



HAL
open science

Comparaison des effets radio-induits par les rayonnements beta reçus à l'ADN et à l'organisme entier chez le poisson zèbre, *Danio rerio*

Magali Schiano Di Lombo

► To cite this version:

Magali Schiano Di Lombo. Comparaison des effets radio-induits par les rayonnements beta reçus à l'ADN et à l'organisme entier chez le poisson zèbre, *Danio rerio*. Sciences de l'environnement. Université Aix Marseille, 2024. Français. ⟨NNT:⟩. ⟨tel-05116364⟩

HAL Id: tel-05116364

<https://theses.hal.science/tel-05116364v1>

Submitted on 17 Jun 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Copyright - All rights reserved

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

le 21 Mars 2024 par

Magali SCHIANO DI LOMBO

Comparaison des effets radio-induits par les rayonnements
beta reçus à l'ADN et à l'organisme entier chez le poisson

zèbre, *Danio rerio*

Discipline

Science de l'environnement

Spécialité

Environnement et santé

École doctorale

ED 251 - Sciences de l'environnement

Laboratoire/Partenaires de recherche

IRSN/PSE-ENV/SERPEN - Laboratoire
de recherche sur les effets des radionu-
cléides sur les écosystèmes (LECO)

Composition du jury

•	Marilyne STUART, Pr	Rapporteure
•	Canadian Nuclear Laboratories	
•	Vincent BRETON, Pr	Rapporteur
•	Université Clermont-Auvergne, LPC	
•	Laetitia DE JONG-MOREAU, MCF	Examinatrice
•	Université Aix-Marseille, IMBE	
•	Laure GARRIGUE-ANTAR, Pr	Présidente du jury
•	Université Paris-Est Créteil, LEESU	
•	Frank LE FOLL, Pr	Examineur
•	Université Le Havre Normandie, Sebio	
•	Béatrice GAGNAIRE, DR	Directrice de thèse
•	IRSN PSE-ENV/SERPEN/LECO	
•	Jérôme CACHOT, Pr	Co-directeur de thèse
•	Université de Bordeaux, EPOC-EA	
•	Yann PERROT, DR	Tuteur de la thèse
•	IRSN PSE-SANTE/SDOS/LDRI	

Affidavit

Je soussigné, Magali Schiano Di Lombo, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Béatrice Gagnaire, Jérôme Cachot et Yann Perrot, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

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

Fait à Saint-Paul-lez-Durance le 11 Août 2023



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

Liste de publications et participation aux conférences

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

- (1) **Schiano Di Lombo M.**, Cavalie I., Camilleri V., Perrot Y., Gagnaire B. 2023. Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry. *Radiation Research*, 199, 373-384
- (2) **Schiano Di Lombo M.**, Cavalie I., Camilleri V., Armant O., Perrot Y., Cachot J., Gagnaire B. 2023. Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 265, 106766
- (3) (en cours) **Schiano Di Lombo M.**, Cavalie I., Camilleri V., Perrot Y., Cachot J., Gagnaire B. Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish (*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine
- (4) (en cours) **Schiano Di Lombo M.**, Cavalie I., Camilleri V., Floriani M., Larcher T., Cachot J., Perrot Y., Gagnaire B. Study of the metabolic, muscular and behavioural alterations induced by the exposure to tritiated thymidine in the zebrafish, *Danio rerio*

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

— En présentiel

- (1) Journée des thèses de l'IRSN (28 - 31 Mars 2022, France) - oral
- (2) Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA, 30 Juin - 01 Juillet 2022, France) - oral
- (3) 5th International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity (ICRER, 04 - 09 Septembre 2022, Norvège) - oral
- (4) Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA, 05 - 06 Juillet 2023, France) - oral

— En ligne

- (1) Journée des thèses de l'IRSN (30 Mars - 01 Avril 2021) - oral
- (2) 28ème congrès des doctants, séminaire de l'école doctorale ED251 (14 - 15 Avril 2021) - poster
- (3) Colloque conjoint en écotoxicologie 2021 (31 Mai - 03 Juin 2021) - oral

Résumé

Le tritium est un isotope radioactif de l'hydrogène qui est présent dans tous les compartiments environnementaux. Ce dernier existe, entre autres, sous forme de thymidine tritiée, forme sélectionnée dans le cadre de ce travail de doctorat afin de caractériser la toxicité du tritium. L'internalisation et la toxicité de la thymidine tritiée ont été étudiées sur le poisson zèbre, *Danio rerio*. Ce modèle biologique a été choisi afin de permettre une comparaison des résultats obtenus avec ceux obtenus par le passé, mais également pour ses nombreux avantages expérimentaux, tels que son rapide développement et la transparence de ses œufs. L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre entraîne une internalisation du tritium dans l'organisme et l'ADN dès 22 µGy/h. Un ralentissement du développement est également observé à 22 et 170 µGy/h, ainsi qu'un retard d'éclosion à 170 et 470 µGy/h. L'exposition des embryons à 470 µGy/h pendant 24 et 72 heures entraîne, respectivement, une augmentation de l'activité des embryons dans leur chorion et une diminution du rythme cardiaque des larves. La production des ROS (espèces réactives de l'oxygène) augmente après 96 heures d'exposition à 170 µGy/h, et l'induction de dommages à l'ADN est significative dès 24 heures d'exposition à 22 µGy/h. Une surexpression de nombreux gènes est également observée après 24 heures d'exposition à 22 µGy/h. Les simulations de micro- et nanodosimétrie, quant à elles, confirment l'effet du volume des cellules sur la déposition d'énergie, ainsi que la formation majoritaire de SSB (cassures simple brin) et de dommages indirects. Ces expériences permettent de mettre en évidence des différences de toxicité entre le tritium organique, le tritium libre et le césium (¹³⁷Cs), mais également d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée.

Mots clés : tritium, thymidine tritiée, poisson zèbre, internalisation, ROS, développement, dommages à l'ADN, microdosimétrie, nanodosimétrie

Abstract

Tritium is a radioactive isotope of hydrogen and is present in all environmental compartments. It can exist under the form of tritiated thymidine, and this form was selected in this work in order to better characterize its toxic effects. Its internalization and toxicity have been studied on the zebrafish, *Danio rerio*. This biological model has been chosen as it allows the comparison between the results obtained in this work and in previous ones, but also because of its various experimental advantages, as its rapid development and the transparency of its embryos. Exposure of zebrafish embryos and larvae to an absorbed dose rate as low as 22 $\mu\text{Gy/h}$ led to its internalization in both the organism and the DNA. The development was temporarily slowed down after exposure to 22 and 170 $\mu\text{Gy/h}$, while the hatching was delayed after exposure to 170 and 470 $\mu\text{Gy/h}$. Exposure of the embryos and larvae to 470 $\mu\text{Gy/h}$ for 24 and 72 hours led to, respectively, an increase in the embryonic activity and to a decrease in the larval cardiac rhythm. The ROS (reactive oxygen species) production increased after exposure to 170 $\mu\text{Gy/h}$ for 96 hours, and DNA damage were induced after exposures to all selected absorbed dose rates for 24 and 96 hours. A surexpression of various genes was also observed after exposure to 22 $\mu\text{Gy/h}$ for 24 hours. Micro- and nanodosimetry simulations confirmed the effect of the cell volume on the energy depositing processes, while also highlighting the formation of a majority of SSB (single strand breaks) and of indirect damage. These experiments showed that various differences exist between the toxicity of aqueous tritium, organically bound tritium and cesium (^{137}Cs), while leading to a better understanding of the toxicity mechanisms arising from the exposure to tritiated thymidine.

Keywords: tritium, tritiated thymidine, zebrafish, internalization, ROS, development, DNA damage, microdosimetry, nanodosimetry

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier l'IRSN, et plus spécifiquement les services du SRTE et du SERPEN pour m'avoir accueillie au sein de leurs locaux et de leurs équipes, mais aussi pour avoir rendu cette thèse possible. Je désire aussi remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de doctorat. Merci également à Christine, Denis et Nicolas pour avoir accepté de faire partie de mon comité de pilotage, nos discussions annuelles ont été des plus enrichissantes.

Je souhaite également remercier les membres de mon encadrement pour la confiance qu'ils ont eue en moi, mais aussi pour leur encadrement et leurs conseils. Béatrice, merci d'avoir eu l'idée de cette thèse, de l'avoir rendue possible et d'avoir été présente pendant ces quatre années. Grâce à cette thèse, j'ai énormément grandi, que ça soit professionnellement ou personnellement. Yann, merci pour ta disponibilité sans faille et surtout, merci pour ta pédagogie et tes explications au niveau dosimétrique. Si cette partie de la thèse est ce qu'elle est, c'est grâce à toi. Jérôme, merci pour m'avoir encadrée pendant six ans, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, mais aussi pour m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. Je souhaite également remercier mes différents chefs de laboratoire. Rodolphe, que ça soit en tant que chef de labo ou en tant que chef de service, merci de t'être rendu disponible et d'avoir fait en sorte que cette thèse se passe de la meilleure manière possible. Patrick, merci pour toutes ces années à tes côtés et pour tes conseils, qu'ils soient professionnels ou personnels, cette thèse n'aurait clairement pas été la même sans toi. Olivier, merci pour ta présence en laboratoire, ces formations m'ont énormément

aidée. Merci également pour toutes ces discussions, entre autres au moment de la clôture des expérimentations et de la rédaction de la thèse, tes conseils m'ont vraiment été précieux. Merci également à Thibaut Larcher pour les analyses et marquages des mitochondries des larves de poisson zèbre.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire LECO. Plus particulièrement, je souhaiterais remercier Isabelle et Virginie, cette thèse n'aurait jamais été possible sans vous. Merci pour ces heures et journées passées au laboratoire, que ça soit pendant ou après les expérimentations. Merci aussi pour ces moments passés ensemble en dehors du laboratoire, vous êtes géniales. Magali Coquillat, merci pour ta présence, ta bonne humeur, et surtout ton aide administrative. Une chose est sûre, tu sais rendre la vie des membres du service plus facile! Merci Jean-François pour ta disponibilité et ton efficacité à toutes épreuves, la plupart de mes expériences n'auraient probablement jamais eu lieu sans toi, je te considère comme le professionnel de la ventilation nucléaire! Merci Daniel pour tout ce temps passé à m'apprendre le principe de la dosimétrie et à gérer les Quantulus pour qu'ils soient fonctionnels en tout temps. Ce projet n'aurait jamais été possible sans toi. Merci à toi, Nicolas, pour tous ces moments passés ensemble, mais aussi pour tous les conseils que tu as pu me donner quant à la manipulation de substances radioactives. Merci pour ta disponibilité et pour, quand c'était encore d'actualité, les petites pauses cigarette. Merci à Magali Floriani pour le temps que tu as passé à me former au MET, que ça soit pour la préparation des gellules, la coupe ou l'observation des muscles des petits zebras.

Evidemment, merci à tous les doctorants et stagiaires que j'ai pu croiser au cours de ma thèse. Pierre, mon plus fidèle collègue de bureau, merci à toi pour les heures passées en dehors de ce bureau maudit, que ça soit à jouer en ligne ou à dépenser bien trop d'argent dans des figurines Warhammer. Merci aussi pour tes recommandations en terme de jeux vidéos, mon compte en banque ne te remercie probablement pas.

Clément, mon compagnon de début de thèse, merci pour tous les conseils administratifs que tu as pu me donner quand je suis arrivée, j'aurais été perdue sans toi. Et évidemment, merci aussi pour toutes tes recommandations cinématographiques! Nathan, Dina et Sarah, quel plaisir d'avoir pu commencer ma thèse avec vous. On est tous partis à tour de rôle, mais tous les moments que l'on a pu passer ensemble me tiennent fortement à coeur. Elsa et Elizabeth, merci pour l'initiation à l'escalade et merci aussi pour les soirées passées à essayer de décoder tous les indices de Malfosse, j'en garde de très bons souvenirs. Adrien T., merci pour cette JdT que je n'oublierai pas de sitôt (pauvres serveurs...), mais aussi pour tous les moments que l'on a pu passer ensemble. Léa et Margot, on s'est rencontrées bien trop tard! Merci pour les sorties et pour toutes les pauses café. Et surtout, merci pour tous ces moments où vous avez réussi à me faire lâcher mon PC quand j'étais submergée par la thèse. Thomas, Léonore et Théo, merci pour ces sessions jeu de rôle, ça a été génial de pouvoir m'y remettre. Hugo et Selena, merci pour ces pauses café, qu'elles soient le matin ou le midi, j'aurais aimé pouvoir vous rencontrer plus tôt, vous aussi.

Pour finir, merci à ma famille et à mes amis. Merci aux rencontres virtuelles que j'ai pu faire pendant ces quatre années, avec une mention toute particulière pour vous, Marie, Marlène, Simon, Dydiane, Tamara et Alex. Discuter et écrire avec vous a été un de mes passe-temps favoris. Tant qu'à être dans le virtuel, merci à mes deux streamers favoris, Ponce et CrazyMoxx, pour avoir été un fond sonore pendant mes plus grandes heures de rédaction, mais aussi pour m'avoir divertie quand je ne travaillais pas. Merci à vous, Inès et Elise, pour avoir toujours été disponibles quand je rentrais en Gironde, mais aussi pour tous les appels que l'on a pu échangés. Merci, évidemment, à ma famille. Merci pour ces heures entières passées au téléphone ou en visio, mais aussi pour toutes les vacances que l'on a pu s'organiser malgré la thèse et le COVID. Merci d'être venus visiter Manosque et la Provence, que ça soit au moment de ma soutenance ou bien avant celle-ci. Votre soutien, qu'il soit personnel ou professionnel, a été ma plus grande force pendant ces quatre années, donc merci à vous. Marius, merci

à toi pour tout ce que tu m'as apporté. Merci de m'avoir soutenue quand je doutais, même quand c'était bien trop tard le soir pour être acceptable, ou quand je ne savais plus par quel bout prendre mes résultats ou ma rédaction. Merci de m'avoir motivée à rédiger ma thèse sur LaTeX et InkScape. Merci d'avoir répondu à toutes questions, même quand une simple recherche Google aurait pu y répondre, le résultat est bien meilleur que ce que j'aurais pu espérer. En somme, merci d'avoir été toi, et surtout d'avoir été là, et ce pendant la majeure partie de ce doctorat.

Encore une fois, merci à tous, et bonne lecture!

Table des matières

Affidavit	2
Liste de publications et participation aux conférences	3
Résumé	5
Abstract	6
Remerciements	7
Table des matières	11
Table des figures	16
Liste des tableaux	18
Acronymes	18
Introduction générale	21
A. ETAT DE L'ART	24
A.1. Les rayonnements ionisants	24
A.1.1. Les différentes familles de rayonnements ionisants	24
A.1.2. Les origines des radionucléides	26
A.1.3. Les risques liés aux rayonnements ionisants	28
A.1.4. La radioprotection	29
A.2. Le tritium	30
A.2.1. Les formes du tritium	30

A.2.2.	Les origines du tritium	33
A.2.3.	Le tritium dans l'environnement	34
A.3.	La dosimétrie	35
A.3.1.	Le concept de dosimétrie	35
A.3.2.	La microdosimétrie	36
A.3.3.	La nanodosimétrie	37
A.3.4.	La dosimétrie appliquée au tritium	39
A.4.	La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques	40
A.4.1.	Les effets moléculaires du tritium	40
A.4.2.	Les effets cellulaires du tritium	42
A.4.3.	Les effets tissulaires du tritium	43
A.4.4.	Les effets individuels du tritium	44
A.4.5.	L'efficacité biologique relative, EBR	45
B.	OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX	48
B.1.	Les objectifs de la thèse	48
B.1.1.	Axe 1 : Internalisation de la thymidine tritiée et quantification des dépôts cellulaires d'énergie	49
B.1.2.	Axe 2 : Etude multi-échelles de la toxicité de la thymidine tritiée à différents niveaux d'organisation biologique	49
B.1.3.	Axe 3 : Détermination des mécanismes d'action de la thymidine tritiée et comparaison de sa toxicité avec celles d'autres radionu- cléides	50
B.2.	Les choix expérimentaux	51
B.2.1.	Le poisson zèbre, <i>Danio rerio</i>	51
B.2.2.	La thymidine tritiée	54
B.2.3.	Les débits de dose absorbée	56
B.2.4.	Les marqueurs biologiques	57
B.3.	Les choix de simulations	62
B.3.1.	Les cellules	62

B.3.2. Les noyaux	62
C. AXE 1 : INTERNALISATION DU TRITIUM SOUS FORME ORGANIQUE	65
C.1. Objectifs de l'étude	65
C.2. Synthèse des résultats de l'étude	66
C.2.1. Approche expérimentale : analyse de l'internalisation à l'échelle de l'organisme et de l'ADN	66
C.2.2. Approche théorique : analyse des dépôts d'énergie à l'échelle des cellules	69
C.3. Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry" . .	71
C.4. Discussion	86
D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN	91
D.1. Objectifs de l'étude	91
D.2. Synthèse des résultats de l'étude	92
D.2.1. Axe expérimental : mesure des dommages à l'ADN	92
D.2.2. Axe théorique : simulation des dommages à l'ADN	95
D.3. Article 2 : "Experimental and computational analysis of the damage in- duced in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) DNA after exposure to tritiated thymidine	98
D.4. Discussion	131
E. AXE 2 : TOXICITE DE LA THYMINDE TRITIEE : DE LA MOLECULE A L'INDIVIDU	135
E.1. Objectifs de l'étude	135
E.2. Synthèse des résultats de l'étude	136
E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (<i>Danio rerio</i>)" .	139
E.4. Discussion	152

F. AXE 2 : EFFETS DE LA THYMIDINE TRITIÉE SUR LE COMPORTEMENT NATATOIRE DES LARVES DE POISSON ZÈBRE	157
F.1. Objectifs de l'axe	157
F.2. Matériel et méthodes	158
F.2.1. Enregistrement des mouvements des individus	158
F.2.2. Mesure de l'activité natatoire en conditions normales d'exposition	159
F.2.3. Mesure de la réaction à un stimulus lumineux	160
F.2.4. Mesure de la réaction à une vibration	162
F.3. Résultats	163
F.3.1. Activité de nage à l'obscurité	163
F.3.2. Réaction à un stimulus lumineux	164
F.3.3. Réaction à un stimulus vibratoire	166
F.4. Discussion	168
G. DISCUSSION GENERALE	174
G.1. L'intérêt et les limitations de l'étude multi-échelles de l'activité et des dépôts d'énergie issus du tritium	174
G.2. Axe 3 : Les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée : premières hypothèses	178
G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma	184
H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	194
H.1. Conclusion générale	194
H.1.1. Internalisation et dépôts d'énergie	194
H.1.2. Toxicité de la thymidine tritiée	195
H.2. Perspectives de recherche	197
H.2.1. Le développement de nouveaux modèles de simulations : une nécessité pour les expositions <i>in vivo</i> chroniques.	197

H.2.2. L'étude d'un plus grand nombre de marqueurs de toxicité : une nécessité afin de déterminer les mécanismes toxiques de la thymidine tritiée.	199
H.2.3. L'étude de stades de développement plus avancés et d'autres formes biologiques du tritium : une nécessité pour confirmer les hypothèses formées au cours de ce doctorat.	200
Bibliographie	203
Index	229
A. Annexe 1 : Cycle de l'hydrogène dans l'environnement	233
ANNEXES	233
B. Annexe 2 : Protocoles expérimentaux relatifs à l'axe 1	234
B.1. Reproduction et tri des œufs	234
B.2. Séchage et minéralisation pour la mesure d'activité	235
B.3. Déchoriation des embryons de 27 et 51 hpf	236
C. Annexe 3 : Qualification de l'importance de la prise en compte des cellules voisines pendant les simulations de microdosimétrie	238

