

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

**Olivier ARMANT**

## Etude épidémiologique

- Survivants d'Hiroshima (exposition prénatal)
  - > Augmentation de risque de cancer > 0.1 Gy (Preston et al. 2008)
  - > Microcéphalie > 0.1 Gy (8-15 semaines) (Otake et al. 1984) (Miller et al. 1972)
  - > Réduction des capacités cognitives (Otake et al. 1984 1996)
- Diminution de la taille du cerveaux d'espèces sauvages à Chernobyl et Fukushima (Moller et al. 2011, Hayama et al. 2017)



## Etude sur les animaux de laboratoire

- Diminution du poids de cerveau de souris lors d'expositions aiguës > 0.5Gy (E14-E17) (Hossain et al. 2005)
- Microcéphalie et défauts cognitifs chez des embryons de souris exposés > 0.3Gy (E11) (Verreet et al. 2016)
- Effets neurologique et cardiaque chez les embryons de poisson zèbre > 5Gy (26hpf) (Freeman et al. 2014)

## Etude des effets à faibles débits de doses de rayonnement ionisant (RI)

- Dommages à ADN et dommages de fibres musculaires chez le poisson zèbre à 20 mGy/h (3hpf) (Gagnaire et al. 2015)
- Détection de changement épigénétiques (méthylation de l'ADN sur locus Avy) sur la F1 de souris exposés à 7mGy (Bernal et al. 2013)
- Transmission d'effets maternel (mortalité, dommages ADN, methylation de l'ADN) à la descendance chez des poissons zèbres adultes exposés 21 jours à 8.7mGy/h (S. Hurem et al. 2017, S. Hurem et al. 2018, Kamstra et al. 2018)

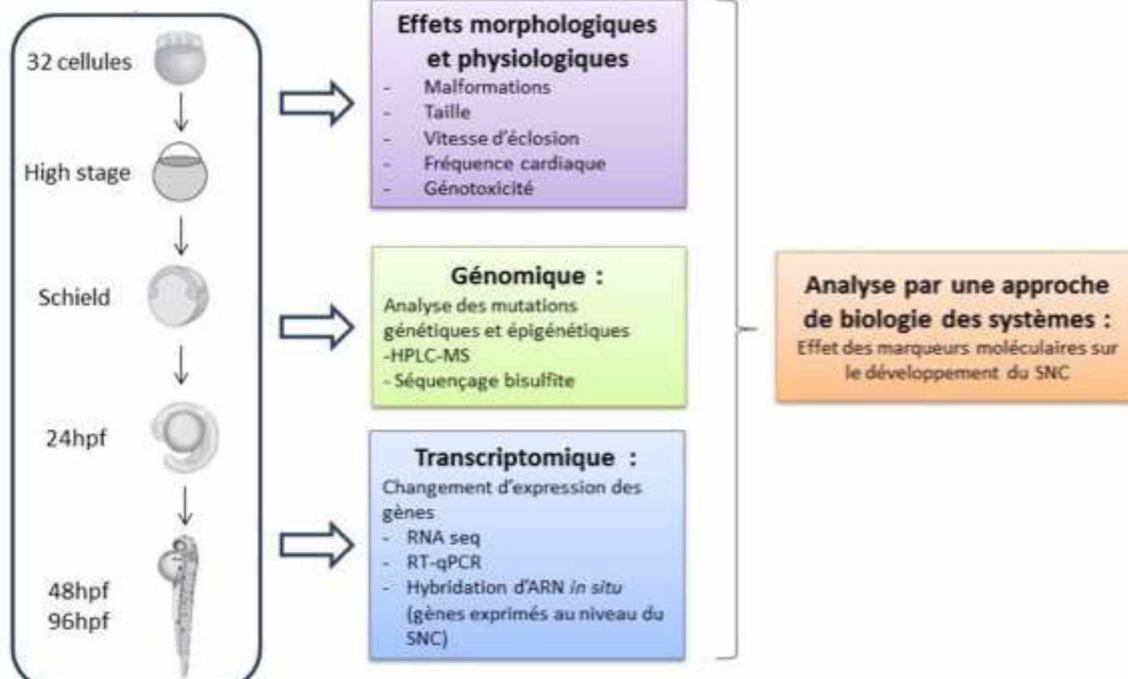
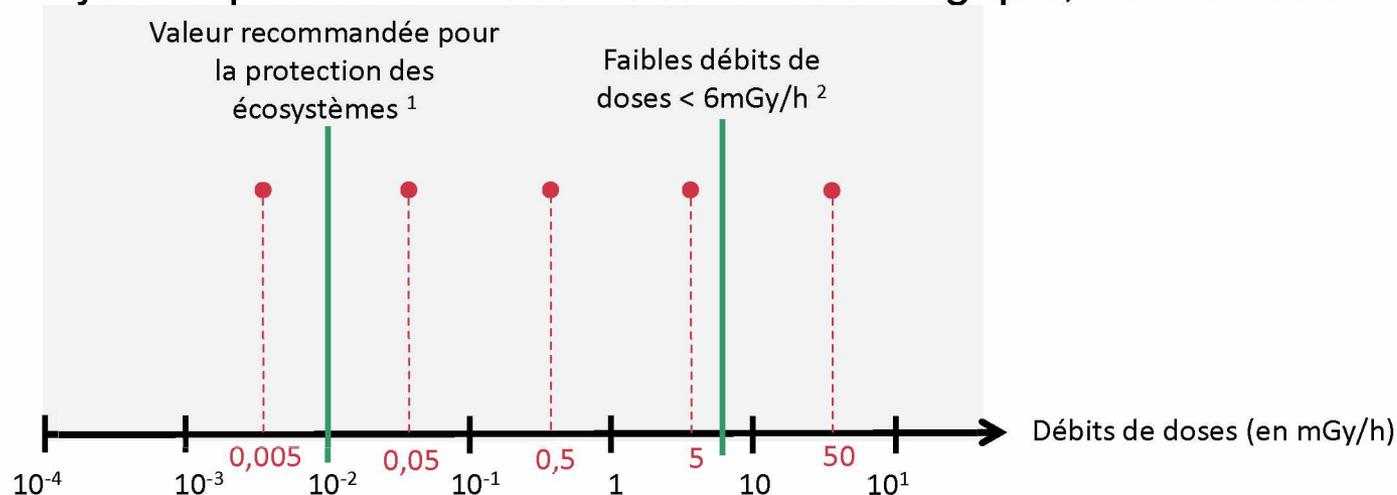
### Quels sont les effets des RI chronique à faible doses sur le développement embryonnaire?

- Quels sont les voies de régulations impactées? A quelle débit dose?
- Quels sont les effets sur la neurogénèse et sur le comportement
- Est il possible de trouver des changements moléculaires prédictifs d'effets macroscopiques
- Y a-t-il des modifications épigénétiques et peuvent elles induire des changements phénotypiques

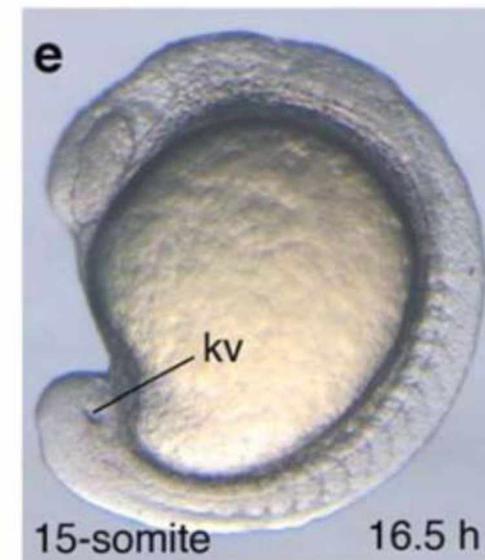
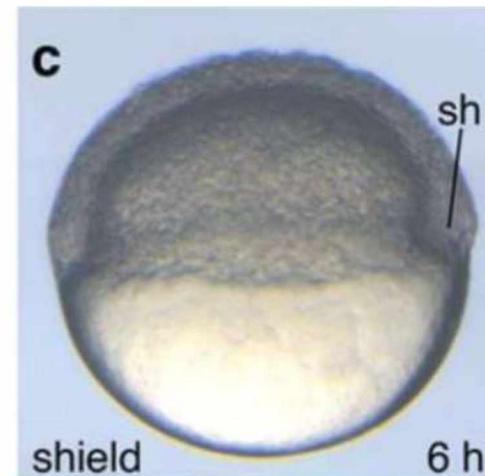
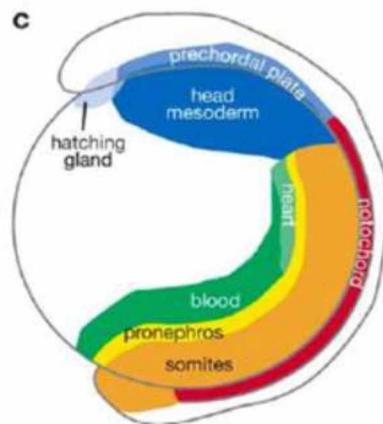
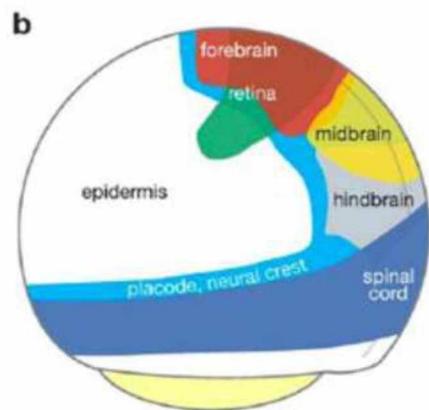
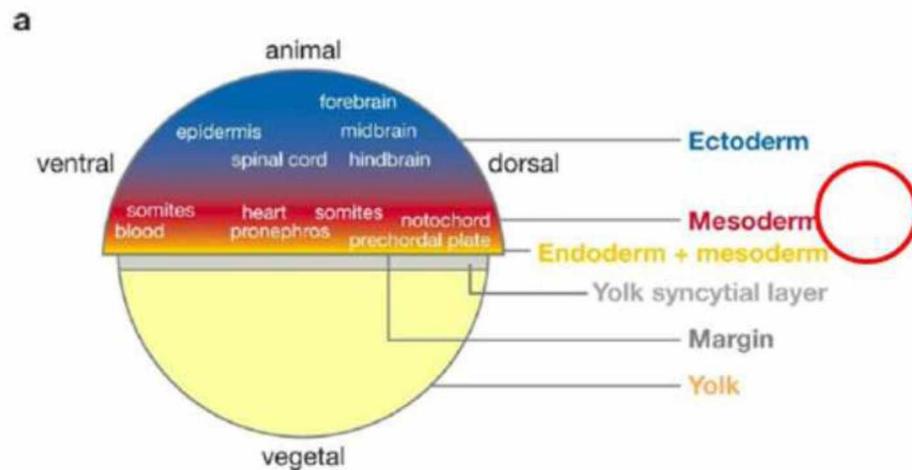
### Méthode

