; GO:0090304 ; GO:0010556 ; GO:0003002 ; GO:0016055 ; GO:0044085 ; GO:0051252 ; GO:0031326 ; GO:0009889 ; GO:0010468 ; GO:0001759 ; GO:0002568 ; GO:0002681 ; GO:0009299 ; GO:0033153 ; GO:0042789 ; GO:0043153 ; GO:0019438 ; GO:0051171 ; GO:0006783 ; GO:0006351 ; GO:0018130 ; GO:0097659 ; GO:0019219 ; GO:0032774	nucleosome assembly ; chromatin assembly ; chromatin assembly or disassembly ; nucleosome organization ; DNA packaging ; protein-DNA complex assembly ; DNA conformation change ; protein-DNA complex subunit organization ; cellular macromolecular complex assembly ; chromatin organization ; protein complex assembly ; protein complex biogenesis ; entrainment of circadian clock ; protein complex subunit organization ; macromolecular complex assembly ; regulation of macromolecule metabolic process ; regulation of primary metabolic process ; chromosome organization ; DNA metabolic process ; response to hydrogen peroxide ; regulation of DNA methylation ; regulation of metabolic process ; regulation of cellular metabolic process ; regulation of circadian rhythm ; macromolecular complex subunit organization ; regulation of gene expression, epigenetic ; cellular component assembly ; response to reactive oxygen species ; regulation of transcription, DNA-templated ; regulation of nucleic acid-templated transcription ; regulation of RNA biosynthetic process ; regulation of cellular macromolecule biosynthetic process ; nucleic acid metabolic process ; regulation of macromolecule biosynthetic process ; regionalization ; Wnt signaling pathway ; cellular component biogenesis ; regulation of RNA metabolic process ; regulation of cellular biosynthetic process ; regulation of biosynthetic process ; regulation of gene expression ; organ induction ; somatic diversification of T cell receptor genes ; somatic recombination of T cell receptor gene segments mRNA transcription ; T cell receptor V(D)J recombination ; mRNA transcription from RNA polymerase II entrainment of circadian clock by photoperiod ; aromatic compound biosynthetic process ; regulation of nitrogen compound metabolic process ; heme biosynthetic process ; transcription, DNA-templated ; heterocycle biosynthetic process ; nucleic acid-templated transcription ; regulation of nucleobase-containing compound metabolic process ; RNA biosynthetic process	1,10E-09 ; 1,80E-09 ; 2,60E-09 ; 3,70E-09 ; 7,10E-09 ; 1,80E-08 ; 1,90E-08 ; 4,30E-08 ; 1,00E-05 ; 3,70E-05 ; 6,60E-05 ; 6,60E-05 ; 2,20E-04 ; 2,40E-04 ; 2,70E-04 ; 3,10E-04 ; 3,10E-04 ; 4,80E-04 ; 8,20E-04 ; 1,08E-03 ; 1,08E-03 ; 1,45E-03 ; 1,84E-03 ; 3,18E-03 ; 3,23E-03 ; 3,46E-03 ; 3,78E-03 ; 3,86E-03 ; 5,01E-03 ; 5,05E-03 ; 5,13E-03 ; 5,31E-03 ; 5,31E-03 ; 5,75E-03 ; 6,00E-03 ; 6,10E-03 ; 6,13E-03 ; 6,45E-03 ; 7,68E-03 ; 8,06E-03 ; 8,28E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,63E-03 ; 8,83E-03 ; 8,92E-03 ; 9,23E-03 ; 9,31E-03 ; 9,36E-03 ; 9,37E-03 ; 9,70E-03 ; 9,83E-03
<b>Down in 96 hpf larvae at 4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0006508 ; GO:0009410 ; GO:0055114 ; GO:0019369 ; GO:0001676 ; GO:0008152 ; GO:0006805 ; GO:0006690 ; GO:1901568 ; GO:0033559 ; GO:1901615 ; GO:0006584 ; GO:0009712 ; GO:0071466 ; GO:0006629 ; GO:0044255 ; GO:0006631 ; GO:0018958 ; GO:0006147 ; GO:0008306 ; GO:0008542 ; GO:0021855 ; GO:0061373 ; GO:0061374 ; GO:0061379 ; GO:0061381 ; GO:0019538	Proteolysis ; response to xenobiotic stimulus ; oxidation-reduction process ; arachidonic acid metabolic process ; long-chain fatty acid metabolic process ; metabolic process ; xenobiotic metabolic process ; icosanoid metabolic process ; fatty acid derivative metabolic process ; unsaturated fatty acid metabolic process ; organic hydroxy compound metabolic process ; catecholamine metabolic process ; catechol-containing compound metabolic process ; cellular response to xenobiotic stimulus ; lipid metabolic process ; cellular lipid metabolic process ; fatty acid metabolic process ; phenol-containing compound metabolic process ; guanine catabolic process ; associative learning ; visual learning ; hypothalamus cell migration ; mammillary axonal complex development ; mammillothalamic axonal tract development ; inferior colliculus development ; cell migration in diencephalon ; protein metabolic process	2,00E-12 ; 2,40E-04 ; 2,90E-04 ; 4,50E-04 ; 6,60E-04 ; 7,10E-04 ; 8,90E-04 ; 1,22E-03 ; 1,22E-03 ; 1,33E-03 ; 1,44E-03 ; 1,52E-03 ; 1,52E-03 ; 1,72E-03 ; 3,04E-03 ; 4,14E-03 ; 6,12E-03 ; 6,20E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 6,62E-03 ; 9,47E-03
<b>Up in 96 hpf larvae at 4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
GO:0006633 ; GO:0072330 ; GO:0016053 ; GO:0046394 ; GO:0042542 ; GO:0006631 ; GO:0044283 ; GO:0009314 ; GO:0071407 ; GO:0009628 ; GO:0033993 ; GO:0043401 ;	fatty acid biosynthetic process ; monocarboxylic acid biosynthetic process ; organic acid biosynthetic process ; carboxylic acid biosynthetic process ; response to hydrogen peroxide ; fatty acid metabolic process ; small molecule biosynthetic process ; response to radiation ; cellular response to organic cyclic compound ; response to abiotic stimulus ; response to lipid ; steroid hormone mediated signaling pathway ; lipid biosynthetic process ; response to	1,70E-07 ; 9,50E-07 ; 1,20E-05 ; 1,20E-05 ; 2,40E-05 ; 2,60E-05 ; 2,90E-05 ; 4,50E-05 ; 5,70E-05 ; 5,90E-05 ; 9,00E-05 ; 1,30E-04 ; 1,40E-04 ; 1,70E-04 ; 1,80E-04 ; 1,90E-04 ;

## Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

<p>GO:0008610 ; GO:0014070 ; GO:0071396 ;            GO:0006334 ; GO:0000302 ; GO:0009725 ;            GO:0006979 ; GO:0009755 ; GO:0031497 ;            GO:0002028 ; GO:0006333 ; GO:0007584 ;            GO:0009649 ; GO:0019371 ; GO:0033273 ;            GO:0034728 ; GO:0009416 ; GO:0032787 ;            GO:0006323 ; GO:0032870 ; GO:0071383 ;            GO:0007623 ; GO:0065004 ; GO:0071103 ;            GO:0048545 ; GO:0010765 ; GO:0071824 ;            GO:0006694 ; GO:0001516 ; GO:0006692 ;            GO:0006693 ; GO:0046457 ; GO:0048511 ;            GO:0042127 ; GO:0030199 ; GO:0032411 ;            GO:0019752 ; GO:0006954 ; GO:0006775 ;            GO:0050896 ; GO:0032922 ; GO:0043270 ;            GO:0006950 ; GO:0043436 ; GO:0006082 ;            GO:0008283 ; GO:0042752 ; GO:0070493 ;            GO:0006629 ; GO:0009648 ; GO:0018105 ;            GO:1901576 ; GO:0018149 ; GO:0046456 ;            GO:1901570 ; GO:0010959 ; GO:0018209 ;            GO:0006636 ; GO:0008202 ; GO:0044255</p>	<p>organic cyclic compound ; cellular response to lipid ; nucleosome assembly ; response to reactive oxygen species ; response to hormone ; response to oxidative stress ; hormone-mediated signaling pathway ; chromatin assembly ; regulation of sodium ion transport ; chromatin assembly or disassembly ; response to nutrient ; entrainment of circadian clock ; cyclooxygenase pathway ; response to vitamin ; nucleosome organization ; response to light stimulus ; monocarboxylic acid metabolic process ; DNA packaging ; cellular response to hormone stimulus ; cellular response to steroid hormone stimulus ; circadian rhythm ; protein-DNA complex assembly ; DNA conformation change ; response to steroid hormone ; positive regulation of sodium ion transport ; protein-DNA complex subunit organization ; steroid biosynthetic process ; prostaglandin biosynthetic process ; prostanoid metabolic process ; prostaglandin metabolic process ; prostanoid biosynthetic process ; rhythmic process ; regulation of cell proliferation ; collagen fibril organization ; positive regulation of transporter activity ; carboxylic acid metabolic process ; inflammatory response ; fat-soluble vitamin metabolic process ; response to stimulus ; circadian regulation of gene expression ; positive regulation of ion transport ; response to stress ; oxoacid metabolic process ; organic acid metabolic process ; cell proliferation ; regulation of circadian rhythm ; thrombin receptor signaling pathway ; lipid metabolic process ; photoperiodism ; peptidyl-serine phosphorylation ; organic substance biosynthetic process ; peptide cross-linking ; icosanoid biosynthetic process ; fatty acid derivative biosynthetic process ; regulation of metal ion transport ; peptidyl-serine modification ; unsaturated fatty acid biosynthetic process ; steroid metabolic process ; cellular lipid metabolic process</p>	<p>1,90E-04 ; 2,30E-04 ; 2,40E-04 ; 2,50E-04 ;            2,50E-04 ; 2,60E-04 ; 3,00E-04 ; 3,50E-04 ;            3,50E-04 ; 3,50E-04 ; 3,50E-04 ; 3,60E-04 ;            3,80E-04 ; 4,40E-04 ; 5,20E-04 ; 6,40E-04 ;            7,20E-04 ; 7,40E-04 ; 8,40E-04 ; 8,90E-04 ;            1,14E-03 ; 1,14E-03 ; 1,37E-03 ; 1,65E-03 ;            1,70E-03 ; 1,70E-03 ; 1,70E-03 ; 1,70E-03 ;            1,78E-03 ; 2,26E-03 ; 2,37E-03 ; 2,37E-03 ;            2,45E-03 ; 2,60E-03 ; 3,13E-03 ; 3,71E-03 ;            4,00E-03 ; 4,00E-03 ; 4,17E-03 ; 4,45E-03 ;            4,68E-03 ; 4,90E-03 ; 4,96E-03 ; 4,96E-03 ;            5,95E-03 ; 6,02E-03 ; 6,65E-03 ; 7,11E-03 ;            7,17E-03 ; 7,17E-03 ; 7,17E-03 ; 7,41E-03 ;            8,10E-03 ; 8,42E-03 ; 9,32E-03 ; 9,60E-03</p>
<b>Up in 24 hpf embryos and 96 hpf larvae at 4 mGy/h</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
<p>GO:0009649 ; GO:0009314 ; GO:0042542 ;            GO:0042752 ; GO:0000302 ; GO:0009416 ;            GO:0009628 ; GO:0007623 ; GO:0043153            GO:0048511 ; GO:0009605 ; GO:0006979 ;            GO:0010035 ; GO:1901700 ; GO:0042753 ;            GO:0045892 ; GO:1902679 ; GO:1903507 ;            GO:0051253 ; GO:0009445 ; GO:0009446 ;            GO:0033387 ; GO:0045475 ; GO:0045934 ;            GO:2000113 ; GO:0010558 ; GO:0031327 ;            GO:0009890 ; GO:0051172 ; GO:0006591 ;            GO:0051591 ; GO:0010629 ; GO:0007622 ;            GO:0044030 ; GO:0048512 ; GO:0060255 ;            GO:0080090 ; GO:0031323 ; GO:0048246</p>	<p>entrainment of circadian clock ; response to radiation ; response to hydrogen peroxide ; regulation of circadian rhythm ; response to reactive oxygen species ; response to light stimulus ; response to abiotic stimulus ; circadian rhythm ; entrainment of circadian clock by photoperiod ; rhythmic process ; response to external stimulus ; response to oxidative stress ; response to inorganic substance ; response to oxygen-containing compound ; positive regulation of circadian rhythm ; negative regulation of transcription, Dna-templated ; negative regulation of RNA biosynthetic process ; negative regulation of nucleic acid-templated transcription ; negative regulation of RNA metabolic process ; putrescine metabolic process ; putrescine biosynthetic process ; putrescine biosynthetic process from ornithine ; locomotor rhythm ; negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process ; egative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process ; negative regulation of macromolecule biosynthetic process ; negative regulation of cellular biosynthetic process ; negative regulation of biosynthetic process ; negative regulation of nitrogen compound metabolic process ; ornithine metabolic process ; response to cAMP ; negative regulation of gene expression ; rhythmic behavior ; regulation of DNA methylation ; circadian behavior ; regulation of macromolecule metabolic process ; regulation of primary metabolic process ; regulation of cellular metabolic process ; macrophage chemotaxis</p>	<p>5,60E-06 ; 2,10E-05 ; 2,80E-05 ; 8,40E-05 ;            1,00E-04 ; 2,40E-04 ; 3,10E-04 ; 1,28E-03 ;            1,40E-03 ; 2,04E-03 ; 2,05E-03 ; 2,39E-03 ;            2,48E-03 ; 2,55E-03 ; 2,81E-03 ; 3,31E-03 ;            3,35E-03 ; 3,35E-03 ; 3,62E-03 ; 4,21E-03 ;            4,21E-03 ; 4,21E-03 ; 4,21E-03 ; 4,76E-03 ;            4,97E-03 ; 5,03E-03 ; 5,78E-03 ; 5,85E-03 ;            6,47E-03 ; 7,01E-03 ; 7,01E-03 ; 7,07E-03 ;            8,40E-03 ; 8,40E-03 ; 8,40E-03 ; 8,78E-03 ;            8,85E-03 ; 9,78E-03 ; 9,79E-03</p>
<b>Up at 0.4 mGy/h and down at 4 mGy/h in 24 hpf embryos</b>		
<b>GO.ID</b>	<b>Term</b>	<b>classicFisher</b>
<p>GO:0030239 ; GO:0045214 ; GO:0006936 ;            GO:0031032 ; GO:0003012 ; GO:0006937 ;            GO:0090257 ; GO:0055002 ; GO:0055001 ;            GO:0006941 ; GO:0051146 ; GO:0006811 ;            GO:0042692 ; GO:0010927 ; GO:0030036 ;            GO:0030029 ; GO:0003009 ; GO:0060048 ;</p>	<p>myofibril assembly ; sarcomere organization ; muscle contraction ; actomyosin structure organization ; muscle system process ; regulation of muscle contraction ; regulation of muscle system process ; striated muscle cell development ; muscle cell development ; striated muscle contraction ; striated muscle cell differentiation ; ion transport ; muscle cell differentiation ; cellular component assembly involved in morphogenesis ; actin cytoskeleton organization ; actin filament-based process ; skeletal muscle contraction ; cardiac muscle contraction ; multicellular organismal movement ; musculoskeletal movement ; hypochlorous acid metabolic process ; hypochlorous acid biosynthetic process ;</p>	<p>7,70E-06 ; 8,30E-06 ; 1,60E-05 ; 1,90E-05 ;            2,00E-05 ; 1,40E-04 ; 1,70E-04 ; 2,20E-04 ;            3,20E-04 ; 3,90E-04 ; 5,60E-04 ; 7,00E-04 ;            9,60E-04 ; 1,08E-03 ; 1,48E-03 ; 1,59E-03 ;            3,16E-03 ; 3,82E-03 ; 4,18E-03 ; 4,18E-03 ;            4,21E-03 ; 4,21E-03 ; 2,1E-03 ; 4,21E-03 ;</p>

## Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

<p>GO:0050879 ; GO:0050881 ; GO:0002148 ;                  GO:0002149 ; GO:0010310 ; GO:0055064 ;                  GO:0061061 ; GO:0006810 ; GO:0044765 ;                  GO:0051234 ; GO:1902578 ; GO:0033552</p>	<p>regulation of hydrogen peroxide metabolic process ; chloride ion homeostasis ; muscle structure development ; transport ; single-organism transport ; establishment of localization ; single-organism localization ; response to vitamin B3</p>	<p>4,29E-03 ; 4,44E-03 ; 5,17E-03 ; 5,46E-03 ; 7,43E-03 ; 8,41E-03</p>
<b>Up at 0.4 and 4 mGy/h in 96 hpf larvae</b>		
GO.ID	Term	classicFisher
<p>GO:0042542 ; GO:0000302 ; GO:0002028 ;                  GO:0009649 ; GO:0006979 ; GO:0006633 ;                  GO:0010765 ; GO:0009628 ; GO:0009314 ;                  GO:0032411 ; GO:0072330 ; GO:0006954 ;                  GO:0043270 ; GO:0010959 ; GO:0006814 ;                  GO:0007623 ; GO:0042127 ; GO:0042752 ;                  GO:0009416 ; GO:0009648 ; GO:0048511 ;                  GO:0006883 ; GO:0010035 ; GO:0006631 ;                  GO:0006950 ; GO:0055067 ; GO:1901700 ;                  GO:0002432 ; GO:0002544 ; GO:0002631 ;                  GO:0002633 ; GO:0002676 ; GO:0002678 ;                  GO:0043153 ; GO:0050900 ; GO:0016053 ;                  GO:0046394 ; GO:0008283 ; GO:0055078 ;                  GO:0018105 ; GO:0006952 ; GO:0018209</p>	<p>response to hydrogen peroxide ; response to reactive oxygen species ; regulation of sodium ion transport ; entrainment of circadian clock ; response to oxidative stress ; fatty acid biosynthetic process ; positive regulation of sodium ion transport ; response to abiotic stimulus ; response to radiation ; positive regulation of transporter activity ; monocarboxylic acid biosynthetic process ; inflammatory response ; positive regulation of ion transport ; regulation of metal ion transport ; sodium ion transport ; circadian rhythm ; regulation of cell proliferation ; regulation of circadian rhythm ; response to light stimulus ; photoperiodism ; rhythmic process ; cellular sodium ion homeostasis ; response to inorganic substance ; fatty acid metabolic process ; response to stress ; monovalent inorganic cation homeostasis ; response to oxygen-containing compound ; granuloma formation ; chronic inflammatory response ; regulation of granuloma formation ; positive regulation of granuloma formation ; regulation of chronic inflammatory response ; positive regulation of chronic inflammatory response ; entrainment of circadian clock by photoperiod ; leukocyte migration ; organic acid biosynthetic process ; carboxylic acid biosynthetic process ; cell proliferation ; sodium ion homeostasis ; peptidyl-serine phosphorylation ; defense response ; peptidyl-serine modification</p>	<p>3,50E-06 ; 2,80E-05 ; 3,80E-05 ; 9,60E-05 ; 2,10E-04 ; 3,10E-04 ; 3,20E-04 ; 4,20E-04 ; 5,80E-04 ; 6,60E-04 ; 7,10E-04 ; 7,80E-04 ; 1,12E-03 ; 1,20E-03 ; 1,27E-03 ; 1,30E-03 ; 1,34E-03 ; 1,40E-03 ; 1,58E-03 ; 1,70E-03 ; 2,55E-03 ; 3,20E-03 ; 3,39E-03 ; 3,56E-03 ; 3,71E-03 ; 4,37E-03 ; 5,40E-03 ; 5,69E-03 ; 5,69E-03 ; 5,69E-03 ; 5,69E-03 ; 5,69E-03 ; 5,69E-03 ; 6,01E-03 ; 6,43E-03 ; 6,43E-03 ; 6,67E-03 ; 6,86E-03 ; 7,10E-03 ; 7,81E-03 ; 8,29E-03</p>
<b>Up at 0.4 mGy/h and down at 4 mGy/h in 96 hpf larvae</b>		
GO.ID	Term	classicFisher
<p>GO:0006805 ; GO:0006584 ; GO:0009712 ;                  GO:0006508 ; GO:0018958 ; GO:0006629 ;                  GO:0019369 ; GO:0001676 ; GO:1901565 ;                  GO:0006690 ; GO:1901568 ; GO:1901615 ;                  GO:0033559 ; GO:0006147 ; GO:1901575 ;                  GO:0071466 ; GO:0009308 ; GO:0009410 ;                  GO:0009056 ; GO:0044255 ; GO:0006145 ;                  GO:0006857 ; GO:0046098 ; GO:0055114 ;                  GO:0008152</p>	<p>xenobiotic metabolic process ; catecholamine metabolic process ; catechol-containing compound metabolic process ; proteolysis ; phenol-containing compound metabolic process ; lipid metabolic process ; arachidonic acid metabolic process ; long-chain fatty acid metabolic process ; organonitrogen compound catabolic process ; icosanoid metabolic process ; fatty acid derivative metabolic process ; organic hydroxy compound metabolic process ; unsaturated fatty acid metabolic process ; guanine catabolic process ; organic substance catabolic process ; cellular response to xenobiotic stimulus ; amine metabolic process ; response to xenobiotic stimulus ; catabolic process ; cellular lipid metabolic process ; purine nucleobase catabolic process ; oligopeptide transport ; guanine metabolic process ; oxidation-reduction process ; metabolic process</p>	<p>8,10E-05 ; 1,40E-04 ; 1,40E-04 ; 1,60E-04 ; 5,80E-04 ; 6,10E-04 ; 9,60E-04 ; 1,23E-03 ; 1,75E-03 ; 1,86E-03 ; 1,86E-03 ; 1,97E-03 ; 1,98E-03 ; 2,01E-03 ; 2,08E-03 ; 2,35E-03 ; 2,62E-03 ; 3,82E-03 ; 4,08E-03 ; 7,12E-03 ; 8,00E-03 ; 8,00E-03 ; 8,00E-03 ; 8,19E-03 ; 8,78E-03</p>



Table S4: Shared up-regulated genes between 24 hpf embryos and 96 hpf larvae at 0.4 and 4 mGy.h-1.