Table des figures

A.1. Représentation des différentes familles de rayonnements ionisants. . .	25
A.2. Représentation schématique de l'hydrogène et de ses deux isotopes. .	31
A.3. Processus de simulation de nanodosimétrie	38
B.1. Objectifs de la thèse.	48
B.2. Frise du développement du poisson zèbre.	52
B.3. Processus de transformation de la thymidine en thymine.	55
B.4. Représentation de la thymidine tritiée.	55
B.5. Frise des débits de dose absorbée étudiés.	56
B.6. Marqueurs de toxicité étudiés pendant le doctorat.	58
C.1. Schéma récapitulatif des expériences réalisées dans l'axe expérimental de l'axe 1 de la thèse.	67
C.2. Schéma récapitulatif des simulations réalisées dans l'axe théorique de l'axe 1 de la thèse.	70
D.1. Schéma récapitulatif des expériences menées dans le cadre de l'analyse des dommages à l'ADN.	93
D.2. Schéma récapitulatif des simulations de nanodosimétrie réalisées dans le cadre de l'analyse des dommages à l'ADN.	96
E.1. Schéma récapitulatif des expériences réalisées dans le cadre de l'étude multi-échelles des effets toxiques de la thymidine tritiée.	136
F.1. Représentation simplifiée du protocole de mesure comportementale. .	159

F.2. Distance parcourue par les larves pendant leur période de nage basale.	163
F.3. Distance parcourue par les larves dans les différentes conditions lumineuses.	164
F.4. Réponse natatoire au changement de luminosité.	166
F.5. Réponse de nage pré- et post-stimulus vibratoire.	167
F.6. Réaction natatoire au stimulus vibratoire.	168
G.1. Mécanismes d'action de la thymidine tritiée sur le poisson zèbre	180
G.2. Taux de cassures à l'ADN induites par le tritium organique, le tritium libre et le césium.	186
G.3. Complexité des DSB induites par le tritium organique, le tritium libre et le césium	187
G.4. Origine des cassures induites par le tritium organique, le tritium libre et le césium	188
G.5. Origine des DSB induites par le tritium organique, le tritium libre et le césium	188
S.1. Cycle de l'hydrogène dans l'environnement	233
S.2. Représentation schématique de la mise en reproduction des poissons adultes.	234
S.3. Protocoles de séchage et de minéralisation des individus pour mesure de la teneur interne en tritium.	235
S.4. Représentation du processus de déchoriation des embryons de poisson zèbre.	236
S.5. Energie moyenne impartie dans les cellules sphériques et ellipsoïdales.	238

Liste des tableaux

B.1. Processus biologiques d'intérêt étudiés par le biais du suivi de l'expression génique.	59
B.2. Génome détaillé du poisson zèbre	64
G.1. Tableau récapitulatif des effets toxiques de la thymidine tritiée sur les embryons et larves de poisson zèbre.	179

Acronymes

ADN acide désoxyribonucléique

AOP Adverse Outcome Pathway

ATP adénosine triphosphate

BET bromure d'éthidium

cDSB cassure double brin complexe

CIPR Commission Internationale de Protection Radiologique

CNPE centre nucléaire de production d'électricité

DMSO diméthylsulfoxyde

DSB cassures double brin

EBR efficacité biologique relative

eOBT tritium organiquement lié échangeable

ERICA Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management

FASSET Framework for assessing the impact of ionising radiation on non-human
biota

Fpg formamidopyrimidine glycolase

Gpb Giga paire de bases

GPx glutathion peroxydase

hpf heures post-fertilisation

HT tritium gazeux

HTO eau tritiée

IRSN Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

MBT mid-blastula transition

neOBT tritium organiquement lié non échangeable

OBT tritium organiquement lié

PMA phorbol myristate acétate

PNEC Predicted No-Effect Concentration

ROS espèces réactives de l'oxygène

SB cassure à l'ADN

sDSB cassure double brin simple

SSB cassures simple brin

TEL transfert d'énergie linéique

TFWT tritium libre dans les tissus

Introduction générale

Les populations naturelles d'organismes aquatiques sont exposées à des radionucléides émetteurs de différents types de rayonnements (α , β , γ). Ces expositions peuvent mener à l'apparition d'effets délétères qui dépendent de plusieurs facteurs tels que le type de rayonnement, le temps d'exposition et la répartition subcellulaire du radionucléide dans l'organisme (IRSN, 2012). Plusieurs études se sont déjà intéressées à la toxicité de nombreux radionucléides sur différents vertébrés et invertébrés aquatiques. Ces études ont mis en évidence des effets développementaux et génotoxiques avec, entre autres, l'apparition de dommages à l'ADN, une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène et plusieurs dérégulations dans l'expression de nombreux gènes (Adam-Guillermin et al., 2012; AlAmri et al., 2012; Bedford et al., 1975; Gagnaire et al., 2015a; Han et al., 2014; Parisot et al., 2015).

Le poisson zèbre, *Danio rerio*, est un vertébré faisant partie de la famille des Cyprinidées. Ce dernier est un modèle biologique de plus en plus utilisé dans les domaines de la biologie, toxicologie et écotoxicologie (Lele and Krone, 1996; Li et al., 2021; Padilla et al., 2011; Pei and Strauss, 2013; Powers et al., 2010; Sassi-Messai et al., 2009). Cette utilisation est liée à l'obtention simple de pontes, la transparence de ces dernières, et le rapide développement des embryons et larves. Egalement, le génome du poisson zèbre est entièrement séquencé, ce qui rend son utilisation dans des études génomiques et transcriptomiques d'autant plus justifiée.

Le tritium est un émetteur β de faible énergie. Il est un isotope de l'hydrogène et possède une demi-vie radioactive de 12,3 ans (Health Protection Agency, 2007; IRSN, 2014). Son spectre d'énergie est continu et présente une énergie moyenne de 5,7 keV et

une énergie maximale de 18,6 keV. Les rayonnements β issus du tritium ne parcourent que de faibles distances dans l'air et dans l'eau (ou les tissus), avec des distances maximales de 6 et 1 μm , respectivement. Ce radionucléide est présent dans tous les compartiments environnementaux, mais majoritairement dans les écosystèmes aquatiques (ASN, 2010). En raison de ses propriétés physico-chimiques, identiques à celle de l'hydrogène, le tritium peut pénétrer dans l'organisme, rendant l'étude de son internalisation et de ses potentiels effets toxiques d'autant plus importante. Le tritium est retrouvé sous trois formes dans l'organisme : le tritium libre dans les tissus (TFWT), le tritium organique échangeable (eOBT) et le tritium organique non échangeable (neOBT). Malgré le fait que le temps de rétention du tritium organique dans l'organisme soit plus long que celui du tritium libre, son internalisation et sa toxicité ne sont que peu étudiées, et ces études sont majoritairement réalisées *in vitro* (Hopwood et al., 1975; Jaeschke et al., 2011; Naito et al., 1987; Zajicek et al., 1963).

L'objectif général de cette thèse est de caractériser l'internalisation et la toxicité du tritium lié à la thymidine (forme non échangeable du tritium) chez le poisson zèbre à ses stades précoces de développement. Si la réalisation d'expérimentations sur les embryons et larves de poisson zèbre permet d'obtenir de nombreuses informations clés quant à ces deux processus, une importante part de ce doctorat est la dosimétrie, soit la simulation des dépôts d'énergie issus des électrons émis lors de la désintégration du tritium. Ces dernières ont été réalisées à l'échelle de la cellule (microdosimétrie) et de l'ADN (nanodosimétrie), alors que les expérimentations d'internalisation se sont concentrées sur l'organisme entier et l'ADN. L'analyse des marqueurs de toxicité, quant à elle, a été réalisée à plusieurs échelles biologiques, allant de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle. La première partie de ce travail de doctorat correspond à la caractérisation et quantification de l'internalisation du tritium dans l'organisme, mais également des dépôts d'énergie pouvant être attendus au niveau de la cellule (Chapitre C). La deuxième partie de ce travail concerne l'étude des dommages à l'ADN par le biais de mesures expérimentales, mais également par le biais de simulations

de nanodosimétrie (Chapitre D). La troisième partie se concentre sur l'étude multi-marqueurs de la toxicité de la thymidine tritiée, et plus particulièrement sur l'étude du développement, du stress oxydant et de l'expression génique chez des individus exposés pendant plusieurs jours au radionucléide (Chapitre E). Pour finir, la quatrième partie de ce projet se concentre sur l'impact comportemental d'une exposition à la thymidine tritiée (Chapitre F). La partie finale de ce mémoire de doctorat discute des liens potentiels entre les différents effets mesurés expérimentalement, mais également de l'importance des simulations dans les études d'internalisation et de toxicité (Chapitre G). C'est également dans cette dernière partie que la toxicité du tritium organique est comparée à celles du tritium libre et du césium (^{137}Cs).

A. ETAT DE L'ART

A.1. Les rayonnements ionisants

A.1.1. Les différentes familles de rayonnements ionisants

La matière est composée, sous toutes ses formes, d'atomes. Ces derniers sont composés de différents constituants, tels que les neutrons et les protons, qui constituent ensemble le noyau de l'atome. Autour de ce noyau, des électrons gravitent afin que l'atome soit électriquement neutre. Quand un atome a un excès de certains de ses constituants nucléaires, il est considéré comme étant instable (IRSN, 2012). Dans ce cas, l'atome se désintègre et émet un rayonnement afin d'atteindre un état plus stable : c'est la radioactivité. Une seule désintégration ne suffit pas toujours, l'atome résultant de la première désintégration pouvant encore être instable. Dans ce cas, une chaîne de multiples désintégrations successives est nécessaire afin que l'atome initial atteigne un état stable. Lorsqu'un rayonnement issu de la désintégration d'un atome instable est capable d'arracher des électrons présents dans la matière, on considère ce rayonnement comme étant ionisant et l'atome comme étant un radionucléide.

Si l'origine des rayonnements ionisants permet de les classifier, cela ne donne pas toutes les informations nécessaires pour les caractériser (IRSN, 2012). Pour avoir plus d'informations sur les différentes caractéristiques d'un rayonnement ionisant, le transfert d'énergie linéique (TEL) peut être utilisé (Li et al., 2018; Zirkle et al., 1951). Ce dernier est exprimé en keV/ μm et dépend de deux facteurs : le matériau que le rayonnement traverse et les caractéristiques du rayonnement (type de particule et

énergie). Plus la distance parcourue entre chaque dépôt d'énergie est grande, plus l'énergie des dépôts en question est faible, et le TEL l'est également. En effet, un rayonnement ionisant possédant un faible TEL parcourt une grande distance dans la matière, alors qu'un rayonnement ionisant possédant un fort TEL parcourt une distance plus courte dans cette même matière.

Les rayonnements ionisants sont divisés en trois familles distinctes, elles-mêmes réparties en deux catégories (Azzam et al., 2012; Han et al., 2014). Ces derniers sont représentés dans la Figure A.1 :

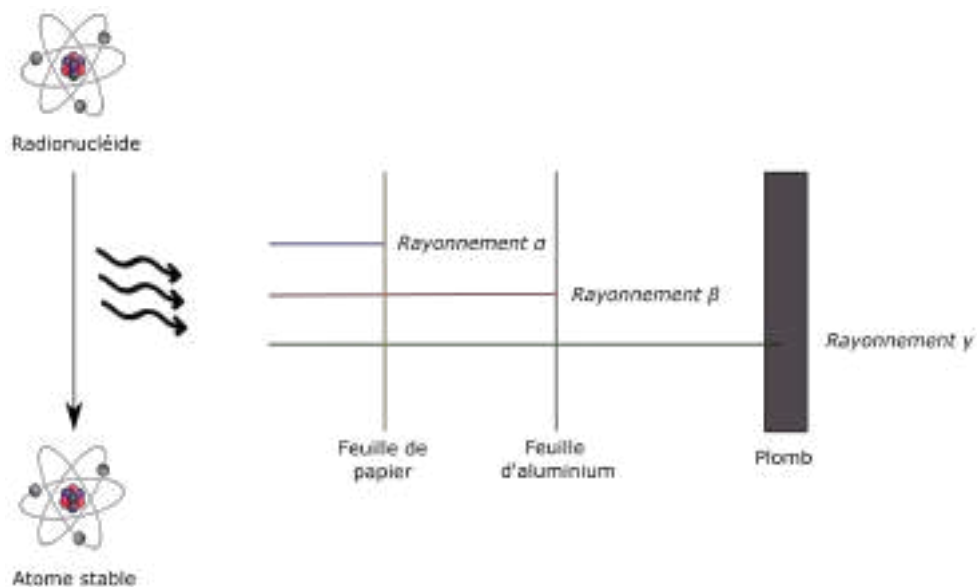


FIGURE A.1. – Représentation des rayonnements ionisants α , β et γ , issus de la désintégration des radionucléides, ainsi que des matériaux nécessaires pour stopper leur parcours dans l'air.

— **Les rayonnements particuliers :**

! Les rayonnements α : ces rayonnements possèdent le TEL le plus élevé, et par conséquent, le pouvoir pénétrant le plus faible. Ils ne parcourent que quelques centimètres dans l'air et sont stoppés par une feuille de papier (L'Annunziata, 2012). Ils sont émis par les radionucléides présentant un excès de neutrons ou de protons. Ces atomes, lors de leur désintégration,

émettent un atome d'hélium constitué de deux protons et deux neutrons, également appelée particule α . L'uranium (^{238}U) et le radium (^{226}Ra) sont des radionucléides émetteurs de rayonnements α .

l Les rayonnements β : ces rayonnements possèdent un pouvoir pénétrant plus élevé et un TEL plus faible que les rayonnements α . Les rayonnements β peuvent être stoppés par un habit ou par une feuille d'aluminium. Ces derniers sont émis par les radionucléides dans lesquels un grand écart entre les nombres de neutrons et de protons est retrouvé. Lors de la désintégration de ces atomes, la particule émise est soit un positron (β^+), soit un électron (β^-). Le fluor (^{18}F , β^+) et le tritium (^3H , β^-) sont des radionucléides émetteurs de rayonnements β .

— **Les rayonnements électromagnétiques** (rayonnements γ) : ces rayonnements possèdent le pouvoir pénétrant le plus élevé et le TEL le plus faible. Seule une épaisse couche de plomb peut stopper un rayonnement γ . Ils sont émis par les atomes qui possèdent trop d'énergie et leur désintégration entraîne l'émission d'une onde électromagnétique de même nature, mais plus énergétique, que celle émise par les rayons X (L'Annunziata, 2012). Le baryum (^{137}Ba , issu de la désintégration du césium, ^{137}Cs) et l'américium (^{241}Am) sont des radionucléides émetteurs de rayonnements γ .

A.1.2. Les origines des radionucléides

Comme de nombreux composés retrouvés sur Terre, les rayonnements ionisants ont deux origines : une origine naturelle et une origine humaine (CEA, 2002; IRSN, 2012; UNSCEAR, 1996).

Il y a cinq milliards d'années environ, au moment où la Terre a été formée, les rayonnements ionisants existaient déjà (Han et al., 2014; Kong et al., 2016). Ces derniers étaient issus de radionucléides dont la majorité a, depuis, retrouvé une forme stable. Cependant, certains radionucléides dont la demi-vie radioactive est longue

A. ETAT DE L'ART – A.1. Les rayonnements ionisants

émettent encore des rayonnements ionisants. C'est le cas, par exemple, de l'uranium (^{238}U) et du potassium (^{40}K) dont les demi-vies radioactives sont de 4,5 et 1,2 milliards d'années, respectivement. Par conséquent, les descendants radioactifs de l'uranium continuent d'être formés et d'émettre des rayonnements ionisants. C'est le cas, par exemple, du radium (^{226}Ra) qui, lors de sa désintégration, se transforme en un gaz également considéré comme étant radioactif, le radon (^{222}Rn). Les radionucléides et, par conséquent, les rayonnements ionisants, ont également une origine cosmique : l'action des rayonnements cosmiques de forte énergie (Kong et al., 2016). Cette action peut donner naissance à des radionucléides tels que le tritium (^3H) et le carbone (^{14}C).

Les sources humaines sont, quant à elles, plus diversifiées (Han et al., 2014; Kong et al., 2016). Elles peuvent être classées en deux catégories : les rejets réglementés et les rejets exceptionnels ou accidentels. Par exemple, les activités d'un centre nucléaire de production d'électricité (CNPE), d'un centre de retraitement de combustibles usagés, ou d'un hôpital sont considérées comme des activités donnant lieu à des rejets réglementés, ces derniers ayant été discutés et réduits au maximum avant d'être mis en place. Dans les effluents liquides des CNPE, une activité moyenne de $(6 - 40) \times 10^4$ Bq/L de tritium est mesurée, et une activité moyenne de 1×10^8 Bq/L est mesurée dans les effluents de l'usine de retraitement des combustibles usagés de la Hague (ASN, 2010; Health Protection Agency, 2007). Cependant, les rejets comme ceux causés par les essais nucléaires atmosphériques ayant eu lieu entre 1945 et 1980 sont considérés comme des rejets exceptionnels. C'est également le cas des rejets issus des accidents nucléaires de Tchernobyl en Ukraine et de Fukushima au Japon, deux accidents ayant eu lieu en 1986 et 2011, respectivement. Ces deux accidents sont responsables de rejets de quantités importantes de radionucléides tels que l'iode (^{131}I), le césium (^{134}Cs et ^{137}Cs), l'américium (^{241}Am) et le plutonium (^{238}Pu et $^{239+240}\text{Pu}$) (Izrael, 2007; Kim et al., 2012; Smith and Beresford, 2005; Yoshida and Kanda, 2012).

A.1.3. Les risques liés aux rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants sont considérés comme dangereux vis-à-vis de l'exposition humaine (IRSN, 2012). Cette dernière est assez commune, avec des expositions exceptionnelles telles que les expositions liées à différentes analyses médicales (*e.g.*, la radiographie), mais elle peut également être considérée comme fréquente en fonction du lieu de résidence de la personne exposée, avec par exemple l'exposition au radon (^{222}Rn), un gaz présent sur la totalité du territoire français. Afin de caractériser au mieux les différentes expositions auxquelles l'Homme peut être sujet, deux types d'exposition ont été décrites :

- L'exposition externe : une exposition est considérée comme externe lorsque le radionucléide se trouve à l'extérieur du corps. Elle est considérée dans le cas d'une irradiation, par exemple. C'est une voie d'exposition qui est considérée comme négligeable dans le cas des rayonnements possédant un faible pouvoir pénétrant, elle n'est donc prise en considération que dans le cas des rayonnements γ .
- L'exposition interne : une exposition est considérée comme interne lorsque le radionucléide est présent dans l'organisme cible. Elle est, par exemple, considérée après ingestion du radionucléide, ou après contact de ce dernier avec une plaie ouverte. Les rayonnements α et β possédant un faible pouvoir pénétrant, l'exposition interne est considérée comme étant leur seule voie d'exposition.

Lorsque l'Homme est exposé aux rayonnements ionisants, deux types d'effets sont considérés comme pouvant apparaître (IRSN, 2012) :

- Les effets immédiats, apparaissant à partir d'un certain seuil d'exposition, également appelés effets déterministes : ces effets sont généralement considérés dans le cas d'expositions à de hauts débits de dose absorbée (Beaton et al., 2019). Les effets déterministes sont, par exemple, le changement de formulation sanguine, l'apparition de nausées ou de brûlures cutanées.
- Les effets à long terme, également appelés effets stochastiques ou aléatoires : ces

effets sont considérés dès les plus faibles débits de dose absorbée. On considère, entre autres, l'apparition de cancers ou de tumeurs comme l'effet stochastique le plus connu.