- Etude cinétique durant le développement
- Analyses globales multiomiques sans *a priori*
- Analyses à plusieurs niveaux d'échelles biologique, du moléculaire au comportement

- Etude cinétique durant le développement
- Analyses globales multiomiques sans *a priori*
- Analyses à plusieurs niveaux d'échelles biologique, du moléculaire au comportement



# Détermination des territoires embryonnaire lors de la gastrulation

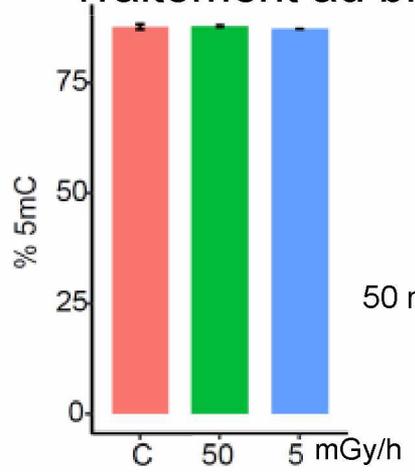




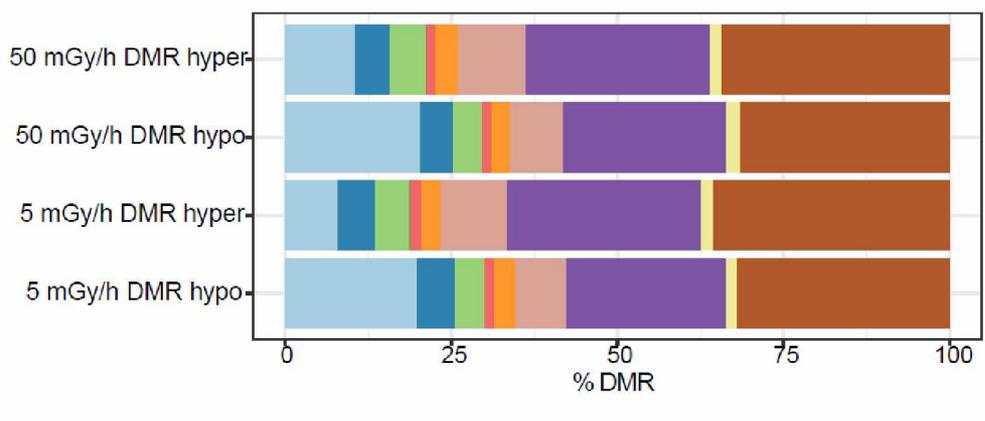
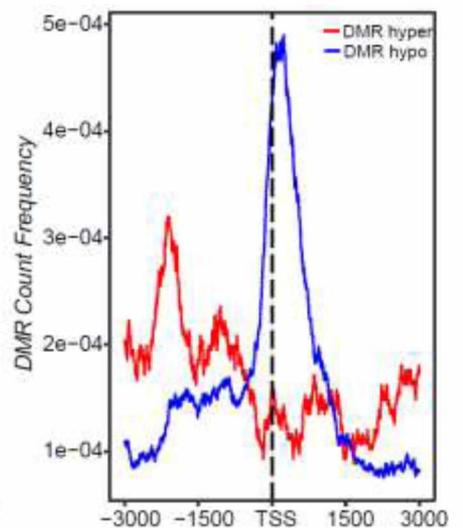
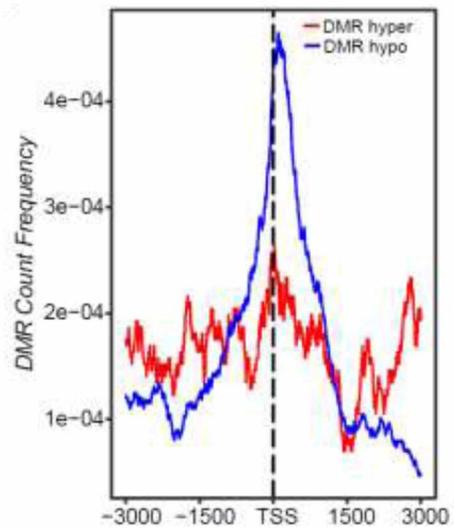
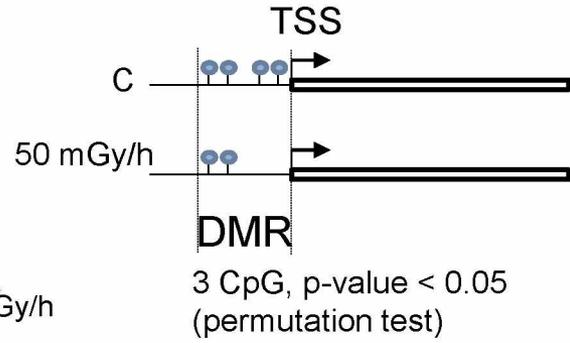
-Expositions: de la fertilisation -> 50% epiboly (Shield stage 6 hpf)

-Analyse des effets sur la méthylation de l'ADN

Traitement au bisulfite et séquençage d'ADN (whole genome bisulfite sequencing)



Taux global de méthylation inchangé



- Promoter (<=1kb)
- Promoter (1-2kb)
- Promoter (2-3kb)
- 5' UTR
- 3' UTR
- 1st Exon
- Other Exon
- 1st Intron
- Other Intron
- Downstream (<=300)
- Distal Intergenic

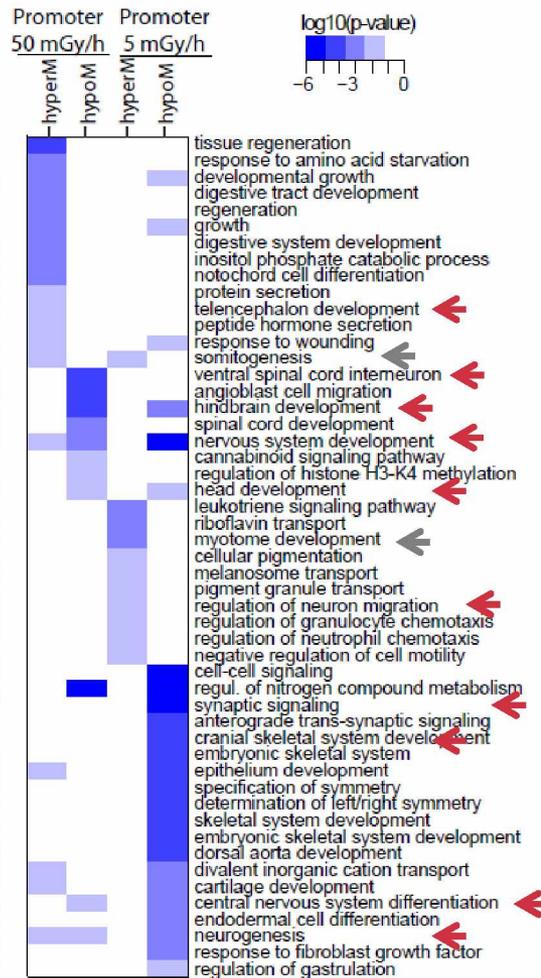
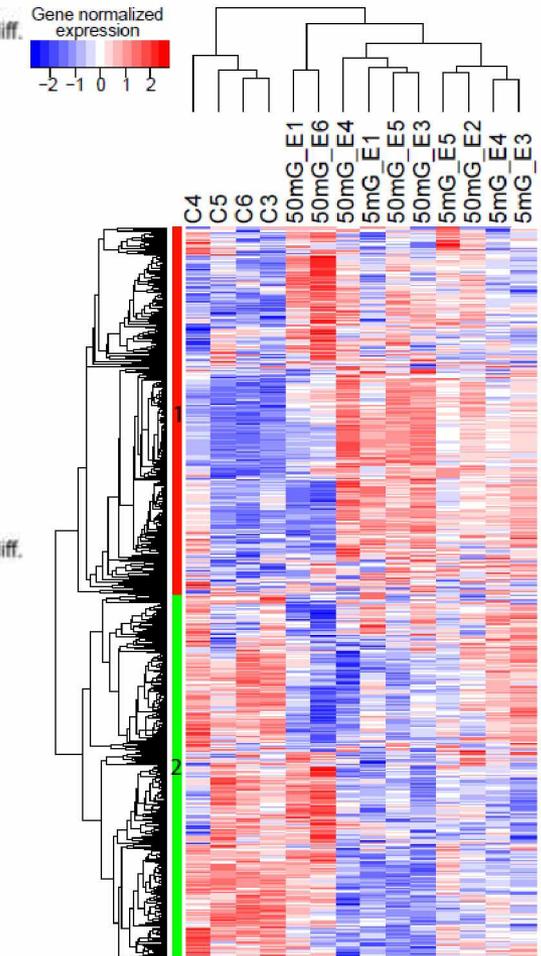
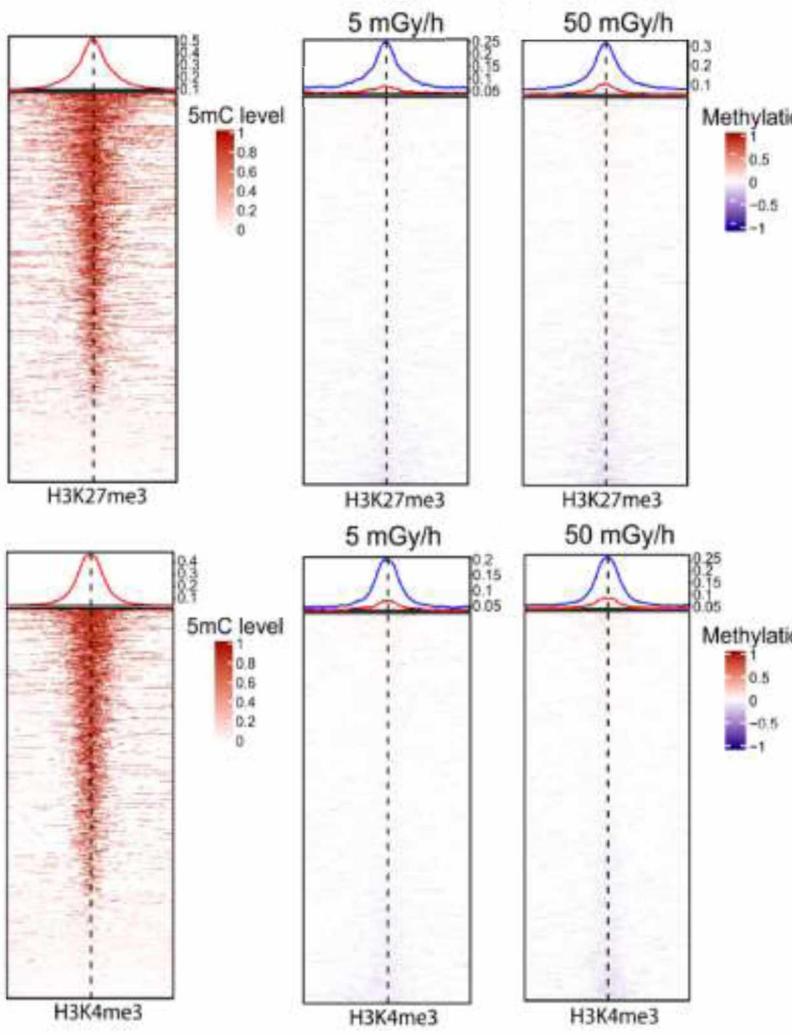
Enrichissement de région hypo-méthylé au niveau du site d'initiation de la transcription