0.4 mGy/h - shared up-regulated genes between 24 hpf embryos and 96 hpf larvae						
Ensembl.Gene.ID	log2FoldChange - 24hpf	padj - 24hpf	log2FoldChange - 96hpf	padj - 96hpf	ZFIN.symbol	WikiGene.Description
ENSDARG00000004748	1,24842349	4,20E-13	1,414941755	6,25E-17	zgc:100868	zgc:100868
ENSDARG00000007344	1,894993558	2,14E-07	1,819142255	5,86E-07	tcap	titin-cap (telethonin)
ENSDARG00000007769	3,339957261	1,81E-09	1,4771631	0,005334393	sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1
ENSDARG00000009123	1,205088548	2,69E-08	1,27050229	6,54E-09	sele	selectin E
ENSDARG00000012388	1,233802312	0,000158029	1,006724165	1,38E-08	cox4i1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1, like
ENSDARG00000012395	1,928380218	4,13E-10	3,028310516	6,74E-29	mmp13a	matrix metalloproteinase 13a
ENSDARG00000012789	1,125102366	0,001653942	3,562731235	3,51E-36	plek2	pleckstrin 2
ENSDARG00000013926	1,643297778	2,76E-07	1,568458155	6,32E-08	slc16a9a	solute carrier family 16, member 9a
ENSDARG00000022615	2,046029588	4,04E-10	1,759435783	7,21E-08	si:ch211-241e1.3	laminin subunit alpha-3
ENSDARG00000023176	2,312568488	2,12E-05	1,996831455	6,40E-10	tdo2b	tryptophan 2,3-dioxygenase b
ENSDARG00000023217	1,221936461	3,22E-13	1,371147919	1,59E-17	crema	cAMP responsive element modulator a
ENSDARG00000031588	2,998722468	0,000332639	2,482716337	0,003429929	si:dkey-239b22.1	si:dkey-239b22.1
ENSDARG00000038025	1,582726348	8,14E-10	1,779968259	2,32E-15	cbx7a	chromobox homolog 7a
ENSDARG00000042816	1,262688588	0,000581984	2,509345525	1,56E-14	mmp9	matrix metalloproteinase 9
ENSDARG00000042908	1,536998618	2,41E-10	1,017496064	1,20E-06	hsh2d	hematopoietic SH2 domain containing
ENSDARG00000045768	1,154114447	7,34E-15	1,376521075	3,89E-22	cry1aa	cryptochrome circadian clock 1aa
ENSDARG00000045808	1,060977595	0,001170614	1,203724089	7,14E-07	rlbp1b	retinaldehyde binding protein 1b
ENSDARG00000055854	1,488686131	0,006156394	1,788593467	0,00054721	nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
ENSDARG00000058206	1,284044214	3,70E-05	1,541608237	2,70E-07	si:ch211-153b23.5	si:ch211-153b23.5
ENSDARG00000058557	2,062794286	0,000902833	2,36778201	2,48E-05	il11b	
ENSDARG00000061242	1,144767946	2,60E-10	1,133940345	1,19E-10	tuft1a	tuftelin 1a
ENSDARG00000062788	2,523230717	3,68E-11	2,648888904	2,21E-12	irg1l	immunoresponsive gene 1, like
ENSDARG00000062830	1,464227892	0,003853398	1,66759075	1,10E-12	fam46d	
ENSDARG00000075229	1,921630818	1,22E-11	1,132943464	3,59E-05		thymic stromal cotransporter homolog
ENSDARG00000075397	1,063761608	2,05E-11	1,482796564	7,25E-28	cipca	CLOCK-interacting pacemaker a
ENSDARG00000076839	1,148357627	1,21E-07	1,69105956	6,31E-15	ftr86	finTRIM family, member 86
ENSDARG00000077169	1,735064276	9,95E-11	2,751726823	5,73E-27	si:ch211-153b23.4	si:ch211-153b23.4
ENSDARG00000078567	1,310445575	8,12E-20	2,22492633	5,92E-57	lonrf1l	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1, like
ENSDARG00000079227	4,03880951	2,59E-05	2,756379473	0,00447889	plekhs1	pleckstrin homology domain containing, family S member 1
ENSDARG00000087623	1,410440421	0,005801323	1,411136968	0,001368616	si:dkey-119g10.5	
ENSDARG00000088432	4,237514003	2,00E-15	2,376334165	1,35E-06	si:dkey-162h11.3	

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

ENSDARG00000090873	1,245481003	0,000459288	1,02650203	0,006951541	ccl34a.4	
ENSDARG00000091085	1,508372516	0,002506694	2,829347019	3,91E-07	lepa	leptin a
ENSDARG00000091715	3,673459754	1,11E-24	1,841256148	5,40E-07	si:dkey-162h11.2	
ENSDARG00000092704	2,217302891	0,000340894	1,854471683	0,002265686		uncharacterized LOC568241
ENSDARG00000093042	1,704568191	0,003626182	1,869755407	0,000631452	si:dkey-104n9.1	
ENSDARG00000093101	3,326637291	0,001924329	2,456785021	0,009894026		
ENSDARG00000094460	1,129333885	3,16E-17	1,025108769	2,55E-24	si:dkey-100j22.4	
ENSDARG00000094570	2,356128284	0,004763018	2,705495065	0,000307163	si:ch211-226h7.2	
ENSDARG00000095820	2,42953678	0,008499587	2,507729084	0,00059477	si:dkey-6n3.3	
ENSDARG00000100280	1,019743616	0,001686474	1,518287972	2,48E-07	znfx1	
ENSDARG00000104284	1,306661488	1,62E-09	1,11555911	8,79E-07		GTPase IMAP family member 4-like
ENSDARG00000104687	1,067481172	3,21E-15	1,049817744	6,92E-15	slc16a9b	solute carrier family 16, member 9b
ENSDARG00000104919	2,361382708	9,38E-05	3,44620858	1,06E-09	si:ch211-153b23.3	si:ch211-153b23.3
<b>4 mGy/h - shared up-regulated genes between 24 hpf embryos and 96 hpf larvae</b>						
Ensembl.Gene.ID	log2FoldChange - 24hpf	padj - 24hpf	log2FoldChange - 96hpf	padj - 96hpf	ZFIN.symbol	WikiGene.Description
ENSDARG00000007377	1,045908535	2,12E-13	1,858826745	1,07E-52	odc1	ornithine decarboxylase 1
ENSDARG00000012395	1,150495903	0,001327973	2,602834788	2,67E-21	mmp13a	matrix metalloproteinase 13a
ENSDARG00000012789	1,533163636	0,000145865	3,644045546	2,17E-37	plek2	pleckstrin 2
ENSDARG00000015355	2,341335175	2,75E-05	4,134517046	3,32E-19	fosl1a	FOS-like antigen 1a
ENSDARG00000017653	1,510613036	0,00353757	1,300829202	5,39E-07	rgs13	regulator of G-protein signaling 13
ENSDARG00000019498	1,111857351	3,78E-06	1,717505971	1,67E-17	cry5	cryptochrome circadian clock 5
ENSDARG00000026759	1,221408393	1,34E-09	1,277936317	1,43E-12	ldlrb	
ENSDARG00000034503	1,623834185	3,74E-13	2,912167651	4,59E-55	per2	period circadian clock 2
ENSDARG00000035422	1,198897909	3,57E-07	1,31060268	6,41E-10	cyr61l1	cysteine-rich, angiogenic inducer 61 like 1
ENSDARG00000037859	1,532835689	0,002694975	2,870152026	2,78E-14	il11a	uncharacterized LOC570404
ENSDARG00000042725	1,696555765	5,78E-17	1,613915777	6,95E-20	cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
ENSDARG00000045768	1,278990524	8,10E-14	1,56057271	3,60E-28	cry1aa	cryptochrome circadian clock 1aa
ENSDARG00000060246	1,11168481	0,000165923	1,637245838	1,76E-11	slc16a6b	solute carrier family 16, member 6b
ENSDARG00000060926	1,550385283	3,00E-12	1,429851324	5,61E-18	rnf19b	ring finger protein 19B
ENSDARG00000062315	1,013144933	2,03E-12	1,910373391	2,05E-63	sik2b	salt-inducible kinase 2b
ENSDARG00000074378	1,483687275	0,000433345	1,108981459	0,005876975	junba	jun B proto-oncogene a
ENSDARG00000078567	1,220839576	6,82E-13	2,155744503	4,46E-51	lonrf1l	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1, like
ENSDARG00000089156	1,80091665	5,40E-05	1,827674078	1,95E-06	egr3	early growth response 3
ENSDARG00000091131	1,369251015	4,61E-14	1,536075262	8,77E-24	cry1bb	cryptochrome circadian clock 1bb
ENSDARG00000091234	1,939510143	0,004225774	1,940986785	0,001574943		E3 ubiquitin-protein ligase RNF182-like

ENSDARG00000094154	2,183771818	1,96E-14	1,219686033	0,000642687	hist2h3c	histone cluster 2, H3c
ENSDARG00000098970	2,04065238	0,001447413	2,226131189	0,002400608	si:dkey-23a13.10	
ENSDARG00000099002	1,06822821	0,003706044	2,12247091	9,52E-13	creb5a	cyclic AMP-responsive element-binding protein 5-like
ENSDARG00000100185	1,113380918	4,53E-09	2,200502303	7,03E-44	elovl7b	ELOVL fatty acid elongase 7b
ENSDARG00000102916	1,327898657	4,35E-06	2,102997687	1,75E-15		midnolin-B-like
ENSDARG00000103277	1,816101716	7,92E-05	1,614178786	0,000111402	cyp24a1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
ENSDARG00000103980	1,567367306	3,74E-17	1,750175426	6,30E-28	ets2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
ENSDARG00000104501	2,213303524	4,98E-09	1,111435994	0,004849167		histone H2B 1/2
ENSDARG00000104588	2,005210874	0,00149579	2,247188936	0,000465672	si:ch73-368j24.8	histone H2B 1/2-like
ENSDARG00000104687	1,110656268	5,74E-13	1,223775164	3,84E-20	slc16a9b	solute carrier family 16, member 9b
ENSDARG00000105393	2,558735728	0,000225973	2,293569783	0,000808121	si:ch1073-159d7.6	zgc:112234
ENSDARG00000105507	2,252436804	5,19E-05	1,465750749	0,005014061	si:ch1073-159d7.13	wu:fe11b02

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

**Table S5:** Genes involved in eye opacity differentially expressed in 24 hpf embryos at 0.4 and 4 mGy.h-1.

Stage	Ensembl.Gene.ID	ZFIN.symbol	Wiki.Gene.Description	0.4 mGy/h			4 mGy/h		
				log2(fold change HTO/Ctrl)	log2(fold change)SE	p-value	log2(fold change HTO/Ctrl)	log2(fold change)SE	p-value
24 hpf	ENSDARG00000030349	cryba2a	crystallin, beta A2a	1,265367921	0,110682057	2,42E-27	-1,057966778	0,125175263	1,19E-14
24 hpf	ENSDARG00000024548	cryba4	crystallin, beta A4	1,357846966	0,138956293	5,64E-20	-1,144874893	0,156253678	3,93E-11
24 hpf	ENSDARG00000041925	cryba2b	crystallin, beta A2b	1,518978829	0,122659111	3,58E-32	-1,244663773	0,138076725	1,04E-16
24 hpf	ENSDARG00000053862	crygmx	crystallin, gamma MX	1,59663331	0,168915931	9,74E-19	-1,29479601	0,193174413	2,44E-09
24 hpf	ENSDARG00000074001	crygmxl2	crystallin, gamma MX, like 2	1,897961784	0,237000736	1,59E-13	-1,504027845	0,268527757	1,03E-06
24 hpf	ENSDARG00000018797	crygmxl1	crystallin, gamma MX, like 1	2,689722581	0,555179369	3,35E-05	-2,567041503	0,670167514	0,0015649
24 hpf	ENSDARG00000057460	crygm2d13	crystallin, gamma M2d13	2,140250751	0,132080939	5,55E-55	-2,04630856	0,160992484	2,49E-33
24 hpf	ENSDARG00000069801	crygm2d12	crystallin, gamma M2d12	2,33880738	0,153800028	1,25E-48	-2,305647659	0,194489853	4,88E-29
24 hpf	ENSDARG00000073750	crygm2d9	crystallin, gamma M2d9	3,144095422	0,37879156	1,65E-14	-2,678585937	0,457217939	2,76E-07
24 hpf	ENSDARG00000073874	crygm2d6	crystallin, gamma M2d6	1,538919379	0,238815119	7,26E-09	-1,669336096	0,272143184	6,27E-08
24 hpf	ENSDARG00000076572	crygm2d7	crystallin, gamma M2d7	2,302806197	0,211999667	1,11E-24	-1,400937498	0,264262498	4,38E-06
24 hpf	ENSDARG00000076693	crygm2d19	crystallin, gamma M2d19	1,913003161	0,134370391	1,27E-42	-2,199609195	0,163454438	2,25E-37
24 hpf	ENSDARG00000086658	crygm2d21	crystallin, gamma M2d21	2,299066262	0,280013985	3,30E-14	-2,624042168	0,317991631	5,28E-14
24 hpf	ENSDARG00000086912	crygm2d18	crystallin, gamma M2d18	2,965797626	0,229769575	5,63E-35	-2,467678241	0,307502063	3,06E-13
24 hpf	ENSDARG00000087164	crygm2d4	crystallin, gamma M2d4	2,869748931	0,212022017	1,42E-38	-2,506927802	0,250222044	1,60E-20
24 hpf	ENSDARG00000087324	crygm2d1	crystallin, gamma M2d1	2,802210215	0,195326609	2,94E-43	-2,802305185	0,251776179	1,66E-25
24 hpf	ENSDARG00000087765	crygm2d10	crystallin, gamma M2d10	2,217438434	0,146919773	6,06E-48	-2,342855847	0,190662083	3,16E-31
24 hpf	ENSDARG00000088687	crygm2d17	crystallin, gamma M2d17	2,422303143	0,254458149	5,41E-19	-2,54987079	0,324814481	1,10E-12
24 hpf	ENSDARG00000088823	crygm2d3	crystallin, gamma M2d3	2,654750106	0,192584888	4,93E-40	-1,734439858	0,270088599	1,25E-08
24 hpf	ENSDARG00000091148	crygm2d20	crystallin, gamma M2d20	2,339666827	0,168738677	1,85E-40	-2,437917669	0,212600046	3,87E-27
24 hpf	ENSDARG00000013963	mipb	major intrinsic protein of lens fiber b	2,309359652	0,303451606	3,09E-12	-1,614776578	0,34047721	5,25E-05
24 hpf	ENSDARG00000015445	lim2.4	lens intrinsic membrane protein 2.4	1,452676624	0,13321288	7,35E-25	-1,179108376	0,151695653	1,92E-12
24 hpf	ENSDARG00000037402	lim2.3	lens intrinsic membrane protein 2.3	1,692167156	0,161116053	4,02E-23	-1,376043592	0,187645918	3,84E-11

**Table S6:** Moderately up- or Down-regulated gene for both stages and dose rates.

Ensembl.Gene.ID	ZFIN.symbol	Wiki.Gene.Description	0.4 mGy/h					
			24 hpf			96 hpf		
			log2 fold change HTO/Ctrl	log2 fold changeSE	p-value	log2 fold change HTO/Ctrl	log2 fold changeSE	p-value
ENSDARG00000009494	xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	0,045275661	0,046263221	0,582165264	0,018198533	0,053950262	0,863994693
ENSDARG00000018061	neil1	nei-like DNA glycosylase 1	0,275085479	0,110166008	0,066906924	0,157870737	0,115437133	0,376291283
ENSDARG00000045843	apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	-0,142208113	0,089166798	0,303244797	0,034388854	0,091162648	0,847402127
ENSDARG00000013576	gadd45bb	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta b	-0,195825407	0,218193829	0,621487028	0,463936435	0,216701202	0,120212857
ENSDARG00000039754	xpc	xeroderma pigmentosum, complementation group C	-0,061189238	0,086195286	0,7140604	0,474521783	0,094941168	1,48E-05
ENSDARG0000004325	casp9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	0,731172242	0,103084639	1,15E-10	0,284909639	0,094718474	0,017856563
ENSDARG00000055045	casp3b	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase b	0,506915278	0,144797679	0,005105847	0,395796086	0,143636844	0,033535727
ENSDARG00000058325	casp8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	0,145150635	0,169678049	0,642092814	0,320897346	0,167532306	0,176087303
ENSDARG00000062052	casp2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	0,009961365	0,085293874	0,964735072	-0,18926009	0,088109874	0,118723698
ENSDARG00000069282	bbc3	BCL2 binding component 3 (PUMA)	0,871718877	0,151165802	3,64E-07	0,200719993	0,138899893	0,343511279
ENSDARG00000087993	bada	BCL2-associated agonist of cell death a	0,495453387	0,121399152	0,000726807	0,043629413	0,095743519	0,811542528
ENSDARG0000008434	bcl2l1	bcl2-like 1	0,066840881	0,069811086	0,592993965	0,581358186	0,07017551	1,56E-14
ENSDARG00000026766	bcl2l10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	-0,054003534	0,067269779	0,667610767	0,014616375	0,067662362	0,916036094
ENSDARG00000062370	bcl2l13	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	-0,022534871	0,105639636	0,930391705	0,152554664	0,10339977	0,330707419
ENSDARG00000033367	rrm2b	ribonucleotide reductase M2 b	-0,122648721	0,063581443	0,188245426	0,009150865	0,068627527	0,951615773
ENSDARG00000010478	hsp90aa1.1	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 1	-0,77972781	0,108521853	6,27E-11	0,337075249	0,111237273	0,016838861
ENSDARG00000024746	hsp90aa1.2	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 2	-0,432707931	0,115545215	0,00231142	0,364781361	0,115210938	0,011687594
ENSDARG00000008433	unc45b	unc-45 myosin chaperone B	-0,451048814	0,113045019	0,001011133	0,174400869	0,115943832	0,318528724
Ensembl.Gene.ID	ZFIN.symbol	Wiki.Gene.Description	4 mGy/h					
			24 hpf			96 hpf		
			log2 fold change HTO/Ctrl	log2 fold changeSE	p-value	log2 fold change HTO/Ctrl	log2 fold changeSE	p-value
ENSDARG00000009494	xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	0,186876381	0,052575349	0,003825076	0,228028731	0,054865202	0,000610176

Partie D - évaluation de l'expression des gènes après exposition à l'HTO via une méthode haut débit

ENSDARG00000018061	neil1	nei-like DNA glycosylase 1	0,249949122	0,122510014	0,138157376	0,47825856	0,115784975	0,000671747
ENSDARG00000045843	apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	0,247304501	0,099735482	0,059902159	0,347845439	0,091091103	0,002003121
ENSDARG00000013576	gadd45bb	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta b	0,998378331	0,245019971	6,86E-04	0,99834515	0,217441538	0,000106377
ENSDARG00000039754	xpc	xeroderma pigmentosum, complementation group C	0,037302285	0,096700764	0,839039748	0,631371848	0,095169914	2,23E-09
ENSDARG00000004325	casp9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	0,014784827	0,120079673	0,957406153	0,296908065	0,095769488	0,017775587
ENSDARG00000055045	casp3b	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase b	-0,511508367	0,161301152	0,01157823	-0,027416886	0,144477997	0,937695558
ENSDARG00000058325	casp8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	-0,536655168	0,187481409	0,025385782	-0,21716602	0,170355002	0,470267389
ENSDARG00000062052	casp2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	-0,335637936	0,096433018	0,004758084	-0,02131377	0,088663248	0,920331193
ENSDARG00000069282	bbc3	BCL2 binding component 3 (PUMA)	0,323790373	0,165930043	0,159467602	0,123139884	0,141056	0,662332239
ENSDARG00000087993	bada	BCL2-associated agonist of cell death a	-0,04644774	0,135864214	0,860832188	0,21900938	0,097086127	0,122268457
ENSDARG00000008434	bcl2l1	bcl2-like 1	0,238527807	0,078902696	0,01705291	0,282214024	0,07088984	0,001145073
ENSDARG00000026766	bcl2l10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	-0,116266551	0,075426137	0,29525109	0,310571052	0,067817899	0,000111874
ENSDARG00000062370	bcl2l13	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	0,141543814	0,118347826	0,442382771	0,368635395	0,103615729	0,004649814
ENSDARG00000033367	rrm2b	ribonucleotide reductase M2 b	0,013145554	0,071130789	0,931056379	0,337336553	0,068456457	2,43E-05
ENSDARG00000010478	hsp90aa1.1	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 1	0,456983363	0,121223434	0,001910747	-0,293744576	0,111848281	0,057015431
ENSDARG00000024746	hsp90aa1.2	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 2	-0,058127334	0,129214979	0,806741339	-0,422196168	0,115451804	0,003419537
ENSDARG00000008433	unc45b	unc-45 myosin chaperone B	0,236804583	0,126278089	0,180752576	0,17923582	0,116331834	0,353819123

---

Partie E - comprendre les liens entre les compartiments biologiques : analyses à l'échelle de l'organe et de l'individu au regard des effets moléculaires

---





## 1. Résumé de l'article scientifique

### 1.1. Objectifs

Cet article s'intègre dans l'axe 2 de ce travail de thèse portant sur la compréhension des effets et des modes d'action toxique de l'eau tritiée. Il a pour objectif d'évaluer les effets de l'exposition à l'HTO à des échelles biologiques supérieures à la molécule, notamment l'organe et l'individu. Les analyses réalisées dans cet article découlent des effets observés sur la modulation de l'expression de gènes mis en évidence par l'analyse transcriptomique (*Cf. Partie D*). En effet, cet article a également pour but de faire le lien entre les échelles biologiques via le croisement des effets observés pour les échelles biologiques considérées dans ce travail.

### 1.2. Matériels et méthodes

Des œufs de poisson zèbre (3 hpf) issus de parents non contaminés ([Annexe 1](#)) ont été exposés à deux activités d'eau tritiée :  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL ([Annexe 3](#)). Ces activités correspondent à des débits de dose de respectivement 0,4 et 4 mGy/h. La contamination a été réalisée dans une boîte à gants. Les organismes, témoins et contaminés, ont été placés dans des incubateurs à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pour éviter la contamination du milieu témoin par le milieu tritié, les organismes témoins ont été conservés dans un autre incubateur en dehors de la boîte à gants mais dans la même pièce. Pour éviter la contamination entre les deux activités testées, les expérimentations ont été réalisées séparément.

Tout au long des expérimentations, un suivi de l'activité en HTO dans le milieu de contamination a été effectué. De plus, un renouvellement du milieu a été fait 72h après le début de l'expérimentation pour s'assurer de la qualité et d'une activité constante dans le milieu de contamination. Les échantillons ont été analysés par scintillation liquide ([Annexe 2](#)).

A l'échelle de l'individu et en lien avec la modulation de gènes impliqués dans la contraction musculaire, des analyses comportementales ont été effectuées de 24 à 96 hpf. Toutes les analyses ont été réalisées dans une pièce dédiée. Avant chaque analyse, une période d'acclimatation de 30 minutes a été respectée. A 24 hpf, les mouvements spontanés au niveau de la queue des embryons ont été analysés. A 48 et 72 hpf, le rythme cardiaque (battements par seconde) de larves anesthésiées a été observé. Pour ces deux tests, les vidéos ont été réalisées sous une loupe binoculaire reliée à une caméra et enregistrées via le logiciel Media

Recorder (Noldus Information Technology, Netherlands). Les vidéos ont ensuite été analysées avec le logiciel DanioScope (Noldus Information Technology, Netherlands). Le comportement de nage des larves à 96 hpf a également été analysé. Pour cela, les larves ont été placées dans des plaques 24 puits ([Figure 1](#)) dans le dispositif DanioVision (Noldus Information Technology, Netherlands). Des vidéos de 10 minutes ont été réalisées avec un stimulus tactile sur le côté de la plaque 5 minutes après le début de la vidéo. Le comportement de nage (vitesse) a été analysé via le logiciel EthoVision XT (Noldus Information Technology, Netherlands). Toutes ces analyses ont été réalisées en triplicats et la méthodologie est détaillée en [Annexe 7](#).