A.1.4. La radioprotection

Comme indiqué dans la partie précédente, l'exposition de l'Homme aux rayonnements ionisants représente un risque. C'est pour cela que la radioprotection a été mise au point. Elle correspond à l'ensemble des moyens destinés à protéger l'Homme des rayonnements ionisants et de leurs effets néfastes (IRSN, 2012). C'est dans le cadre de cette même radioprotection que différentes unités de mesure ont été mises au point afin de pouvoir caractériser l'exposition aux rayonnements ionisants (Li et al., 2018).

L'unité la plus commune pour caractériser l'activité d'un échantillon est le Becquerel (Bq), 1 Bq représentant une désintégration par seconde. Le plus fréquemment, l'activité est exprimée en fonction du volume concerné, soit en Bq/L dans les échantillons liquides, en Bq/m³ dans les échantillons gazeux et en Bq/kg dans les échantillons solides. La dose absorbée est, quant à elle, définie en Gray (Gy) et correspond à l'énergie déposée par unité de masse, avec $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$ (Li et al., 2018). Les débits de dose absorbée correspondent à la dose absorbée par unité de temps, elle est généralement exprimée en Gy/jour ou en Gy/heure. Cependant, les dommages causés par une exposition aux rayonnements ionisants ne sont pas seulement liés à la dose absorbée. En effet, ils sont également liés à la nature du rayonnement utilisé, au type d'exposition, mais également à la cible (cellule, organe, ou organisme). Pour cette raison, deux autres concepts de dose ont été mis en place :

- La dose équivalente : elle prend en compte le type de rayonnement et est calculée en multipliant la dose absorbée par un facteur qui dépend du rayonnement (*e.g.*, facteur 3 pour le tritium, (Adam-Guillermin et al., 2012)).
- La dose efficace : celle-ci, en plus de prendre en compte le type de rayonnement, prend également en compte le type de tissu, ou l'organe touché par le rayonne-

ment. Cette dose permet donc d'intégrer l'importance de la cible touchée dans l'estimation des dommages causés par le rayonnement.

Plus récemment, la radioprotection a été adaptée à l'environnement, prenant en compte des risques équivalents à ceux déjà considérés pour l'Homme. En effet, pendant plusieurs années, il était considéré qu'étant donné que l'Homme était protégé, les écosystèmes l'étaient également (ICRP, 1977). Cependant, cette affirmation a été rediscutée dans les années 1990, de nombreux projets de recherche tels que Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management (ERICA) et Framework for assessing the impact of ionising radiation on non-human biota (FASSET) voyant le jour à cette période-là (Brown et al., 2004; Delistraty, 2008; Howard and Larsson, 2008; Larsson, 2004). C'est grâce à ces deux projets que plusieurs valeurs seuil ont été instaurées pour la protection de l'environnement. Le projet ERICA a mis en place un seuil de 10 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ qui est considéré comme le seuil sans effet pour les écosystèmes, là où le projet FASSET, quant à lui, a proposé une valeur prévisionnelle de 20 et 200 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ chez les vertébrés et invertébrés aquatiques, respectivement (Ferreira et al., 2023; Garnier-Laplace et al., 2010).

A.2. Le tritium

A.2.1. Les formes du tritium

Le tritium (^3H ou T) est un isotope de l'hydrogène, dans lequel on retrouve un proton et deux neutrons, comparé à l'hydrogène dans lequel on retrouve uniquement un proton, et aucun neutron (Figure A.2) (IRSN, 2014).

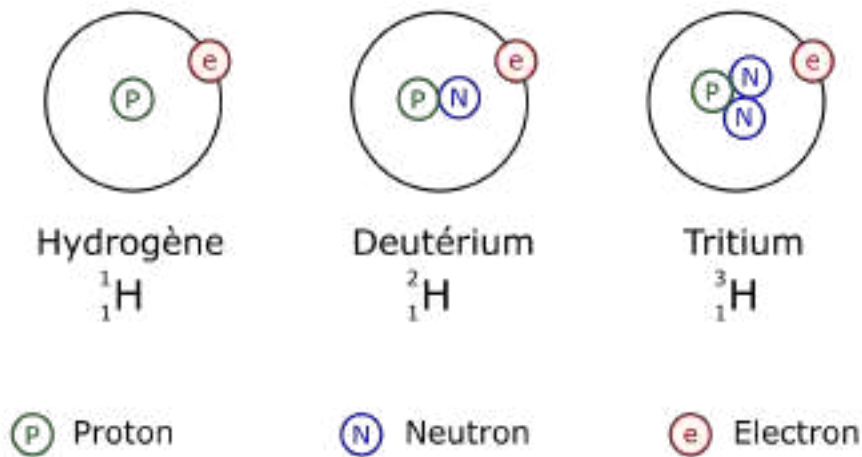


FIGURE A.2. – Représentation schématique de l'hydrogène et de ses deux isotopes, le deutérium et le tritium. Dans la figure, N représente un neutron, P représente un proton et e représente un électron. Le deutérium n'est pas un isotope radioactif de l'hydrogène.

Le tritium est le seul isotope radioactif de l'hydrogène (Chen, 2006). Il est émetteur de rayonnements β - de faible énergie et sa demi-vie radioactive est de 12,3 ans (Health Protection Agency, 2007; IRSN, 2014). Lors de sa désintégration (Equation A.1), le tritium libère un rayonnement de faible énergie ainsi qu'un électron, devenant ainsi un atome stable d'hélium.



Le spectre d'émission issu de cette désintégration est continu et présente une énergie moyenne de 5,7 keV, ainsi qu'une énergie maximale de 18,6 keV. Il est considéré comme possédant un faible pouvoir pénétrant et un fort TEL (4,7 keV/ μm), étant donné qu'il traverse des distances de 6 μm et d'environ 1 μm dans l'air et les tissus, respectivement (ASN, 2010; Hill and Johnson, 1993). Le tritium, étant un isotope de l'hydrogène, possède des propriétés physico-chimiques similaires à ce dernier, ce qui signifie également qu'il se comporte de la même manière que l'hydrogène dans l'environnement (ASN, 2010; Jha et al., 2005). Considérant ses propriétés, le tritium

est considéré comme étant très mobile dans l'environnement, mais également dans les systèmes biologiques, et ce par le biais du cycle de l'hydrogène (*cf.* Annexe A).

Dans l'environnement, le tritium existe sous trois formes distinctes :

- **Le tritium sous forme libre**, également appelé eau tritiée (HTO). Il s'agit de la forme la plus abondante de tritium dans l'environnement et peut être retrouvée dans tous les compartiments environnementaux (Diabate and Strack, 1993; Gonen et al., 2014; Hill and Johnson, 1993).
- **Le tritium gazeux (HT)**. Cette forme gazeuse ne correspond qu'à une fraction des émissions atmosphériques du tritium, mais elle pourrait devenir de plus en plus importante, entre autres à cause des travaux sur la production d'énergie par fusion nucléaire (Diabate and Strack, 1993; Hill and Johnson, 1993). Le tritium gazeux peut être oxydé en HTO par les microorganismes terrestres (Momoshima et al., 1990). Cette forme de tritium est également celle étant la moins présente dans l'environnement (Chao et al., 2012).
- **Le tritium organiquement lié (OBT)**, également appelé tritium organique. Cette fraction du tritium correspond au tritium lié à la matière organique. Elle résulte de l'incorporation du tritium dans la matière organique au cours de processus de synthèse de la matière vivante (Diabate and Strack, 1993; Hill and Johnson, 1993). Cette fraction est elle-même divisée en deux fractions :
 - | Le tritium organiquement lié échangeable (eOBT) : ce dernier correspond aux molécules organiques dans lesquelles l'atome de tritium est lié à un atome d'oxygène, d'azote, ou de soufre (Diabate and Strack, 1993; Hill and Johnson, 1993). Quand le tritium échangeable est présent dans l'organisme, il s'équilibre rapidement avec le tritium libre dans les tissus (TFWT), qui lui-même s'équilibre rapidement avec le tritium présent dans l'environnement (Chen, 2006; Ferreira et al., 2023).
 - | Le tritium organiquement lié non échangeable (neOBT) : ce dernier correspond aux molécules organiques dans lesquelles l'atome de tritium est lié

à un atome de carbone par le biais d'une liaison covalente (Diabate and Strack, 1993; Hill and Johnson, 1993). Quand le tritium non échangeable est présent dans l'organisme, il est considéré qu'il ne s'équilibre pas, ou très lentement, avec le tritium libre présent dans les tissus (Chen, 2006; Ferreira et al., 2023). Cette difficulté à atteindre l'équilibre est causée par la solidité des liaisons covalentes C-H et, par conséquent, des liaisons C-³H.

A.2.2. Les origines du tritium

Le tritium, comme beaucoup d'autres radionucléides, possède des origines à la fois naturelles et humaines.

La production naturelle du tritium est issue des réactions des atomes d'azote et d'hydrogène de la haute atmosphère avec les rayonnements cosmiques de forte énergie (ASN, 2010; Ferreira et al., 2023; Hill and Johnson, 1993). Sa production annuelle moyenne est estimée comme étant entre 0,15 et 0,20 kg, soit $(5 - 7) \times 10^{16}$ Bq. Une faible fraction du tritium naturel est également générée dans la croûte terrestre par le biais de réactions de capture des neutrons sur des traces de lithium (⁶Li) dans les roches.

Les sources humaines, quant à elles, sont bien plus nombreuses. Parmi ces dernières, on retrouve les essais nucléaires atmosphériques principalement réalisés entre 1945 et 1963 (ASN, 2010). Sur les 520 tests réalisés, l'énergie libérée représente $5,2 \times 10^8$ tonnes de tritium, ce qui a libéré une activité d'environ $2,4 \times 10^{20}$ Bq dans l'environnement. L'industrie nucléaire est également une source artificielle de tritium avec, entre autres, les réacteurs nucléaires et les usines de retraitement de combustibles usagés (Adam-Guillermin et al., 2012; Arcanjo et al., 2020; Ferreira et al., 2023; Hill and Johnson, 1993; Hyodo-Taguchi and Egami, 1977). Le mécanisme prédominant de formation du tritium dans les réacteurs nucléaires est la fission ternaire des isotopes fissiles (*i.e.*, susceptibles de subir une fission, peu importe les neutrons qui les percutent) de plutonium et d'uranium dans le combustible (IRSN, 2012). Un autre mécanisme de production est l'activation neutronique du deutérium (²H, atome d'hydrogène

constitué d'un proton et d'un neutron, Figure A.2), et cette dernière entraîne la production d'environ $6,8 \times 10^{14}$ Bq de tritium chaque année. Enfin, il existe également d'autres sources de tritium telles que les déchets nucléaires immergés au Nord-Est de l'Atlantique entre 1949 et 1982, ainsi que les industries ayant des applications militaires, médicales ou liées à la recherche nucléaire.

A.2.3. Le tritium dans l'environnement

Les taux de tritium dans les différents compartiments environnementaux sont mesurés afin d'obtenir une meilleure vision de son comportement dans l'environnement (IRSN, 2017).

En France, les mesures atmosphériques en zone non influencée par la radioactivité ont mis en avant des taux de tritium variant entre $(1,5 - 4,6) \times 10^{-3}$ Bq/m³ dans le cas de l'HTO, mais également des activités variant entre $(6 - 13) \times 10^{-3}$ Bq/m³ dans le cas de l'HT (IRSN, 2017). Lorsque les niveaux d'HTO et d'HT étaient mesurés dans des zones sous influence radioactive, les taux mesurés variaient entre 0,2 et 1,7 Bq/m³ et entre 1 et 40 Bq/m³, respectivement, soit des valeurs au moins 100 fois plus élevées que les valeurs de bruit de fond. Les mesures terrestres, quant à elles, ont été réalisées grâce à la collecte de différents végétaux (ASN, 2018; IRSN, 2017). L'activité retrouvée dans l'eau de combustion des échantillons prélevés en zone non influencée par la radioactivité était de 1,4 Bq/L d'OBT. Autour du CEA/DAM de Valduc, un site sous influence radioactive, des niveaux de 50 à 5000 Bq/L ont été mesurés dans l'eau de combustion d'échantillons de sol et des niveaux de 10 à 100 Bq/L dans les échantillons de plantes pérennes, soit au moins 10 fois plus élevés que le bruit de fond. Pour finir, dans le compartiment aquatique français, les mesures du bruit de fond ont permis d'obtenir des valeurs variant entre 0,12 et 0,86 Bq/L, alors que dans le cas des mesures réalisées en sortie de CNPE, les niveaux variaient entre 1 et 61 Bq/L dans le Rhône, ou entre 5 et 35 Bq/L dans la Garonne, la Loire et la Moselle, soit des valeurs au moins 10 fois plus élevées que le bruit de fond (ASN, 2018; IRSN, 2017).

Plusieurs études ont également été réalisées dans les cours d'eau anglais (IRSN, 2017; McCubbin et al., 2001). Ces dernières ont permis de mettre en avant une activité d'environ 10 Bq/L en sortie d'usines nucléaires, l'activité diminuant ensuite au fur et à mesure que les prélèvements s'éloignaient de la station (amont-aval). Egalement, des études ont mis en évidence des activités de 29400 Bq/kg (poids humide) dans le flet, *Platichthys flesus*, et de 24800 Bq/kg (poids humide) chez la moule commune, *Mytilus edulis*. D'autres prélèvements réalisés dans le cadre de la même étude ont mis en avant une activité de 440 Bq/kg (poids humide) dans les algues. Ces études, tout comme celles présentées précédemment, mettent en évidence une accumulation du tritium dans tous les compartiments environnementaux, et ce sous différentes formes.

A.3. La dosimétrie

A.3.1. Le concept de dosimétrie

La dosimétrie est définie par la caractérisation de l'énergie absorbée et est basée sur une étude multi-échelles qui combine la macro-, la micro- et la nanodosimétrie (Li et al., 2018; Ünak and Selvi, 1995). Afin de qualifier au mieux la radiation lorsqu'elle interagit avec la matière, plusieurs grandeurs ont été mises en place :

- L'énergie transmise : elle correspond à la somme de tous les dépôts d'énergie sur un volume donné.
- La section efficace : elle définit la probabilité d'interaction d'une particule avec la matière. Elle correspond au quotient du nombre moyen d'interactions par la fluence de la particule (*i.e.*, la densité superficielle spatiale).
- Le transfert d'énergie linéique (TEL) : il correspond à la perte d'énergie sur une distance précise, comme défini par l'équation A.2, avec dE la perte d'énergie

(keV) et dl la distance parcourue (μm).

$$\text{TEL} = \frac{dE}{dl} \quad (\text{A.2})$$

A.3.2. La microdosimétrie

La microdosimétrie est l'étude systématique et la quantification de la distribution spatiale et temporelle de l'énergie absorbée dans une matière irradiée (Kellerer and Chmelevsky, 1975; Li et al., 2018; Santa Cruz, 2016). Elle a été mise au point en 1959 par Rossi, avant d'être appliquée aux émetteurs internes par Roesch en 1977, dans l'objectif d'obtenir plus d'informations sur les interactions entre le rayonnement et la matière, le tout à l'échelle microscopique (*e.g.*, de la cellule) (Roesch, 1977; Rossi, 1959; Rossi et al., 1961). La microdosimétrie permet d'obtenir des informations supplémentaires à celles fournies par la macrodosimétrie qui, quant à elle, se limite à la mesure de la dose absorbée retrouvée dans l'organisme entier ou ses organes. La microdosimétrie est basée sur la mesure ou la simulation des dépôts de l'énergie impartie à des volumes de dimensions faibles. Elle traite de la nature stochastique du dépôt d'énergie à cette échelle. Elle permet, entre autres, de mesurer ou simuler différentes grandeurs :

- L'énergie impartie : elle définit l'énergie déposée dans un volume infinitésimal. Elle est définie par l'équation A.3 :

$$E = E_{\text{in}} - E_{\text{out}} + Q \quad (\text{A.3})$$

avec E_{in} l'énergie de la particule ionisante incidente, E_{out} la somme des particules ionisantes quittant le volume et Q la variation d'énergie au repos des noyaux de toutes les particules élémentaires impliquées dans l'interaction.

- L'énergie spécifique : elle correspond au quotient de l'énergie transmise à la matière lors d'un seul évènement de dépôt d'énergie par la masse de la matière.
- L'énergie linéale : elle correspond au quotient de l'énergie transmise à la matière

lors d'un seul évènement par la longueur de corde de ce volume. La corde correspond à la section de trajectoire primaire de la particule dans la matière.

La microdosimétrie a tout d'abord été utilisée afin de déterminer les facteurs de qualité de plusieurs radiations (Al-Affan and Watt, 1987). Elle a également été utilisée à de nombreuses reprises ces dernières années, entre autres dans l'objectif d'obtenir plus d'informations sur la répartition des dépôts d'énergie dans les cellules après irradiation, afin de corrélérer les quantités microdosimétriques à l'effet biologique, mais aussi pour obtenir plus d'informations sur le comportement d'électrons de faible énergie avec la matière (Liamsuwan et al., 2012; Tang et al., 2019b).

A.3.3. La nanodosimétrie

La nanodosimétrie a été mise au point dans l'objectif de pallier les limites liées à l'utilisation de la microdosimétrie. En effet, là où la microdosimétrie ne permet d'obtenir des informations qu'à l'échelle microscopique, soit de la cellule, la nanodosimétrie permet d'obtenir des informations au niveau du noyau et, plus précisément, de l'ADN (Li et al., 2018). En effet, cette dernière a initialement été utilisée comme un outil utilisable afin d'explorer les mécanismes de la radiation au niveau moléculaire (Rabus and Nettelbeck, 2011). La méthode Monte Carlo appliquée à la nanodosimétrie permet de simuler l'irradiation, par un nombre précis de particules, d'un noyau de forme, volume et composition prédéfinis. Comme indiqué dans la Figure A.3, la nanodosimétrie permet de simuler les étapes physique, physico-chimique et chimique de l'interaction entre les particules primaires et la matière. *In fine*, elle permet donc de quantifier et qualifier les cassures observables au niveau de l'ADN après irradiation. La nanodosimétrie a été utilisée à plusieurs reprises ces dernières années, en majorité afin de caractériser l'apparition de dommages à l'ADN chez des cellules ou organismes de différents types (*e.g.*, levures, bactéries, cellules endothéliales et fibroblastes) après irradiation à l'aide de protons ou de particules α (Lampe et al., 2018; Meylan et al., 2017; Tang et al., 2019a,b).