# Impact potentiel des DMR sur la transcription lors de la gastrulation



-Sélection de DMR localisé à < 3kb  
 -Etude de l'expression des gènes par RNAseq

-Sélection de DMR  
 -Test d'enrichissement (GO)



Co-localisation des CpG hypométhylés avec les marques histones

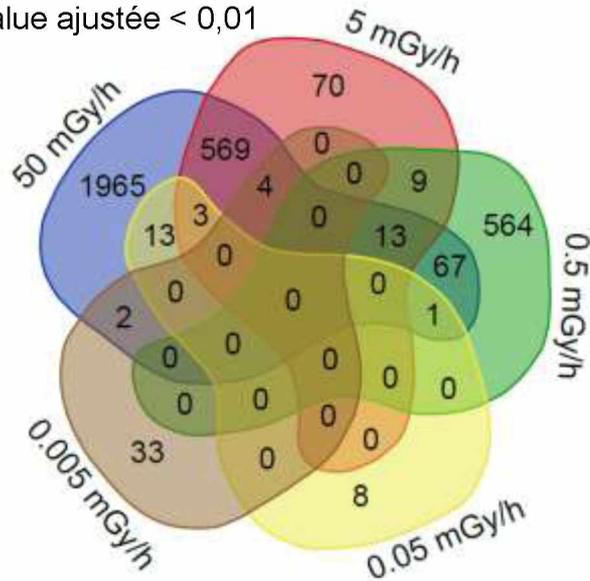
Les DMR peuvent moduler l'expression des gènes

DMR->gènes impliqués dans la neurogénèse et myogénèse

# Etudes des effets des RI sur l'expression des gènes lors de la gastrulation

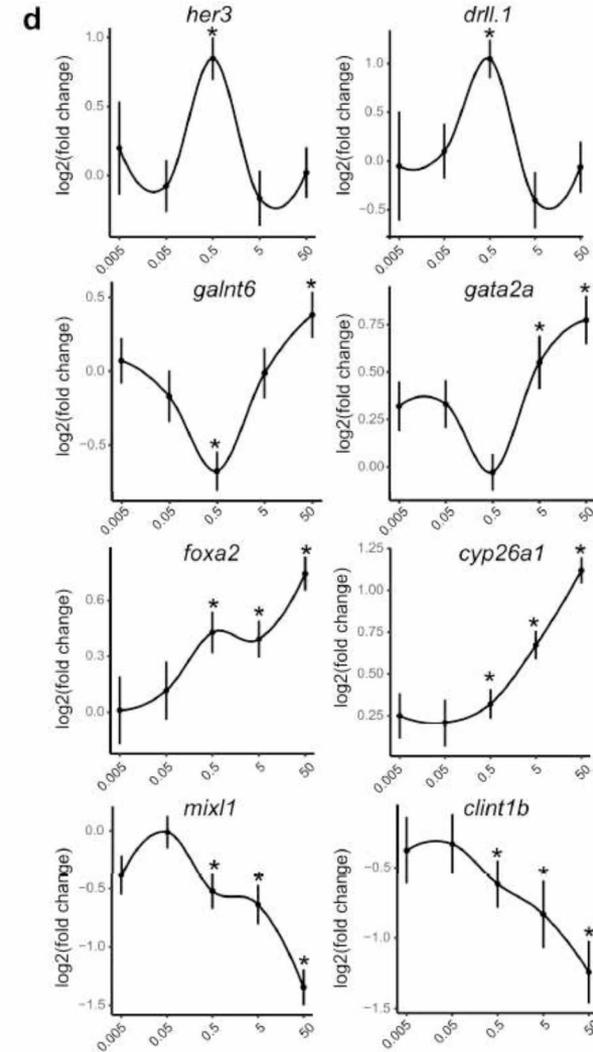
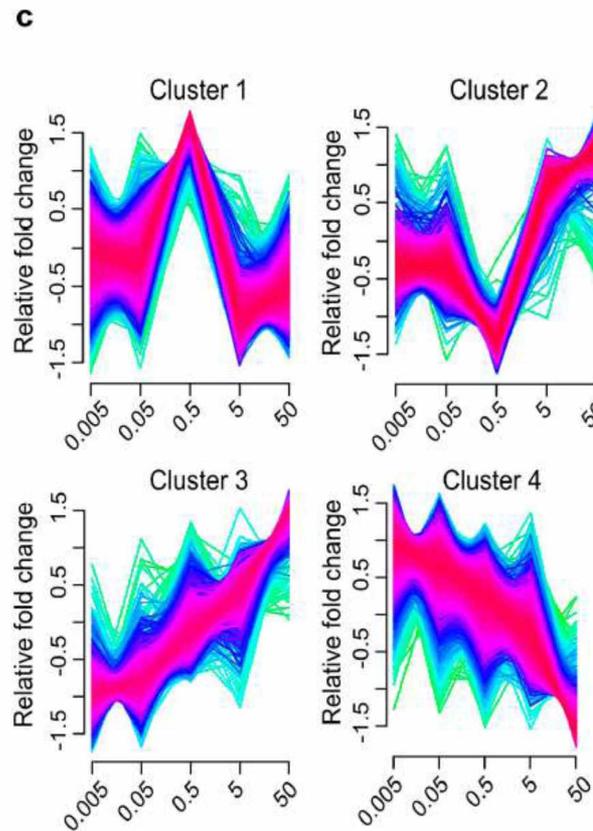


Gène différentiellement exprimés (DEG)  
 |Fold-change| ≥ 1,5  
 p-value ajustée < 0,01

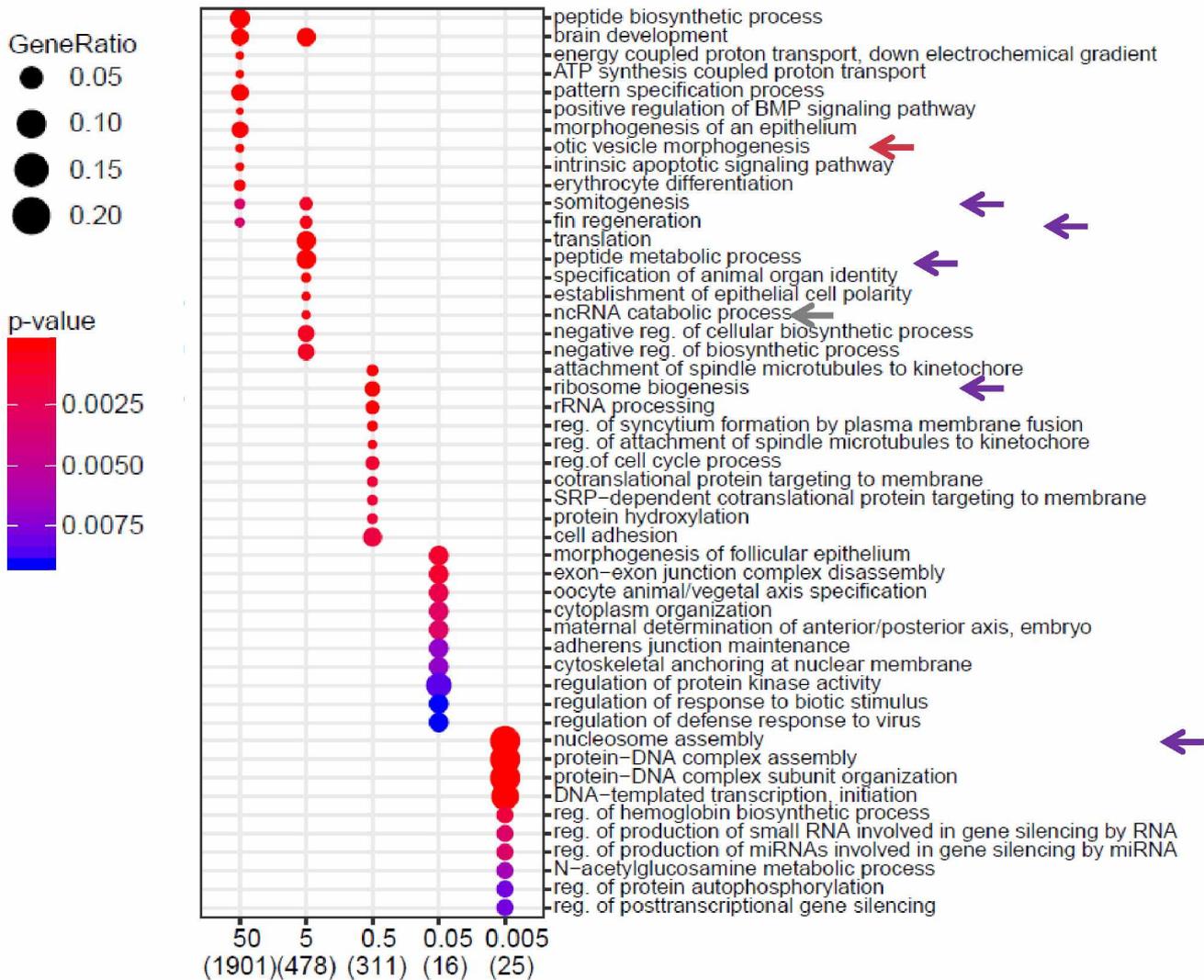


- Aucun DEG en commun à toutes les doses
- Relation dose / nombre de DEG
- 22% DEG en commun à 5 et 50 mGy/h