Un immunomarquage sur des embryons déchorionés à 24 hpf des foyers gamma-H2AX ([Annexe 8](#)), marqueur précoce des processus de réparation des cassures double brins, a été réalisés. En effet une sur-expression de certains gènes, dont *h2afx*, avait été mise en évidence lors de l'analyse à l'échelle moléculaire (Cf. *Partie D*). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Carl Zeiss, France) et ont par la suite été analysées avec le logiciel Fiji ImageJ.

A l'échelle de l'organe, des coupes histologiques des yeux ont été effectuées à 48, 72 et 96 hpf après l'exposition à  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL (4 mGy/h) uniquement. En effet, une sous-expression de gènes impliqués dans le développement et la transparence de l'œil ont été mis en évidence à 24 hpf dans l'étude transcriptomique (Cf. *Partie D*). Des coupes de 400 nm ont été réalisées grâce à un ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) et marquées au bleu de Toluidine. Les coupes ont ensuite été observées au microscope optique (DM750, Leica) équipé d'une caméra ICC50 (Leica) et du logiciel LAS EZ. Des focus au x100 ont été réalisés au niveau de la lentille et de la rétine des organismes.

### 1.3. Principaux résultats et discussion

En premier lieu, des analyses comportementales ont été réalisées sur les œufs et les larves de poissons zèbre. Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les mouvements spontanés de la queue des embryons quel que soit le débit de dose ([Figure 2](#)). En revanche, un effet significatif du temps, i.e. les heures auxquelles ont été enregistrées les vidéos, a été observé pour les deux débits de dose. Une diminution des mouvements spontanés au cours du temps comme celle observée dans cette étude a déjà été rapportée dans la

littérature. En effet, ces mouvements sont à leur maximum aux alentours de 19 hpf puis leur fréquence diminue avec le temps (Saint-Amant and Drapeau, 1998).

En termes de rythme cardiaque, une augmentation des battements par seconde a été mise en évidence lors de la comparaison des données entre les débits de dose (Figure 3). Dans la littérature portant sur le rythme cardiaque après exposition à un contaminant chimique, il a plutôt été observé une diminution du rythme, suggérant des modes d'action différents entre les contaminants chimiques et radiologiques pour ce marqueur (Asharani et al., 2011; Huang et al., 2010; Perrichon et al., 2015). Cependant, à l'instar des mouvements spontanés, un effet significatif du temps a été observé pour le rythme cardiaque. Il reste donc difficile de conclure si les effets observés sont dus à l'exposition à l'HTO ou à l'effet du temps sur le paramètre mesuré.

Concernant le comportement de nage, durant les 5 premières minutes de vidéo, une diminution de la vitesse de déplacement des larves a été observée uniquement à 0,4 mGy/h par rapport aux témoins (Figure 4A). Après des expositions aux rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$ , il a déjà été observé des malformations vertébrales (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993) et des altérations musculaire semblant augmenter avec le débit de dose (Gagnaire et al., 2015a). Cependant, les altérations au niveau musculaire ne peuvent pas expliquer à elles seules les effets observés au niveau du comportement de nage. En effet, aucune différence par rapport aux témoins n'a été mise en évidence pour le plus fort débit de dose (Figure 4B). Il pourrait donc être intéressant de se pencher sur les effets neurotoxiques potentiels de l'HTO.

Dans le cadre des effets comportementaux, la réponse des larves face à un stimulus tactile a également été étudiée. Les résultats montrent une augmentation de la vitesse de nage quel que soit le traitement (Figure 5) mais une capacité de réponse plus faible après exposition à 0,4 mGy/h par rapport aux témoins (Figure 6). Une diminution de la réponse face à un tel stimulus a été rapportée dans la littérature après exposition à des contaminants chimiques comme la nicotine, l'éthanol et la caféine (Carvan et al., 2004; Chen et al., 2008; Parker and Connaughton, 2007; Svoboda et al., 2002). Les modes d'action évoqués dans ces publications pour expliquer cet effet portent sur des paramètres neurotoxiques, comme l'innervation des fibres musculaires par les motoneurones. Bien que cette étude comportementale ait été réalisée avec du matériel dédié et spécifique au poisson zèbre, un certain nombre de questions se posent, comme l'effet du temps auquel les vidéos sont effectuées et qui semble avoir un effet sur les résultats.

Des coupes histologiques se focalisant sur les yeux des larves de 48 à 96 hpf uniquement exposées à 4 mGy/h ont été réalisées. Les résultats n'indiquent pas de différences prononcées en termes de développement de la rétine ([Figure 7](#)) ou de la lentille ([Figure 8](#)). En effet, l'œil après l'exposition à l'HTO semble, d'après les coupes histologiques, se développer de façon normale ([Chhetri et al., 2014](#); [Dahm et al., 2007](#)). Bien qu'une sous-expression de gènes impliqués dans le développement de l'œil et notamment sa transparence aient été mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique ([Arcanjo et al., 2018](#)) et que le développement de cataracte soit souvent reporté après thérapie aux rayons  $\beta$  ([Barron et al., 1970](#)), il ne semble pas y avoir d'impact sur la transparence de l'œil après une exposition à 4 mGy/h pour l'HTO dans nos conditions d'exposition. Ces résultats posent la question de la sensibilité de la technique utilisée ; en effet, une étude du comportement spécifiquement relié aux capacités visuelles comme la réponse optocinétique pourrait être envisagée pour compléter ces résultats.

Le marquage immunologique réalisé au niveau de l'embryon entier à 24 hpf a mis en évidence une augmentation du nombre de foyer gamma-H2AX normalisé par cellules analysées après exposition à 4 mGy/h par rapport à 0,4 mGy/h ([Figure 9](#)). Ces données sont cohérentes avec les données acquises via l'analyse du transcriptome mettant en évidence une sur-expression de gènes impliqués dans les processus de réparation des dommages à l'ADN plus marquée au plus fort débit de dose ([Arcanjo et al., 2018](#)). Une meilleure capacité de réparation des dommages à l'ADN au plus fort débit de dose pourrait en partie expliquer les effets observés, notamment sur le comportement de nage.

## 2. Article : « From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure »

Article à soumettre.

## **From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure**

Caroline Arcanjo<sup>1</sup>, Sophia Murat El Houdigui<sup>1</sup>, Giovanna Loro<sup>1</sup>, Claire Della-Vedova<sup>2</sup>, Magali Floriani<sup>1</sup>, Isabelle Cavalie<sup>1</sup>, Virginie Camilleri<sup>1</sup>, Christelle Adam-Guillermin<sup>1</sup>, Béatrice Gagnaire<sup>1</sup>

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

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

## Abstract

Tritium ( $^3\text{H}$ ), a radioactive isotope of hydrogen, is ubiquitously present in the environment. In a previous study, we highlighted a mis-regulation of genes involved in muscle contraction, eye transparency and response to DNA damages after exposure to 0.4 and 4 mGy/h of tritiated water (HTO). The present study aimed at linking this genes mis-regulation to biological response at higher levels to look for adverse outcomes. Zebrafish embryo-larvae were exposed, as previously, to 0.4 and 4 mGy/h. Related to mis-regulation of genes involved in muscle contraction, analyses on spontaneous tail movement, locomotor activity and heart rate was performed. Histological sections of eyes were made to evaluate the impact of HTO on eye transparency and whole embryo immunostainings were realized to assess DNA double strand breaks using gamma-H2AX foci. Results highlighted more detrimental effects of HTO exposure on locomotor behavior of 96 hpf larvae for 0.4 mGy/h of HTO compared to 4 mGy/h, with a decrease of velocity before and after a tactile stimulus compared to controls. As no effects were shown at 4 mGy/h, muscular impairments at molecular or tissular scales could not entirely explain this response. The investigation of the impacts of HTO exposure on the nervous system coupled with muscular impairments could be more relevant in order to explain the observed effects. Histological sections of larvae lens and retina performed only after the exposure to 4 mGy/h did not show obvious differences in lens transparency or retinal development between contaminated and control organisms. Gamma-H2AX foci count revealed a higher proportion of foci/cell after the exposure to the highest dose rate compared to the lowest one, however, no differences appeared in the number of gamma-H2AX foci between contaminated animals and controls, for both dose rates. This study aimed at make the link between genes mis-regulation found at the molecular scales and possible adverse outcomes at higher biological level. It appears that not all effects found at the molecular scale were confirmed using higher biological stages, questioning the precocity of effects at these higher scales. However, crossing data from different scales highlight new pathway to explore, i.e. neurotoxic pathways, for better understanding HTO effects on organisms.

**Keywords:** Tritiated water; Zebrafish; Locomotor activity; eye opacity; DNA double strand breaks

## 1. Introduction

Organisms are largely exposed to radionuclides originating from natural or anthropic sources. Among them, tritium ( $^3\text{H}$ ) can be found in the environment coming from both sources. As a radioactive isotope of hydrogen, it enters in the water cycle and therefore is present in all environmental compartments (ASN, 2010). The decay of tritium, following a half-time of 12.32 years, emits a beta particle of low energy (mean = 5.7 keV) and low penetration range (mean = 0.56  $\mu\text{m}$  in water) (HPA, 2007). This last property implies that the energy deposition in tissues is very localized and give to tritium a high ionization capacity that could be considered negligible for external exposure (Mathur-De Vre and Binet, 1984). However, if tritium is integrated in organisms' tissues, the effects could be more detrimental. In France, tritium is mainly discharged in the environment by nuclear power plants and nuclear reprocessing plants in normal operation in the form of tritiated water (HTO) or tritiated hydrogen (HT) (ASN, 2010). The development of new nuclear facilities, such as European Pressurized Reactor or International Thermonuclear Experimental Reactor, is expected to increase tritium discharge in environment.

The effects of tritiated water exposure were studied over a large range of species, from mammals through the effects on reproduction in mice or rats (Cahill and Yuile, 1970; Laskey et al., 1973; Lowry Dobson and Cooper, 1974) and human cells to assess DNA damages (Gonen et al., 2014) to aquatic invertebrates or vertebrates (Adam-Guillermin et al., 2012b). For those organisms, studies range from *in vitro* (Stuart et al., 2016) to *in situ* (Gagnaire et al., 2017a) through laboratory studies mainly focusing on developmental and reproductive effects (Adam-Guillermin et al., 2012b). Despite the wide range of species in which effects of HTO exposure were studied, there is still a lack of knowledge of tritium modes of action at the molecular scale, the transgenerational effects, the adaptation or the behavior of organisms (Adam-Guillermin et al., 2012b; ASN, 2010).

The present work is part of a project which aims to identify the modes of action of tritiated water. To reach this objective, an aquatic vertebrate model was used, the zebrafish, *Danio rerio*. The embryo larval stages were chosen, as early developmental stages are supposed to be more sensitive to pollutant and as the effects of pollutants on these early stages could induce detrimental effects during the rest of the fish development (Frayse et al., 2006). Furthermore, these early stages are recommended in OECD guidelines for the testing of chemicals (OECD,

Partie E - comprendre les liens entre les compartiments biologiques : analyses à l'échelle de l'organe et de l'individu au regard des effets moléculaire (2013). Zebrafish is a very convenient laboratory model especially when the use of the embryo-larvae stages is required, as in this project. Indeed, adults can spawn hundreds of transparent eggs in a single spawning (Spence et al., 2008). The genome of this species is fully sequenced, and a wide variety of mutants are now available (Scholz et al., 2008), which is useful when focusing on modes of action. Furthermore, zebrafish is an emerging model to study behavior and many tools are now available to assess plenty of behavioral parameters in adult and embryo-larvae of zebrafish (Ahmad et al., 2012).

In this project, a previous study was conducted and focused on the effects of HTO exposure on zebrafish early life stages at the molecular scale using a transcriptomic analysis by mRNAseq (Arcanjo et al., 2018). This study revealed an effect of HTO exposure on genes involved in muscle contraction, eye transparency, circadian clock, response to reactive oxygen species and repair of DNA damages. The aim of the present study was to complete the results of this previous work by investigating if the effects observed at the molecular scale were confirmed at higher biological scales including tissue and individual, more relevant from an ecological point of view.

To reach this objective, 3 hpf (hours post-fertilization) zebrafish eggs were exposed to the same dose rates that previously used (i.e. 0.4 and 4 mGy/h). These two dose rates correspond to the DCRL for fish, i.e. a band of dose rates, spanning one order of magnitude, within which there is some chance of deleterious effects from ionizing radiation (ICRP, 2012). In term of activity concentrations, these two doses rates and correspond to tritiated water activities of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL, respectively. As the first part of the study highlighted differential expression of genes involved in muscle contraction (skeletal and cardiac) (Arcanjo et al., 2018), 24 hpf eggs and 96 hpf larvae were challenged with behavioral analyses including spontaneous tail movements, heart rate and free-swimming behavior. Histological observations of organisms' eyes from 48 hpf to 96 hpf were also performed to make the link with modulation of genes involved in eye transparency. Finally, a whole mount immunostaining was performed to detect gamma-H2AX foci, an early marker of double strand break repair process (Rogakou et al., 1998), as some genes involved in DNA repair pathways were found mis-regulated in a previous study (Arcanjo et al., 2018).



## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish maintenance and eggs production

Adult wild-type zebrafish (AB genetic background) were maintained in a Tecniplast© ZebTEC system in 8L tanks (20 adults per tank) with a temperature of  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , males and females being kept separated. A photoperiod of 12/12h dark-light cycles was used. Eggs were produced by mating couples in 1.7L Breeding Tank Beach Style Design (Tecniplast©) at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Males and females were kept apart in the same breeding tank during the night before the mating. The morning of mating, couples were allowed to mate, and eggs were sampled 30 min after the beginning of the mating in order to obtain synchronised eggs. All eggs were pooled together, sorted, counted and kept in petri dish with embryo medium, 60mg/L of Instant Ocean© sea salt diluted in ultrapure water (Westerfield, 1995), at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  until the beginning of the experiments.

### 2.2. Eggs contamination and sampling

Tritiated water source (97% purity, 185 MBq, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) was diluted in embryo medium to obtain final activity concentrations of  $1.22 \times 10^5$  and  $1.22 \times 10^6$  Bq/mL. At 3 hpf (hours post-fertilization), eggs were contaminated respecting a density of 5 eggs per 2mL of HTO solution in three experimental units (three replicates). The eggs were kept in the dark at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  in a thermo-regulated incubator confined inside a glove box. Control eggs were placed in embryo medium and kept in the same manner as contaminated organisms in the same room outside the glove box. Water in contaminated and control experimental units was renewed once (at 72h) during the experiment to ensure water quality and constant tritiated water activity. Samples of contamination medium were made to monitor tritium activity along the experiments in the three experimental units. These samples were analysed by liquid scintillation counting. Briefly, samples were diluted with tritium-free water (Les Abatilles, Arcachon, France) to obtain a volume of 1 mL. A liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer) was then added to a final volume of 20 mL. Samples were analysed using a Quantulus 1220 (DL = 5 Bq/L, PerkinElmer, WinQ software) and spectrum were analysed using the EASY View Spectrum analysis Program (PerkinElmer). To avoid cross-contamination between the two HTO activity concentrations, experiments were conducted separately. The statistical analyses performed to compare mean activity concentration between experimental units showed no differences for both activities tested in this study. Measured activity

concentrations along experiments and for all experimental units were of  $1.10 \times 10^5$  ( $\pm 5.72 \times 10^3$ ) Bq/mL and  $1.35 \times 10^6$  ( $\pm 8.89 \times 10^4$ ) Bq/mL respectively for the lowest and the highest activity concentration tested.

Concerning the sampling of organisms needed for the behavioral and histological analysis as well as for the gamma-H2AX immunostaining, contaminated organisms were washed three times in clean and non-tritiated embryo medium to remove them from the glove box because of the high tritium activity concentrations. Control organisms were handled in the same way. This protocol was optimized for zebrafish (Arcanjo et al., unpublished).

### **2.3. Behavioral analyses**

All behavioral analyses were preceded by an acclimation period of at least 30 min for all organisms (control and contaminated) in the behavioral room. Acclimation was performed in a dark thermoregulated incubator (AquaLytic, Germany) at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Videos for the assessment of spontaneous tail movements of chorionated embryos at 24 hpf and heart rate of 48 and 72 hpf larvae were performed under a stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to a high-resolution camera (acA1300-60gm, Basler, Germany) under the room light. Recording were performed using Media Recoder Software (v.4.0.542.1, Noldus Information Technology, Netherlands) and the analysis of videos was performed using the DanioScope Software (v.1.1.110, Noldus Information Technology, Netherlands). Concerning the swimming behavior of 96 hpf larvae, the DanioVision Observation Chamber (Noldus Information Technology, Netherlands) coupled with the DanioVision Temperature Control Unit (Noldus Information Technology, Netherlands) at  $28^\circ\text{C}$  ( $\pm 0.1$ ) were used and videos were analysed using the EthoVision XT software (v.13.0.1216, Noldus Information Technology, Netherlands). All videos used for the swimming behavior analyses were performed in the dark under infra-red light. Results for all behavioral tests were compared to their respective control. Furthermore, to be able to compare the responses between dose rates, we normalized data by the mean value of their respective control, results from this normalization was referred as “normalized” in the text.

#### **2.4.1. Spontaneous tail movements of 24 hpf eggs**

For the assessment of the spontaneous tail movement in 24 hpf eggs, three replicates of 30 organisms were used. As the 30 organisms cannot be recorded together under the

stereomicroscope, replicates were divided in three sub-replicates of 10 organisms. After the acclimation period, sub-replicates were placed on a petri-dish containing 1% agarose gel (Sigma-Aldrich), then 20  $\mu$ L of methyl cellulose was added to avoid movement of eggs during the recording time. Organisms were then placed under the stereomicroscope and after an acclimation period of 2 min before the videos were recorded (5 min of video, frame rate = 25). Control and contaminated replicates were alternated. All the recordings of the spontaneous movement in 24 hpf eggs took place between 10:20 am and 01:00 pm. For the statistical analysis, the burst activity was used. It corresponds to the percentage of time the embryo was moving along the duration time of the video. Based on the data distribution, values below 1 and above 40 were considered as outliers and were excluded from the data set.

#### *2.4.2. Heart rate of 48 and 72 hpf larvae*

For the heart rate analysis, protocol was almost the same as described for the activity assessment, except that three replicates of 10 organisms were used. These replicates were divided in three sub-replicates of 5 organisms. After the acclimation period, sub-replicates were placed on a petri-dish containing 1% agarose gel (Sigma-Aldrich), then 20  $\mu$ L of methyl cellulose and 1  $\mu$ L of MS-222 final concentration 0.02 % (w.v.) (Tricaine methanesulfonate, Molekula) were added to avoid movement of larvae during the recording time. MS-222 concentration used in the present study was about 2 times higher than the  $EC_{50}$  found for 3 dpf zebrafish larvae after a 1h exposure (Rombough, 2007). However, for the present study, larvae were only exposed few minutes to MS-222 before the beginning of video, so a sufficient concentration of anaesthetic was needed. Furthermore, after the end of video, larvae were placed in clean embryo medium and start to swim normally. When anesthetised, organisms were then placed under the stereomicroscope and, after an acclimation period of 2 min, the videos were recorded (30 sec of video, frame rate = 25). Control and contaminated replicates were alternated. All the recordings of the heart rate in 48 and 72 hpf larvae took place between 10:15 am and 11:30 am. For the statistical analysis, based on the data distribution, a number of beats per second below 1.5 and above 3.5 were considered as outliers and were excluded from the data set.

### *2.4.3. Swimming behavior of 96 hpf larvae*

The swimming behavior of the 96 hpf larvae was assessed using three replicates of 16 organisms per treatment distributed in four 24-wells plates ([Figure 1](#)). Organisms were placed individually in each well with 2mL of embryo medium; controls and contaminated animals were in the same plate. All four plates were prepared few minutes before the beginning of their respective recording time. Once placed in the DanioVision Observation Chamber, an acclimation period of 10 min was respected before the beginning of the recording. Videos of 10 min were recorded with a tapping stimulus (level=8, on the side of the well plate) at t=5min after the beginning of the recording. All the recordings of the swimming behavior in 96 hpf larvae took place between 11:00 am and 12:40 pm. Analysis were made between control and contaminated during the first five minutes of the video to assess the basal level. The response to the tactile stimulus was assessed by comparing responses 1 second before and 1 one second after the stimulus for all treatment. Then the delta of the response (after-before) was used to compare the response between control and contaminated larvae.

### *2.5. Histological analysis of organisms' eyes*

The histological sections of zebrafish eyes from 48 to 96 hpf were performed after the exposure à 4 mGy/h of HTO only. Sections of 400 nm were realized using an ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and stained with toluidine blue. Sections were then observed with an optic microscope (DM750, Leica) with ICC50 camera (Leica) coupled with the LAS EZ software. Images focusing on retina and lens were made using the 100x objective. Both eyes for two replicates were used for the three stages studied.

### *2.6. Whole mount gamma-H2AX immunostaining*

#### *2.6.1. Immunostaining*

The whole mount gamma-H2AX immunostaining were performed using at least 20 eggs at 24 hpf for each treatment (control and contaminated). After the sampling, eggs were manually dechorionated and fixed in 2mL of PFA 4% in PBS 1X (Sigma-Aldrich) during 3h at 4°C. Once fixed, organisms were kept in 100% methanol (VWR International) at -20°C until the beginning of the staining.

The staining begins by the rehydration of organisms with successive washes with decreasing concentrations of methanol in PBS 1X (70%; 50%; 25% methanol). Organisms were then permeabilized with Proteinase K in PTW buffer (10 µg/mL final concentration) for 3min at room temperature. After a brief wash in PTW buffer, organisms were fixed in PFA 4% in PBS 1X (Sigma-Aldrich) for 20min at 4°C. The samples were blocked in a 0.2% BSA and 1% DMSO PBST solution for 3h at room temperature, and then incubated with the primary antibody (1:200 gamma-H2AX in blocking solution, GeneTex GTX127342) at 4°C overnight. The samples were washed five times in PTW buffer, incubated with the secondary antibody (1:500 Sigma-Aldrich anti rabbit-FITC F0382) 2h at room temperature and then accurately washed with PTW buffer. The samples were kept protected from light at 4°C until analysis by confocal microscopy.

### *2.6.2. Confocal observations*

Confocal microscopy analyses were performed using a laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, France) using a 20x dry objective (N.A. 0.8), with a pinhole setting of 1 A.U. For FITC fluorescence, excitation was performed at 488nm and emission acquired between 510/550 nm. For DAPI detection, samples were stained in a 0.1% Tween and 300nM DAPI PBS solution for 1h and 30min, excitation was performed at 405 nm and detection between 420 and 500nm. The samples were mounted on 35 mm imaging dish with a polymer coverslip bottom (Ibidi) and covered by a 2% methyl-cellulose solution.