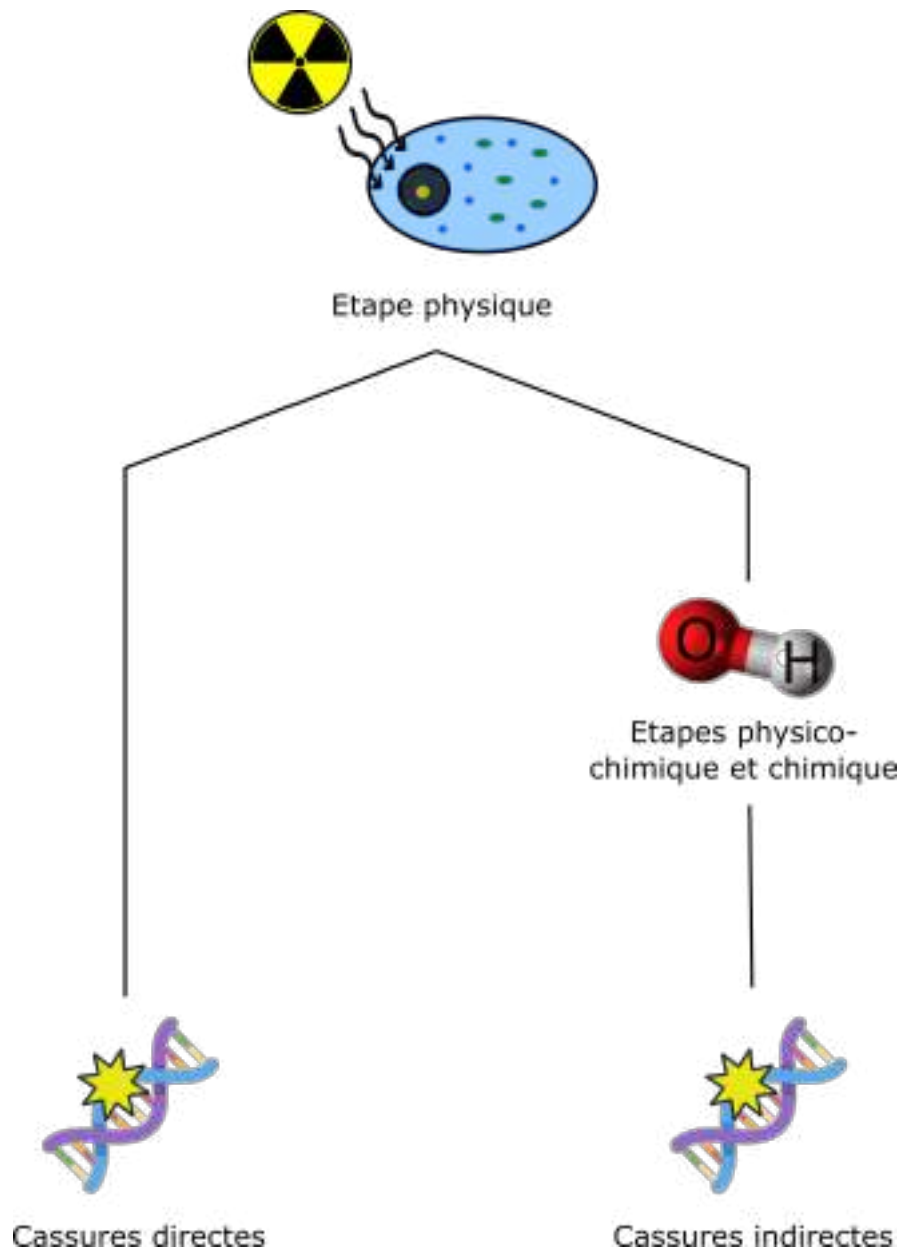


FIGURE A.3. – Représentation du processus de simulation de la nanodosimétrie. L'étape physique correspond à la simulation du trajet des particules primaires dans le noyau, et les étapes physico-chimiques et chimiques correspondent à la simulation de la production des radicaux $\cdot\text{OH}$.

A.3.4. La dosimétrie appliquée au tritium

La microdosimétrie a été utilisée à de nombreuses reprises dans le cadre de différentes études réalisées sur le tritium.

Une première étude a permis de calculer la qualité de radiation du tritium (Chen, 2006). Cette dernière a mis en avant que dans, le cas de l'OBT, la distribution de l'énergie linéique pouvait être calculée par le biais de la méthode de Monte Carlo. Cela a permis de déterminer que l'énergie linéique était différente entre le tritium libre et le tritium organique, ce dernier possédant une énergie linéique 1,7 fois plus élevée que celle du tritium libre. Une autre étude avait pour objectif d'étudier le comportement du tritium et du ^{14}C dans différents matériaux (Ünak and Selvi, 1995). Cette étude a mis en évidence le fait que, pour des radiations qui parcourent de faibles distances dans la matière (*e.g.*, le tritium), les considérations microdosimétriques et le TEL étaient d'autant plus importants afin de pouvoir interpréter les effets radiologiques produits à l'échelle microscopique de la matière. *In fine*, cette étude a également permis de mettre en avant que les rayonnements issus du tritium parcouraient des distances 35 fois plus faibles que celles parcourues par les rayonnements issus du carbone. Une dernière étude a utilisé la microdosimétrie afin d'étudier le tritium réparti de manière hétérogène dans la matière (Chao et al., 2012). Etant donné que les particules β issues du tritium ne peuvent pas parcourir de longues distances dans la matière, l'étude a mis en avant le fait que la dose absorbée variait en fonction de la région subcellulaire où se trouvait le tritium. Cette étude a également permis de mettre en avant une différence dans l'utilisation de la dose absorbée au niveau du noyau et de l'énergie linéique correspondante. En effet, la dose absorbée au niveau du noyau cellulaire ne donnait pas d'informations sur la nature stochastique des dépôts d'énergie au niveau de la cible alors que l'énergie linéique a permis d'avoir une description stochastique de l'énergie déposée pendant un évènement unique dans la cellule. Chao a également précisé que tous les calculs théoriques réalisés dans le cas du tritium hétérogène ont demandé l'utilisation du modèle de sections efficaces afin

de pouvoir décrire l'interaction des électrons de faible énergie avec l'eau. Pour finir, cette étude a montré l'importance de la dosimétrie dans le cas de l'étude de l'OBT dans les cellules humaines, car sa demi-vie biologique est plus longue que celle d'HTO, tout en ayant une toxicité plus importante. Il faut considérer le fait que, peu importe la source du tritium au niveau cellulaire, le noyau est toujours considéré comme étant la cible de ce dernier.

A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

Comme indiqué précédemment (*cf.* Introduction, partie A.2.1), le tritium possède un faible pouvoir pénétrant, ce qui signifie qu'il ne parcourt pas de grandes distances dans l'organisme. Pour cette raison, seule l'exposition interne au tritium est considérée comme étant à risque (Chen, 2006; Mathur-De Vré and Binet, 1984). Les différents effets ayant déjà été observés chez les organismes aquatiques exposés au tritium sont présentés ci-dessous.

A.4.1. Les effets moléculaires du tritium

Plusieurs études réalisées sur différentes espèces aquatiques ont documenté la fragilité de l'ADN face à l'exposition au tritium. En effet, une étude réalisée sur la moule commune a mis en avant qu'après exposition à $3,7 \times 10^6$ Bq/L d'HTO, le nombre de micronoyaux augmentait significativement, tout comme le taux de dommages à l'ADN (Jha et al., 2005). Une seconde étude réalisée sur le même modèle biologique a mis en évidence une augmentation de la fréquence d'apparition d'échanges entre chromatides sœurs et d'aberrations chromosomiques dès $3,7 \times 10^5$ Bq/L (Hagger et al., 2005). Enfin, une dernière étude réalisée sur la moule commune a démontré une augmentation de la génotoxicité du tritium lorsque celui-ci est sous forme organique, ici sous forme de glycine tritiée (Jaeschke et al., 2011). Une étude réalisée sur une autre espèce de moule, la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, a documenté

A. ETAT DE L'ART – A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

une augmentation des dommages à l'ADN dans les hémocytes dès 5×10^6 Bq/L (Ferreira et al., 2023). Une étude réalisée *in situ* sur le vairon à tête de boule, *Pimephales promelas*, a également mis en avant une augmentation des dommages à l'ADN dans les gonades et des micronoyaux dans les cellules sanguines dès $6,2 \times 10^3$ Bq/L (Gagnaire et al., 2017). La même étude a été réalisée en laboratoire et, cette fois, une augmentation des dommages à l'ADN a été observée dès exposition des individus à 25×10^3 Bq/L d'OBT et après exposition à $1,8 \times 10^5$ Bq/L d'HTO (Gagnaire et al., 2020b). Une étude réalisée sur le poisson zèbre a mis en évidence une diminution des dommages à l'ADN observés à 96 hpf lorsque les embryons et larves étaient exposés à 10^7 Bq/L, et une augmentation de ces mêmes dommages dès exposition à 10^8 Bq/L (Gagnaire et al., 2020a).

Le test γ -H2AX permet, entre autres, de spécifiquement mesurer les cassures double brin (DSB), alors que le test des comètes réalisées en conditions alcalines permet de mesurer l'intégralité des dommages (*i.e.*, les sites alcali-labiles, les cassures simple brin (SSB) et les DSB) (Tice et al., 2000). Le test γ -H2AX a été réalisé *in vitro* sur des cellules de testicules de vairon à tête de boule et des cellules tumorales de la souris (FHMT-W1 et 3B11, respectivement) et a mis en avant l'absence d'induction de DSB, à 10 comme à 10^3 Bq/L (Stuart et al., 2016). Ces résultats ont été confirmés par le biais de deux études réalisées *in vivo* sur le vairon à tête de boule et le poisson zèbre (Arcanjo et al., 2020; Gagnaire et al., 2017). En effet, l'exposition du tête de boule à des activités de tritium variant entre $3,5 \times 10^2$ et $1,2 \times 10^4$ Bq/L, tout comme l'exposition du poisson zèbre à des activités d'HTO variant entre 10^7 et 10^9 Bq/L, n'entraînait pas d'augmentation du taux de DSB.

L'étude de l'expression génique de différents individus exposés au tritium permet également d'obtenir une vision globale des mécanismes d'action de ce radionucléide sur un organisme. Chez la moule méditerranéenne, une dérégulation de plusieurs gènes tels que *hsp70*, *hsp90*, *mt20* et *p53* a été observée après exposition au tritium à une activité de $1,5 \times 10^7$ Bq/L d'HTO (Dallas et al., 2016). Une première étude réa-

A. ETAT DE L'ART – A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

lisée sur le poisson zèbre a présenté une surexpression des gènes *mt2* et *mpx* après exposition à 10^7 et 10^8 Bq/L de tritium libre, respectivement (Gagnaire et al., 2020a). Une exposition à 10^9 Bq/L, quant à elle, entraînait une surexpression de *cyp1a* à 96 heures post-fertilisation (hpf), ainsi qu'une sur-expression des gènes *lyz*, *mpx* et *mt2* à 168 hpf. Une seconde étude, elle aussi réalisée sur le poisson zèbre, a montré que l'exposition des embryons et larves de poisson zèbre au tritium libre (10^8 et 10^9 Bq/L) affectait de nombreux processus (Arcanjo et al., 2018). En effet, d'une part, les auteurs ont mis en évidence une surexpression de gènes impliqués dans de nombreux processus. Les processus en question étaient, par exemple, la régulation de la contraction musculaire, la réponse au stress oxydant et aux stimuli lumineux, le transport d'ions, le rythme circadien, mais également l'organisation des sarcomères. D'autre part, une sous-expression de gènes impliqués dans la différenciation des somites, la fusion des myoblastes, la contraction musculaire, ainsi que la différenciation des mastocytes a également été observée. Pour finir, une dernière étude réalisée sur le poisson zèbre a permis de mettre en avant une dérégulation des gènes impliqués dans de nombreux processus développementaux (Li et al., 2021). En effet, plusieurs processus ont été affectés, tels que le développement neuronal, cellulaire, ou cardiaque, par exemple.

A.4.2. Les effets cellulaires du tritium

Les rayonnements ionisants étant capables d'induire la production de ROS par le biais de la radiolyse de l'eau, il est pertinent de s'intéresser à la production de ces dernières dans les organismes vivants, ainsi que sur le stress oxydant pouvant être induit par ces dernières (Azzam et al., 2012). Une étude réalisée sur le vairon à tête de boule a mis en avant une corrélation positive entre les niveaux de ROS, avec et sans stimulation au phorbol myristate acétate (PMA), et le débit de dose absorbée de tritium utilisé dans le cadre de l'exposition (Gagnaire et al., 2020b). Une seconde étude, réalisée sur le même modèle biologique, a indiqué une différence de réponses entre le laboratoire et le terrain (Beaton et al., 2019). En effet, l'étude réalisée sur le terrain a mis en évidence une corrélation négative entre l'enzyme glutathion peroxy-

dase (GPx) et le débit de dose absorbée dans le foie, ainsi qu'une corrélation positive entre cette même enzyme et le débit de dose absorbée dans le cerveau. Cependant, aucune variation de cette enzyme n'a été observée en laboratoire. Une autre étude, réalisée sur des poissons zèbre exposés à 10^8 et 10^9 Bq/L d'HTO, a indiqué l'absence de production significative de ROS par rapport aux larves témoins (Arcanjo et al., 2020). Une seconde étude réalisée sur le poisson zèbre a mis en avant un effet du tritium libre sur la production des ROS (Gagnaire et al., 2020a). En effet, il a été montré que l'indice de production des ROS était plus élevé après exposition des embryons à 10^8 et 10^9 Bq/L d'HTO.

A.4.3. Les effets tissulaires du tritium

Le tritium est également capable d'induire la formation de défauts tissulaires, généralement observés au niveau de la fibre musculaire. En effet, il a été montré que l'exposition du poisson zèbre à des activités de 10^8 et 10^9 Bq/L d'HTO entraînait une désorganisation au niveau des muscles squelettiques chez les larves âgées de 96 hpf, par le biais d'un détachement des myofilaments de la bande Z de la fibre musculaire (Arcanjo et al., 2018). L'exposition à l'activité la plus élevée d'HTO a également entraîné une détérioration des sarcomères. Une seconde étude réalisée sur le poisson zèbre a mis en évidence des altérations au niveau des mitochondries chez les larves âgées de 168 hpf, avec une désorganisation ou un nombre plus faible de crêtes au niveau des mitochondries, ce qui pourrait être représentatif d'une diminution de la production d'adénosine triphosphate (ATP). L'absence de certaines mitochondries a également été observée, menant à la formation de "trous" dans la fibre, et ce dès 10^8 Bq/L d'HTO (Gagnaire et al., 2020a).

A.4.4. Les effets individuels du tritium

Les études réalisées sur les effets du tritium sur le développement et le comportement d'espèces aquatiques sont nombreuses et ont été réalisées à la fois dans le laboratoire et sur le terrain.

Plusieurs études se concentrant sur les effets du tritium sur la croissance des individus ont été réalisées sur plusieurs espèces aquatiques. Une première étude a mis en évidence une augmentation de la taille des larves de carassin argenté, *Carassius gibelio*, après exposition à une activité de 500 Bq/L d'HTO (Ferreira et al., 2023). L'effet inverse a été observé après exposition d'embryons de fugu, *Fugu niphobles*, à une activité de $3,7 \times 10^{11}$ Bq/L de tritium libre. Une étude réalisée sur le poisson zèbre, quant à elle, a documenté l'effet du tritium libre sur le développement des stades embryo-larvaires de cette espèce (Gagnaire et al., 2020a). En effet, après exposition à une activité de 10^7 Bq/L d'HTO, une taille plus réduite des larves a été observée à 96 hpf, alors que le volume vitellin des larves âgées de 72 et 168 hpf était plus grand. A une activité plus élevée (10^8 Bq/L), la taille des larves était plus faible lorsque celles-ci étaient âgées de 72 hpf mais, tout comme pour l'activité inférieure, cette diminution n'était que transitoire. Cependant, une autre étude réalisée sur la même espèce a montré que sur toutes les activités testées (jusqu'à $3,7 \times 10^8$ Bq/L), il n'y avait pas d'effet sur les larves de 60 et 72 hpf (Li et al., 2021). Deux études ont également été réalisées sur le viron à tête de boule. L'une d'entre elle a été réalisée en laboratoire alors que la seconde a été réalisée sur le terrain (Gagnaire et al., 2017, 2020b). Ces deux études ont montré que le développement du viron à tête de boule n'était pas impacté par l'exposition au tritium, que cette dernière soit réalisée *in vivo* ou *in situ*, et ce jusqu'à des activités de $1,8 \times 10^5$ Bq/L. Ces résultats ont été confirmés par une étude réalisée à la fois en laboratoire et sur le terrain, montrant que les poids des individus exposés et non exposés étaient similaires, et ce peu importe les conditions d'exposition (Beaton et al., 2019).

A. ETAT DE L'ART – A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

Il a également été mis en évidence que l'exposition de différentes espèces aquatiques au tritium entraînait l'apparition de malformations, ainsi qu'un ralentissement de l'éclosion. En effet, une étude réalisée sur la moule commune a montré l'augmentation significative du nombre de larves présentant un manque de cils ou de flagelles lorsque celles-ci étaient exposées à des activités supérieures ou égales à $3,7 \times 10^5$ Bq/L d'HTO (Hagger et al., 2005). Il a également été mis en avant que, dès $3,7 \times 10^{11}$ Bq/L, une induction significative de malformations apparaissait chez le fugu, avec un gonflement de la vésicule vitelline (Ferreira et al., 2023). Une dernière étude a mis en avant qu'à partir de 56 hpf, un retard d'éclosion était observé chez les embryons de poisson zèbre exposés à des activités d'HTO variant entre $3,7 \times 10^6$ et $3,7 \times 10^8$ Bq/L (Li et al., 2021).

Des effets sur le comportement ont également été mis en avant chez plusieurs espèces de poisson. Une première étude indique qu'après exposition d'embryons de fugu à $3,7 \times 10^{11}$ Bq/L d'HTO pendant 130 heures, les larves étaient considérées comme étant inactives, mais également qu'une diminution de l'activité natatoire était observée chez le poisson zèbre après exposition à une activité de $3,7 \times 10^6$ Bq/L pendant 60 et 120 heures (Ferreira et al., 2023). Dans une autre étude, il a été démontré qu'après exposition d'embryons de poisson zèbre à 10^8 Bq/L d'HTO, la vitesse de nage des larves âgées de 96 hpf diminuait significativement, tout comme leur réaction à un stimulus vibratoire (Arcanjo et al., 2020).

A.4.5. L'efficacité biologique relative, EBR

L'efficacité biologique relative (EBR) est une mesure qui permet de comparer l'efficacité toxique d'un rayonnement par rapport à un rayonnement de référence, généralement le rayonnement γ indirectement émis lors de la désintégration du césium (^{137}Cs) ou les rayons X (Little and Wakeford, 2008). Cette valeur ne dépend pas uniquement des rayonnements considérés, mais également du marqueur de toxicité pris en compte (Equation A.4).

A. ETAT DE L'ART – A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

$$EBR = \frac{D_{ref}}{D_x} \quad (A.4)$$

D_{ref} correspond à la dose absorbée du rayonnement de référence (rayon X ou rayonnement γ) nécessaire pour obtenir un effet A chez un organisme B. D_x correspond à la dose absorbée du rayonnement étudié nécessaire pour obtenir le même effet A sur le même organisme B.

L'EBR a été calculée à plusieurs reprises sur plusieurs organismes et marqueurs de toxicité afin d'obtenir plus d'informations sur le degré de toxicité du tritium. L'EBR du tritium a d'abord été étudiée chez des mammifères tels que les souris (Little and Wakeford, 2008). Les résultats sont assez variés, mais l'étude de la survie cellulaire ou de l'apparition de tumeurs indique des EBR d'environ 1,5 à 2,5. Dans le cadre d'une revue ayant pour objectif de mesurer l'EBR du tritium sur plusieurs marqueurs et sur différents organismes aquatiques, les valeurs mesurées étaient toujours supérieures à 1, avec des valeurs moyennes variant entre 1,9 et 4,2 en fonction de l'organisme cible et des marqueurs étudiés, avec une obtention majoritaire de données dans le cadre de l'étude des effets sur la reproduction (Adam-Guillermin et al., 2012). L'organisme Environment Canada, ainsi que les projets FASSET et ERICA ont choisi une valeur moyenne de 3.