## Fuzzy clustering des DEG



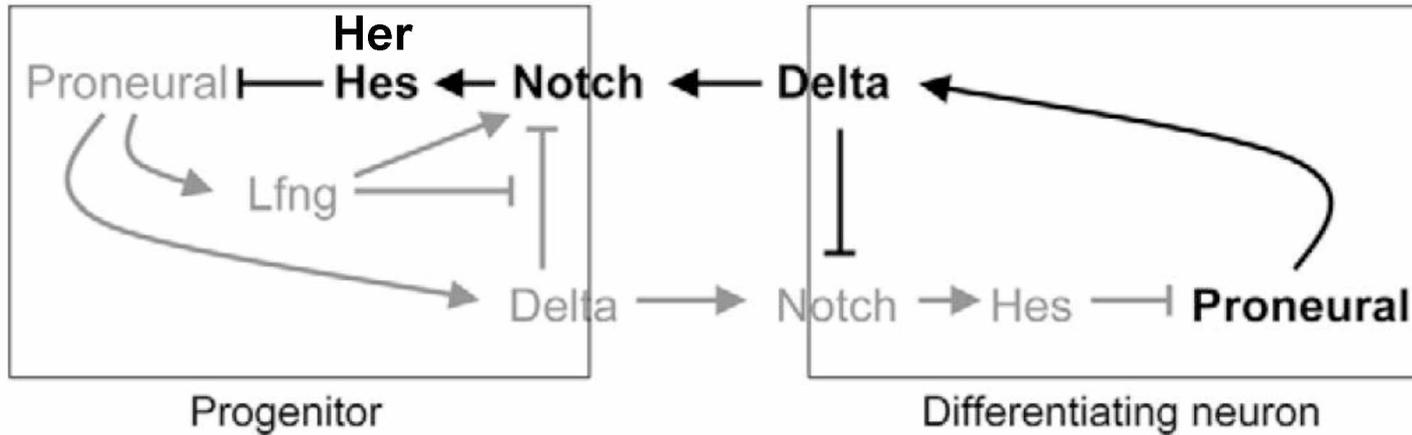
- 4 groupes de gènes avec des profiles d'expression différents
- Dérégulation de facteurs de transcriptions importants pour le développement



-Dérégulation des voies de l'acide rétinolique, inhibition latérale (Delta-Notch), Wnt, BMP  
 -Prédiction d'effets potentiels sur la neurogénèse et la myogénèse

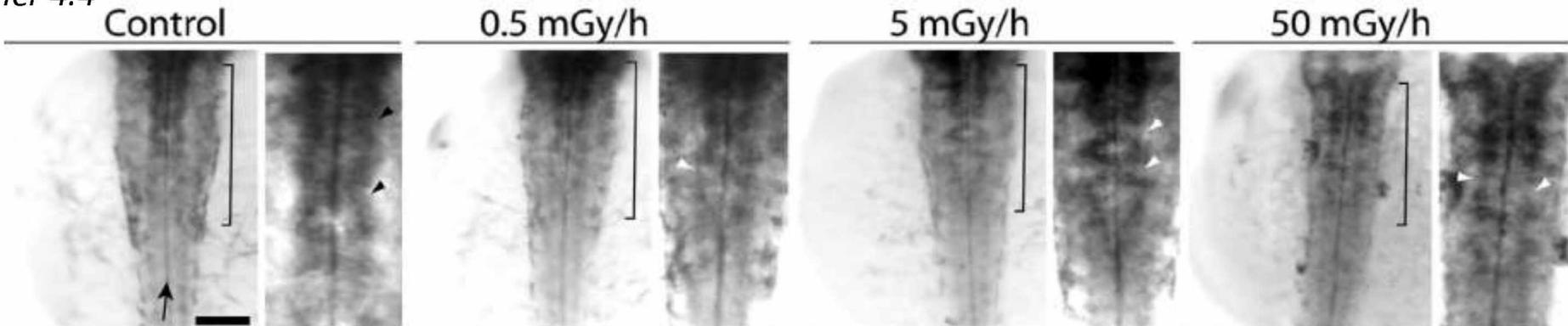


## Inhibition latérale et différenciation neuronale du tube neural



### Hybridation d'ARN *in situ* à 24 hpf

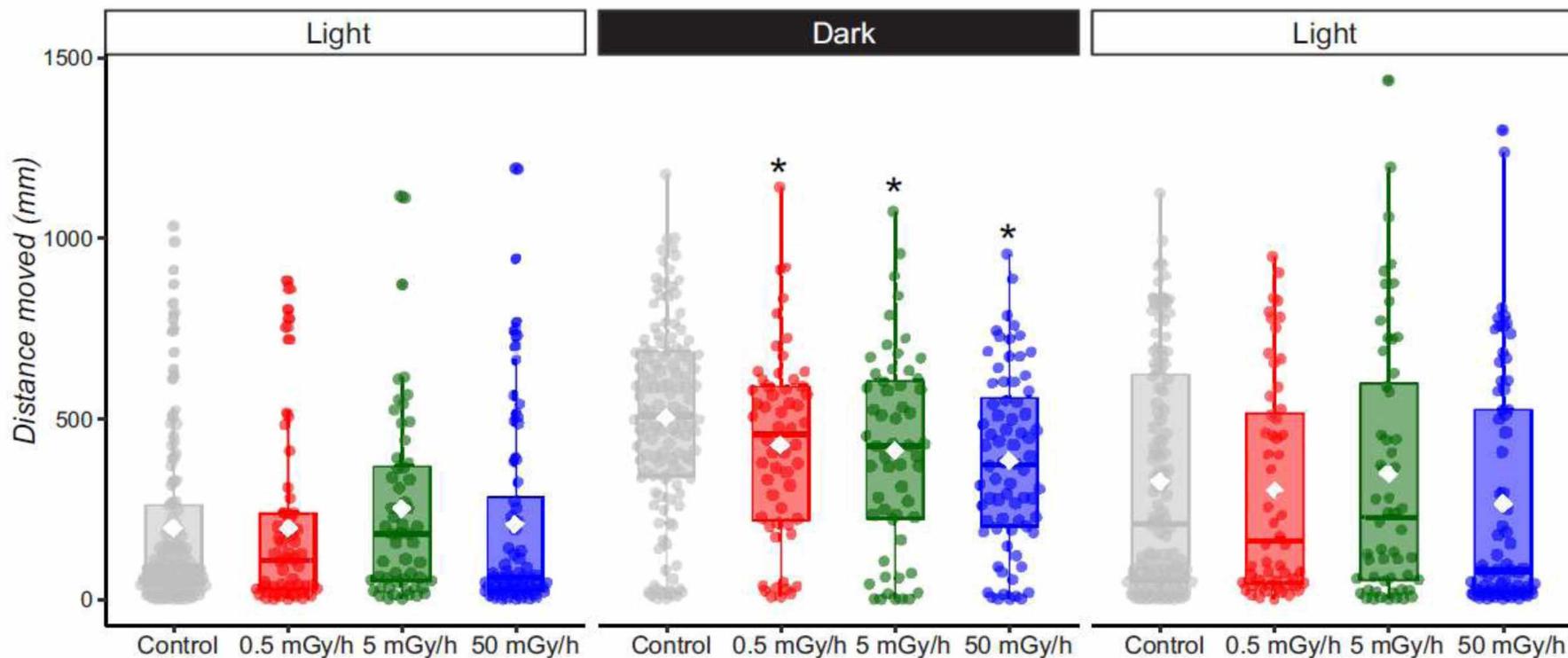
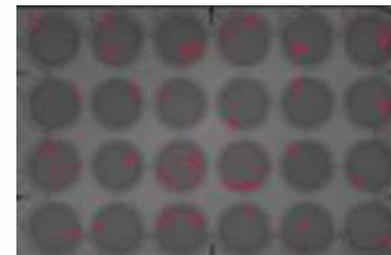
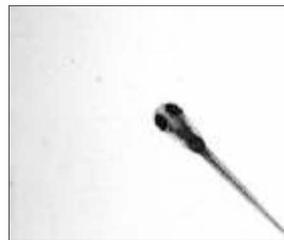
Visualisation de l'expression des gènes sur embryon entier  
*her 4.4*



Diminution du nombre de cellules *her4.4* dans la zone ventriculaire du tube neural

## Test comportemental

Locomotion des larves à 120 hpf



- Diminution de la locomotion des larves Durant la phase d'obscurité pour tous les debits de doses
- En lien avec les effets neuro-musculaires observés aux échelles biologiques inférieures