### *2.6.3. Image analysis*

The images acquired at the confocal microscope were analysed using the open-source software Fiji ImageJ. For each image, the smooth filter was applied (this filter replaces each pixel with the average of its 3×3 neighbourhood) to increase the ratio signal/noise, and then the level of background was chosen (values between 5 and 10). Several regions of interest (ROI) were designed on the nuclei detected in the DAPI channel, using the ImageJ tool ROI manager. The ROI were transferred and combined with the FITC channel. The function Find Maxima was used to identify and count the foci; this algorithm determines local maxima that pass the threshold (noise tolerance) in the selected area. The values derived from the initial background analysis were used as a threshold. The ratio between the number of maxima identified by the function and the number of selected nuclei was reported as foci/cell.

## 2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the *stats* v3.4.3 package in the R software (R Core Team, 2017). For the behavioral analysis, i.e. tail spontaneous movements, heart rate and locomotor activity, random permutation tests were applied using the *pgirmess* packages (Giraudoux et al., 2018) on a mixed model constructed using the *nlme* package (Pinheiro et al., 2017) with treatment and the time at which the video was recorded (reported as “time effects” in the text) as fixed effects and replicates as random effect. For the analyses of HTO activity in water, behavioral normalized data and gamma-H2AX foci, data normality and homogeneity were assessed using the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test from the *stats* package. Student test, Anova or Wilcoxon test were used to compare data. Groups were considered significantly different when tests give a p-value < 0.05. In the figures an “\*” was used when comparing contaminated data to their respective controls and a “#” when comparing dose rates from each other (i.e. normalized data).

## 3. Results

### 3.1. Behavioral and physiological analysis

In 24 hpf eggs, the spontaneous movements of the tail were not significantly different in controls and in contaminated organisms regardless of dose rates. Furthermore, no significant differences were shown when comparing normalized spontaneous tail's movements between dose rates (Figure 2). However, a significant effect of the time was found for both dose rates and treatments as a diminution of tail movement.

The heart rate of 48 hpf and 72 hpf larvae were also analysed. Beats per second (BPS) in control and contaminated organisms were not significantly different regardless of stages and dose rates. Significant effect of the time was however highlighted for both dose rates in 48 hpf larvae and only for 4 mGy/h in 72 hpf larvae as an increase of BPS. Comparisons of normalized beats per second between dose rates for both stages were also performed. At 48 hpf, no significant difference was highlight by the analysis. However, the normalized beats per seconds in 72 hpf larvae exposed to 0.4 mGy/h were significantly lower than those to 4 mGy/h (Figure 3).

Concerning the swimming behavior of 96 hpf larvae after a 0.4 mGy/h exposure, control organisms showed significant higher velocity (mm/s) during the first five minutes of the tracking videos than contaminated organisms (([Figure 4A](#)). This difference was not found in 96 hpf larvae exposed to 4 mGy/h ([Figure 4B](#)). The comparison of the normalized velocities between dose rates showed that after an exposure to 0.4 mGy/h, the velocity of 96 hpf larvae was lower than the velocity after 4 mGy/h. Following the tapping stimulus (i.e. one second before and one second after), control and contaminated 96 hpf larvae showed significant differences in velocity (mm/s). Indeed, the velocity of 96 hpf larvae was significantly lower one second before the tapping stimulus than one second after in control and contaminated organisms for both dose rates ([Figure 5](#)). The delta of the response to the stimulus (i.e. after-before) between control and contaminated organisms was compared for both dose rates. Results showed that after an exposure to 0.4 mGy/h, the delta of the response in control 96 hpf larvae was significantly higher than the delta observed in contaminated organisms ([Figure 6](#)). After an exposure to 4 mGy/h, no such difference was found ([Figure 6](#)). As for other behavioral endpoints, the normalized delta of the response was compared between dose rates and no difference was highlighted.

### ***3.2. Histological observations of organisms' eyes***

The histological observations were performed on zebrafish eyes from 48 hpf to 96 hpf exposed to a dose rate of 4 mGy/h. The comparison between pictures did not show notable alterations in the retinal structure when comparing control and contaminated organisms for all stages. Indeed, as expected when normal development occurs, the five layers composing the retina were not distinguishable from each other in 48 hpf larvae but well defined in 72 hpf and 96 hpf larvae ([Figure 7](#)). When focusing on the lens, no remarkable difference appeared in lens development between 4 mGy/h exposed larvae and controls for all the three stages. In 48 hpf larvae, lens was fully detached from the ectoderm and showed a mono layer of epithelial cells on the anterior part of the lens while in the central part elongated primary lens fibre were visible as a concentric layer ([Figure 8](#)). On later stages (i.e. 72 hpf and 96 hpf larvae), the lens structure became more homogenous, with cells forming a concentric structure still visible in 72 hpf larvae but not in 96 hpf larvae ([Figure 8](#)).

### 3.3. Whole mount gamma-H2AX immunostaining

For both dose rates, the comparison between control and contaminated organisms was performed using the foci/cell ratio. For control and samples exposed to 0.4 mGy/h a total of 850 and 779 cell were counted respectively. A similar number of cells were counted in control and 24 hpf eggs exposed to 4 mGy/h (824 for control and 936 for contaminated samples). For both dose rates, no significant difference was highlighted between control and contaminated 24 hpf eggs. To compare dose rates, the normalized foci/cell ratio in contaminated samples was used. Results reveal a significant lower proportion of foci/cell for 0.4 mGy/h than for 4 mGy/h in 24 hpf embryos ([Figure 9](#)).

## 4. Discussion

### 4.1. Behavior and heart rate

#### 4.1.1. HTO exposure did not change spontaneous tail movement

At 24 hpf, the spontaneous movement of the zebrafish embryo tail was investigated. Results did not show significant differences between control and contaminated organisms regardless of the dose rate. The same results were found when comparing dose rates. These results suggested that the effects found in the first part of this study via a transcriptomic analysis, i.e. mis-regulation of genes involved in muscle contraction found in 24 hpf eggs for both dose rates ([Arcanjo et al., 2018](#)), did not affect spontaneous tail movements at the same developmental stages. Furthermore, as the spontaneous movements of the tail originate from the spinal cord and are dependent of functional motoneuron innervation ([Brustein et al., 2003](#)), it suggests that this pathway did not seem to be affected by HTO exposure in 24 hpf eggs for both dose rates tested. However, it would be interesting to validate or not this assumption as genes involved in neurotransmitter transport (SLC6 family) were modulated in 24 hpf eggs after exposure to 0.4 and 4 mGy/h of HTO ([Arcanjo et al., 2018](#)). Furthermore, in 240 hpf larvae exposed to 4 mGy/h of HTO an over-expression of the *ache* gene, coding for the acetylcholinesterase protein that play a role in muscle relaxation or muscular and neuronal development ([Behra et al., 2002](#)), was found compared to control (Gagnaire et al, unpublished data). Furthermore, a well-known neurotoxicant such as chlorpyrifos was shown to increase tail movements in zebrafish embryo from 24 to 26 hpf from 0.625 to 10 mg/L, with 10 mg/L reported in this study as the highest non-teratogenic concentration ([Selderslaghs et al., 2010](#)). Interestingly, the statistical analysis performed on the spontaneous tail movement highlighted



a significant effect of time for both HTO exposures; meaning that the time during which experiments were made has a significant effect on the measured parameter (burst activity). Indeed, the first spontaneous movement appeared around 17 hpf. In dechorionated embryos, the spontaneous movements reach a peak around 19 hpf and then slowly decrease by 26 hpf (Saint-Amant and Drapeau, 1998). Such a decrease of the spontaneous tail movement was also reported in literature in control organisms (Huang et al., 2010; Wang et al., 2013) confirming that time influence this parameter. As experiments performed in this paper performed on stages between 24 hpf and 27 hpf, it is not surprising to find a significant effect of time in the obtained data.

#### 4.1.2. HTO exposure did not change beats per seconds

After an exposure to 0.4 mGy/h of HTO, no significant differences in BPS were highlighted between control and exposed organisms for both stages. Same results were found for the highest dose rate, 4 mGy/h. However, the normalized BPS in the 72 hpf larvae were significantly lower at 0.4 mGy/h compared to 4 mGy/h. No such difference was highlighted in 48 hpf larvae. This result could suggest an effect of HTO exposure on heart rate. However, statistical analyses showed a significant effect of time in 72 hpf larvae BPS data after exposure to 4 mGy/h. As no differences were found between contaminated and control organisms for both dose rates, the significant difference observed in normalized BPS at 72 hpf between dose rate could be explained by the effect of time more than by the effects of exposure. After exposure to chemical, the heart rate seems to decrease. Indeed, in zebrafish larvae (48 hpf and 60 hpf) exposed to a range of perfluorooctanesulphonicacid (PFOS) concentrations, a persistent organic contaminant, a decrease of heart beats was shown from 0.1 to 8  $\mu$ M for both stages, with an EC<sub>50</sub> at 120 hpf of 2.23  $\mu$ M (Huang et al., 2010). After a zebrafish F0 exposure to different kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) with environmentally relevant concentrations, a concentration dependent decrease of cardiac activity was shown on the F1 generation (120 hpf) (Perrichon et al., 2015). Furthermore, a dose dependent drop of heart rate was found in 24 hpf eggs exposed to silver nanoparticles. Heart rate continued to drop according to nanoparticles concentration in 48 hpf and 7hpf larvae (Asharani et al., 2011).

Together, the results found for the cardiac activity after HTO exposure suggested no effect of HTO on this parameter for developmental stages investigated. Furthermore, due to a significant effect of time, it is difficult to attribute the effect found when comparing dose rate

to HTO exposure. As previously said, it appears that the down-regulation of genes involved in both muscle contraction and event leading to the muscle contraction found in a previous study in 24 hpf eggs (Arcanjo et al., 2018) had no effects on cardiac activity on 48 and 72 hpf larvae. To go further, it would be interesting to perform dedicated experiments to find the moments of the day were larvae show constant BPS to avoid time effect and to see if the effect found between dose rates in this study could be explained by HTO exposure or not.

#### 4.1.3. HTO exposure induces effects on locomotor behavior

To get insight into the swimming abilities of 96 hpf larvae after HTO exposure, a free-swimming behavioral test was performed in 96 hpf larvae, followed by a tactile stimulus on the side of the plate containing organisms. Results highlighted that during the first five minutes of the video tracking, the 0.4 mGy/h exposed larvae showed a mean velocity significantly lower than control larvae. The comparison between dose rates of the normalized mean velocity during the first five minutes of the tracking video highlighted that the velocity of the 96 hpf larvae was lower when exposed to 0.4 mGy/h than to 4 mGy/h. After HTO or gamma exposure, it was already documented vertebral malformations in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 35.42 mGy/h (HTO) and 18.3 mGy/h (gamma) during embryonic stages (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993). Furthermore, muscle impairments as disorganization of sarcomeres myofilaments (96 hpf) and disruption of genes involved in muscle contraction (24 hpf) were reported in a previous study using the same dose rates (Arcanjo et al., 2018). Also in zebrafish, gamma exposure to 0.03 mGy/h and 23.75 mGy/h induced degradation of myofibrils which were more deleterious for the higher dose rate tested (Gagnaire et al., 2015a). Together, these results could explain the effect on locomotor activity found in the present study after the exposure to HTO. However, the impairments of the muscular system, both at the molecular and tissue scales, cannot explain the observed effects alone, as the locomotor activity in 96 hpf larvae exposed to 4 mGy/h was not affected by HTO exposure. Furthermore, as a proper locomotor activity depends on both the nervous and the muscular systems (Drapeau et al., 2002), the neurotoxic effects of HTO exposure has to be considered.

The response to a tactile stimulus was then investigated and showed that controls and HTO-contaminated organisms (for both dose rates) responded to the tactile stimulus by a significant enhancement of their velocity one second after the stimulus. The delta of the response to the tactile stimulus was also studied. It appeared that the 0.4 mGy/h exposed 96

hpf larvae showed a delta of the response significantly lower than control organisms. In studies focusing on chemicals such as nicotine (Parker and Connaughton, 2007; Svoboda et al., 2002), caffeine (Chen et al., 2008) or ethanol (Carvan et al., 2004), effects on the locomotor behavior of zebrafish larvae after a tactile stimulus, dose dependent decrease of response was shown in contaminated organisms comparing to controls. The mode of action evoked to explain these results are linked to the neuronal system by effects of chemical on the development and on the alteration of the axonal pathfinding of the secondary spinal motoneurons as defects on the neuromuscular junction (Chen et al., 2008; Svoboda et al., 2002). To go further, it would be interesting to focus on the effects of the HTO exposure on the motoneuron development and axonogenesis. Furthermore, it would be interesting to investigate the HTO effects on the lateral line, a mechanosensory system in fish and on the Mauthner cells which mediated the trunk and tail contraction during the response to a tactile stimulus (Eaton et al., 1977). Furthermore, as vertebral malformations were reported after HTO exposure in medaka, *O. latipes* (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993), it would be interesting to follow vertebral development in zebrafish after exposure to HTO.

Together, these results highlighted that HTO exposure had more detrimental effect on 96 hpf zebrafish locomotor activity after an exposure to 0.4 mGy/h than to 4 mGy/h. The impact of HTO on the velocity of larvae could cause delayed response to predators or decrease success of prey capture and could therefore have a detrimental impact on fish fitness.

#### **4.2. Histology of the eyes**

As cataract is one of the complications after beta radiation therapy in Human and that cataract incidence was shown to increase in Chernobyl birds (Barron et al., 1970; Mousseau and Møller, 2013), the potential development of cataract in HTO exposed zebrafish larvae was investigated. Histological sections of eyes lens and retina were then performed. As genes involved in eye transparency were found down-regulated in 24 hpf eggs after an exposure to 4 mGy/h in a previous study (Arcanjo et al., 2018), all sections were made at this dose rate. Results highlighted no distinguishable defects in larvae (from 48 hpf to 96 hpf) when comparing control and contaminated organisms. Indeed, as expected in normal zebrafish eyes development, in 48 hpf larvae the lens is fully detached from the cornea and show different kind of cells, an anterior monolayer of epithelial cells and in more centrally the primary lens fiber starting to elongated (Dahm et al., 2007). At 72 hpf, histological sections of lens showed

a more homogeneous appearance with lens fiber cell even more elongated with degraded nucleus (Dahm et al., 2007). Finally, at 96 hpf, sections of the lens also showed a homogenous pattern with no appearance of nuclei. At this stage the differentiation of lens fiber cells is terminated, and lens is totally transparent (Goishi et al., 2006). Concerning the histological sections of retina, as for lens, no obvious differences could be seen between control and contaminated organisms regardless of stages. Indeed, the five retinal layers were well distinguishable in 72 hpf and 96 hpf larvae. These five layers are composed of three nuclear layers (ONL, INL and GCL) and two plexiform layers (IPL and OPL) (Chhetri et al., 2014). No remaining nuclei was found in lens, as already shown by histological section of zebrafish eyes with cataract (Dhakal et al., 2015; Goishi et al., 2006). Therefore, these results did not support the molecular alterations previously shown (Arcanjo et al., 2018).

Together, the results showed no effect of HTO on lens transparency or retinal development at the analyzed developmental stages. This results suggest that the transient down-regulation of genes involved in eye transparency at 24 hpf (Arcanjo et al., 2018) did not have effects on the development of eyes assess here by histological observations. However, no eyes observations were performed at 24 hpf in this study, it could be interesting to performed histological sections of eye at this stage as mis-regulation of genes were found in 24 hpf eggs. The question of the precocity of effects when comparing biological scales could also be addressed here. To go further, it would be interesting to investigate behavioral testes dedicated to visual parameters as the optokinetic response (OKR) or the optomotor response (OMR) in 96 hpf larvae, as at this stage the retinal structure and the ocular muscles are functional, which leads to evident eye movements to investigate if behavioral response could be seen even when no structural defects are observed (Chhetri et al., 2014). Indeed, the OKR was used to isolated zebrafish mutant with visual defect and highlighted two mutants lacking obvious morphological difference from controls (Brockhoff et al., 1995).

#### **4.3. H2AX**

The effects of HTO exposure on DNA damages was already investigated using wide range of species as mollusk (Hagger et al., 2005; Jaeschke et al., 2011; Jha et al., 2005), aquatic vertebrates (Gagnaire et al., 2017a; Suyama et al., 1981) or fish cell culture (Stuart et al., 2016). In the present study, we focused on DNA double strand breaks in 24 hpf eggs using an immunostaining method to assess number of gamma-H2AX foci, an early marker of DNA double

Partie E - comprendre les liens entre les compartiments biologiques : analyses à l'échelle de l'organe et de l'individu au regard des effets moléculaire

---

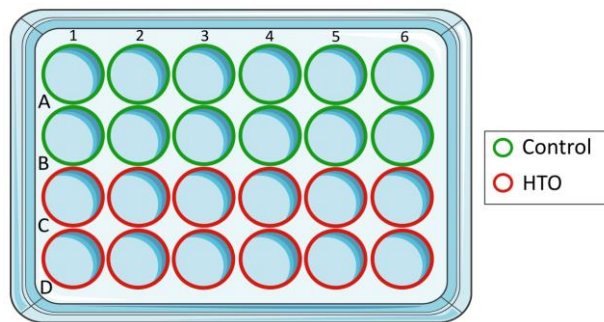
strand break repair (Rogakou et al., 1998). Results showed that, comparing to their respective controls, no significant differences were found for both dose rate. However, the comparison of the normalized foci/cell ratio highlighted that this ratio was higher after exposure to 4 mGy/h compared to 0.4 mGy/h exposure, suggesting the onset of double strand break repair after the 4 mGy/h exposures in 24 hpf eggs. This result was in good agreement with previous findings at the molecular stages in which the *h2afx* gene was found to be up-regulated in 24 hpf eggs after an exposure to 4 mGy/h (Arcanjo et al., 2018). DNA damages were assessed for the same dose rate as in this study on 24 hpf eggs and 96 hpf larvae and increase of DNA damage was found in both stages at 0.4 mGy/h and no effect at 4 mGy/h (Gagnaire et al, unpublished data). Furthermore, a study on ZF4 zebrafish cells showed an increase of gamma-H2AX foci per cells after 24h of chronic gamma radiation at 4.2 mGy/h and 31.25 mGy/h while no differences were found at 0.42 mGy/h (Pereira et al., 2011). As gamma-H2AX foci is an early marker of DNA double strand break repair, it would be interesting to see if these damages are properly repaired by following the presence or not of gamma-H2AX foci allow time or to performed comet assay.

## 5. Conclusion

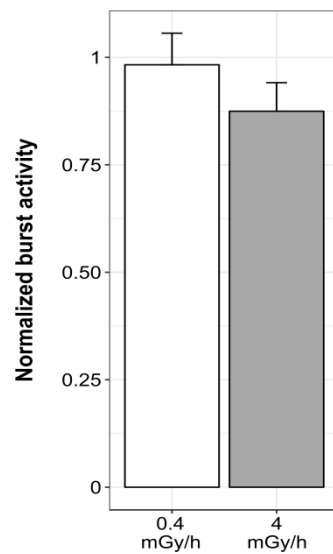
In this study, we investigated the effects of tritiated water exposure to dose rate of 0.4 and 4 mGy/h on zebrafish eggs and larvae. We first focused on 48 hpf to 96 hpf larvae eye development in search for cataract phenotype to confirm molecular responses observed on genes involved in eye transparency. Results of the histological sections observations showed no obvious developmental differences between control and 4 mGy/h contaminated zebrafish larvae eyes regardless of the stages. As a down-regulation of genes involved in eye transparency was found in a previous study for the same dose rate but at earlier stages (i.e. 24 hpf only), results could suggest that this early mis-regulation of genes has no impact on the future development of eye for the stages used in the present study. Behavioral testes were also performed from 24 hpf eggs to 96 hpf larvae. Results highlighted that the 0.4 mGy/h exposure could have more detrimental effects than the 4 mGy/h exposure on the locomotor activity. Indeed, exposed larvae showed a significant lower velocity than control larvae in the first five minutes of the video tracking and when assessing the response to a tactile stimulus. These results could be partly explained by the impact on muscle (structure and genes) previously highlighted for both dose rate, but not entirely, as no effects were seen in the present study on

locomotor behavior of 96 hpf larvae exposed to 4 mGy/h. Therefore, an impact on the nervous system coupled with muscular impairments could be more relevant for the explanation of effects on the locomotor behavior. Furthermore, the ability to respond to damages after HTO exposure could also be advanced. Indeed, the higher number of gamma-H2AX foci per cells found in 4 mGy/h exposed 24 hpf eggs compared to the 0.4 mGy/h exposed organisms could suggest an improved response to DNA damages, and further a better ability to recovered after HTO exposure. In this study focusing on higher hierarchical levels, observed effects at the molecular scale, i.e. genes involved in muscle contraction, eye transparency and response to DNA damage, have not all been confirmed at higher biological scales. This could be due to the precocity of observed effects, as effects at the molecular scale are often described earlier. Despite that, the present study allowed to link responses observed at different organization levels, from molecule to individual, contributed to improve the knowledge of tritiated water exposure effects and highlighted a signaling pathway to explore, the neurotoxic effects of HTO, up to now poorly evaluated.

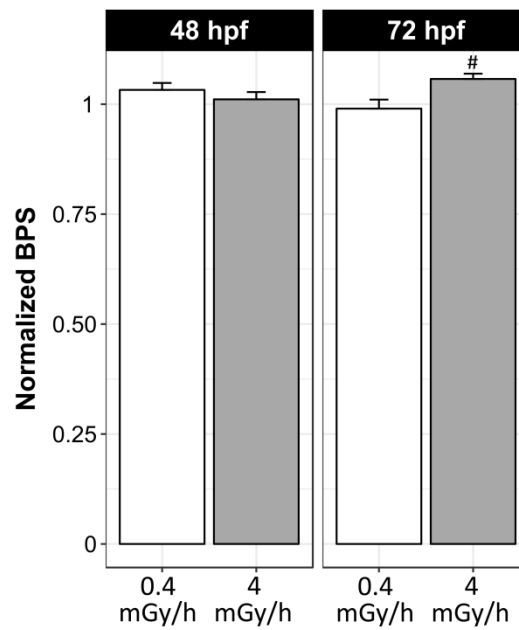
Figures:



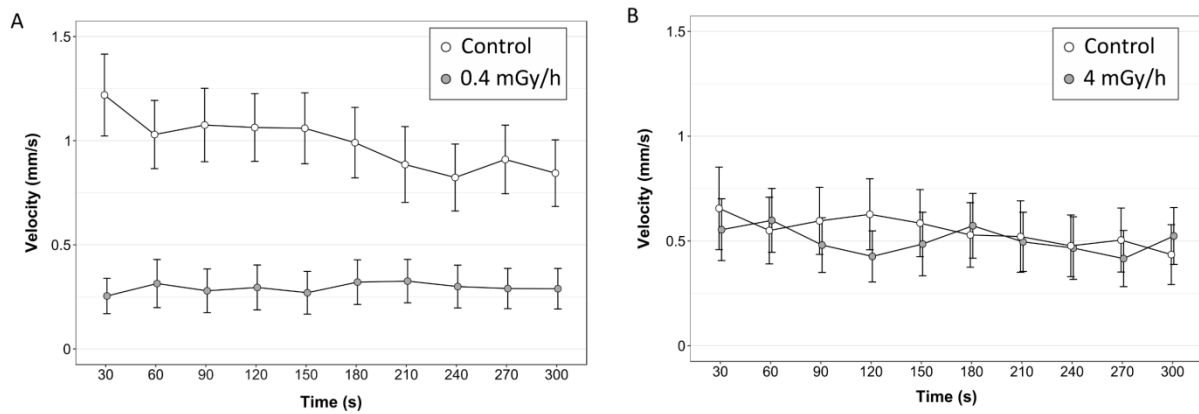
**Figure 1:** Scheme of the repartition of control (green circles) and contaminated (red circles) 96 hpf larvae in the 24-well plate for the free-swimming behavioral test.