Il a ainsi été mis en évidence que l'EBR du tritium était toujours supérieure à 1 quand le rayonnement de référence choisi était le rayonnement γ ou les rayons X (Jaeschke and Bradshaw, 2013). Le fait que les valeurs d'EBR du tritium soient supérieures à 1 peut-être lié au fait que l'exposition au tritium induit 10 à 30 fois plus d'ionisations par unité de volume tissulaire par rapport aux rayonnements γ ou aux rayons X (Moskalev et al., 1973). Ces valeurs sont également potentiellement liées à la transmutation du tritium en hélium, mais aussi à une potentielle accumulation du tritium au niveau de l'ADN (Adam-Guillermin et al., 2012). Également, il a déjà été observé que le tritium sous forme organique est plus toxique que le tritium libre. Cependant, il est important

A. ETAT DE L'ART – A.4. La toxicité du tritium sur les organismes aquatiques

de prendre en compte qu'il n'est pas toujours possible de calculer l'EBR, la relation dose-réponse d'un marqueur n'étant pas toujours linéaire(Gagnaire et al., 2021).

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX

B.1. Les objectifs de la thèse

Le sujet de thèse présenté dans ce manuscrit a été mis au point afin de pouvoir caractériser au mieux les mécanismes de toxicité des radionucléides. Ce projet est divisé en trois objectifs principaux, représentés dans la Figure B.1.

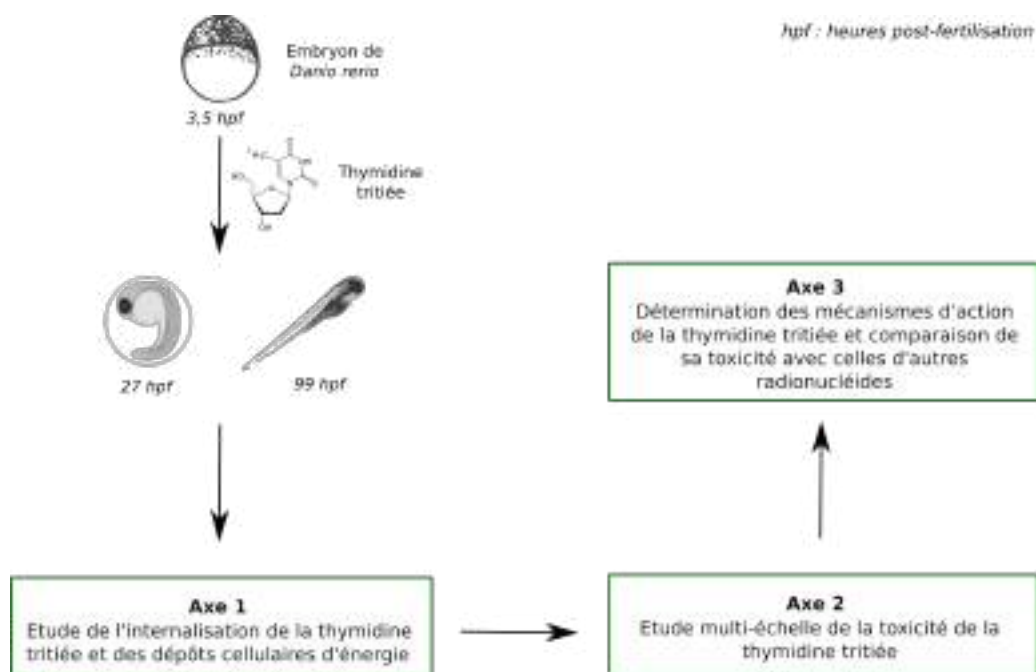


FIGURE B.1. – Représentation des objectifs de la thèse et des liens entre eux.

B.1.1. Axe 1 : Internalisation de la thymidine tritiée et quantification des dépôts cellulaires d'énergie

Ce premier axe est décomposé en deux parties : une première partie expérimentale, et une deuxième partie basée sur l'utilisation de l'outil de simulation Geant4.

L'étude expérimentale du processus d'internalisation est réalisée afin d'apporter de nouvelles données sur l'internalisation du tritium organique dans les cellules vivantes. Les expérimentations se concentrent sur la quantification de l'internalisation du tritium par le poisson zèbre à l'aide des calculs de débits de dose absorbée réalisés pour chaque activité externe utilisée. Les expérimentations se concentrent également sur la cinétique d'internalisation dans l'organisme et l'incorporation du tritium dans l'ADN.

L'outil de simulation Geant4 est utilisé afin de quantifier les dépôts cellulaires d'énergie induits par la désintégration du tritium organique. Les simulations de microdosimétrie se concentrent sur la quantification des dépôts d'énergie moyens attendus pour chaque type cellulaire, mais aussi sur l'énergie spécifique attendue dans chacune d'entre elles. Cette dernière est également, par la suite, liée à la forme et au volume des cellules étudiées.

B.1.2. Axe 2 : Etude multi-échelles de la toxicité de la thymidine tritiée à différents niveaux d'organisation biologique

Ce deuxième axe, le plus long de ce travail de doctorat, est basé sur l'étude des effets toxiques de la thymidine tritiée sur les embryons et larves de poisson zèbre. Tout comme le premier axe, celui-ci est réalisé à la fois grâce à l'utilisation de procédures expérimentales et d'un outil de simulation, Geant4-DNA.

L'étude expérimentale est réalisée à différents niveaux d'organisation biologique,

de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle. Le choix des marqueurs à étudier est basé sur la littérature disponible sur les effets toxiques des radionucléides sur les organismes aquatiques (cf. Etat de l'Art, partie A.4), mais également sur les liens entre les marqueurs. Ceux qui sont étudiés dans cet axe expérimental sont l'expression de plusieurs gènes d'intérêt, la production de ROS, les dommages à l'ADN, l'intégrité musculaire et tissulaire, mais également le comportement natatoire et la cinétique du développement, ainsi que ses anomalies.

L'outil de simulation Geant4-DNA est utilisé afin de qualifier les dommages à l'ADN attendus dans les noyaux des cellules de poisson zèbre. Les résultats de ces simulations permettent de pouvoir émettre différentes hypothèses sur la nature des cassures à l'ADN observées par le biais du test des comètes. Ils permettent également d'obtenir plus d'informations sur la position des dommages au niveau de l'ADN.

B.1.3. Axe 3 : Détermination des mécanismes d'action de la thymidine tritiée et comparaison de sa toxicité avec celles d'autres radionucléides

Le dernier axe de ce travail de doctorat en est également le moins lourd et est, entre autres, basé sur l'utilisation commune des résultats obtenus au cours de cette thèse et de ceux présents dans la littérature. Ce travail a également deux objectifs : en premier lieu, cet axe du doctorat vise à déterminer les mécanismes d'action de la thymidine tritiée, afin de pouvoir caractériser sa toxicité au mieux. *In fine*, cela peut également permettre de mettre des hypothèses au point quant aux marqueurs à étudier dans le futur. En second lieu, l'objectif est de pouvoir comparer la toxicité de la thymidine tritiée avec celles du tritium sous forme libre et du césium (^{137}Cs). Les résultats utilisés pour cette comparaison n'ont pas été obtenus au cours de ce travail de doctorat, mais au cours d'anciennes études réalisées dans le même laboratoire que cette thèse (Arcanjo et al., 2020, 2018; Gagnaire et al., 2021, 2020a; Murat El Houdigui et al., 2019).

De plus, le calcul de nouvelles valeurs d'EBR peut également être rendu possible par de telles comparaisons, visant ainsi à quantifier les différences de toxicité entre ces différents radionucléides, en plus de pouvoir les qualifier par le biais d'une inspection de la littérature.

B.2. Les choix expérimentaux

B.2.1. Le poisson zèbre, *Danio rerio*

Le poisson zèbre fait partie de la famille des cyprinidés, *Cyprinidae*. Il est originaire d'Asie du Sud et est également retrouvé dans des pays tels que l'Inde, le Pakistan, le Népal et le Bhoutan (Engeszer et al., 2007; Westerfield, 1993). Dans la nature, le poisson zèbre vit dans une eau dont la température varie entre 16,5 et 34 °C, mais il est recommandé de les garder dans des aquariums dont la température est constante et comprise entre 25 et 31 °C, entre autres afin d'assurer l'obtention de pontes de bonne qualité. Le développement des individus est considéré comme rapide, l'éclosion ayant lieu à l'âge d'environ 72 hpf à 28 °C et la maturité sexuelle étant atteinte après environ trois mois (Figure B.2) (Kimmel et al., 1995). Une reproduction entre un mâle et une femelle réalisée dans de bonnes conditions permet d'obtenir plus d'une centaine d'œufs.

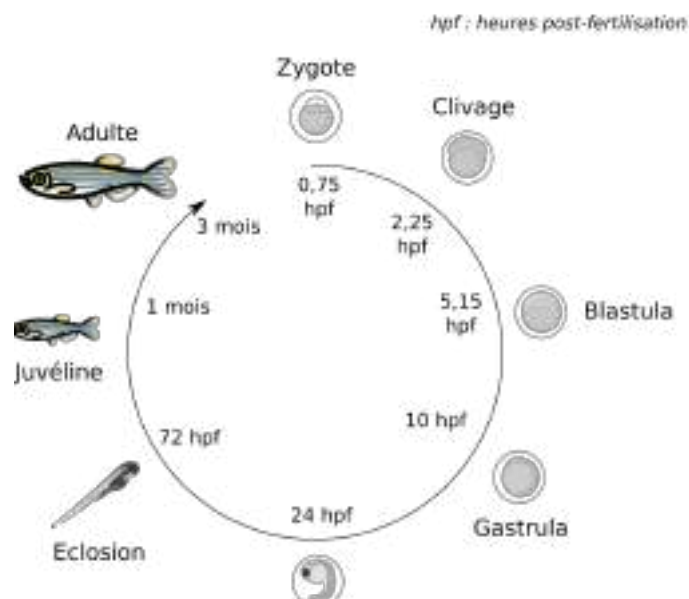


FIGURE B.2. – Frise représentant les stades de développement du poisson zèbre. Les nombres correspondent à l'âge de l'individu, et le nom correspond au stade représenté dans le schéma.

Dans ce projet, les stades embryonnaires et larvaires (0 à 96 hpf) ont été choisis car il a été prouvé que les stades précoces de développement de nombreuses espèces aquatiques sont plus sensibles que le stade adulte à de nombreux polluants (Hagger et al., 2005; Jha et al., 2005; Shen et al., 2020; Yang et al., 2016a). La transparence de l'enveloppe de l'œuf permet de suivre le développement embryonnaire, qui a été divisé en plusieurs stades (Kimmel et al., 1995) :

- Zygote (0 - 0,75 hpf) : également appelé stade 1-cellule, il correspond à la fertilisation de l'ovocyte. A ce stade, les individus sont en grande majorité composés de vitellus (*i.e.*, la réserve énergétique du futur individu).
- Clivage (0,75 - 2,25 hpf) : six divisions cellulaires ont lieu pendant cette période, l'embryon passant par les stades 2, 4, 8, 16, 32, et 64-cellules, les divisions cellulaires se faisant sur les plans verticaux et horizontaux des cellules déjà formées. Toutes les cellules sont présentes sur une seule face de l'œuf, et le vitellus occupe encore la majorité de la place dans l'œuf.
- Blastula (2,25 - 5,15 hpf) : cette période comprend l'apparition de la mid-blastula

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.2. Les choix expérimentaux

transition (MBT), chaque cycle cellulaire devenant de plus en plus long à partir de ce stade (2,75 hpf). La forme de l'embryon devient équivalente à une sphère vers 4 hpf, la couche cellulaire étant assez fine pour être confondue avec l'enveloppe du vitellus, avant que l'ensemble de l'embryon ne prenne la forme d'un dôme, montrant le début de l'épibolie.

- Gastrula (5,25 - 10 hpf) : pendant cette période, l'épibolie continue jusqu'à s'interrompre vers 10 hpf. C'est également pendant cette période que les divisions cellulaires successives font apparaître l'axe embryonnaire.
- Segmentation (10 - 24 hpf) : pendant cette période, les somites apparaissent, ce qui donnera plus tard naissance, par exemple, aux muscles, vertèbres ainsi qu'au derme de l'individu. C'est durant cette période que les mouvements spontanés de l'individu apparaissent.
- Pharyngula (24 - 48 hpf) : pendant cette période, l'embryon continue de s'allonger, s'enroulant autour de sa réserve vitelline. La fréquence des mouvements spontanés diminue au fur et à mesure de cette période, et le cœur devient visible pour la première fois, tout comme la circulation sanguine.
- Ecllosion (48 - 72 hpf) : la formation des organes primaires se termine et les enzymes choriolytiques digèrent le chorion (*i.e.*, l'enveloppe de l'œuf), permettant ainsi à l'individu, en complément des mouvements spontanés de ce dernier, d'éclore et d'atteindre le stade larvaire.

Suite à l'éclosion, la vessie natatoire de l'individu se gonfle et la vésicule vitelline perd en volume au fur et à mesure que l'individu la consomme. Ce n'est qu'une fois que la vésicule vitelline est complètement résorbée que l'individu commence à se nourrir, ce qui arrive vers environ 120 hpf.

Comme indiqué précédemment, le chorion semble avoir un rôle important dans la croissance de l'individu, même s'il est possible de déchorioner (*i.e.*, retirer manuellement le chorion) l'individu sans pour autant l'endommager (Kimmel et al., 1995). Il a également été mis en évidence par plusieurs études que le chorion permet de protéger

l'individu contre les effets toxiques de plusieurs contaminants, limitant leur incorporation dans ce dernier en agissant telle une barrière, on parle donc d'un "effet barrière" (Bourrachot et al., 2008; Scholz et al., 2008; Selderslaghs et al., 2013; van Pomeran et al., 2017; Yang et al., 2020). Le chorion est une couche acellulaire principalement composée de protéines et de glycoprotéines dont la formation et la composition dépendent majoritairement du développement de l'ovocyte (Bonsignorio et al., 1996; Dumont and Brummet, 1980; Selman et al., 1993). Le chorion possède une épaisseur d'environ 3,5 µm et est divisée en trois couches d'épaisseurs différentes dont les structures sont considérées comme étant complexes (Hart and Collins, 1991; Rawson et al., 2000; Scholz et al., 2008). Il possède trois rôles principaux : permettre l'échange des gaz tout en permettant la protection physique de l'embryon, permettre le transport de matériaux, et permettre la protection de l'embryon vis-à-vis des microorganismes et des composés toxiques.

Le poisson zèbre est de plus en plus utilisé dans le cadre d'études de biologie et d'écotoxicologie, entre autres par rapport aux avantages que représentent son développement rapide, l'obtention simple de pontes, ainsi que la transparence de ses embryons (Lele and Krone, 1996; Li et al., 2021; Padilla et al., 2011; Pei and Strauss, 2013; Powers et al., 2010; Sassi-Messai et al., 2009). De plus, son génome est entièrement séquencé, ce qui a permis de mettre en évidence une correspondance à 87 % avec celui de l'Homme, c'est pour cette raison qu'il est d'autant plus considéré comme étant un modèle intéressant dans le domaine de la médecine (Wang et al., 2019).

B.2.2. La thymidine tritiée

La thymidine est la molécule précurseur de la thymine, une des quatre bases azotées de l'ADN. Elle est transformée en thymine grâce à une réaction avec une molécule de phosphate d'hydrogène (HPO_4^{2-}), comme indiqué dans la Figure B.3 (Naito et al., 1987; Plagemann et al., 1974; Zajicek et al., 1963).

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.2. Les choix expérimentaux

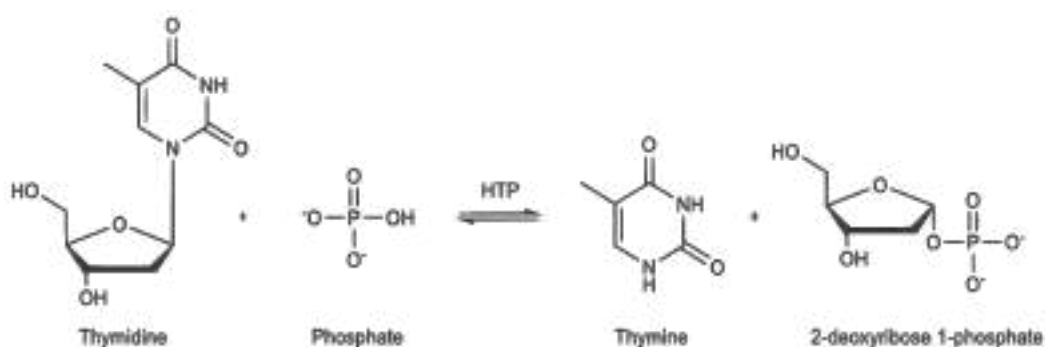


FIGURE B.3. – Représentation du processus de transformation de la thymidine en thymine. HTP représente le nom de l'enzyme : "Human Thymidine Phosphorylase".

Lorsque le tritium est lié à la molécule de thymidine, on parle de thymidine tritiée, qui est par conséquent une forme organique du tritium. Comme indiqué dans la Figure B.4, le tritium peut être sous forme échangeable ou non échangeable. C'est la thymidine tritiée sous forme non échangeable qui a été utilisée pendant l'intégralité du doctorat.

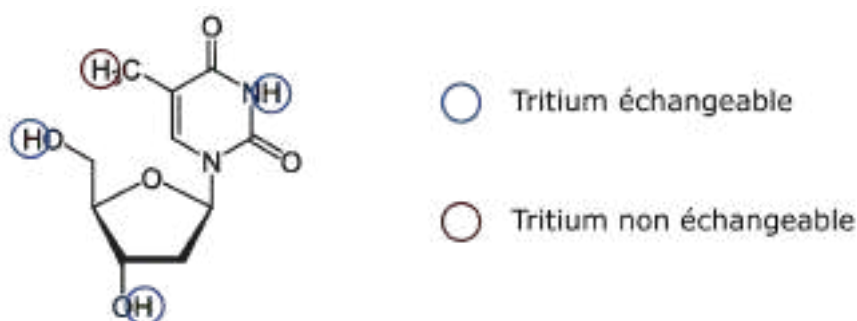


FIGURE B.4. – Représentation de la thymidine tritiée. Les cercles bleus représentent la position du tritium dans le cas du tritium organique sous forme échangeable, et le cercle rouge représente la position du tritium dans le cas du tritium organique sous forme non échangeable.

La thymidine tritiée a été utilisée dans de nombreuses études *in vitro* se concentrant sur le processus de transformation de la thymidine en thymine, la synthèse de l'ADN, mais également sur les différentes étapes du cycle cellulaire. Plusieurs études ont mis en avant une incorporation rapide du tritium dans l'ADN des cellules, dont la vitesse

variait en fonction de l'avancement du cycle cellulaire, cette dernière atteignant son maximum, puis son minimum, aux stades S et G1 du cycle cellulaire, respectivement (Hopwood et al., 1975; Naito et al., 1987; Plagemann et al., 1974; Zajicek et al., 1963). Une étude a également mis en avant l'existence d'un seuil de saturation d'incorporation de la thymidine dans l'ADN (Zajicek and Gross, 1964). Ce seuil est propre à chaque individu et chaque espèce, étant donné qu'il dépend du taux de thymine dans l'ADN étudié. D'autres études se sont concentrées sur la toxicité de la thymidine tritiée sur les cellules. L'une d'elle a mis en évidence l'induction de mort cellulaire lorsque des cellules V79 d'hamster de Chine, *Cricetulus griseus*, étaient exposées à la thymidine tritiée (Bedford et al., 1975). Deux autres études ont mis en avant l'apparition de cassures à l'ADN ou d'altération de la croissance des cellules V79 (Cleaver et al., 1972; Ehmann et al., 1975).