Test de permutation  
p-value < 0,05  
n = 56 -128

Kiehn. 2016

## Analyse transcriptomique

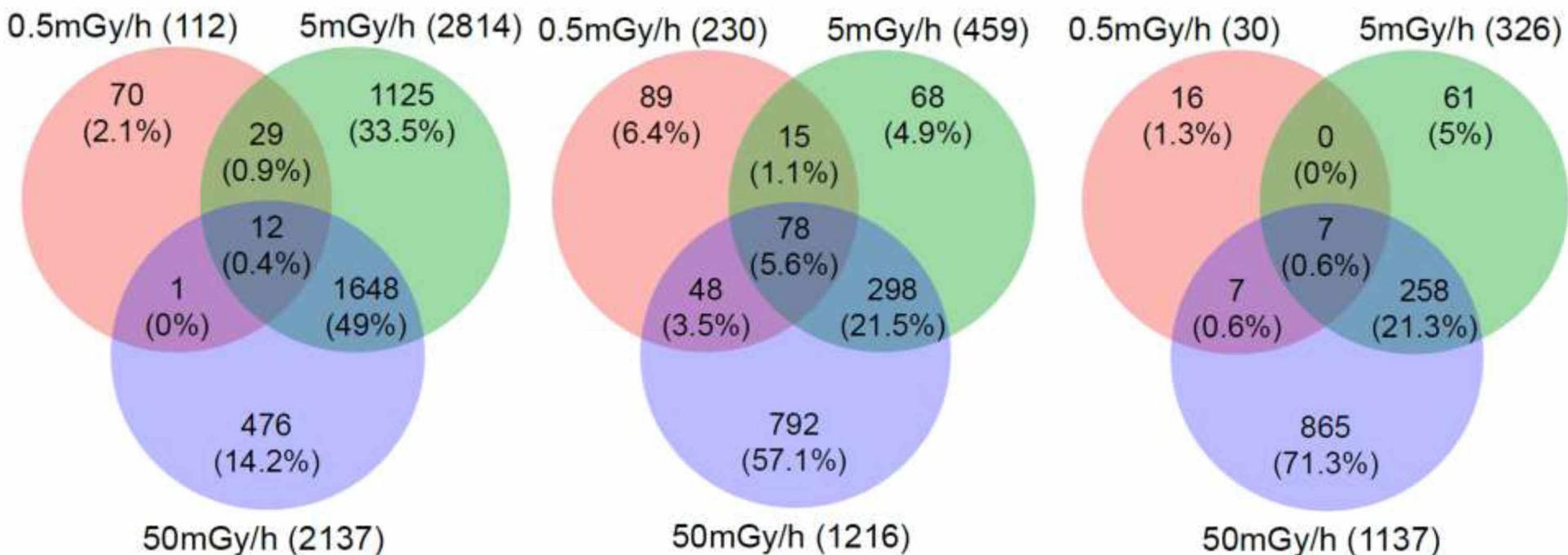
Nombre de gènes différentiellement exprimés entre les débits de doses

Critères pour les gènes différentiellement exprimés

Fold-change  $\geq 1,5$

p-value ajustée  $< 0,01$

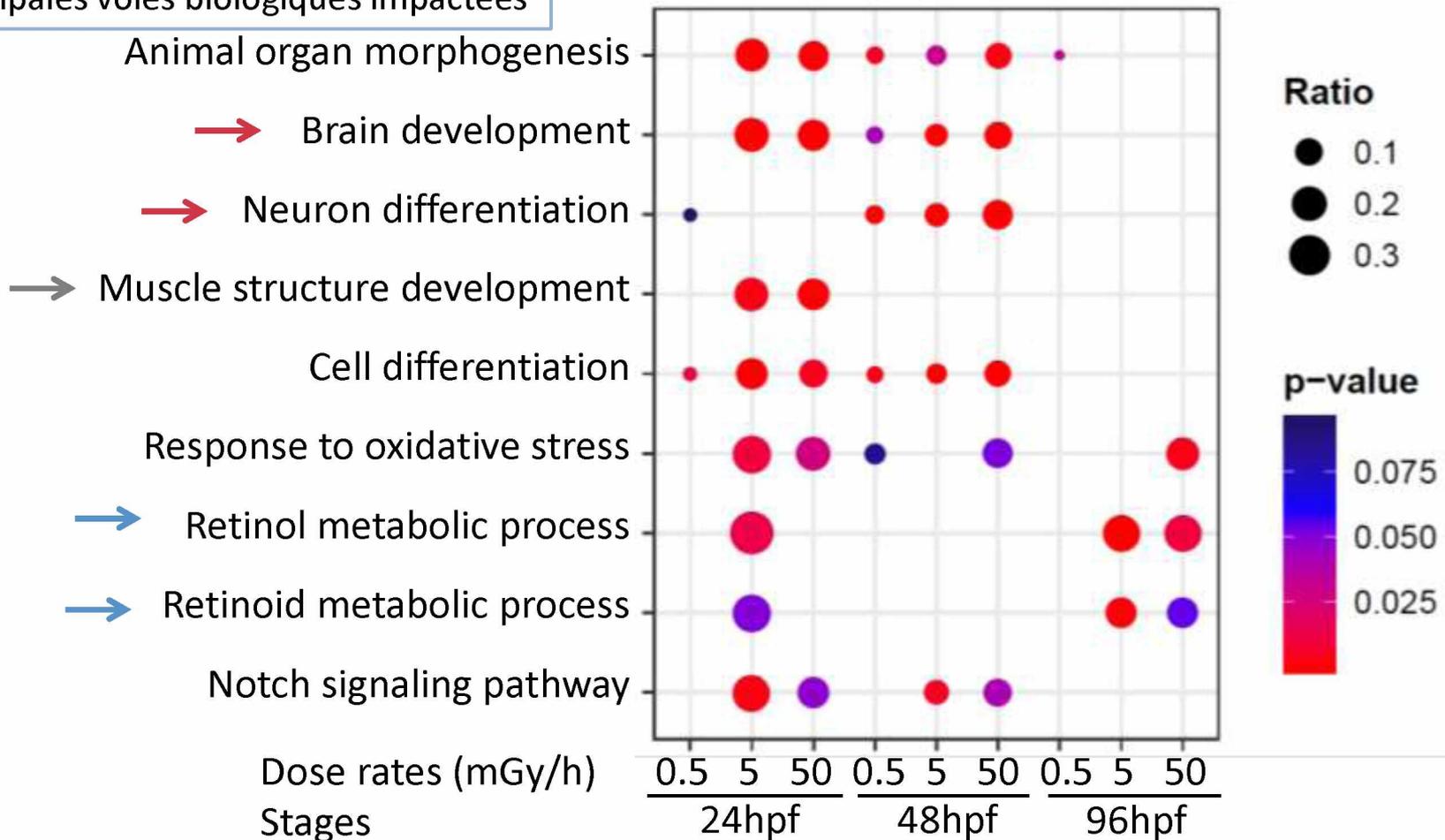
$$\text{Fold-change} = \left( \frac{\text{Expression Exposé}}{\text{Expression Contrôle}} \right)$$



- Moins de gènes différentiellement exprimés à **0,5 mGy/h**
- De 20% à 50% de gènes en commun entre **5 mGy/h et 50 mGy/h**

## Analyse transcriptomique

### Principales voies biologiques impactées

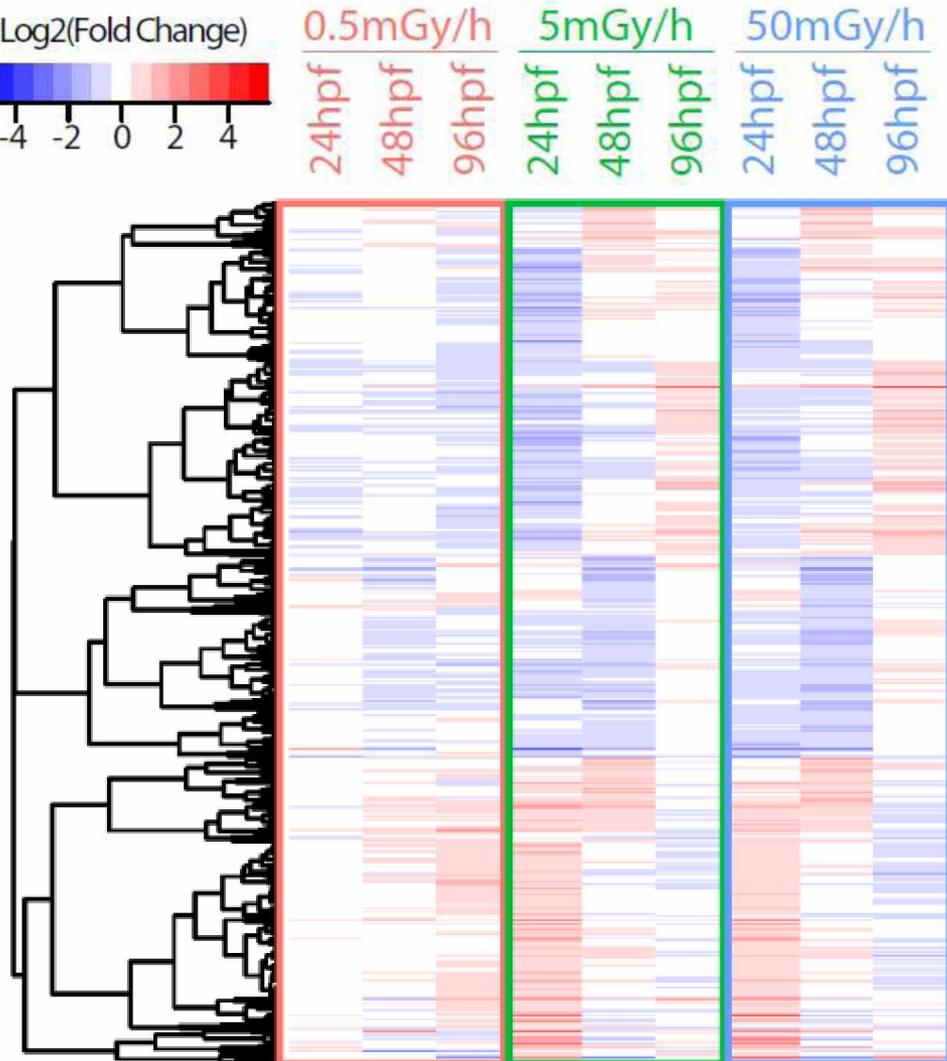
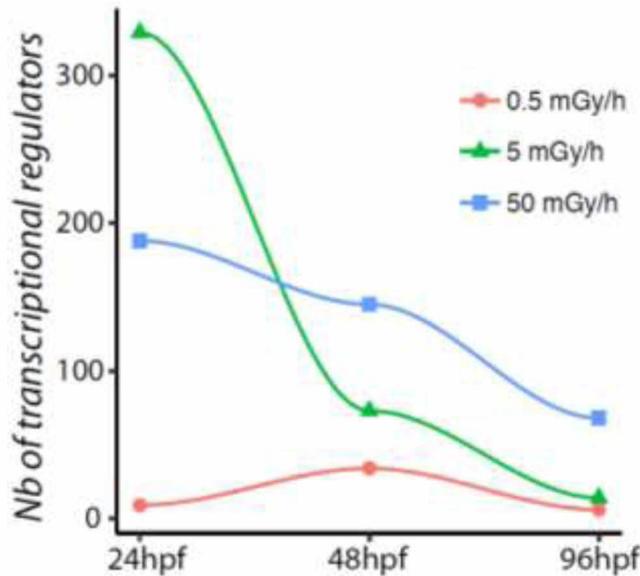