**Figure 2:** normalized burst activity of 24 hpf eggs exposed at 0.4 mGy/h (white bar) and 4 mGy/h (grey bar) of HTO.

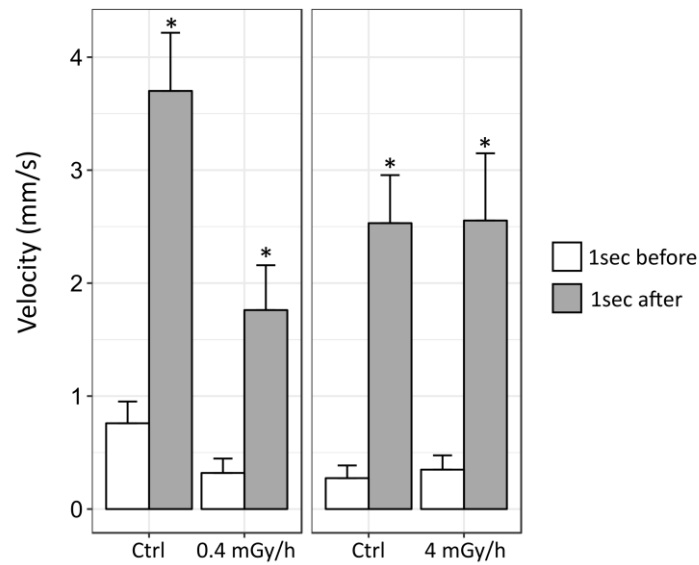


**Figure 3:** Normalized BPS (Beat Per Second) of 48 hpf and 72 hpf larvae after HTO exposure at 0.4 mGy/h (white bars) and 4 mGy/h (grey bars). # ANOVA, pairwise t.test  $p < 0.05$ .

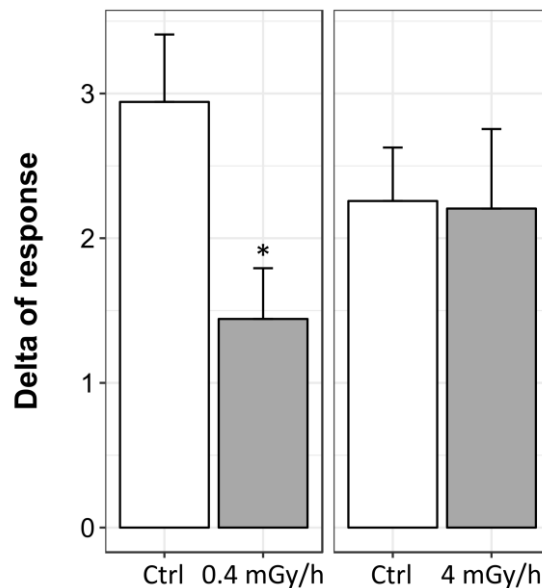


**Figure 4:** velocity (mm/s) of control (white circles) and contaminated (grey circles) 96 hpf larvae after exposure at (A) 0.4 mGy/h of HTO and (B) 4 mGy/h of HTO.

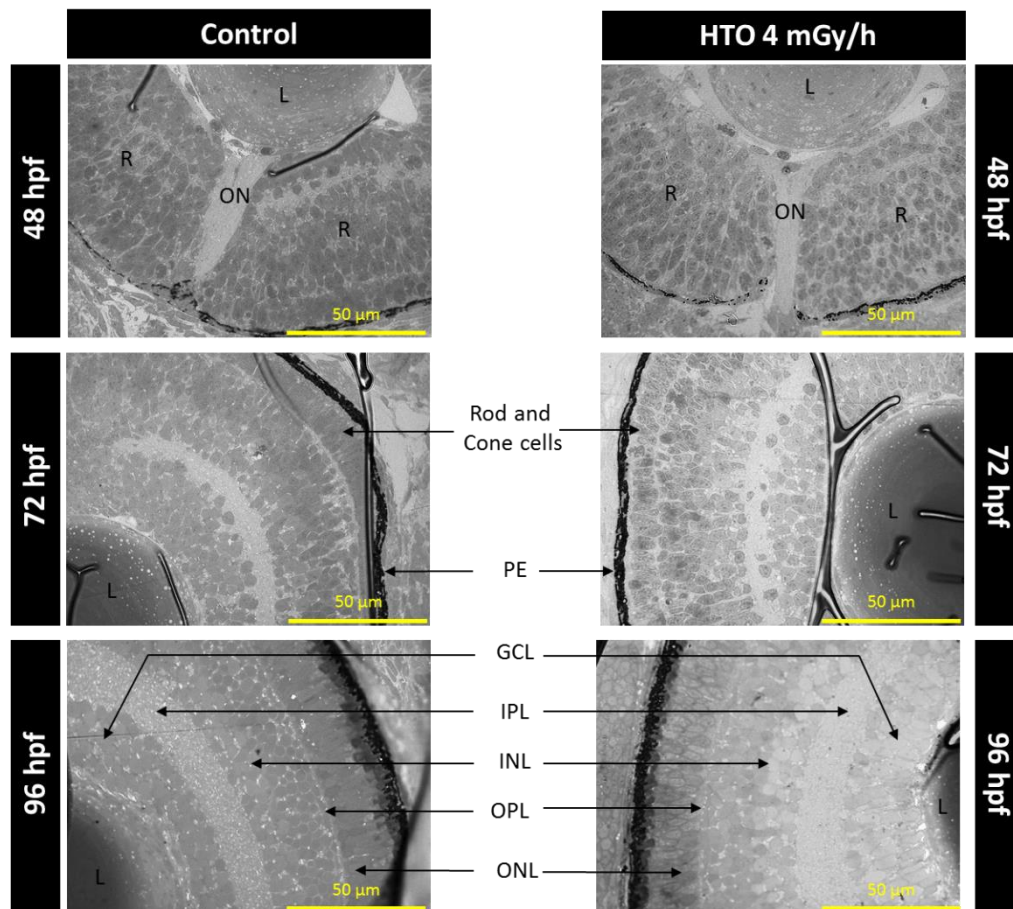




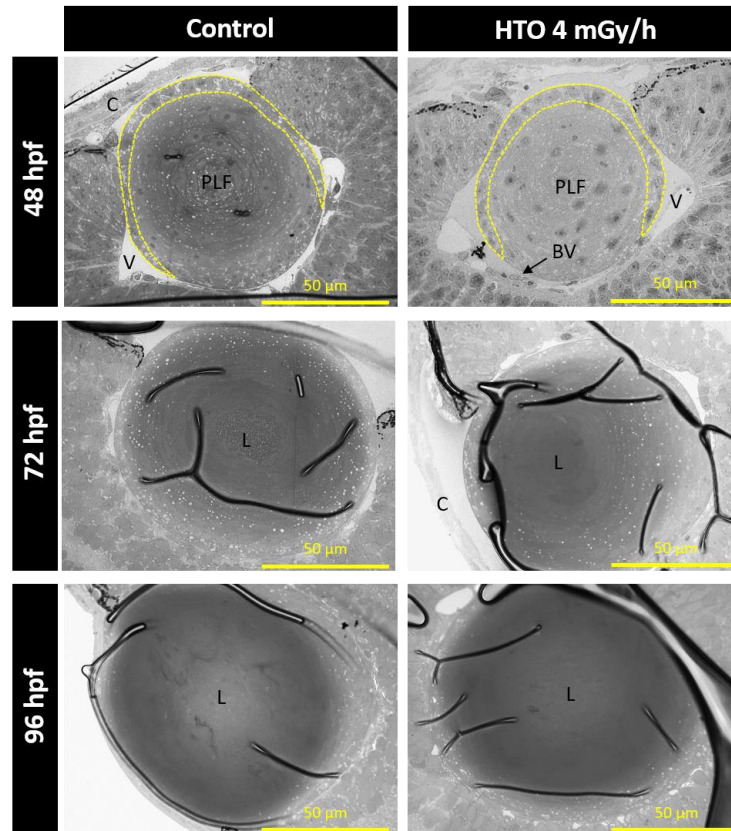
**Figure 5:** Velocity (mm/s) of 96 hpf larvae one second before (white bars) and one second after the tactile stimulus (grey bars). The left bar plot represents control and contaminated 96 hpf larvae for the 0.4 mGy/h dose rate. Right bar plot represents control and contaminated 96 hpf larvae for the 4 mGy/h dose rate. \* Permutation test,  $p < 0.05$ .



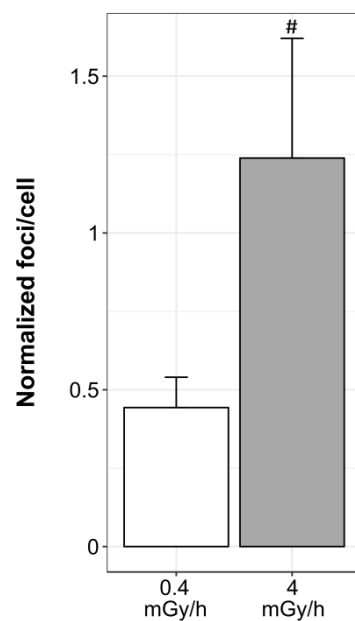
**Figure 6:** Delta of the response of the tactile stimulus (delta = after - before) in control (white bars) and contaminated (grey bars) 96 hpf larvae exposed at 0.4 mGy/h (left bar plot) and 4 mGy/h (right bar plot). \* Permutation test,  $p < 0.05$ .



**Figure 7:** histological sections of control (left) and contaminated (right, 4 mGy/h) retina of 48 hpf, 72 hpf and 96 hpf larvae (from top to bottom). At 48 hpf (top), the lens (L) and the optic nerve (ON) are visible, but the retina (R) layers are not distinguishable. At 72 hpf and 96 hpf (middle and bottom), the five retinal layers are well visible: ganglion cell layer (GCL), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear cell layer (INL), outer plexiform layer (OPL) and outer nuclear layer (ONL) containing rod and cone cells. The most outer layer in retina is the pigmented epithelium (PE). In all panels ventral is down.



**Figure 8:** histological sections of control (left) and contaminated (right, 4 mGy/h) lens of 48 hpf, 72 hpf and 96 hpf larvae (from top to bottom). At 48 hpf (top), the lens is formed of a monolayer of epithelial cells (dashed yellow lines) and primary lens fibers (PLF) with visible nucleus. The cornea (C), the vitreous cavity (V) and blood vessels (BV) are also visible. At 72 hpf the lens fiber shows a more elongated pattern and at 96 hpf, the lens (L) show a more homogeneously pattern. In all panels ventral is down.



**Figure 9:** normalized gamma-H2AX foci per cell ratio in 24 hpf eggs exposed at 0.4 mGy/h (white bar) and 4 mGy/h (grey bar) of HTO.

---

## Conclusion générale et perspectives de recherche

---



## 1. Conclusion générale

Ces travaux de thèse avaient pour objectif d'évaluer les modes d'action toxique du tritium sous sa forme libre, l'eau tritiée (HTO), via l'utilisation des stades de développement précoces d'un modèle de vertébré aquatique : le poisson zèbre, *Danio rerio*. Dans un premier temps, et afin d'évaluer le plus précisément possible la dose absorbée, un protocole permettant la mesure de l'activité en tritium total et en tritium lié à la matière organique (TOL total) a été développé. Une fois la dose absorbée caractérisée, les effets de l'exposition à l'HTO ont été étudiés. Une démarche intégrant les effets à différents niveaux d'organisation biologique a été utilisée pour mieux comprendre les mécanismes qui les lient. Les effets ont dans un premier temps été évalués à l'échelle moléculaire via une analyse sans *a priori* de la modulation de l'expression des gènes (mRNAseq). Des observations au niveau des tissus musculaires, des yeux ainsi que des analyses comportementales ont par la suite été réalisées en lien avec les effets trouvés à l'échelle moléculaire.

### 1.1. La caractérisation de la dose absorbée : donnée indispensable pour l'évaluation du risque environnemental

Une partie des résultats acquis lors de ce travail de thèse s'est concentrée sur la caractérisation de la dose absorbée. Cette caractérisation est une étape indispensable dans le processus d'évaluation du risque environnemental. En effet, elle permet de faire le lien entre les effets observés et la dose absorbée. Pour caractériser au mieux la dose absorbée, un protocole robuste et reproductible permettant la mesure du tritium total a été validé. Les données acquises ont permis le calcul des débits de dose pour chaque stade de développement (24 et 96 hpf), et a permis de montrer qu'ils étaient cohérents avec ceux attendus de 0,4 et 4 mGy/h. En plus de permettre la mesure du tritium total, ce protocole a également permis la mesure du TOL total et par conséquent de calculer la part de tritium libre dans les tissus (TFWT). La mesure de ces différentes formes a permis de confirmer que les processus d'internalisation étaient rapides pour le tritium total et le TFWT, et plus lents pour le TOL total, spécialement dans notre étude où la contamination n'a lieu que via l'eau tritiée. Dans leur ensemble, les résultats obtenus contribuent à compléter les données sur le comportement du tritium et

apportent un outil permettant la mesure de l'activité en tritium dans des organismes de petite taille ne pouvant pas, ou difficilement, être analysés via une méthode de mesure plus classique (i.e. lyophilisation/combustion).

Malgré le fait qu'un protocole ait été mis en place et permette une mesure robuste de l'activité en tritium, des limites subsistent. En effet, la préparation des échantillons reste une étape longue qui pourrait faciliter les échanges isotopiques entre les organismes et le milieu ambiant moins concentré en tritium. La prise en compte de ces échanges lors de la préparation des échantillons est indispensable. En effet, ces échanges peuvent biaiser les mesures d'activité en induisant une sur- ou une sous-estimation de cette dernière ce qui a un impact sur le calcul du débit de dose. Les effets observés seraient alors, à tort, reliés à un débit de dose non représentatif de la véritable exposition des organismes. Le fait que la préparation des échantillons soit une étape longue induit également que le nombre d'individus analysés est limité. Pour augmenter le nombre d'échantillons, des améliorations de la technique de prélèvement pourraient être envisagées. L'étape consistant à retirer le  $^3\text{H}$  adsorbé pourrait se faire sur des pools d'organismes plutôt qu'individuellement par exemple. Cependant, le protocole de mesure semble suffisamment robuste pour donner des résultats avec une faible variabilité biologique. Ceci pourrait être expliqué dans notre étude via d'une part la répétabilité du protocole, mais également le fait que les organismes soient synchronisés ce qui diminue la variabilité interindividuelle. Des variations biologiques plus importantes pourraient être observées lors de mesures sur des organismes issus de campagnes de terrains par exemple. Concernant la discrimination des formes du tritium, le protocole décrit dans cette thèse ne permet pas de différencier le TOL dit « échangeable » et « non échangeable ». Le TOL dit « échangeable » est capable de réaliser des échanges isotopiques rapides avec le milieu environnant, qu'il s'agisse d'HTO ou d'un milieu pauvre en tritium. En revanche, le TOL dit « non échangeable » a un temps de résidence plus long dans les tissus, il a donc potentiellement plus d'impact sur les organismes (Galeriu et al., 2008). C'est pourquoi il pourrait être intéressant de discriminer ces formes.

Comme évoqué précédemment, une caractérisation de la dose à l'organisme la plus précise possible est une donnée essentielle dans la démarche d'évaluation du risque environnemental. En effet, cette caractérisation permet de relier les effets observés à toutes les échelles biologiques à une dose absorbée et ainsi évaluer le risque face à l'exposition aux

radionucléides. Lors de ce travail de thèse, la mise au point d'un protocole permettant cette mesure sur des œufs et des larves de poisson zèbre a permis de relier une dose absorbée à des effets observés depuis la molécule jusqu'à l'individu. De plus, les résultats obtenus via le protocole développé lors de cette thèse sont cohérents avec ceux de la littérature utilisant une méthode de mesure plus classique (lyophilisation/combustion), permettant de valider la robustesse de notre protocole.

## 1.2. Faire le lien entre les échelles biologiques : une étude intégrative de la molécule à l'individu

La seconde partie de cette thèse s'est focalisée sur les effets et les modes d'action du tritium. Les résultats acquis via l'analyse du transcriptome ont mis en évidence une modulation de l'expression de gènes impliqués dans des processus comme la contraction musculaire ou le développement de l'œil (24 hpf) et le cycle circadien ou la réponse face au stress oxydatif (96 hpf). Pour mettre en évidence les liens entre les effets précoces observés à l'échelle moléculaire et ceux observés plus tardivement à des échelles supérieures, des analyses au niveau des tissus, des organes et des individus ont été réalisées en se concentrant sur les effets sur les muscles, l'œil et la réparation des dommages à l'ADN. Sur les tissus, quelques altérations des fibres musculaires ont été reportées. Pour les effets individuels, le comportement de nage des larves a été étudié et a mis en évidence des effets après 0,4 mGy/h avec une diminution de la vitesse de nage et une réponse moins importante face à un stimulus tactile. Un immunomarquage sur des embryons entiers à 24 hpf a permis de mettre en évidence l'augmentation de marqueurs précoces du processus de réparation des cassures double brins de l'ADN (foyers gamma-H2AX) à 4 mGy/h par rapport à 0,4 mGy/h.

Globalement, les données acquises dans cet axe de la thèse montrent qu'il est pertinent de réaliser des études intégratives. En effet, les observations réalisées sur le comportement des organismes étaient initialement basées sur le fait que l'analyse de l'expression des gènes avait mis en évidence une modulation de gènes impliqués dans la contraction musculaire. Or, ces effets ne semblent pas pouvoir expliquer à eux seuls les observations à l'échelle individuelle ce qui ouvre une nouvelle voie d'investigation portant sur les effets neurotoxiques de l'exposition au tritium. De plus, les effets plus prononcés au plus faible débit de dose par



rapport au plus fort débit de dose testé, notamment concernant le comportement de nage ou les dommages à l'ADN, pourraient orienter les recherches vers les capacités de réponse des organismes face aux stress appliqués après l'exposition à l'HTO. En effet, de meilleures capacités de réponse face aux dommages induits par l'exposition à 4 mGy/h d'HTO pourraient en partie expliquer les effets plus prononcés au faible qu'au plus fort débit de dose.

Dans cette étude, le recoupement des effets observés de la molécule à l'individu ouvre sur des voies de recherche qui n'avaient pas été mises en évidence via l'analyse moléculaire. Cependant, la précocité, la représentativité biologique ainsi que la sensibilité des marqueurs utilisés peuvent être questionnées. En effet, bien que plus pertinentes d'un point de vue écologique, les observations microscopiques réalisées dans le cadre de ce travail sont difficiles à analyser de façon quantitative. Des méthodes pourraient être appliquées pour tenter de quantifier les dommages. De plus, les analyses comportementales, bien que réalisées avec du matériel dédié et spécifique au poisson zèbre, peuvent être influencées par de nombreux facteurs pouvant masquer les effets de la contamination comme la période de la journée à laquelle les analyses sont réalisées ou la taille ainsi que la forme des puits dans lesquelles les larves sont placées (MacPhail et al., 2009; Padilla et al., 2011).

### 1.3. La radiotoxicité du tritium

#### 1.3.1. Comparaison entre contamination à l'HTO et irradiation gamma : intérêt pour l'évaluation du risque

Bien que le tritium soit considéré comme un élément faiblement radiotoxique, l'évaluation de ses effets sur les organismes non-humains regagne de l'importance au vu de l'augmentation potentielle de ses rejets dans l'environnement via notamment les projets de recherche en cours sur la fusion thermonucléaire contrôlée (ASN, 2010). Pour évaluer le risque lié à l'exposition à un radionucléide, il est important de considérer que les effets dus à l'exposition dépendent notamment du type de rayonnement et de la sensibilité de l'organisme ou de l'organe exposé. Pour évaluer l'efficacité d'un rayonnement, il est nécessaire de le comparer à un rayonnement de référence, généralement le rayonnement gamma. Cette comparaison sert ensuite à l'estimation de l'efficacité biologique relative (EBR), qui servira par la suite à estimer un facteur de pondération qui sera utilisé lors du calcul des débits de dose. Une sur- ou une sous-estimation de l'EBR pourrait donc conduire au calcul d'une dose absorbée

n'étant pas représentative de la réalité. Relier cette dose absorbée à un effet observé pourrait avoir un impact sur l'évaluation du risque en sur- ou sous-estimant l'impact radiotoxique d'un radionucléide. Un EBR de 3 est généralement considéré pour les émetteurs de faible énergie comme le tritium. Des EBR compris entre 0,06 et 14,9 avec une moyenne de 3,1 ( $\pm 3,7$ ) ont été calculés par rapport au rayonnement gamma pour des effets portant sur la reproduction, le développement ainsi que les dommages à l'ADN sur des vertébrés et invertébrés aquatiques (Adam-Guillermin et al., 2012b). Cependant, il n'existe pas de consensus dans la communauté scientifique sur la valeur d'EBR à appliquer pour le tritium. C'est pourquoi l'IRSN, en parallèle de travaux sur le tritium comme cette thèse ou le GGP-Environnement, développe des projets de recherche sur les effets des rayonnements gamma sur les stades embryon-larvaire du poisson zèbre (notamment la thèse de Sophia Murat El Houdigui). Le croisement des données entre ces différents projets servirait à compléter les données existantes d'EBR pour le tritium et ainsi permettre une meilleure estimation du risque lié à son exposition.