B.2.3. Les débits de dose absorbée

Les débits de dose absorbée sélectionnés lors de ce doctorat sont présentés dans la Figure B.5, accompagnés de débits de dose absorbée de référence qui ont permis de les sélectionner. Le choix des trois débits de dose absorbée est expliqué ci-dessous.

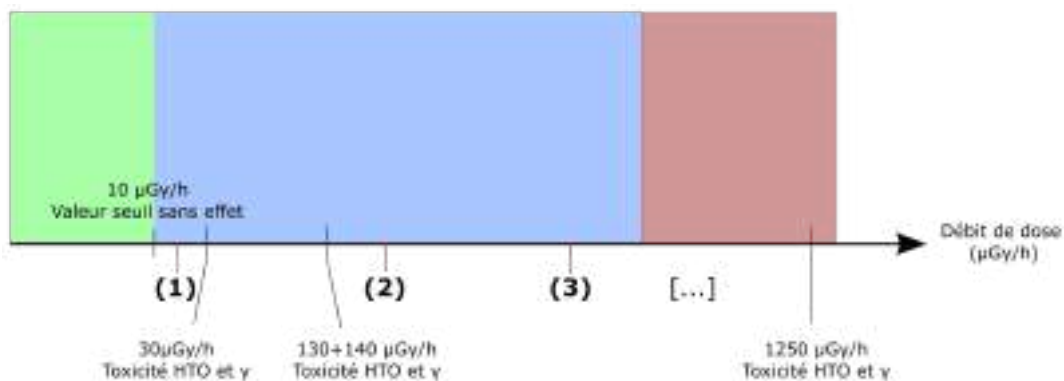


FIGURE B.5. – Frise des débits de dose absorbée étudiés pendant le projet ou par le passé. Les débits de dose absorbée numérotés représentent les débits de dose absorbée étudiés dans le cadre de ce doctorat.

(1) **22 $\mu\text{Gy/h}$** : comme décrit dans l'état de l'art (partie A.1.4), des seuils de radio-

protection de l'environnement ont été mis en place par les projets ERICA et FASSET. Ces valeurs sont de 10 et 20 $\mu\text{Gy/h}$, respectivement. Dans le cadre d'une étude réalisée à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) sur les effets de l'irradiation gamma sur les embryons et larves de poisson zèbre, le débit de dose absorbée de 30 $\mu\text{Gy/h}$ a déjà été utilisé, tout comme dans une thèse, traitant des effets du tritium libre sur le poisson zèbre, réalisée dans le même laboratoire (Arcanjo, 2018; Gagnaire et al., 2015a). Etudier les effets de la thymidine tritiée à un débit de dose absorbée de 22 $\mu\text{Gy/h}$ permet par conséquent de confronter les résultats expérimentaux de toxicité aux valeurs seuils admissibles dans l'environnement, mais aussi aux résultats de toxicité observés dans le cas d'une exposition à l'irradiation gamma ou au tritium libre.

- (2) **170 $\mu\text{Gy/h}$** : les débits de dose absorbée de 130 et 140 $\mu\text{Gy/h}$ ont été utilisés dans le cadre d'études des effets de l'irradiation gamma et du tritium libre sur les embryons et larves de poisson zèbre (Arcanjo, 2018; Gagnaire et al., 2021). Etudier les effets de la thymidine tritiée à un tel débit de dose absorbée permet donc d'en comparer la toxicité avec celle du tritium libre et de l'irradiation gamma.
- (3) **470 $\mu\text{Gy/h}$** : dans les deux études présentées dans le point précédent, un débit de dose absorbée d'environ 1250 $\mu\text{Gy/h}$ a été étudié. Ce dernier n'étant pas atteignable par le biais d'une contamination à la thymidine tritiée, le débit de dose absorbée maximum atteignable de 470 $\mu\text{Gy/h}$ a été choisi. Cela permet d'avoir une meilleure vision de l'évolution de la toxicité de la thymidine tritiée avec le débit de dose absorbée afin de, si possible, calculer l'EBR de cette forme de tritium organique.

B.2.4. Les marqueurs biologiques

L'ADN est la cible principale des rayonnements ionisants (AlAmri et al., 2012; Chen, 2006; Friedland and Kunderát, 2013; Kuzin, 1963; Minouflet et al., 2005; Parisot et al., 2015; Tsyusko et al., 2007). Cependant, étudier les dommages à l'ADN ne permet

pas d'obtenir assez d'informations pour caractériser au mieux les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée. Pour cette raison, plusieurs marqueurs ont été étudiés à différents niveaux d'organisation biologique, comme indiqué dans la Figure B.6.

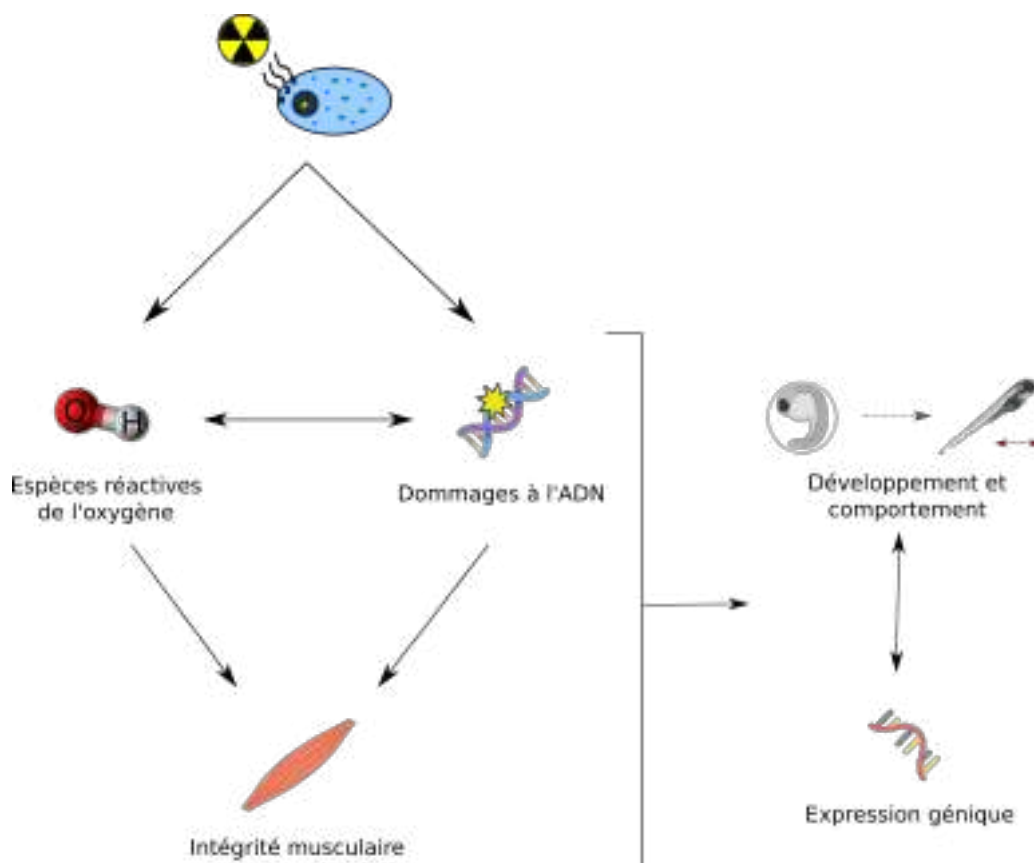


FIGURE B.6. – Marqueurs de toxicité étudiés sur les stades embryon-larvaires de poisson zèbre pendant le doctorat. Les flèches noires et pleines indiquent la manière dont, hypothétiquement, ils sont liés les uns aux autres.

B.2.4.1. Les marqueurs moléculaires

Vingt-sept gènes ont été sélectionnés afin d'en étudier l'expression après 24 et 96 heures d'exposition. Ces derniers ont été sélectionnés pour leur rôle dans l'organisme, mais également pour faire le lien avec d'anciennes études. Par exemple, plusieurs fonctions biologiques ont été sélectionnées afin d'être étudiées au cours de ce doctorat et sont indiquées dans le Tableau B.1, accompagnées des gènes étant impliqués dans

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.2. Les choix expérimentaux

ces dernières. Egalement, les gènes *ache*, *baxa*, *cyp1a*, *ef1*, *gstp1*, *lyz*, *mpx* et *mt2* ont été étudiés à plusieurs reprises dans le projet GGP Environnement, co-piloté par l'IRSN et EDF (Gagnaire et al., 2015b). Les derniers gènes sélectionnés, *atp2a1l*, *eef1a2*, *hspb9* et *mmp13a* ont été sélectionnés car leur expression a été dérégulée après exposition d'embryons et larves de poisson zèbre au tritium sous forme libre (Arcanjo, 2018).

Fonctions (ou processus)	Gènes sélectionnés correspondants
Apoptose	<i>baxa</i> , <i>bbc3</i> , <i>bcl2</i> , <i>cas9</i>
Développement	<i>cryba2b</i> , <i>crygm2d13</i>
Intégrité de l'ADN	<i>crx</i> , <i>cry5</i> , <i>ddb2</i> , <i>elf1</i> , <i>gadd45bb</i> , <i>h2ax</i> , <i>tbpl1</i> , <i>xpc</i> , <i>xrcc1</i>
Rythme circadien et mobilité	<i>per2</i> , <i>tnni2b.2</i>
Stress oxydant	<i>mpx</i> , <i>sod2</i>

TABLEAU B.1. – Processus biologiques étudiés au cours de ce doctorat. Dix-neuf des gènes sélectionnés dans le cadre du suivi de l'expression génique sont impliqués dans ces derniers et sont indiqués dans ce tableau.

Le test des comètes a été sélectionné afin d'étudier les dommages à l'ADN causés par la désintégration du tritium lié à la thymidine tritiée et à l'ADN. Lorsque le test des comètes est réalisé dans des conditions basiques (pH > 13), les dommages à l'ADN pouvant être mesurés sont les cassures simple et double brin, ainsi que les sites alcali-labiles. Le test comètes peut également être réalisé en ajoutant des enzymes supplémentaires telles que les enzymes Fpg, EndoIII, ou hOGG1, par exemple (Collins et al., 1997; Hada and Sutherland, 2006; Muruzabal et al., 2021; Tice et al., 2000). Dans le cadre de ce projet, c'est l'enzyme formamidopyrimidine glycolase (Fpg) qui a été sélectionnée, étant donné qu'elle permet de faire apparaître les dommages issus du stress oxydant avec, entre autres, la formation d'une lésion nommée 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. Le choix de cette enzyme permet donc une étude complémentaire à celle de la production des ROS, étant donné que cela permet de mesurer un des dommages que ces dernières peuvent causer dans un organisme vivant (Lee and Steinert, 2003).

B.2.4.2. Les marqueurs cellulaires

Les rayonnements ionisants sont capables d'induire une radiolyse de l'eau, entraînant la création de ROS (Alexandrova et al., 2011; Azzam et al., 2012; Friedland and Kundrát, 2013; Liamsuwan et al., 2012; Selivanova et al., 2014). Le poisson zèbre étant lui-même composé d'eau et vivant dans un environnement aquatique, il est considéré comme étant important de quantifier la production des ROS dans les larves exposées au tritium. C'est, plus précisément, sur la production du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ que se concentre cette partie du projet. En effet, ayant été étudiée dans le cadre de l'exposition du poisson zèbre à d'autres radionucléides, l'étude de la production de ce composé permettrait de comparer la toxicité de la thymidine tritiée à celle du tritium libre et du ¹³⁷Cs (Arcanjo, 2018; Gagnaire et al., 2021, 2015a).

B.2.4.3. Les marqueurs tissulaires

Les rayonnements ionisants peuvent également avoir un effet sur l'intégrité musculaire des individus. Dans le cas du poisson zèbre, celle-ci est importante étant donné que les muscles squelettiques sont responsables de l'activité natatoire du poisson, c'est pour cette raison que cette étude se concentre sur l'intégrité des muscles contractiles de la queue. Ces résultats pourront ainsi être reliés aux résultats de l'étude du comportement natatoire du poisson zèbre, mais également comparés à ceux obtenus dans le cas de l'étude des effets de l'irradiation gamma et du tritium libre sur le poisson zèbre (Arcanjo et al., 2018; Gagnaire et al., 2021, 2020a, 2015a; Murat El Houdigui et al., 2019).

B.2.4.4. Les marqueurs individuels

Un des axes principaux étudiés dans le cadre de ce doctorat est le développement. Il est intéressant de se concentrer sur ce dernier étant donné qu'il est un des marqueurs les plus impactés par l'exposition à différents contaminants (Icoglu Aksakal and Ciltas, 2018; Qiang and Cheng, 2019; Sun and Liu, 2017; Yang et al., 2016a). Celui-ci peut-être étudié par le biais de plusieurs paramètres :

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.2. Les choix expérimentaux

- La taille des individus : les mesures des individus permettent d'obtenir plusieurs informations. D'une part, la taille globale de l'individu renseigne sur sa croissance, mettant en avant un ralentissement ou un accélération de celle-ci. Les mesures de l'aire de la vésicule vitelline donnent également plus d'informations sur l'énergie consommée par l'individu.
- L'éclosion : l'étude de l'éclosion peut mettre en avant un ralentissement ou une accélération du développement qui ne serait pas visible par la simple mesure des individus. En effet, lorsque les individus éclosent plus tard que d'autres, leur taille n'est pas impactée, étant donné qu'ils continuent de grandir à l'intérieur du chorion (Kimmel et al., 1995). Le suivi de l'éclosion complète donc les données obtenues par le biais des mesures des individus.
- Les mouvements spontanés de l'embryon dans le chorion : ils apparaissent naturellement un peu avant que l'embryon n'atteigne 24 hpf, et diminuent par la suite, comme indiqué dans la partie réservée à la description du développement du poisson zèbre (*cf.*, Objectifs, partie B.2.1). Ces observations, qui renseignent sur le développement, indiquent également le niveau de stress de l'individu.
- Le rythme cardiaque : le coeur du poisson zèbre est considéré comme étant formé à partir de 24 hpf. Son rythme cardiaque, quant à lui, augmente au fur et à mesure du développement de l'individu (Arcanjo et al., 2020; Yang et al., 2016b). Cela signifie donc que l'étude du rythme cardiaque des larves de poisson zèbre permet d'en savoir plus sur leur stade de développement. Par conséquent, l'étude du rythme cardiaque du poisson zèbre permet d'obtenir plus d'informations sur les atteintes développementales causées par la thymidine tritiée.

En complément du développement, l'activité natatoire a été étudiée, ainsi que la réaction à différents stimuli : le stimulus vibratoire et le stimulus lumineux. L'étude de la réaction à une vibration permet de se concentrer sur la capacité du poisson zèbre à réagir au danger (Arcanjo et al., 2018; Scott and Sloman, 2004). Le stimulus lumineux, quant à lui, permet également de se concentrer sur la capacité visuelle de l'individu,

étant donné que le cycle lumineux a une importance capitale dans son cycle de vie journalier, mais également car un changement brutal de luminosité peut indiquer la présence d'un prédateur ou d'un congénère (MacPhail et al., 2009).

B.3. Les choix de simulations

B.3.1. Les cellules

Dans le cadre des simulations de microdosimétrie, il est important de sélectionner le type de cellules qui seront utilisées comme centre d'intérêt des simulations. Dans le cadre de ce travail de doctorat, cela s'est fait par le choix de la forme des cellules, mais également de leurs dimensions. Afin de déterminer quels types de cellules pourraient être utilisés, une revue de littérature a été réalisée sur trois stades de développement : 10 hpf, 24 hpf et 96 hpf. La littérature a indiqué que la majorité des cellules sont soit sphériques, soit ellipsoïdales (Braat et al., 1999; Concha and Adams, 1998; Easter and Nicola, 1996; Field et al., 2003; Glickman et al., 2003; Grandel and Schulte-Merker, 1998; Kimmel et al., 1998; Li et al., 2011; Liu et al., 2020; Yin et al., 2008). Ces mêmes articles ont indiqué que dans le cas des cellules sphériques, le diamètre des cellules varie entre 0,5 et 20 μm environ, et que dans le cas des cellules ellipsoïdales, le diamètre des cellules varie entre 1 et 30 μm environ. Pour cette raison, il a été décidé de réaliser les simulations de microdosimétrie sur des cellules sphériques dont les diamètres sont de 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 et 20 μm , ainsi que sur des cellules ellipsoïdales dont les diamètres du plus petit axe sont de 1; 5; 10; 15; 20; 25 et 30 μm (longueur des demi-axes : $x=\text{rayon}$; $y=2*\text{rayon}$; $z=2*\text{rayon}$).

B.3.2. Les noyaux

Dans le cadre de la mise en place des simulations de nanodosimétrie, plusieurs paramètres doivent être pris en compte : la composition du génome du poisson zèbre, mais également la forme et le volume des noyaux de ces cellules.

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.3. Les choix de simulations

Les recherches se concentrant sur le génome du poisson zèbre ont permis d'obtenir différentes informations. En premier lieu, cette espèce possède un génome composé de 25 chromosomes (Freeman et al., 2007). De plus, l'intégralité des chromosomes contient environ $1,7 \times 10^9$ paires de bases azotées d'ADN. La répartition des paires de bases entre les chromosomes est présentée dans le tableau B.2.

Afin de déterminer la forme et le volume des cellules à mettre en place à l'aide de DnaFabric, une revue de littérature a été réalisée sur trois stades de développement, identiques à ceux étudiés dans le cas de la microdosimétrie (Objectifs, partie B.3.1). Cette dernière a indiqué que les noyaux des cellules de poisson zèbre ont, en grande majorité, une forme sphérique (Braat et al., 1999; Easter and Nicola, 1996; Johnson et al., 2016; Landemaine et al., 2014). D'après la littérature, le diamètre des noyaux en question varie entre 2 et 13 μm . Pour cette raison, deux noyaux différents ont été générés à l'aide de DnaFabric, dont les diamètres étaient de 5 et 10 μm .

B. OBJECTIFS DE LA THESE ET CHOIX EXPERIMENTAUX – B.3. Les choix de simulations

Numéro du chromosome	Nombre de paires de base ($\times 10^6$)
1	65
2	65
3	68
4	74
5	78
6	65
7	78
8	61
9	67
10	52
11	52
12	53
13	53
14	59
15	53
16	61
17	18
18	52
19	52
20	61
21	54
22	43
23	53
24	47
25	42
Total	1459

TABLEAU B.2. – Répartition des paires de base du génome du poisson zèbre entre ses chromosomes, tiré de Freeman et al. (2007)

C. AXE 1 : INTERNALISATION DU TRITIUM SOUS FORME ORGANIQUE

C.1. Objectifs de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le premier axe de ce projet de doctorat. Elle vise à lier des pratiques théoriques et expérimentales dans l'objectif de caractériser l'internalisation de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre, ainsi que les dépôts d'énergie pouvant être attendus dans les cellules de ces derniers.

L'objectif expérimental de ce travail est de qualifier et quantifier l'internalisation de la thymidine tritiée chez les embryons et larves de poisson zèbre. Le tritium sous forme organique se comportant d'une manière différente du tritium sous forme libre, il est nécessaire d'adapter les protocoles expérimentaux : les cristallisoirs sont couverts d'un morceau de Parafilm[®] afin d'éviter toute évaporation du milieu et, par conséquent, toute augmentation de l'activité volumique. Également, il est nécessaire de quantifier l'internalisation sur une large gamme d'activités radioactives afin de pouvoir qualifier l'évolution de l'internalisation de la thymidine tritiée avec l'activité externe utilisée pour la contamination. *In fine*, l'objectif est également de déterminer quelles activités de thymidine tritiée doivent être utilisées pour obtenir les débits de dose absorbée souhaités dans le cadre de l'étude des effets toxiques du tritium

organique chez les embryons et larves de poisson zèbre (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$).