- Impact sur le **développement du SNC** à tous les débits de doses
- A 5 et 50 mGy/h impact sur la **voie de l'acide rétinoïque** et sur la myogenèse
- **Hypothèse:** perturbation de la voie de l'acide rétinoïque pourrait impacter le développement du SNC et des muscles

## Analyse transcriptomique

Facteurs de transcriptions différentiellement exprimés

Clusterisation des facteurs de transcription



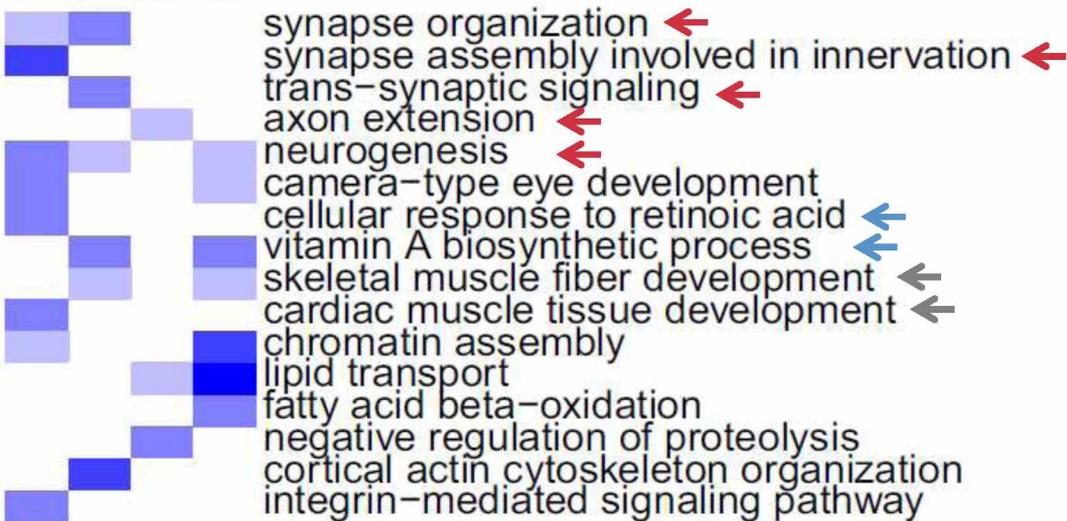
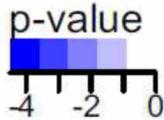
- Diminution du nombre de **facteurs de transcriptions** différentiellement exprimés au cours du développement
- Profil d'expression **similaire** entre 5 et 50 mGy/h

### Analyse protéomique à 96 hpf

Protéines différentiellement exprimées et voies biologiques impactées

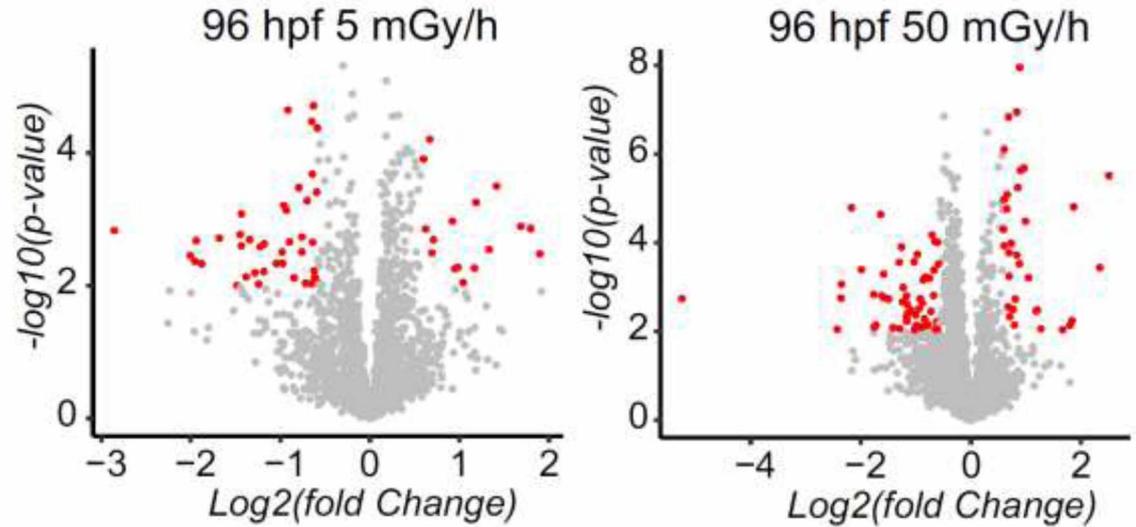


Up 50 mGy/h  
Down 50 mGy/h  
Up 5 mGy/h  
Down 5 mGy/h



### Critères pour les protéines différentiellement exprimées

Fold-change  $\geq 1,5$  et p-value ajustée  $< 0,01$



- Impact sur la **neurogenèse** et la **myogenèse**
- Perturbation de la **voie de l'acide rétinoïque**
- **Concordance avec les résultats de RNA-seq**