Lors de ce travail de thèse, l'attention s'est portée sur les effets sur le muscle, sur la vision et sur les processus de réparation des dommages à l'ADN. Les débits de dose ont été calculés via l'utilisation de coefficients de dose calculé via le logiciel EDEN v3 développé par l'IRSN (Beaugelin-Seiller et al., 2006) qui applique un facteur de pondération de 3 pour le tritium. Afin de pouvoir comparer les effets induits par l'exposition au tritium et l'irradiation gamma, il est donc nécessaire de prendre en compte cette pondération. Les débits de dose ainsi que les doses totales issus des expérimentations  $^3\text{H}$  ont donc été divisés par 3 pour permettre cette comparaison. Lorsque l'on compare ces données avec la littérature portant sur les effets de l'irradiation gamma sur les stades embryon-larvaires du poisson zèbre, le même type d'effets est retrouvé. En effet, des altérations au niveau des filaments de myosine ont été observées chez des larves de poisson zèbre. Ces altérations, bien plus prononcées qu'après la contamination au tritium, sont apparues pour une dose totale plus faible : 3,3 mGy ( $^{137}\text{Cs}$ ) alors que seulement de rares altérations étaient visibles après la contamination avec l'HTO pour une dose totale de 12,4 mGy (Arcanjo et al., 2018; Gagnaire et al., 2015a). Des altérations au niveau du développement de l'œil ont également été observées chez des larves après irradiation gamma pour une dose totale de 620 mGy ( $^{60}\text{Co}$ ) (Hurem et al., 2017). Dans le cas du tritium, aucun effet n'a été mis en évidence sur le développement de l'œil via les observations microscopiques, mais la modulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement de l'œil a été mise en évidence dès 2,8 mGy (Arcanjo et al., 2018). Après la contamination au

tritium, une augmentation des dommages à l'ADN a été mise en évidence à 2,8 et 12,4 mGy, aucune différence n'a été observée pour des doses plus importantes (Gagnaire et al., 2016). Une augmentation des dommages après irradiation gamma ( $^{137}\text{Cs}$ ) a également été observée, mais dès 0,082 mGy jusqu'à 570 mGy puis une diminution des dommages a été observée à 2280 mGy (Gagnaire et al., 2015a). A 620 mGy ( $^{60}\text{Co}$ ), aucune différence en termes de dommages à l'ADN n'a été mise en évidence chez des larves de poisson zèbre par rapport aux témoins (Hurem et al., 2017).

Dans l'ensemble, il apparait que ces deux modes d'exposition ( $\beta$  et  $\gamma$ ) partagent certains modes d'actions. Cependant, il semble que les effets sur le muscle, les yeux ou les dommages à l'ADN soient plus prononcés après irradiation gamma, ce qui remet en cause un EBR de 3 pour le tritium. Cependant, il est délicat de comparer des données acquises pour des temps d'irradiation différents, commençant à des âges de larves différents et avec parfois des écarts de dose importants. Pour pouvoir comparer de façon plus précise les données issues de ces travaux de thèse, il serait intéressant de réaliser le même type d'expérimentation après irradiation gamma.

### 1.3.2. Les relations non-monotones après exposition à l'HTO

Dans le cadre de cette thèse et dans le cadre du projet GGP-Environnement, trois débits de dose ont été étudiés (0,04 ; 0,4 et 4 mGy/h) dès 24 hpf et jusqu'à 240 hpf. Les effets observés pour l'ensemble des débits de dose et l'ensemble des stades sont présentés dans le [Tableau 2](#) (Gagnaire et al., 2017b). Avec l'augmentation de la dose absorbée, on pourrait s'attendre à observer une augmentation linéaire des effets. Or, lorsque l'on compare les réponses obtenues pour les 3 débits de dose testés, on remarque que, pour certains effets étudiés, les effets suivent une tendance non-monotone plutôt que linéaire. Ce type de relation est défini comme une relation dose-réponse dont la pente change de direction en fonction de la gamme de dose testée (Lagarde et al., 2015). C'est notamment le cas pour les dommages à l'ADN avec aucun effet observé pour le plus faible et le plus fort débit de dose mais avec une augmentation des dommages au débit de dose intermédiaire ([Tableau 2](#)). Des effets transitoires ont également été mis en évidence pour les paramètres développementaux ([Tableau 2](#)). De plus, lors de l'analyse du transcriptome, une sur-expression de gènes impliqués dans la contraction

musculaire et le développement de l'œil a été observée à 0,4 mGy/h alors qu'une sous-expression de ces mêmes gènes a été mise en évidence à 4 mGy/h (Arcanjo et al., 2018). Dans le cas des perturbateurs endocriniens, un ensemble d'hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer l'observation de réponses non-monotones en fonction de la dose. Certaines d'entre elles pourraient être avancées dans le cas de l'exposition au tritium, notamment l'hypothèse de la pluralité des cibles moléculaires (Lagarde et al., 2015). Cette hypothèse se base sur le fait que les réponses à de faibles et de fortes doses sont différentes car les cibles moléculaires pourraient être touchées/activées de façon différentielle en fonction de la dose, et ainsi produire des effets différents. Des effets métaboliques pourraient également expliquer les réponses opposées observées. Dans le cas des perturbateurs endocriniens, les effets produits par les parents et les métabolites peuvent être opposés et la saturation du système métabolique à forte dose pourrait favoriser les effets des parents plutôt que ceux des métabolites (Lagarde et al., 2015). Dans le cas du tritium, le TOL se forme via l'HTO par des processus métaboliques dans les organismes, on pourrait alors faire l'hypothèse que l'impact d'une gamme de dose sur ces processus métabolique pourrait mener à l'observation d'effets opposés en fonction de la dose. Cependant, la réponse non-monotone que l'exposition à l'HTO semble induire doit être vérifiée, notamment via l'ajout de débits de dose, car il semble difficile de conclure à l'observation d'une relation non-monotone avec un nombre de dose testées inférieur ou égal à trois (Lagarde et al., 2015). De plus, il est raisonnable de penser que les relations non-monotones observées peuvent être liées à des effets compensatoires en fonction des débits de dose plutôt que des effets néfastes opposés (Lagarde et al., 2015).

Dans le cadre de l'évaluation du risque, bien que les relations non-monotones ne fassent pas encore consensus, elles semblent importantes à prendre en compte notamment lors de l'utilisation de seuils de protection. En effet, dans le cas des courbes dose-réponse en forme de U ou en cloche, il est difficile de définir le seuil sans effets observés (NOAEL) ou la plus petite dose pour laquelle des effets sont observés (LOAEL), alors que les effets à de faibles et de fortes doses peuvent être opposés.

### 1.3.3. Comparaison entre les effets d'une contamination à l'HTO et d'une forme liée à la matière organique

A l'instar de la détermination d'une dose absorbée la plus précise possible, la prise en compte des potentielles différences de toxicité du tritium sous ses formes libres et liées à la matière organique (TOL) est importante lors de l'évaluation du risque. En effet, le TOL possède une demi-vie biologique plus importante que le tritium sous sa forme libre et une fois dans l'organisme il va pouvoir se lier à différentes biomolécules, comme l'ADN et les protéines, et de ce fait avoir des effets plus délétères que le tritium libre (Galeriu et al., 2008).

Chez la moule commune, *M. edulis*, les effets d'une exposition à de l'HTO et à de la glycine tritiée (T-Gly) ont été étudiés chez des adultes (Jaeschke et al., 2011). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité en tritium dans l'ADN pour les moules exposées à la T-Gly par rapport aux moules uniquement exposées à l'HTO. L'impact de cette incorporation a été évalué via le test des micronoyaux et a mis en évidence que l'exposition à la T-Gly était 15 fois plus génotoxique que l'exposition à l'HTO. Dans le cadre du projet GGP-Environnement réalisé en parallèle de ce travail de thèse, des expositions à la thymidine tritiée (T-Thym) ont été réalisées sur des œufs et des larves de poisson zèbre (Adam-Guillermin et al., 2012a). Les expositions ont été réalisées avec des débits de dose allant de 0,125 à 3,5 mGy/h. Au niveau des paramètres développementaux, un retard d'éclosion a été mis en évidence ainsi qu'une augmentation du pourcentage d'anomalies du développement pour les deux plus forts débits de dose, 0,625 et 3,5 mGy/h (Adam-Guillermin et al., 2012a). Pour des débits de dose de 0,4 et 4 mGy/h après exposition à l'HTO, aucun effet sur l'éclosion et des effets transitoires en terme d'anomalie du développement ont été rapportés (Gagnaire et al., 2016). En termes de dommages à l'ADN, une exposition à 3,5 mGy/h de T-thym induit une augmentation des cassures mesurées via le test des comètes sur des larves à 96 hpf, de plus il a été montré que la quasi-totalité de la T-thym avait été incorporée à l'ADN (Adam-Guillermin et al., 2012a). Pour le même stade, une augmentation des cassures a été observée après une exposition à 0,4 mGy/h d'HTO, cependant aucun effet n'a été mis en évidence à 4 mGy/h (Gagnaire et al., 2016).

Dans l'ensemble, ces données semblent montrer que les formes de tritium liées à la matière organique sont capables de s'incorporer à l'ADN et sont plus radiotoxiques que l'exposition via l'HTO seulement. Cependant, il serait intéressant de compléter ces données car

peu d'étude portent sur la comparaison des effets entre l'HTO et une forme liée à la matière organique.

**Tableau 2** : Comparaison des résultats obtenus après exposition à l'HTO à 0,04 ; 0,4 et 4 mGy/h chez les œufs et les larves de poisson zèbre.

Stade	24 hpf			96 hpf			168 hpf		240 hpf	
Débit de dose (mGy/h)	0,04	0,4	4	0,04	0,4	4	0,4	4	0,4	4
Dose totale (mGy)	0,096	0,96	9,6	0,39	3,9	39	67	670	96	960
Effets										
Ecllosion	∅	∅	∅	-	-	-	-	-	-	-
Domages à l'ADN	∅	HTO>T	∅	HTO<T	HTO>T	∅ (2016) HTO>T (2017)	∅	∅	∅	∅
Histologie muscle	-	-	-	Rares altérations	Rares altérations	Altérations ± nombreuses	Altérations importantes des mitochondries	Altérations importantes des mitochondries	Altérations importantes des mitochondries	ND
Indice de production des ROS	-	-	-	∅	HTO > T (2016) ∅ (2017)	∅	∅	∅	∅	∅
Développement	Diam.>T	∅	Diam.>T Diam. RV>T	Long.<T Diam. RV>T	Long.<T Diam. RV<T	∅	Diam. RV<T	Diam. RV>T	Diam. RV>T	ND

∅ : pas d'effet observé

ND : donnée non acquise pour le moment

- : donnée non acquise pour le stade de développement considéré

## 2. Perspectives de recherche

### 2.1. Améliorer les connaissances sur le comportement du tritium

Lors de ce travail de thèse, un protocole robuste et reproductible permettant de réaliser une mesure précise de l'activité dans les œufs et les larves de poisson zèbre a été développé. Cependant, comme abordé précédemment, il existe des limites à ce protocole notamment le fait qu'il ne permette pas de discriminer les formes organiquement liées du tritium (TOL). Pour pallier ce problème, une étape de rinçage de la matière sèche avec de l'eau pauvre en tritium pourrait être ajoutée au protocole afin de retirer le TOL dit « échangeable », ce qui permettrait de mesurer le TOL dit « non échangeable ». Dans le cadre de ce travail de thèse, la discrimination des formes de TOL serait intéressante pour pouvoir mieux cibler les effets à étudier. En effet, pour le calcul du débit de dose, le tritium est considéré comme étant réparti de façon homogène, or cette hypothèse n'est pas forcément applicable dans le cas du TOL, notamment le TOL dit « non-échangeable ». En effet cette forme peut se fixer sur des biomolécules, il serait donc intéressant de réaliser des mesures d'activités à l'échelle subcellulaire, ADN et protéines par exemple. Si ces mesures mettent en évidence une fixation préférentielle sur une biomolécule plutôt qu'une autre, il serait intéressant de se focaliser sur les effets de cette fixation préférentielle.

En termes de cinétique, il serait intéressant de compléter les données acquises avec des points de mesures plus précoces, notamment entre 4 hpf et 24 hpf pour le tritium total afin de mieux situer le début du plateau. Il serait aussi intéressant de compléter la cinétique, pour les deux formes (tritium total et TOL), avec des temps plus longs. Ces données sont d'ores et déjà en cours d'acquisition via un projet cofinancé par l'IRSN et par EDF, le GGP Environnement. Ce projet s'est tenu en parallèle de ce travail de thèse et a, entre autres, utilisé des stades de développement plus tardifs (7 et 10 jpf) pour améliorer les connaissances sur le comportement du tritium. En plus des données d'internalisation, des données d'élimination du tritium total et du TOL pour les deux formes pourraient venir compléter les données déjà acquises ou en cours d'acquisition et ainsi participer à l'amélioration des connaissances sur le comportement du tritium dans les organismes.



## 2.2. Compléter les données acquises sur les effets et explorer de nouvelles voies de signalisation

Dans le cadre de ce travail de thèse, les effets d'une exposition à de l'eau tritiée ont été évalués à différents niveaux d'organisation biologiques allant de la molécule à l'individu. A l'échelle moléculaire, il serait pertinent d'aller plus loin dans l'analyse des données de mRNAseq. En effet, la liste de gènes différentiellement exprimés pourrait être utilisée pour identifier des facteurs de transcription pouvant expliquer les modulations d'expression de gènes mis en évidence lors de l'analyse du transcriptome. De plus, il serait intéressant de réaliser une analyse portant sur l'expression des protéines, les molécules effectrices des cellules, et de croiser ces données avec celles de transcriptomique. En effet, la modulation de l'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes ne signifie pas forcément que l'expression des protéines codées par ces gènes sera modulée. Une analyse protéomique est d'ores et déjà en cours via le projet GGP se tenant en parallèle de cette thèse mais sur des stades de développement plus tardifs (7 et 10 jpf). Ces résultats seront à croiser avec les données acquises et en cours d'analyse pour les mêmes stades au niveau du transcriptome.

A l'échelle de l'organisme, il est nécessaire de confirmer les données acquises en termes de comportement (mouvements spontanés et nage) et de physiologie (battement cardiaque). En effet, par manque de temps, ces données ne reposent que sur une seule expérimentation. Il serait également intéressant de réaliser un test portant sur le comportement de nage des larves en alternant des périodes de lumière et d'obscurité. En effet, une modulation de certains gènes impliqués dans le cycle circadien a été mise en évidence via l'analyse du transcriptome. La modulation de ces gènes pourrait entraîner des réponses aberrantes lors de ce test. De plus, au vu des résultats acquis sur le comportement de nage, il serait intéressant d'explorer la neurotoxicité du tritium. Des analyses se focalisant sur la jonction neuromusculaire ou encore la capacité des motoneurones à innerver les muscles pourrait être réalisées, notamment via un marquage immunofluorescent.

Enfin, sur du plus long terme, des expérimentations sur le poisson adulte pourraient être réalisées pour tester notamment les effets reprotoxiques de l'exposition au tritium. L'utilisation de poissons adultes pourrait également servir à élargir la palette de biomarqueurs par rapport aux stades embryo-larvaire. Il serait également intéressant de tester les effets de

formes organiquement liées. Une thèse dans ce sens est proposée pour l'horizon 2020 et servira à compléter les données acquises lors de ce présent travail ainsi que d'élargir la palette d'effets étudiés sur poissons adultes afin d'améliorer les connaissances sur les modes d'action du tritium à différents stades chez le poisson zèbre.

# Valorisation scientifique

---

## Publications scientifiques

Arcanjo, C., Armant, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Simon, O., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2018. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. *Aquatic Toxicology* 200, 114-126.

Arcanjo, C., Maro, D., Simon, O., Cavalie, I., Camilleri, V., Beaugellin-Seiller, K., Carasco, L., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., Assessing tritium internalization and dose rate in zebrafish early life stages: importance of rapid isotopic exchange. *Soumis Journal of Environmental Radioactivity*

Arcanjo, C., Murat El Houdigui, S., Loro, G., Della-Vedova, C., Cavalie, I., Camilleri, V., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure. *In prep*

## Communications orales

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

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

SETAC Europe, 2017, Bruxelles, Belgique.

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

EcoBim, 2018, Bordeaux, France.

## Communications affichées

Journées des thèses de l'IRSN, 2016, Le Croisic, France.

Congrès de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement, 2016, Aix-en-Provence, France.

## Livrables scientifiques

Gagnaire B., Arcanjo C., Cavalié I., Simon O., Floriani M., Camilleri V., Orjollet D., Adam-Guillermin C. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielles de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides : application au tritium et à l'irradiation gamma, 2016, GGP-Environnement.

Gagnaire B., Arcanjo C., Camilleri V., Cavalié I., Floriani M., Camilleri V., Frelon S., Orjollet D., Simon O., Adam-Guillermin C. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielles de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides : application au tritium et à l'irradiation gamma, 2017, GGP-Environnement.

# Références

---

- Abbot, D., Mix, M., 1979. Radiation Effects of Tritiated Seawater on Development of the Goose Barnacle, *Pollicipes polymerus*. *Health Phys.* 36, 283–287.
- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Cavalie, I., Orjollet, D., 2012a. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides - application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fich V1-102).
- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-vedova, C., Hinton, T., Garnier-laplace, J., 2012b. Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 67–103. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3414-6>
- Ahmad, F., Noldus, L.P.J.J., Tegelenbosch, R.A.J., Richardson, M.K., 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149, 1241–1281. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003020>
- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2015. Gene set enrichment analysis with topGO 27.
- Alonzo, F., Bradshaw, C., Della-Vedova, C., Lecomte, C., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., Hertel-Aas, T., Hinton, T., Horemans, N., Oughton, D.H. Rudolfsen, G., Salbu, B., Vandenhove, H., 2011. Plans for laboratory radiation effects studies. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4239.7606>
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741.
- Arcanjo, C., Armant, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Simon, O., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2018. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. *Aquat. Toxicol.* 200, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.012>
- Arnot, J.A., Gobas, F.A., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/a06-005>
- Asharani, P. V., Lianwu, Y., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 5, 43–54. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489207>
- ASN, 2010. Livre Blanc du Tritium.
- Baeza, A., García, E., Paniagua, J.M., Rodríguez, A., 2009. Study of the comparative dynamics of the incorporation of tissue free-water tritium (TFWT) in bulrushes (*Typha latifolia*) and carp (*Cyprinus carpio*) in the Almaraz nuclear power plant cooling reservoir. *J. Environ. Radioact.* 100, 209–214.
- Bagatto, B., Pelster, B., Burggren, W.W., 2001. Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. *J. Exp. Biol.* 204, 4335–4343.
- Barron, A., McDonald, J.E., Hughes, W.F., 1970. Long-term complications of beta-radiation therapy in ophthalmology. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 68, 113–128.
- Barut, B.A., Zon, L.I., 2000. Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease. *Physiol. Genom.* 2, 49–51.
- Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., Børseth, J.F., 2001. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in

- semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1175–1184. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200606>
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: Principles, computerization, and application. *Health Phys.* 90, 485–493. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000182192.91169.ed>
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.-L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5, 111.
- Belot, Y., Roy, M., Métivier, H., 1996. *Le tritium, de l'environnement à l'homme*, IPSN, Les éditions de physique, ISBN.
- Brockerhoff, S.E., Hurley, J.B., Janssen-bienholdt, U., Neuhauss, S.C.F., Driever, W., Dowling, J.E., 1995. A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Neurobiology* 92, 10545–10549.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P., 2003. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol.* 97, 77–86.
- Burke, A.K., Maday, S.L., Rybicka, K.K., Sulcove, J.A., Ward, J., Huang, M.M., Barstead, R., Franzini-Armstrong, C., Allen, T.S.C., 2004. Disruption of *Caenorhabditis elegans* Muscle Structure and Function Caused by Mutation of Troponin I. *Biophys. J.* 86, 991–1001. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74174-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74174-0)
- Cahill, D., Yuile, C., 1970. Tritium: some effects of continuous exposure in utero on mammalian development. *Radiat Res* 44, 727–737. <https://doi.org/10.2307/3573152>
- Canadian Nuclear Safety, 2008. Standards and guidelines for tritium in drinking water.
- Carvan, M.J., Loucks, E., Weber, D.N., Williams, F.E., 2004. Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 757–768.
- CEA, 2002. *Livret la radioactivité : définition, origines et applications*.
- Chen, Y.-H., Huang, Y.-H., Wen, C.-C., Wang, Y.-H., Chen, W.-L., Chen, L.-C., Tsay, H.-J., 2008. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 440–447.
- Chhetri, J., Jacobson, G., Gueven, N., 2014. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research. *Eye* 28, 367–380. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.19>
- Copplestone, D., Hingston, J., Real, A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. *J. Environ. Radioact.* 99, 1456–1463. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.01.006>
- Corvi, R., 2002. Genomics: an in vitro toxicology point of view. *ATLA-NOTTINGHAM-* 30, 129–132.
- Dahm, R., Schonhaler, H.B., Soehn, A.S., van Marle, J., Vrensen, G.F.J.M., 2007. Development and adult morphology of the eye lens in the zebrafish. *Exp. Eye Res.* 85, 74–89. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.02.015>
- Dallas, L.J., Bean, T.P., Turner, A., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2016. Exposure to tritiated water at an elevated temperature: Genotoxic and transcriptomic effects in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Environ. Radioact.* 164, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.07.034>
- Dhakal, S., Stevens, C., Sebbagh, M., Weiss, O., Frey, R., Adamson, S., Shelden, E., Inbal, A., Stenkamp, D., 2015. Abnormal retinal development in cloche mutant zebrafish. *Dev. Dyn.* 244, 1439–1455. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24322>
- Diabate, S., Strack, S., 1993. Organically bound tritium. *Health Phys.* 65, 698–712.
- Dooley, K., Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 252–256. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5)

- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68, 85–111.
- Ducros, L., Eyrolle, F., Della Vedova, C., Charmasson, S., Leblanc, M., Mayer, A., Babic, M., Antonelli, C., Mourier, D., Giner, F., 2018. Tritium in river waters from French Mediterranean catchments: Background levels and variability. *Sci. Total Environ.* 612, 672–682.
- Eaton, R.C., Farley, R.D., Kimmel, C.B., Schabtach, E., 1977. Functional development in the Mauthner cell system of embryos and larvae of the zebra fish. *J. Neurobiol.* 8, 151–172.
- Erickson, R.C., 1971. Effects of chronic irradiation by tritiated water on *Poecilia reticulata*, the guppy. Washington Univ., Seattle. Lab. of Radiation Ecology.
- Etoh, H., Hyodo-Taguchi, Y., 1983. Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka Embryos. *Radiat. Res.* 93, 332–339. <https://doi.org/doi:10.2307/3575989>
- EU, 2013. Council Directive 2013/51/EURATOM of 22 October 2013. Laying down requirements for the protection of the health of the general public with regard to radioactive substances in water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union* 7, 56.
- Eyrolle-Boyer, F., Boyer, P., Claval, D., Charmasson, S., Cossonnet, C., 2014. Apparent enrichment of organically bound tritium in rivers explained by the heritage of our past. *J. Environ. Radioact.* 136, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.05.019>
- Ferrante, M.I., Kiff, R.M., Goulding, D.A., Stemple, D.L., 2011. Troponin T is essential for sarcomere assembly in zebrafish skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 124, 565–577. <https://doi.org/10.1242/jcs.071274>
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.
- Frayse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 253–267.
- Froger, A., Clemens, D., Kalman, K., Németh-Cahalan, K.L., Schilling, T.F., Hall, J.E., 2010. Two distinct aquaporin Os required for development and transparency of the zebrafish lens. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6582–6592. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5626>
- Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., Cavalie, I., Della-Vedova, C., Shultz, C., Kim, S.B., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., Farrow, F., Beaton, D., Tan, E., Wen, K., Stuart, M., 2017a. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Sci. Total Environ.* 599–600, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.210>
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Camilleri, V., Cavalie, I., Floriani, M., Frelon, S., Orjollet, D., Simon, O., Adam-Guillermin, C., 2017b. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielles de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201).
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalie, I., Simon, O., Floriani, M., Camilleri, V., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., 2016. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielles de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201).
- Gagnaire, B., Cavalie, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2015a. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 169, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.005>
- Gagnaire, B., Cavalie, I., Simon, O., Floriani, M., Camilleri, V., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., 2015b. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielles de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201).
- Galeriu, D., Davis, P., Raskob, W., Melintescu, A., 2008. Recent progresses in tritium

- radioecology and dosimetry. *Fusion Sci. Technol.* 54, 237–242.
- Galeriu, D., Heling, R., Melintescu, A., 2005. The dynamics of tritium-including OBT-in the aquatic food chain. *Fusion Sci. Technol.* 48, 779–782.
- Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailles, C., Beresford, N.A., Howard, B.J., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J. Radiol. Prot.* 30, 215–233. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/30/2/S02>
- Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie: définition, intérêt, limite, usage. *Sci. Eaux Territ.* 12–17.
- Giraudoux, P., Giraudoux, M.P., MASS, S., 2018. Package 'pgirmess.'
- Goishi, K., Shimizu, A., Najarro, G., Watanabe, S., Rogers, R., Zon, L., Klagsbrun, M., 2006. A-crystallin expression prevents -crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens. *Dev. Dis.* 133, 2585–2593. <https://doi.org/10.1242/dev.02424>
- Gonen, R., German, U., Alfassi, Z.B., Priel, E., 2014. Production of DNA Double Strand Breaks in Human Cells due to Acute Exposure to Tritiated Water ( HTO ). *Radiat. Prot.*
- Gudkov, D., Kipnis, L., 1996. Long-Term Effect of Tritiated Water on the Biological Indicators of *Daphnia magna*. *Hydrobiol. J.*
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.013>
- Higley, K.A., Kocher, D.C., Real, A.G., Chambers, D.B., 2012. RBE and radiation weighting factors as applied in the context of protection of the environment from ionising radiation.
- Higuchi, M., Komatsu, K., Mukade, A., 1980. Assessment of tritium effect on brine shrimp, *Artemia salina*, reared in a model ecosystem contaminated with tritiated water. *Radiat. Eff. Aquat. Org.* by Nobuo Egami.
- Hirayama, J., Cho, S., Sassone-Corsi, P., 2007. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: Catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15747–15752. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705614104>
- Howard, B.J., Larsson, C.M., 2008. The ERICA Integrated Approach and its contribution to protection of the environment from ionising radiation. *J. Environ. Radioact.* 99, 1361–1363. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.04.013>
- HPA, 2007. Review of Risks from Tritium. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation.
- Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., Dong, Q., 2010. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). *Aquat. Toxicol.* 98, 139–147. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Huang, W., Zhang, R., Xu, X., 2009. Myofibrillogenesis in the developing zebrafish heart: A functional study of *tnnt2*. *Dev. Biol.* 331, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.039>
- Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.K., Oughton, D., Aleström, P., Lyche, J.L., 2017. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Res.* 159, 564–578. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.053>
- Hyodo-taguchi, Y., Egami, N., 1977. Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated water. *Radiat. Res.* 71, 641–652.