Comme indiqué précédemment, des simulations de microdosimétrie ont également été réalisées. L'objectif de ces dernières est de quantifier les dépôts d'énergie observables dans les cellules, mais également de lier ces mêmes dépôts à la géométrie et au volume des cellules d'intérêt. *In fine*, l'objectif à "long terme" des simulations réalisées dans cet axe de ce travail de doctorat est de déterminer si certaines cellules peuvent être considérées comme étant plus à risque que d'autres, mais également de lier les effets toxiques observés dans le projet de thèse aux dépôts d'énergie obtenus par microdosimétrie, et non pas seulement aux débits de dose absorbée et activités internes obtenus par macrodosimétrie.

C.2. Synthèse des résultats de l'étude

C.2.1. Approche expérimentale : analyse de l'internalisation à l'échelle de l'organisme et de l'ADN

La Figure C.1 résume les expérimentations réalisées dans le cadre de l'étude de l'internalisation de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre. Comme indiqué dans ce schéma récapitulatif, les individus ont été utilisés à plusieurs fins.

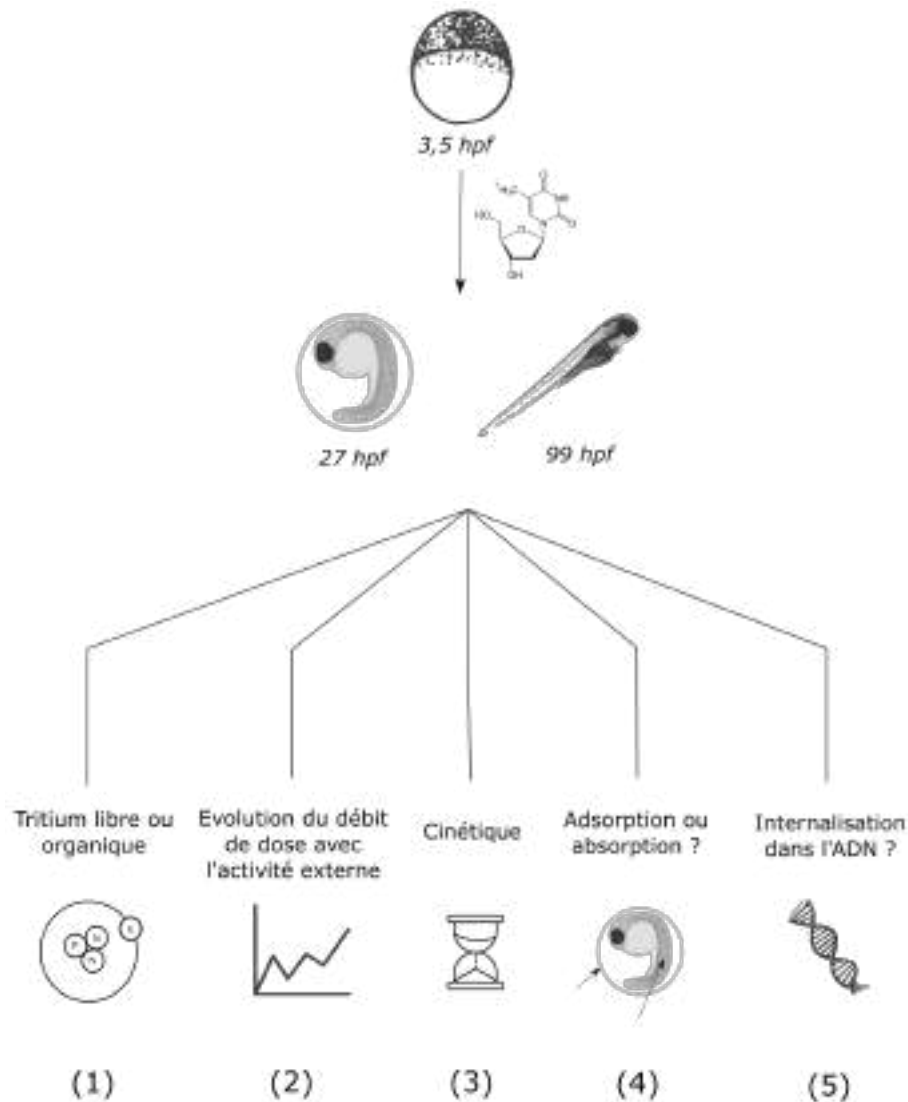


FIGURE C.1. – Schéma récapitulatif des expériences réalisées dans le cadre de l'étude de l'internalisation de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre. Chaque chiffre correspond à une série d'expériences et renvoie au texte ci-dessous pour plus d'explications.

- (1) Les embryons de poisson zèbre (3,5 hpf), issus de la reproduction d'individus adultes élevés au laboratoire (*cf.* Annexe B.1), ont été exposés à $3,46 \times 10^6$; $7,04 \times 10^6$ et $3,69 \times 10^7$ Bq/L de thymidine tritiée, dans l'obscurité, pendant 24 heures. L'exposition a été réalisée dans des incubateurs thermo-régulés à 27 ± 1 °C. Les solutions de thymidine tritiée ont été diluées dans du milieu embryon (composition présentée par Westerfield (1993), pH 7,5, conductivité $500 \mu\text{S}/\text{cm}$,

préparé dans de l'eau Milli-Q). Après exposition (27 hpf), les individus ont été séchés puis minéralisés, afin de mesurer à la fois le tritium total (tritium libre et organique) et l'OBT uniquement (*cf.* Annexe B.2). Ces deux minéralisations ont été réalisées afin de déterminer si les activités tritiées mesurées dans les individus représentaient le tritium libre, le tritium organique, ou les deux. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre le tritium total et le tritium organique, indiquant que lors du processus d'internalisation, une partie presque nulle de thymidine tritiée est transformée en TFWT.

- (2) La quantification de l'évolution de l'internalisation du tritium en fonction de l'activité externe a été réalisée en mesurant l'activité dans les embryons et larves de poisson zèbre après une exposition de 96 heures à 15 activités externes, variant de $2,21 \times 10^6$ à $5,95 \times 10^8$ Bq/L. Les résultats obtenus indiquent que, dans le cas des embryons (24 heures d'exposition) et dans le cas des larves (96 heures d'exposition), le débit de dose absorbée augmente de façon exponentielle avec l'activité externe jusqu'à une activité d'environ $(2 - 2,5) \times 10^8$ Bq/L. A partir de cette activité, l'internalisation sature, avec l'apparition d'un plateau aux débits de dose absorbée d'environ 1250 et 600 $\mu\text{Gy/h}$ dans le cas des embryons et des larves, respectivement.
- (3) Ces résultats mettent également en évidence une différence importante entre les débits de dose absorbée mesurés chez les embryons et les larves. Pour cette raison, des individus ont été prélevés à plusieurs temps pendant une exposition de 96 heures à 4×10^7 Bq/L afin d'étudier la cinétique d'internalisation du tritium. Cette dernière indique qu'après seulement 1 heure d'exposition, une quantité significative de thymidine tritiée est déjà internalisée (environ 50 Bq). L'activité mesurée dans les individus continue d'augmenter jusqu'à 48 heures d'exposition, mais à une vitesse moins importante. C'est entre 48 et 72 heures d'exposition qu'une diminution significative de l'activité interne est observable, avant que cette dernière ne stagne et n'évolue plus jusqu'à 96 heures d'exposition, soit la fin de cette dernière.

- (4) La diminution significative de l'activité entre 48 et 72 heures d'exposition peut être liée à l'éclosion. En effet, dans les expériences, le pic d'éclosion a lieu entre 48 et 72 heures d'exposition, ce sont donc des embryons qui ont été prélevés à 51 hpf, puis des larves à 75 hpf. Afin de vérifier le lien entre l'éclosion et la diminution du débit de dose absorbée, l'activité interne présente dans les individus exposés pendant 48 heures à des activités de $2,4 \times 10^6$ et 4×10^7 Bq/L a été mesurée de deux manières. En premier lieu, les embryons exposés ont été déchorionés (cf. Annexe B.3) avant d'être minéralisés. En second lieu, d'autres embryons, exposés aux mêmes activités externes, ont été minéralisés sans avoir été déchorionés. Ces analyses mettent en avant un effet barrière du chorion, avec une très faible quantité du tritium étant transférée dans l'embryon, et une activité bien plus importante adsorbée sur le chorion (environ 95 %).
- (5) Afin de quantifier la potentielle internalisation du tritium dans l'ADN des individus, ce dernier a été extrait de 5 pools (et 3 pour les témoins) de 25 embryons déchorionés (après 24 heures d'exposition) et de 18 larves (après 96 heures d'exposition) exposés à $3,46 \times 10^6$; $7,04 \times 10^6$ et $3,96 \times 10^7$ Bq/L de thymidine tritiée à l'aide du kit DNeasy[®] Blood and Tissue de Qiagen. Les concentrations en ADN dans les extraits ont ensuite été mesurées grâce au kit Qubit[®] dsDNA Broad Range de ThermoFisher Scientific. Après dilution dans de l'eau des Abatilles (eau sans tritium), l'activité en tritium a été mesurée par scintillation liquide. Ces mesures permettent de confirmer l'internalisation du tritium au niveau de l'ADN, ainsi qu'une augmentation de l'internalisation avec l'activité externe.

C.2.2. Approche théorique : analyse des dépôts d'énergie à l'échelle des cellules

La Figure C.2 résume le processus de simulation suivi dans le cadre de l'étude des dépôts d'énergie attendus au niveau des cellules des embryons et larves de poisson zèbre après exposition à la thymidine tritiée.

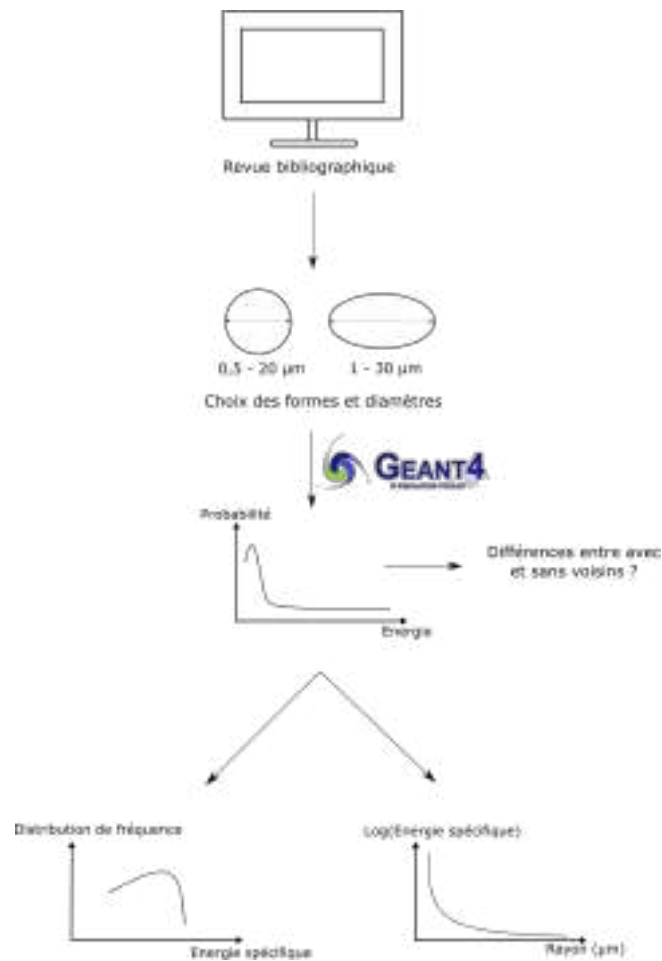


FIGURE C.2. – Schéma récapitulatif du processus de simulations réalisées afin de quantifier les dépôts cellulaires d'énergie induits par l'exposition à la thymidine tritiée.

Toutes les simulations de microdosimétrie ont été réalisées grâce à l'outil de simulation Monte Carlo Geant4 version 10.06. Les simulations ont été réalisées dans de l'eau liquide et la cellule d'intérêt était de forme sphérique (rayon 0,25 - 10 µm) ou de forme ellipsoïdale (0,5 - 15 µm). Les modèles physiques sélectionnés pour ces simulations sont issus de l'extension Geant4-DNA (liste de physique G4EMDNAPhysics_option2), qui permet de mieux transporter les électrons de basse énergie de façon discrète. Dans le cadre de cette étude, les simulations ont également été réalisées sans prendre en compte les cellules voisines à la cellule d'intérêt, afin de déterminer si le fait de ne pas les prendre en compte entraînait une perte trop importante d'informations. Les résultats obtenus démontrent que ce n'était pas le cas, l'information perdue étant moins

importante que le gain de temps correspondant à l'absence des cellules voisines dans les simulations (*cf.* Annexe C). Cependant, afin d'obtenir une meilleure pertinence biologique, les résultats présentés dans cet axe sont ceux issus des simulations réalisées en prenant en compte les cellules voisines. Les résultats mettent en évidence plusieurs informations importantes :

- (1) Dans le cas de toutes les cellules, la probabilité d'observer un dépôt de faible énergie est plus élevée que celle d'observer un dépôt de forte énergie,
- (2) La probabilité d'observer un dépôt d'une énergie fixe diminue quand le rayon de la cellule augmente,
- (3) Pour une même énergie spécifique, la distribution de la fréquence de dépôts d'énergie diminue quand le rayon de la cellule augmente. L'énergie spécifique diminue également lorsque le rayon de la cellule augmente,
- (4) Pour un même rayon, l'énergie spécifique est plus élevée dans le cas des cellules de forme ellipsoïdale plutôt que dans le cas des cellules sphériques.

Ces résultats, ainsi que ceux issus de la partie expérimentale de cette étude, sont présentés dans l'article joint ci-après, et sont discutés par la suite.

C.3. Article 1 : "*Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry*"

Article (et données supplémentaires) soumis le 1er Septembre 2022 au journal *Radiation Research*, accepté le 24 Janvier 2023 et publié le 15 Mars 2023.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

RADIATION RESEARCH **199**, 373–384 (2023)
0033-7587/23 \$15.00
©2023 by Radiation Research Society.
All rights of reproduction in any form reserved.
DOI: 10.1667/RADE-22-00157.1

Tritiated Thymidine Internalization in Zebrafish Early Life Stages: Joint Use of Experimental Procedures and Microdosimetry

Magali Schiano Di Lombo,^{a,1} Isabelle Cavalie,^a Virginie Camilleri,^a Yann Perrot,^b Beatrice Gagnaire^a

^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SRTE/LECO, Cadarache, 13115, Saint-Paul-lez-Durance, France; ^b Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SDOS/LDRI, 92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France

Schiano Di Lombo M, Cavalie I, Camilleri V, Perrot Y, Gagnaire B. Tritiated Thymidine Internalization in Zebrafish Early Life Stages: Joint Use of Experimental Procedures and Microdosimetry. *Radiat Res.* **199**, 373–384 (2023).

Tritium is found in the environment under three forms: free in the water, gaseous, and bound to organic matter. Once internalized in living organisms, it can be found in two forms: tissue free water tritium (TFWT) and organically bound tritium (OBT). This study aims to better understand OBT internalization in living organisms and to show the complementarity between experimental procedures and microdosimetry simulations that have often been used to obtain more information on imparted energy to cell nuclei. To do so, tritiated thymidine, an organic form of tritium, was chosen and zebrafish embryos [3.5 h post fertilization (hpf)] were exposed to a range of activity concentrations (2.21×10^3 to 5.95×10^5 Bq/mL). First, individual zebrafish embryos were sampled after different exposure times (1 to 96 h) to qualify the internalization kinetics. Then, the barrier role of the chorion was assessed after 2 days of exposure. Lastly, individual zebrafish embryos were sampled after 1 and 4 days of exposure to measure the internalization in the whole fish and its DNA, but also to highlight a possible link between the internal dose rate and the external activity concentration. Microdosimetry simulations were also made to quantify the imparted energy that could occur in the zebrafish cells after exposure to tritium. Results showed that when bound to thymidine, tritium rapidly incorporates in zebrafish early life stages, with the internalization being almost complete after 24 h. Results also showed that while the chorion acted as a barrier to prevent thymidine from entering the embryos, significant levels could still be measured in the whole organisms as well as in DNA. This study also highlighted that when the external activity concentration increased, the internal dose rate increased as well, following a sigmoidal trend. Microdosimetry simulations highlighted that the size and shape of the cell matters, and that the smallest cells seem to be at the greater risk, with only low-energy electrons inducing energy depositions. A linear fit was also found between the mean energy deposited and the logarithm of the radius of the cell, thus showing that the quantity of deposited energy is proportional to the radius of the cell. While this study highlighted important internalization pattern, it will

also be used as the starting point of a study focusing on the toxic effects of tritiated thymidine on zebrafish in its early life stages. © 2023 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Tritium is the only hydrogen isotope with radioactive properties (1). It is a β -emitter that has a half-life of 12.3 years, and a mean energy of 5.7 keV. Considering that it is a hydrogen isotope, its physico-chemical properties are the same than that of hydrogen, meaning it could be found in every environmental compartments (2). In the environment, tritium can be found in three main forms: free in the water (HTO), gaseous tritium (HT) and organically bound tritium (OBT), where tritium replaces hydrogen in an organic molecule. Tritium is produced by natural and anthropogenic processes. In the environment, its main anthropogenic sources are nuclear industries such as nuclear power plants, which routinely release tritium as HTO (3–5). Tritium levels in all the environmental compartments have been monitored in France for many years, highlighting basal levels of 0.12 to 0.86 Bq/L (6, 7). Under a radioactive influence, tritium levels were of 1 to 61 and 5 to 35 Bq/L in the Rhône and Garonne rivers, respectively. When the tritium enters the biological tissues, it can be found in three different forms: tissue free water tritium (TFWT), where tritium is trapped in the tissue water; exchangeable-organic tritium (eOBT), where a tritium is bound to oxygen, sulfur, nitrogen or phosphorous; and non-exchangeable organic tritium (neOBT), where tritium is bound to a carbon atom (8). The latter is the tritium form that has the highest biological half-life.

Considering that tritium can enter living organisms, many studies have focused on internalization measurements, both on the field and in the laboratory (3, 5, 8–12). A study focusing on the HTO internalization in zebrafish embryos and larvae have shown that tritium does incorporate in the tissue of the animals at a fast rate, and is mainly found in the form of TFWT (3). It was also shown that when living organisms are exposed to both HTO and OBT, high tritium

¹ Corresponding author: Magali Schiano Di Lombo; email: magali.schianodilombo@gmail.com.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

374

SCHIANO DI LOMBO ET AL.

levels were found in mussel and fish [$(9.92\text{--}22.9) \times 10^4$ Bq/kg and $(2.10\text{--}24.00) \times 10^4$ Bq/kg, respectively] (9). Multiple studies have also focused on the internalization differences between HTO and OBT, highlighting the fact that OBT contributes more to the absorbed tritium dose compared to HTO (8, 10–12). Those studies also showed that both compounds behave differently, with TFWT reaching equilibrium with the external activity concentration while OBT does not, leading to longer deuration rates measured in the latter case.