Hybridation *in situ* à 24 hpf

Visualisation de l'expression des gènes sur embryon entier

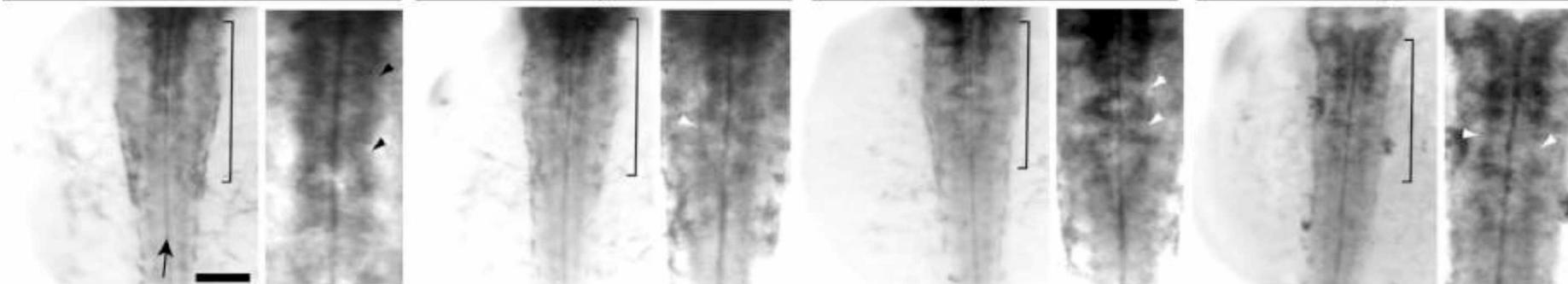
*her 4.4*

Control

0.5 mGy/h

5 mGy/h

50 mGy/h

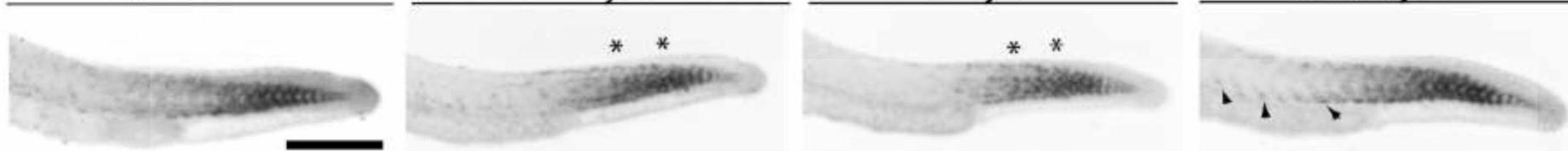
*myog*

Control

0.5 mGy/h

5 mGy/h

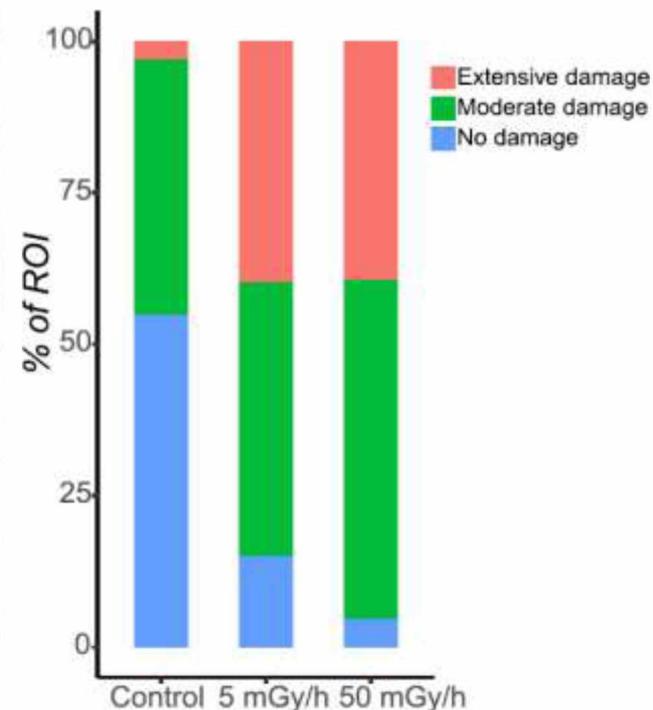
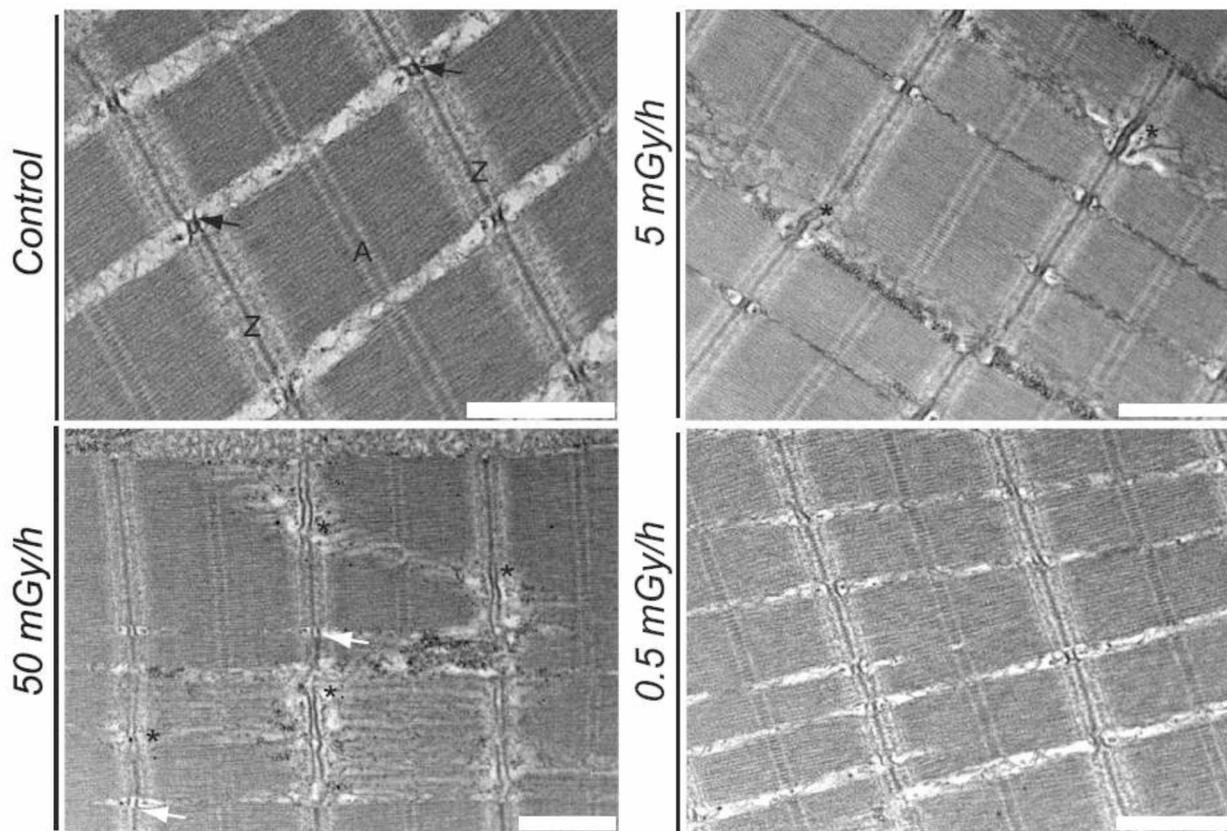
50 mGy/h



- Perturbation du patron d'expression de *her 4.4* au niveau des cellules progénitrices **neuronales**
- Perturbation du patron d'expression de *myog* au niveau des cellules progénitrices **musculaires**

## Observations tissulaire à 96 hpf

Observation du tissu musculaire au microscope électronique à transmission

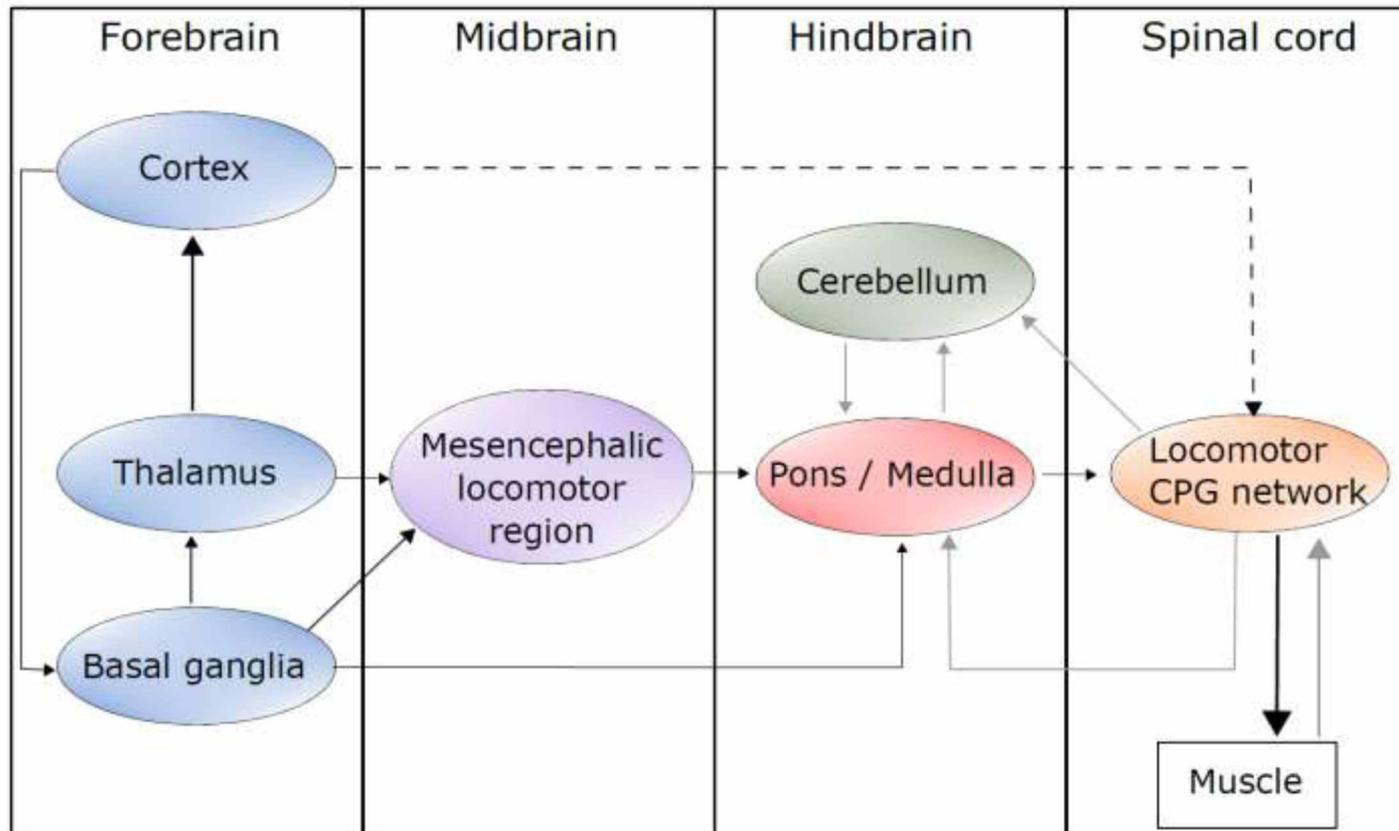


- Effet sur les myofibrilles musculaires à 5 et 50 mGy/h
- Altération des jonctions neuro-musculaire à 50 mGy/h

## Organisation du système locomoteur chez les vertébrés

Le fonctionnement du système locomoteur fait intervenir :

- les différentes parties du **cerveau** (forebrain, midbrain, hindbrain)
- la **moelle épinière**
- les **muscles**



**Réseau CPG dans la moelle épinière : principal acteur de la locomotion**

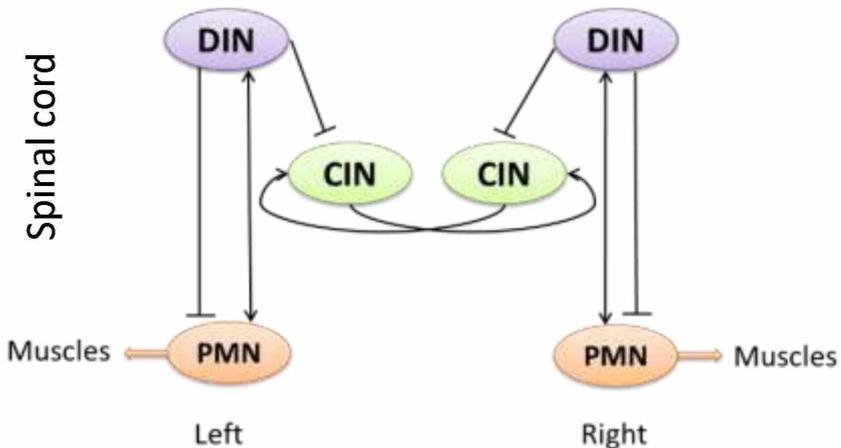
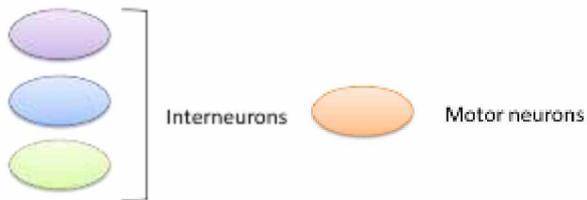
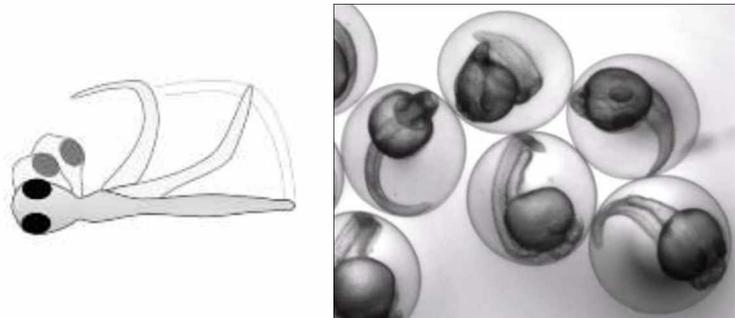
- Neurones sensoriels
- Interneurones
- Neurones moteurs