- Hyodo-Taguchi, Y., Etoh, H., 1993. Vertebral Malformations in Medaka (Teleost Fish) after Exposure to Tritiated Water in the Embryonic Stage. *Radiat. Res.* 135, 400–404. <https://doi.org/10.2307/3578881>
- Hyodo-Taguchi, Y., Etoh, H., 1986. Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka : II Diminished Reproductive Capacity following Embryonic Exposure. *Radiat. Res.* 106, 321–330.
- Ichikawa, R., Suyama, I., 1974. Effects of tritiated water on the embryonic development of two marine teleosts. *Bull. Japan. Soc. Sc. Fish* 40, 819–824. <https://doi.org/10.2331/suisan.40.819>
- ICRP, 2012. Protection of the Environment under Different Exposure Situations. ICRP Publication 124. *Ann. ICRP* 43(1). <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2006.06.001>
- ICRP, 1977. Recommendations of the international commission on radiological protection.
- IRSN, 2017. Actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement.
- IRSN, 2015. Tritium et environnement.
- IRSN, 2012. Les bases de la radioactivité : Les unités de mesure.
- IRSN, 2009. Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique.
- Jaeschke, B.C., Bradshaw, C., 2013. Bioaccumulation of tritiated water in phytoplankton and trophic transfer of organically bound tritium to the blue mussel, *Mytilus edulis*. *J. Environ. Radioact.* 115, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.07.008>
- Jaeschke, B.C., Millward, G.E., Moody, A.J., Jha, A.N., 2011. Tissue-specific incorporation and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 159, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.033>
- Jang, Y.S., Lee, M.H., Lee, S.H., Bae, K., 2011. Cu/Zn superoxide dismutase is differentially regulated in period gene-mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.099>
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 586, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.05.008>
- Kim, S.B., Baglan, N., Davis, P.A., 2013a. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *J. Environ. Radioact.* 126, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.07.011>
- Kim, S.B., Shultz, C., Stuart, M., Festarini, A., 2015. Tritium uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked feed exposures simultaneously. *Appl. Radiat. Isot.* 98, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.01.020>
- Kim, S.B., Shultz, C., Stuart, M., McNamara, E., Festarini, A., Bureau, D.P., 2013b. Organically bound tritium (OBT) formation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked food exposure experiments. *Appl. Radiat. Isot.* 72, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.10.001>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kirchmann, R., Bonotto, S., Soman, S.D., Krishnamoorthy, T.M., Iyengar, T.S., Moghissi, A.A., 1979. Transfer and incorporation of tritium in aquatic organisms, in: *Behaviour of Tritium in the Environment*.
- Knowles, J.F., Greenwood, L.N., 1997. A comparison of the effects of long-term  $\beta$ - and  $\gamma$ -irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *J. Environ. Radioact.* 34, 1–7.



- Krishnan, N., Davis, A.J., Giebultowicz, J.M., 2008. Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.011>
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Asp. Fondam.* Masson, Paris 1–9.
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ. Heal.* 14, 13.
- Larsson, C.M., 2004. The FASSET Framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems - An overview. *J. Radiol. Prot.* 24. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/24/4A/001>
- Laskey, J., Parrish, J., Cahill, D., 1973. Some effects of lifetime Parental Exposure to Low Levels of Tritium on the F2 Generation. *Radiat. Res.* 56, 171–179. <https://doi.org/10.2307/3573801>
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture* 269, 1–20.
- Love, M.I., Anders, S., Huber, W., 2014. Differential analysis of count data - the DESeq2 package, *Genome Biology*. <https://doi.org/110.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowry Dobson, R., Cooper, M., 1974. Tritium toxicity: Effect of low-level 3HOH exposure on developing female germ cells in the mouse. *Radiat. Res.* 58, 91–100.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S., 2009. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* 30, 52–58.
- Mathur-De Vre, R., Binet, J., 1984. Molecular aspects of tritiated water and natural water in radiation biology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 43, 161–193.
- McHenry, M.J., Lauder, G. V, 2006. Ontogeny of form and function: locomotor morphology and drag in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Morphol.* 267, 1099–1109.
- Ménager, M.-T., Goyffon, M., Garnier-Laplace, J., 2009. Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. *BIOFUTUR* 295, 1.
- Mousseau, T.A., Møller, A.P., 2013. Elevated Frequency of Cataracts in Birds from Chernobyl. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066939>
- Nelson, V.A., 1971. Effects of ionizing radiation and temperature on the larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Washington Univ., Seattle. Lab of Radiation Ecology.
- OECD, 2013. Test No. 236: OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005>
- Parker, B., Connaughton, V.P., 2007. Effects of Nicotine on Growth And Development in Larval Zebrafish. *Zebrafish* 4, 59–68. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9994>
- Patzer, R.G., Moghissi, A.A., McNELIS, D.N., 1973. Accumulation of tritium in various species of fish reared in tritiated water. *Int. J. Radiat. Biol.* 13, 109–112. CONF-730503. Int. At. Energy Agency, Vienna 403–412.
- Pei, D.-S., Strauss, P.R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 743, 151–159.
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2831–2837.
- Perrichon, P., Akcha, F., Le Menach, K., Goubeau, M., Budzinski, H., Cousin, X., Bustamante, P.,

2015. Parental trophic exposure to three aromatic fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the zebrafish: Consequences for the offspring. *Sci. Total Environ.* 524–525, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.018>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Heisterkamp, S., Van Willigen, B., Maintainer, R., 2017. Package ‘nlme.’ Linear Nonlinear Mix. *Eff. Model.* version 1–3.
- Povinec, P.P., Aoyama, M., Biddulph, D., Breier, R., Buesseler, K., Chang, C.C., Golser, R., Hou, X., Jeřkovský, M., Jull, A.J.T., 2013. Cesium, iodine and tritium in NW Pacific waters—a comparison of the Fukushima impact with global fallout. *Biogeosciences* 10, 5481–5496.
- R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raeker, M.Ö., Russell, M.W., 2011. Obscurin depletion impairs organization of skeletal muscle in developing zebrafish embryos. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/479135>
- Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguan, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sébille, A., Beckmann, J.S., 2000. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I $\kappa$ B $\alpha$ /nuclear factor  $\kappa$ B pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.* 151, 1583–1590. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1583>
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. Double-stranded Brekas Induce Histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Rombough, P.J., 2007. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 148, 463–469.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., Hume, C.W., 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen London.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* 37, 622–632.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404.
- Sehnert, A.J., Huq, A., Weinstein, B.M., Walker, C., Fishman, M., Stainier, D.Y.R., 2002. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat. Genet.* 31, 106–110. <https://doi.org/10.1038/ng875>
- Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.002>
- Shiels, A., King, J.M., Mackay, D.S., Bassnett, S., 2007. Refractive defects and cataracts in mice lacking lens intrinsic membrane protein-2. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 500–508. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0947>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83, 13–34.
- Stuart, M., Festarini, A., Schleicher, K., Tan, E., Kim, S.B., Wen, K., Gawlik, J., Ulsh, B., 2016. Biological effects of tritium on fish cells in the concentration range of international drinking water standards. *Int. J. Radiat. Biol.* 92, 563–571. <https://doi.org/10.1080/09553002.2016.1222090>
- Suyama, I., Etoh, H., Maruyama, T., 1981. Effects of ionizing radiation on the early development of *Oryzias* eggs. *J. Radiat. ....* <https://doi.org/10.1269/jrr.22.125>
- Svoboda, K.R., Vijayaraghavan, S., Tanguay, R.L., 2002. Nicotinic receptors mediate changes in

- spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine. *J. Neurosci.* 22, 10731–10741.
- Ueno, A.M., 1974. Incorporation of tritium from tritiated water into nucleic acids of *Oryzias latipes* eggs. *Radiat. Res.* 59, 629–637.
- UNSCEAR, 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–717.
- Villeneuve, D.L., Crump, D., Garcia-Reyero, N., Hecker, M., Hutchinson, T.H., LaLone, C.A., Landesmann, B., Lettieri, T., Munn, S., Nepelska, M., 2014. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles. *Toxicol. Sci.* 142, 312–320.
- Walden, S.J., 1971. Effects of tritiated water on the embryonic development of the three-spine stickleback, *gasterosteus aculeatus linnaeus*. Washington Univ., Seattle. Lab. of Radiation Ecology.
- Wang, X., Dong, Q., Chen, Y., Jiang, H., Xiao, Q., Wang, Y., Li, W., Bai, C., Huang, C., Yang, D., 2013. Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 142, 104–113.
- Westerfield, M., 1995. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). University of Oregon press.
- Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., Ahmad, N., 2013. Circadian Rhythm Connections to Oxidative Stress: Implications for Human Health. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 192–208. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4889>
- Yarsan, E., Yipel, M., 2013. The important terms of marine pollution Biomarkers and biomonitoring, bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification. *J Mol Biomark Diagn S* 1, 2.
- Zhang, R., Yang, J., Zhu, J., Xu, X., 2009. Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4130–4140. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp362>

---

## Annexes

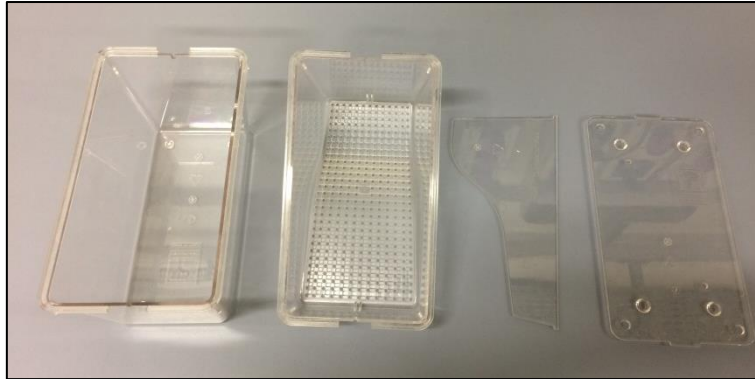
---

## Annexe 1 : Protocole de reproduction

---

### Matériel

- Bacs de reproduction (bac + plage + séparation + couvercle)

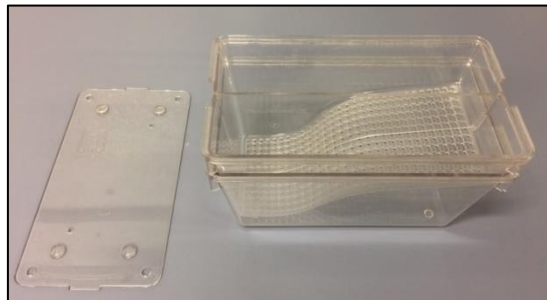


- Pichets de 5L
- Un 10<sup>ième</sup> bac (sans la plage et la séparation)
- Epuisette à maille fine pour retenir les œufs
- Milieu embryon (60 mg/L de sel de mer)

### Protocole

**La veille** de la reproduction :

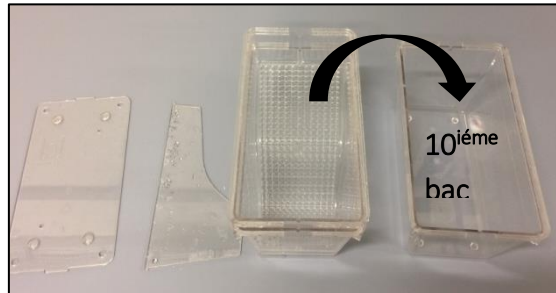
- Remplir les pichets de 5L avec de l'eau de l'armoire
- Monter les bacs (bac + plage + séparation)



- Les remplir totalement avec l'eau de l'armoire
- Mettre **1 mâle** et **1 femelle** par bac, d'un côté et de l'autre de la séparation et remettre le couvercle

**Le jour** de la reproduction :

- Remplir les pichets de 5L avec de l'eau de l'armoire
- **Remplir le 10<sup>ième</sup> bac** avec l'eau de l'armoire
- **Enlever la séparation**
- Soulever le couple n°1 avec la plage et transférer le tout dans le 10<sup>ième</sup> bac

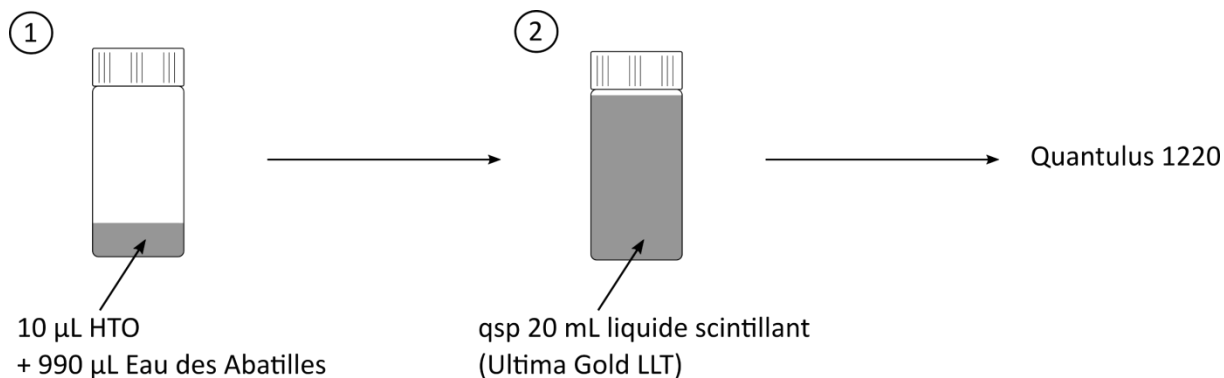


- Compléter avec de l'eau de l'armoire si nécessaire et remettre le couvercle
- **Rincer** le bac dans lequel il y avait le couple n°1 et répéter les étapes précédentes pour un autre couple et ainsi de suite
- Laisser les couples dans l'eau propre **30 min** environ
- Si les pontes ne sont pas suffisantes/satisfaisantes, attendre encore 15 min
- Sinon, remettre les adultes dans leur bac respectif et les **nourrir**
- **Enlever la plage**
- Faire passer tout le contenu du bac à travers une épaisseur de maillage fin pour **recupérer les œufs**
- Ajouter un peu d'eau du robinet dans le bac vide pour récupérer les œufs éventuellement encore à l'intérieur
- **Transférer rapidement les œufs dans du milieu embryon**
- Répéter ces étapes pour toutes les pontes et les **mélanger**
- **Noter le nombre de ponte/total des couples** dans le classeur de suivi
- **Trier et compter les œufs** nécessaires pour l'expérimentation sous une **loupe binoculaire**
- Par précaution, garder les œufs restant jusqu'au début de l'expérimentation

## Annexe 2 : Scintillation liquide

---

Préparation des échantillons :



Principe de la scintillation liquide :

Le principe de la scintillation liquide est de mettre en contact le tritium avec un liquide scintillant. En se désintégrant, le tritium va émettre un rayonnement beta qui va entrer en collision avec les molécules du liquide scintillant et permettre leur excitation. En se désexcitant, les molécules du liquide scintillant vont émettre de l'énergie sous forme de photons qui vont être détectés via un photomultiplicateur. Dans le cadre de notre étude, chaque échantillon a été compté pendant 60 min et les résultats ont été obtenus en coup par minute (CPM).

### Milieu embryon

Solution mère (40 g/L) :

- 1,6 g de sel de mer (Instant Ocean)
- qsp 40 mL d'eau milli-Q

Pour 1 L de solution fille de milieu embryon à 60 mg/L :

- 1,5 mL de solution mère
- qsp 1 L d'eau milli-Q

### Milieux de contamination

#### Sources

- 185 mBq pour 5 mL, pureté 97% (PerkinElmer, Courtaboeuf, France)

Caractérisation des sources  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL suivant le calcul ci-après :

$$A = A_0 \cdot e^{-\ln(2) \cdot t/T} ;$$

avec A l'activité de la source au temps t en Bq;  $A_0$  l'activité de la source à sa fabrication ( $t_0$ ) en Bq ; t le temps depuis  $t_0$  en jours et T la demi-vie du tritium en jours (4380 jours).

En fonction de la date de fabrication des sources, il faut environ 1 source pour faire environ 1 L de solution à  $1,22 \cdot 10^5$  Bq/mL et environ 5 sources pour faire environ 500 mL de solution à  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL. En fonction du nombre de source disponible, la solution à  $1,22 \cdot 10^5$  Bq/mL peut être préparée en diluant 10 fois la solution à  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL. Dans un premier temps, le volume nécessaire de source est dilué dans du milieu embryon qsp 300 mL pour la solution à  $1,22 \cdot 10^5$  Bq/mL et qsp 500 mL pour la solution à  $1,22 \cdot 10^6$  Bq/mL. Les activités dans ces solutions sont ensuite comptées par scintillation liquide. Les volumes des solutions sont ensuite ajustés (milieu embryon) pour avoir l'activité souhaitée.