Tests comportementaux

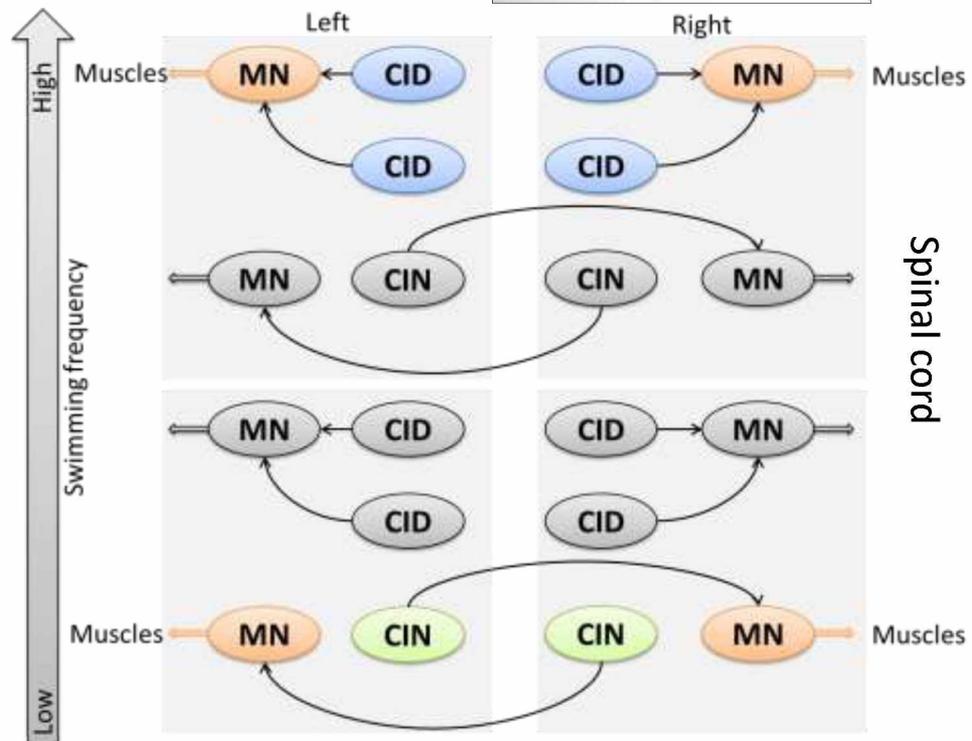
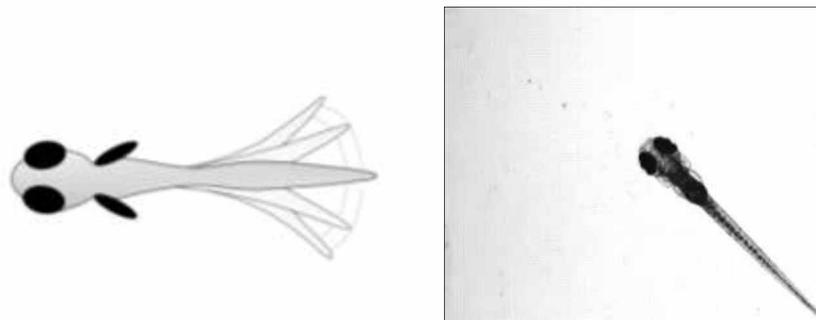
Paramètres intégrateurs du développement des fonctions locomotrices

Brustein *et al.* 2003  
 Goulding. 2009  
 Kiehn. 2016

Test n°1 : Tail coiling (24hpf)

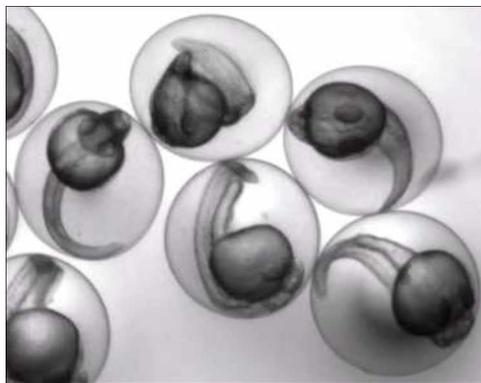


Test n°2 : Visual motor response (120hpf)

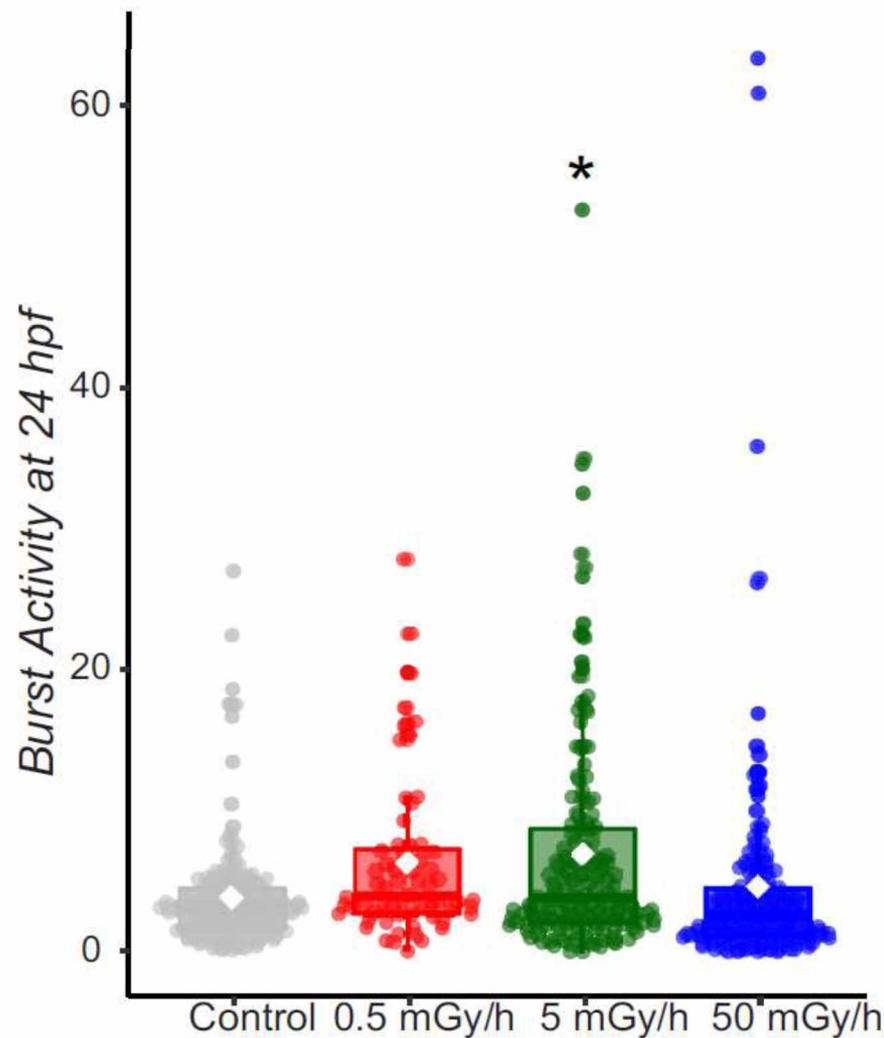


### Tests comportementaux

Activité embryonnaire à 24 hpf



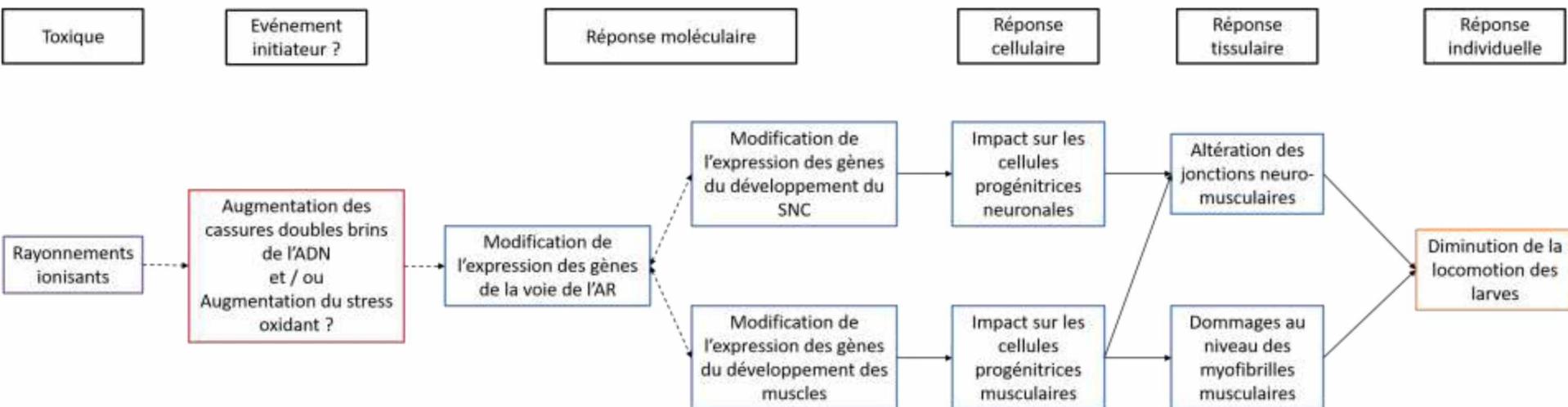
Test de permutation  
p-value < 0,05  
n = 147 - 250



➤ Augmentation de l'activité embryonnaire à 5mGy/h

## Principales conclusions

- Résultats similaires à 5 et 50 mGy/h
- Seuil des débits de doses conduisant à des effets significatifs se situe entre 0,5 et 5 mGy/h
- Effets moléculaires à un stade précoce de développement sont des paramètres sensibles et précis pour évaluer les effets plus tardifs observés à des échelles biologiques supérieures
- Proposition d'un AOP :



## Perspectives

- Caractérisation des réponses moléculaires et cellulaires entre 0,5 et 5 mGy/h
  - Etablir un seuil plus précis pour le domaine des faibles doses?



- Etude de l'impact des rayonnements ionisants sur la spécification des feuillets embryonnaires
  - Lien potentiel avec les effets sur le SNC et les muscles



- Irradiation longue à 5 et 50 mGy/h
  - Observation d'effets phénotypiques?



- Etude des autres modifications épigénétiques
  - Chromatine
  - Histones



- Analyse des effets des rayonnements ionisants sur les mitochondries
  - Stress oxydant
  - Effet sur la méthylation?





Olivier Armant  
Christelle Adam-Guillermin  
Sandrine Frelon  
Claire Della-Vedova  
Mohamed Amide Benadjaoud  
Nicolas Dubourg  
Béatrice Gagnaire  
Magali Floriani  
Isabelle Cavalié  
Virginie Camilleri

## Le LECO, LR2T et LRTA

**Les doctorants :** Caroline, Marine,  
Rémi, Alex, Hamza, Audrey,  
Cécile, Marie, Elsa, Noémie ...

Centre de Recherche  
en Cancérologie de Marseille

Luc Camoin  
Stéphane Audebert  
Emilie Baudelet



## Comité de suivi de thèse :

Philippe Lestaevel  
André Gilles  
Christoph Grunau  
Nele Horemans

## Financement:

NEEDS Environment  
CEA / IRSN project