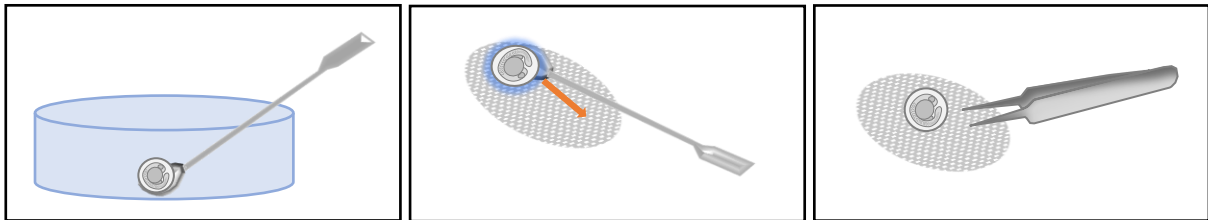


## Annexe 4 : Protocole de préparation des organismes pour retirer le milieu adsorbé

---

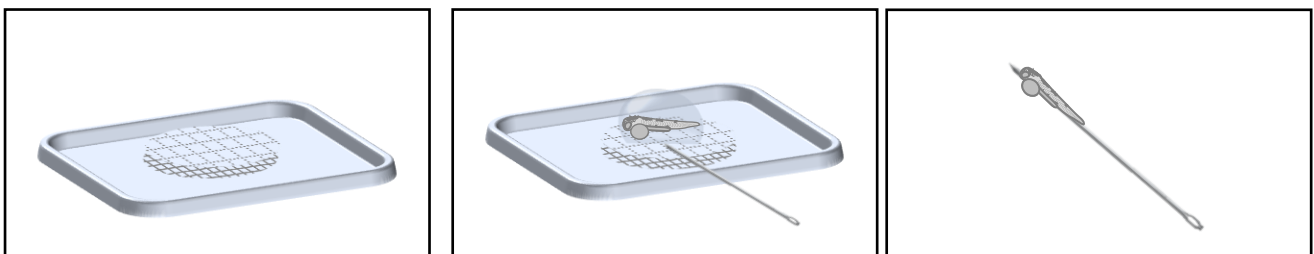
### Préparation des œufs à 24 hpf

- Récupérer au fond du cristallin l'œuf avec la spatule côté cuillère
- Faire remonter l'œuf dans la spatule en restant collé à la paroi du cristallin
- Une fois l'œuf sur la spatule le **déposer délicatement** sur le filtre **2 µm** (Glass Fibre Prefilters Millipore 2µm - AP2005500).
- Le faire **rouler doucement** jusqu'à ce qu'il se détache de la spatule.
- Une fois l'œuf sur le filtre, le récupérer à l'aide de la pince



### Préparation des larves à 96 hpf

- A l'aide d'une **P5000**, déposer une larve dans une **goutte d'eau** sur le filtre 100 µm (Millipore nylon -NY1h04700) superposé avec un filtre 0,45 µm (Millipore type HA cellulose 0,45µM - HAWP04700)
- Une fois la goutte d'eau absorbée par les filtres, soulever **délicatement** la larve à l'aide d'une aiguille à coudre pour la récupérer



## Annexe 5 : Calcul des coefficients de dose via le logiciel EDEN v3

### Définition de l'organisme :

Œuf 24h			
Dimensions	a	0.067	cm
	b	0.067	cm
	c	0.067	cm
Composition	animal-FASSET		
	Masse volumique	1.00E+00	g.cm <sup>-3</sup>
	Masse	1.60E-04	g
Source	volumique		

### Définition de l'environnement :

eau				
Milieu 1	Composition	Eau		
		Masse volumique	1.00E+00 g.cm <sup>-3</sup>	
	Source	volumique		
	Cotes	Hmin	-5.00E-02	cm
		Hmax	4.95E+00	cm

### Définition des compositions (% masse) :

animal-FASSET		Eau	
H	0.1020000	H	0.1111000
C	0.1430000	O	0.8889000
N	0.0340000		
O	0.7100000		
Na	0.0010000		
P	0.0020000		
S	0.0030000		
Cl	0.0010000		
K	0.0040000		

Définition des sources :

Volume	Avant décroissance		Après décroissance	
	Nucléide	Bq/g	Nucléide	Bq/g
oeuf24h	H3	1.00E+00		
Volume	Nucléide	Bq/g	Nucléide	Bq/g
eau	H3	1.00E+00		

Résultats :

Facteurs de pondération pour les DCC par type d'émission :

$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
10	3	1

Source	Radionucléide	DCC par type d'émission			DCC <sub>total</sub>	
		DCC $\alpha$	DCC $\beta$	DCC $\gamma$	sans pondération	avec pondération
oeuf24h (Gy/j)/(Bq/g)	H3	nd	5.37E-08	nd	5.37E-08	1.61E-07
eau (Gy/j)/(Bq/g)	H3	nd	3.02E-10	nd	3.02E-10	9.05E-10

Définition de l'organisme :

larve96h			
Dimensions	a	0.330	cm
	b	0.038	cm
	c	0.038	cm
Composition	animal-FASSET		
	Masse volumique	1.00E+00	g.cm <sup>-3</sup>

	Masse	2.48E-04	g
Source	volumique		

Définition de l'environnement :

Milieu 1	eau			
	Composition	Eau		
		Masse volumique	1.00E+00	g.cm <sup>-3</sup>
	Source	volumique		
	Cotes	Hmin	-2.50E+00	cm
		Hmax	2.50E+00	cm

Définition des compositions (% masse) :

animal-FASSET		Eau	
H	0.1020000	H	0.1111000
C	0.1430000	O	0.8889000
N	0.0340000		
O	0.7100000		
Na	0.0010000		
P	0.0020000		
S	0.0030000		
Cl	0.0010000		
K	0.0040000		

Définition des sources :

Volume	Avant décroissance		Après décroissance	
	Nucléide	Bq/g	Nucléide	Bq/g
larve96h	H3	1.00E+00		
Volume	Nucléide	Bq/g	Nucléide	Bq/g
eau	H3	1.00E+00		

**Résultats :**

Facteurs de pondération pour les DCC par type d'émission :

$\alpha$	$\beta$	$\gamma$				
10	3	1				
Source	Radionucléide	DCC par type d'émission			DCC <sub>total</sub>	
		DCC $\alpha$	DCC $\beta$	DCC $\gamma$	sans pondération	avec pondération
larve96h (Gy/j)/(Bq/g)	H3	nd	5.37E-08	nd	5.37E-08	1.61E-07
eau (Gy/j)/(Bq/g)	H3	nd	4.16E-10	nd	4.16E-10	1.25E-09

### **Rnase free solutions and plasticware. Always wear gloves. Procedure performed on ice.**

It is very important to use fresh tissues! Homogenization of tissues in trizol has to be done as fast as possible after dissection to avoid RNA degradation.

#### **Extraction precipitation**

- Transfer pool of 24 hpf zebrafish (pools of 20 dechorionated embryos) or 96 hpf zebrafish (pools of 15 larvae) to clean RNase free 1.5 mL tube
- Remove as much as possible of embryo medium

-Add 500  $\mu$ L Trizol (Life Technologies). Homogenized by pipetting and vortexing. Incubate at 5 min RT°. It is very important that no piece of tissue remain visible.

*You can keep the tube at this stage at -80°C for 1 to 3 months*

- Add 100  $\mu$ L Chloroform (1/5 vol Trizol). Vortex 15sec. Incubate 2min at RT°
- Centrifuge 13000g 15min at 4°C
- Transfer upper aqueous phase in a clean RNase free 1.5 mL tube
- Add 100  $\mu$ L Chloroform (1/5 vol Trizol). Vortex 15sec. Incubate 2min at RT°
- Centrifuge 13000g 15min at 4°C
- Transfer upper aqueous phase in a clean RNase free 1.5 mL tube
- Add 250  $\mu$ L isopropyl alcohol (1/2 vol trizol). Vortex. Incubate 30 min at -80°C
- Spin 13000g 30 min at 4°C
- Remove supernatant
- Add 500  $\mu$ L of 75% Ethanol freshly prepared with 100% Ethanol for molecular biology
- Spin 5min 13000g at 4°C
- Remove supernatant completely. Air dry 2-5min under a sterile hood. Resuspend pellet in 25  $\mu$ L water DEPC Ambion. Keep -80°C until proceeding to the quantification step with RNA Nano Chips (Bioanalyser 2011, Agilent) following manufacturer's instructions. Quantification can also be made using a NanoDrop or Agarose gel electrophoresis.

### Activité à 24 hpf

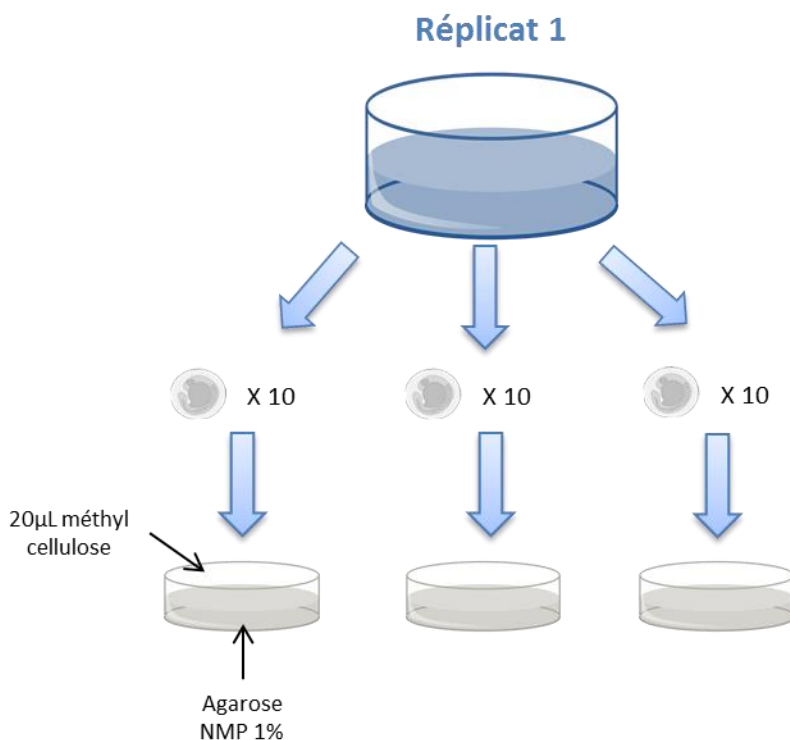
- **Acclimatation** dans la pièce de comportement : **30 min**
- Quelques heures avant le début de la manip, préparer un **gel d'agarose NMP 1%** et mettre un aliquot de **méthyl cellulose** à RT dans la pièce comportement.

*Pour 6 boîtes de pétri (dia. 5cm) : 0.6 g d'agarose NMP + 60 mL d'eau miliQ.*

*Faire chauffer aux micro-ondes jusqu'à obtenir un mélange translucide et homogène.*

*Couler le gel dans les boîtes et laisser prendre dans la pièce comportement.*

- 
- Déroulement de la manip :



Faire de même pour les réplicas 2 et 3.  
Alternier les réplicas Ctrl et HT pour ne pas passer tous les Ctrl à la suite et tous les HTO à la suite.

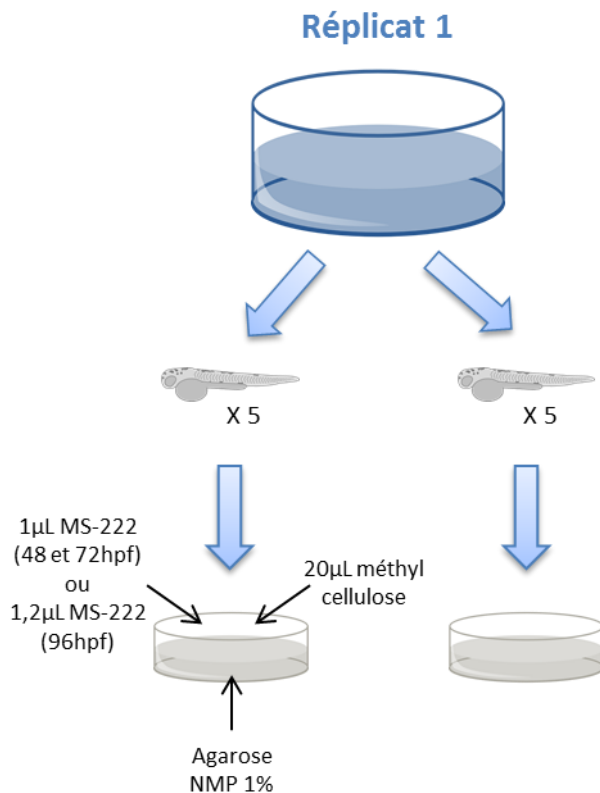
- Avec le logiciel **MediaRecorder®** faire des vidéos de **5 min avec 2 min d'acclimation avant sous la loupe binoculaire** (Frame rate = 25 ; Zoom x1)
- Analyser les vidéos avec le logiciel **DanioScope®**
  - Importer une vidéo
  - Cliquer sur « Detect Embryo » et arranger les arènes
  - Répéter les opérations ci-dessus pour toutes les vidéos
  - Cliquez sur « Acquire All... » pour lancer l'analyse
  - Vérifier les mesures et retracer les arènes si besoin

## Battements cardiaques à 48, 72 et 96 hpf

- **Acclimatation** dans la pièce de comportement : **30 min**
- Quelques heures avant le début de la manip, préparer un **gel d'agarose LMP 1%** et mettre un aliquot de **méthyl cellulose** à RT dans la pièce comportement

*Pour 6 boîtes de pétri (dia. 5cm) : 0.6 g d'agarose NMP + 60 mL d'eau miliQ.  
Faire chauffer aux micro-ondes jusqu'à obtenir un mélange translucide et homogène.  
Couler le gel dans les boîtes et laisser prendre dans la pièce comportement.*

- Déroulement de la manip :



Faire de même pour les réplikas 2 et 3.

Alternier les réplikas Ctrl et HTO pour ne pas passer tous les Ctrl à la suite et tous les HTO à la suite.

Mettre les larves sur le côté.

- Avec le **logiciel MediaRecorder®** faire des vidéos de **30 sec** (Frame rate = 25 ; Zoom x1 ; Luminosité : trait rouge)
- Analyser les vidéos avec le logiciel **DanioScope®**
  - Importer une vidéo
  - Tracer les arènes autour de chaque cœur
  - Répéter les opérations ci-dessus pour toutes les vidéos
  - Cliquez sur « Acquire All... » pour lancer l'analyse
  - Vérifier les mesures et retracer les arènes si besoin

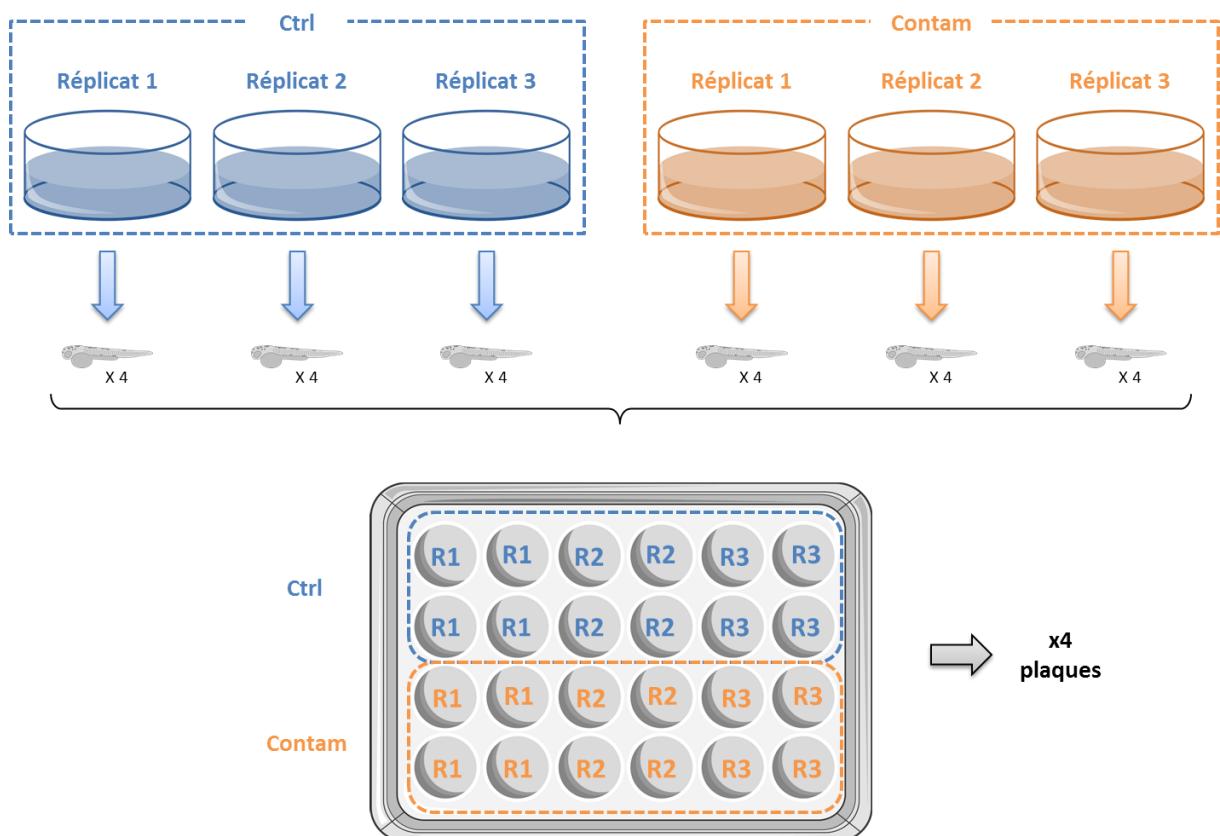


## Comportement de nage à 96 hpf avec stimulus tactile



Quelques heures avant le début de la manip mettre la DanioVision à la bonne température (28°C) en utilisant le système de contrôle de la température prévu à cet effet (voir indications

- **Acclimatation** : minimum **30 min** dans la pièce de comportement.
- Déroulement de la manip : faire **une plaque à la fois**



- Mettre la plaque dans **DanioVision**, puis fermer le dispositif.
- Acclimatation des larves au dispositif : 10 min compris dans le protocole pour la vidéo
- Déroulement de la vidéo :  
**12 min → Début de la vidéo → 5 min → tapping (level=8) → 5 min → Fin vidéo**
- Dans le logiciel **EthoVision** lancer la vidéo
- Une fois la vidéo enregistrer, vérifier que le tacking s'est déroulé correctement, sinon reprendre les vidéos

### 1-/ Fixation

!!!Whole embryos can be fixed with this method, but adult tissue must be cut in order to allow good penetration of the fixative!!!!

- Zebrafish embryos (without chorion) are fixed 3h in 2mL fresh PFA 4% at 4°C
- Remove the PFA 4% and replace by 1,5mL 100% Methanol. **Repeat this step a second time.**
- Keep at -20° until use (at least ON in methanol)

### 2-/ Staining

- Rehydrate embryos in Eppendorf in 800µl of: **(n.b. keep the Eppendorf on the side during all the steps!)**

5min 70% MetOH in 1xPBS

5min 50% MetOH in 1xPBS

5min 25% MetOH in 1xPBS

4X 5 min in PTW buffer

- Incubate 24hpf embryos in ProtK PTW buffer for 3min
- Remove ProtK PTW
- Wash briefly with PTW
- Fix again the embryos for 20min in Fix Solution at 4°C
- Wash 5X 5min in PTW
- Remove supernatant and add 1mL of Blocking buffer for 3hrs at RT°C
- Move the embryos in a 0.5mL Eppendorf containing blocking buffer
- On ice, remove supernatant and add 300µl of primary antibodies (GeneTex GTX127342) diluted in Blocking buffer (1:200)
- Mix gently
- Incubate in a black box O/N at 4°C
- Wash 5 times 15 min at RT with PTW buffer put Eppendorf vertically at the end of the last wash
- On ice, remove supernatant and add 300 µl of secondary antibodies (anti rabbit-FITC F0382) in PTW buffer (1:500)
- Mix gently
- Incubate at RT°C for 2hrs
- Wash 5 times 15 min at RT with PTW buffer for the last wahe use a 2mL Eppendorf
- Keep at 4°C in PTW **protected from light** until analysis



---

## Résumé

---

Les écosystèmes sont naturellement exposés aux rayonnements ionisants. A cette exposition naturelle s'ajoutent les activités anthropiques liées notamment à la production d'électricité, la médecine nucléaire ou l'armement. Le tritium fait partie des radionucléides rejetés en fonctionnement normal par les centres de production d'électricité et les centres de traitement des combustibles. Il est principalement rejeté sous forme d'eau tritiée (HTO) et intègre le cycle de l'eau, ce qui le rend particulièrement mobile au sein des écosystèmes. Des études ont mis en évidence les effets développementaux et reprotoxiques du tritium chez des vertébrés et invertébrés aquatiques. Peu d'entre elles, en revanche, se sont penchées sur les effets moléculaires. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est de caractériser les modes d'action toxiques de l'eau tritiée via l'utilisation des stades embryo-larvaire du poisson zèbre (*Danio rerio*), un organisme modèle en écotoxicologie. Deux débits de dose, 0,4 et 4 mGy/h, ont été testés pour des expositions allant jusqu'à 168h pour caractériser l'internalisation et 96h pour évaluer les effets. La première étape de ce travail a permis de mettre au point un protocole robuste pour la mesure de l'activité dans les organismes. Les résultats acquis via ce protocole ont mis en évidence que l'internalisation de l'HTO est un phénomène rapide. De plus, ce protocole a permis la discrimination des formes de tritium libre dans les tissus (TFWT) et lié à la matière organique (TOL). Enfin, il a permis de calculer la dose absorbée pour les différents stades de vie utilisés, étape importante pour relier les effets observés au débit de dose reçu pour l'évaluation du risque environnemental. La seconde partie de la thèse se focalise sur les effets à différents niveaux d'organisation biologique allant de la molécule à l'individu. A l'échelle moléculaire, une analyse transcriptomique haut débit (RNAseq) a mis en évidence la modulation de gènes impliqués dans la contraction musculaire et le développement de l'œil pour des œufs à 24hpf (heure post-fécondation). Il est intéressant de noter que ces gènes sont sur-exprimés à 0,4 mGy/h et sous-exprimés à 4 mGy/h, suggérant des effets compensatoires et des effets de protection via potentiellement la compaction ciblée de la chromatine. Une sur-expression de gènes impliqués dans le cycle circadien et la réponse au stress oxydant a également été mise en évidence chez les larves à 96hpf. Pour les deux stades, la sur-expression de certains gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN a également été mise en évidence. Pour faire le lien entre les effets observés au niveau moléculaire et les effets observés à des niveaux d'organisation supérieures, des analyses aux échelles tissulaires et individuelles ont été réalisées. Les résultats montrent quelques altérations au niveau des fibres musculaires chez les larves à 96hpf pour les deux débits de dose. Les larves à 96 hpf ont également montré une diminution significative de leur vitesse de nage par rapport aux témoins après exposition à 0,4 mGy/h. Ces analyses, plus pertinentes d'un point de vue écologique ont permis de mettre en évidence des effets différents de l'exposition à l'HTO entre les deux débits de dose. Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de mieux appréhender les cinétiques de transfert du tritium et de caractériser la dose absorbée pour les organismes utilisés. Ils ont également permis de mieux comprendre les modes d'action toxique du tritium via l'analyse moléculaire.

**Mots clés :** eau tritiée ; poisson zèbre, *Danio rerio* ; internalisation ; analyse transcriptomique ; microscopie ; comportement

---

## Abstract

---

Ecosystems are naturally exposed to ionizing radiations. To this natural exposure are added anthropic activities related to the production of electricity, nuclear medicine or nuclear weapons. Tritium is one of the radionuclides released during normal operation by nuclear power plant and nuclear reprocessing plants. It is mainly released in the form of tritiated water (HTO) and integrates the water cycle, which makes it particularly mobile within ecosystems. Studies have highlighted the developmental and reprotoxic effects of tritium on aquatic vertebrates and invertebrates. However, few of them focused on molecular effects. In this context, the main objective of this work is to characterize the modes of action of tritiated water using the embryo-larval stages of the zebrafish (*Danio rerio*), a fish model in ecotoxicology. Two dose rates, 0.4 and 4 mGy/h, were tested for exposure times up to 168h to characterize uptake and 96h to assess effects. The first step in this work was to develop a robust protocol for the measurement of activity concentration in zebrafish eggs and larvae. The results acquired showed that the uptake of HTO is a rapid phenomenon. In addition, this protocol allowed the discrimination of the tissue-free water tritium (TFWT) and organically bound tritium (OBT) forms. Finally, it allowed the calculation of the absorbed dose rate for all stages used during this thesis, an important step to link the observed effects to a dose rate for the environmental risk assessment. The second part of the thesis focused on the effects at different biological organization levels, from the molecule to the individual. At the molecular level, a transcriptomic analysis (RNAseq) showed the modulation of genes involved in muscle contraction and in the development of the eye for eggs at 24hpf (hour post fertilization). It is interesting to note that these genes were up-regulated at 0.4 mGy/h and down-regulated at 4 mGy/h, suggesting compensatory effects and protective effects via potentially targeted chromatin compaction. An up-regulation of genes involved in the circadian rhythm and the response to oxidative stress were also found in 96hpf larvae. For both stages, up-regulation of some genes involved in DNA damage repair has also been highlighted. To make the link between the early effects observed at the molecular level and the effects generally observed later for higher levels of organization, analyzes from tissular to individual levels were made. The results showed some muscle fiber alterations in 96hpf larvae for both dose rates. 96 hpf larvae also showed a significant decrease in swimming velocity compared with controls after exposure to 0.4 mGy/h. These analyses, more ecologically relevant, revealed different effects of exposure to HTO between both dose rates. Overall, this work has provided a better understanding of the transfer kinetics of tritium and the characterization of the absorbed dose for the organism used. It also provided a better understanding of the toxic modes of action of tritium via the molecular analysis.

**Key words:** tritiated water; zebrafish, *Danio rerio*; uptake; transcriptomic analyses; microscopy; behaviour