Tritiated organic compounds as tritiated thymidine have been used to better understand biological mechanisms. As thymidine is a thymine precursor, DNA internalization is expected, leading to its use in studies focusing on DNA synthesis (13–19). Many of those studies have shown that as expected, significant tritium levels could be measured in the cell and in the DNA after an in vitro exposure of those cells to the labelled nucleoside. Two of those studies also highlighted the fact that thymidine enters the cell via the salvage pathway, also known as facilitated diffusion (15, 17). When thymidine reaches the cell, two competing mechanisms occur. Either the thymidine is directly transformed into thymine, leading to its degradation before it can be internalized into the DNA, or it is rapidly phosphorylated and joins the derivative pool, which is the intermediate between the thymidine internalization in the cell and its internalization in the DNA (15, 16, 19). While a major part of the thymidine is directly transformed into thymine before being taken out of the cell, thymidine phosphorylation is still significant, as it enables the DNA synthesis. But while the thymidine phosphorylation is fast, it is still dependent on the thymidine transport system that is itself dependent on the cell cycle. Indeed, it seems that the tritiated thymidine internalization in the cell is almost null in the G1 phase, before strongly increasing when the cells reach the S phase and decreasing when the cells enter the G2 phase (14–16, 18). As explained above, these studies concluded that tritium linked to thymidine can enter the cell and the DNA.

Quantification tools as liquid scintillation can be used to obtain more information on radioactive levels in different organisms. But, to understand all the damages that can occur after an exposure to radiation, this information is not sufficient. Biological effects and internalization should be linked to an actual value of energy deposited. When considering that the sensitive volume is the cell, the energy deposit by decay will have a marked stochastic nature. Microdosimetric formalism is then relevant in order to obtain information on the specific energy distribution at the microscopic level (20). Indeed, microdosimetry gives the formalism necessary to describe the distribution of the energy depositions that occur stochastically in a given target, and it can be used to analyze the imparted energy at the cell scale (21, 22). Such cellular simulations are even more important when considering beta-emitters as tritium (4, 20, 23–25). Indeed, a study has proven that micro-

dosimetric simulations can highlight important differences in energy depositions in materials as Teflon® or water (25). This study showed that the range of beta-rays emitted from tritium were 35 times shorter than the one emitted from carbon-14, with the total energy released by tritium being absorbed in spherical volumes of Teflon or water way smaller than in the case of carbon-14. As beta-rays emitted by tritium cannot travel high distances (i.e., approximately 7 μm in soft tissues for the most energetic rays), the calculated absorbed doses in the decay vicinity of H-3 were found to be very high, thus showing that microdosimetric considerations are important for the evaluation of the radiolytic effectiveness of beta-emitters as tritium (23, 25). Other studies also highlighted differences between HTO and OBT by the means of microdosimetry (4, 23, 24). Significant differences were found between HTO and OBT, specifically when the target size gets smaller, partly because OBT is heterogeneously distributed in the organism, leading to more complex microdosimetric cases.

The main objective of this study was to quantify tritiated thymidine internalization in zebrafish in its early life stages. With this purpose, the tritiated thymidine internalization in the organisms was studied by means of experimental procedures and microdosimetric simulations. The use of both approaches was also chosen to anticipate another objective: showing how experimental processes and simulations could complete each other. Zebrafish was chosen as it is a convenient laboratory species, with adults being able to spawn hundreds of eggs in a single spawning, and the genome of this species being fully sequenced (26, 27). Early developmental stages were chosen as they are considered as being more sensitive to a large range of chemicals. Also, the first developmental stages have already been studied, giving us the required information for the microdosimetric simulations (28, 29). To study the tritium internalization in the zebrafish embryos and larvae, zebrafish embryos were exposed to a large range of tritiated thymidine activity concentrations (2.21×10^3 to 5.95×10^5 Bq/mL). During those exposures, individual embryos were sampled after different exposure times to have more information on the internalization kinetics. Moreover, individual embryos were sampled after 1 and 4 days of exposure to quantify the tritium internalization in the whole zebrafish, but also in its DNA, which was quantified after extraction. Finally, microdosimetric simulations were made to obtain more information on the imparted energy at a cellular level, giving more information on which cells could be more at risk when chronically exposed to tritiated thymidine.

MATERIALS AND METHODS

Fish

All experimental procedures performed in this study were previously approved by IRSN Animal Care Committee and followed French regulations for animal experimentation (protocol P2019-19; registration number of IRSN laboratory: C13-013-07). Four-month-

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

old wild-type zebrafish (AB genetic background) were supplied by Paris Sorbonne University (France) and were kept in a zebrafish housing system (Zebtec Techniplast® Stand Alone) with a 12:12 h light:dark cycle photoperiod. The fish were fed three times a day with Gemma Wean 0.3 (Skretting). Water parameters were monitored daily (pH 7.5 ± 0.2 ; conductivity $400 \pm 20 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, temperature $27.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$). As males and females were kept in different tanks, the mating was done every three to four weeks to ensure that the fish had a good reproductive capacity and that the females stayed in good health. All matings were done in the husbandry using the water from the housing system and using fish that were between 4 and 13 months old.

Embryo Exposure and Tritium Contamination

Exposures to different tritium activities were done separately to ensure that there was no cross-contamination between the different glass crystallizers. Embryo medium was prepared using InstantOcean sea salt at a concentration of 60 mg/L (30). The embryo medium was used as the negative control condition and to dilute the tritiated thymidine source. Tritiated thymidine solution (97% purity, 185 MBq, PerkinElmer, Courtabouef, France) was diluted in embryo medium to obtain final activity concentrations varying between 2.21×10^3 and 5.94×10^5 Bq/mL.

The exposure was designed from the protocol described in Arcanjo et al. (3). At 3.5 h post fertilization (hpf), zebrafish eggs were placed in two glass crystallizers covered with Parafilm at a density of two eggs per mL of tritiated thymidine solution or embryo medium. The eggs were kept in the dark in thermo-regulated incubators (Heratherm, ThermoScientific) at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4 days. At 48 h, 80% of the water medium was renewed with fresh solutions. Tritium-free water (Abatilles water, France) was also placed in the incubators (40 mL/beaker) to monitor tritium exchanges in the incubator. Temperature ($^\circ\text{C}$) and relative humidity (%) were monitored every 30 min during the exposure (HOBO data logger U12, Onset).

Tritium measurements were made on the medium (3 replicates/crystalliser, once a day, 10 μL of medium in 990 μL of tritium free water), on the tritium-free water (1 replicate/beaker, once a day, 1 mL) and on the eggs and larvae (24 and 96 h per exposure). Blank measurements were made on tritium-free water (Abatilles water, France). After adding 19 mL of the liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, Perkin Elmer), the liquid scintillation measurements were done using a Quantulus (Quantulus 1220, Perkin Elmer) monitored by WinQ (1220-307 WinQ, Perkin Elmer). Each measurement was done three times and lasted 20 min. The data were processed using the EasyView software. The results were expressed as Bq/mL.

Internalization Measurements

Tritium Internalization Kinetics and Barrier Function of the Chorion

Tritium kinetics measurements were realized on 10 to 15 individual zebrafish embryos that were exposed during 1 to 96 h (1; 3; 6; 20; 22; 24; 48; 72 and 96 h) to tritiated thymidine at a concentration activity of $(4.2 \pm 0.3) \times 10^4$ Bq/mL. For the negative control, only 3 individual embryos were sampled at each time point. The internalization was measured according to a protocol modified from the one described by Arcanjo et al. (3). Briefly, 10 to 15 individual zebrafish embryos were sampled and individually dried on a filter (RA 1.2, Millipore). With a needle, the egg was rolled over the filter while the larva was only gently taped on the filter. Once the sample was dry, it was placed in a liquid scintillation tube. One mL of soluene-350 (Perkin Elmer) was added to the sample that was then left to heat for 48 h at 55°C . In a next step, 35 μL of glacial acetic acid (Sigma Aldrich) was added, followed by 19 mL of Ultima Gold LLT scintillation liquid (Perkin Elmer). All results were expressed as Bq/sample.

After 48 h of exposure to solution with tritium activity concentrations of 3.4×10^3 and 4×10^4 Bq/mL, two types of samples were dried and mineralized. Firstly, 15 whole embryos were dried as

TABLE 1
Calculated Dose Coefficients for Internal and External Exposures ($\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g) and Fresh Masses Used in the Dose Rate Calculations

Exposure duration (h)	DCC _{ext} ($\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g)	DCC _{int} ($\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g)	Fresh mass (mg)
24	1.26×10^{-5}	2.24×10^{-3}	1.18
96	1.73×10^{-5}	2.24×10^{-3}	0.25

Note. Fresh masses have been measured and reported by Arcanjo et al. (3).

explained above. Secondly, 15 additional individual zebrafish embryos were sampled, and the chorion was carefully removed before sampling the larvae and drying it by taping it on a filter. All samples were mineralized following the process explained above. Results were processed using the EasyView software and were expressed as Bq/sample.

Tritium Internalization Measurements: 24 and 96 H of Exposure

The internalization measurements were realized on 20 to 30 individual zebrafish embryos that were exposed during 24 h (24 h per exposure) to tritiated thymidine at concentration activities ranging from 2×10^3 to 6.5×10^5 Bq/mL (0.2; 3.3; 4.9; 6.5; 6.6; 9; 11; 15; 33 and 65×10^4 Bq/mL). For the negative control, only 6 individual zebrafish embryos were sampled at each time point. The internalization was measured according to a protocol modified from the one Arcanjo et al. (3). Briefly, 30 embryos were sampled and individually dried on a filter (RA 1.2, Millipore) as explained above. Briefly, 10 to 15 tubes were used for total tritium measurement and another 10 to 15 were used to measure OBT. For total tritium measurement, samples were processed as described above and for the OBT measurements, samples were firstly dried in opened tube for 48 h at 55°C before following the same protocol described for total tritium quantification. All samples were measured using a Quantulus monitored by WinQ. The results were processed using the EasyView software. For the larvae exposed for 96 h to the same activity concentrations, only 10 to 15 samples were dried and only the total tritium internalization was measured.

Results were expressed in Bq/kg (fresh weight) using weight data presented by Arcanjo et al. (3). Dose rate (DR, $\mu\text{Gy/h}$) were calculated using Eq. (1):

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

where A_w is the tritium content in the water (Bq/mL), DCC_{ext} is the calculated dose coefficient related to external exposure ($\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g), A_o is the tritium content in the organism (Bq/g, fresh weight) and DCC_{int} is the calculated dose coefficient related to internal exposure ($\mu\text{Gy/h}$ per Bq/g). The dose coefficients (DCs) were calculated by analytical procedure using EDEN v3 (developed by IRSN (31)), following the hypothesis that tritium is homogeneously distributed in the organism. These DCs and weights used are presented in Table 1. Concentrations factors (CF, mL/g) were calculated using Eq. (2):

$$CF = \frac{A_o}{A_w} \quad (2)$$

Where A_o is the tritium content in the organism (Bq/g, fresh weight) and A_w is the tritium content in the water (Bq/mL).

DNA Extraction and Tritium Measurements

DNA was extracted from zebrafish embryos and larvae using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen). Briefly, three pools of 25 control embryos (or 18 larvae) and five pools of 25 contaminated embryos (or 18 larvae) were sampled after being rinsed with clean

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

376

SCHIANO DI LOMBO ET AL.

embryo medium that was then removed and replaced by 200 μL of a buffer ATL/proteine K mix (90:10, v/v). 200 μL of buffer AL were added, followed by 200 μL of Ethanol (> 96%). The mixture was then added to a DNeasy Mini spin column placed in a 2 mL collection tube. The sample was centrifuged for 1 min at 6000g at room temperature. The supernatant was then discarded and then spin column was placed in a new 2 mL collection tube before adding 500 μL of buffer AW1 and centrifuging the sample at 6,000g for 1 min. The supernatant was discarded, and the spin column was added to a new 2 mL collection tube. Buffer AW2 (500 μL) was added in the column and the sample was centrifuged for 3 min at 20,000 g. The column was placed in a 2 mL microcentrifuge tube and the DNA was eluted by adding 50 μL of Buffer AE to the center of the spin column membrane. The DNA was left to incubate at room temperature for 1 min before being centrifuged for 1 min at 6,000g.

DNA concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) was measured using the Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit (ThermoFisher Scientific). All samples are treated individually, and two DNA standards (0 and 100 ng/ μL in TE buffer) were added. In each 0.5 mL tube, 190 μL of the dsDNA BR Reagent/dsDNA BR Buffer mix (1:199, v/v) were mixed with 10 μL of the DNA sample. Each sample was vortexed before being incubated in the dark at room temperature for 5 min. The Qubit® 3.0 Fluorometer was used to measure the DNA concentration in the sample. Extracted DNA (25–35 μL) was mixed with Abatilles water (965–975 μL) and the tritium activity concentration was measured following the protocol already presented for the tritium liquid measurements.

Microdosimetry Simulations

In the formalism used in this study, the energy released to a volume is the imparted energy noted ϵ . It is the sum of all the elementary energy deposits in this volume coming from a primary particle (in our case an electron from the decay) and from all the secondary particles. For each cell, ϵ is a stochastic variable, also leading to different specific energies (z) which is the microdosimetric quantity equivalent to the absorbed dose. It is worth pointing out that absorbed dose D corresponds to the ratio between the mean value of the deposited energy in the matter and the mass of the volume where the deposition occurs.

In this work, simulations were computed using Geant4 Monte Carlo toolkit version 10.06 as well as its extension, Geant4-DNA. This extension proposes, among other things, physical models at very low energy for the simulation of the track structure (i.e. the spatial distribution of the interactions points) in liquid water and which is thus well adapted to microdosimetry (32–37). Geant4 Monte Carlo toolkit has been chosen as both ellipsoidal and spherical cells are usable, which is not the case with MIRDcell, but different studies showed that Geant4 can be used instead of MIRDcell as the results obtained are comparable (37, 38). For microdosimetric calculation the shape and size of the target volume have a strong impact on the distribution of the imparted energy. To simulate the cells present in the zebrafish embryos and larvae, an individual cell was represented as a sphere or an ellipsoid made of liquid water, considering the majority of zebrafish cells are of those shapes. The radius chosen were from 0.25 to 10 μm (0.25; 0.5; 1.25; 2.5; 5; 7.5; 10 μm) for the spherical cells and from 0.5 to 15 μm (0.5; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; 15 μm) for the ellipsoidal ones (22, 39–54). The radius chosen for the ellipsoidal cells corresponds to the smallest of the three axes, the other characteristic dimensions being taken equal to twice this radius ($x = \text{radius}$; $y = 2x\text{radius}$; $z = 2x\text{radius}$). Simulations were made in liquid water on one cell of interest made of liquid water while considering the presence of its neighbor cells, of same shape and dimensions, with the cell of interest being in the middle of a 3D cell cluster. The presence of the neighbor cells was taken into consideration as a study made on the tritiated thymidine incorporation in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) showed that labelled cells are usually close to each other, forming bands (13). For those neighbor cells, it was taken into account that

electrons released by tritium during its decay can only travel up to 6 μm in liquid water (55) and the cells located at a distance greater than 6 μm were therefore not taken into account. For those simulations, 10^6 electrons were being released in the cell of interest but also in its neighbors. The simulation scheme is represented in Fig. 1. As a large number of electrons were used in the simulations, the simulation is robust, and its statistic error is 1.5%.

From these simulations, the probability of having an imparted energy for one tritium disintegration from 50 to 18,500 eV (with a 50-eV bin) was obtained. This energy scale was chosen considering that electrons emitted by tritium during its decay have a maximum energy of 18.6 keV (55). These simulations also indicated the mean imparted energy in each cell, the imparted energy having the highest probability and the maximum energy that could be deposited in the cell. In this work, the mean imparted energy will be expressed in eV per disintegration and represented as a function of the radius of the cell.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using RStudio with PMCMR, car and lme4 packages. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Packages as ggplot2, ggpubr, ggmisc and scales were used to represent the data as graphs. The normality of data distribution and the homogeneity of the variances were verified using the Shapiro-Wilks and Levene tests ($P < 0.05$). For the water tritium content during the experiment, a two-way ANOVA was performed with crystallizer and time as factors. When necessary, this test was followed by a Tukey post-hoc test ($P < 0.05$). To compare the total tritium and OBT contents in the zebrafish embryos and larvae, t test or Wilcoxon test were performed ($P < 0.05$). Lastly, to compare the concentration factors between each experiment, a one-way ANOVA was performed, followed by a Nemenyi post-hoc ($P < 0.05$) when necessary. To compare the tritium concentrations measured in the DNA between the different tritium activity concentrations, the Kruskal-Wallis test was performed, followed by a Bonferroni post-hoc test ($P < 0.05$).

RESULTS

Tritium Internalization in Zebrafish Early Stages

Tritium Internalization Kinetics and Barrier Function of the Chorion. Tritium internalization kinetics measured after the first experiment are presented in Fig. 2A. These results gave the general trend, showing that there was a first significant increase in the internalization between 0 and 1 h of exposure. The internalization then reached a threshold between 1 and approximately 6 h of exposure. It then increased again between 6 and 24 h of exposure before slowing down before 48 h of exposure. Considering the large standard deviations measured at 22, 24 and 48 h, the experiment was repeated using a similar activity concentration (4.0×10^4 instead of 4.5×10^4 Bq/mL) and more individual zebrafish embryos (15 instead of 10) were sampled. The results are exposed in Fig. 2B. These results confirmed the trend already observed after the first experiment, and tritium activity concentrations in the sample statistically different between samples exposed for 1 and 24 h ($P < 0.001$).

To verify the hypothesis of the chorion acting as a barrier, the activity was measured by removing the chorion of half of the individual zebrafish embryos after 48 h of exposure, before mineralization. For both external activities tested, the activity measured in the individual without the chorion was

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

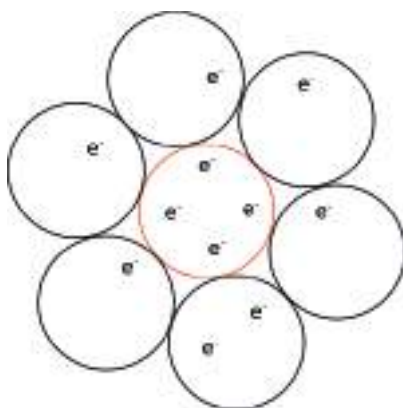


FIG. 1. Schematic representation of the microdosimetry design used in the simulations. The red circle represents the cell of interest while the gray ones represent its neighbors. Electrons (e^- , $1E+06$) were released in the cell of interest and its neighbors.

significantly lower than the activity measured in the individual with the chorion (2.03 vs. 44.71 and 11.09 vs. 171.17 Bq for 3.3×10^3 and 4×10^4 Bq/mL, respectively; $P < 0.001$).

Tritium Internalization in Embryos and Larvae

Activity concentrations measured in the crystallizers at the beginning of the experiment, measured external activity concentrations and calculated internal dose rates after 24 and 96 h of exposure are presented in Table 2. Some data are missing either because they were not planned to be measured, or because there was a technical issue during the experiment. The results showed that for embryos and larvae, the internal dose rate increased with the external activity, but this increase did not seem to be linear. Also, it can be pointed out that the standard deviations for this parameter were higher for embryos compared to larvae. Considering that the increase of the dose rate with the external activity concentration did not seem to be linear, the dose internal dose rate was plotted against the external activity concentration, and those plots are presented in Figs. 4 and 5. For embryos (Fig. 4) as for larvae (Fig. 5), the tritium internalization seemed to follow a sigmoidal curve, with an exponential increase leading to a saturation point at an external activity concentration of approximately 2 to 2.5×10^5 Bq/mL.

The form of the incorporated tritium was also studied by measuring the total tritium and OBT fractions, separately. The results are presented in Table 3. As showed in the table, there were no statistical differences between the total tritium and OBT dose rates ($P > 0.05$).

Tritium Internalization in DNA

Tritium incorporation in the DNA from embryos and larva exposed to three tritium activities was measured and

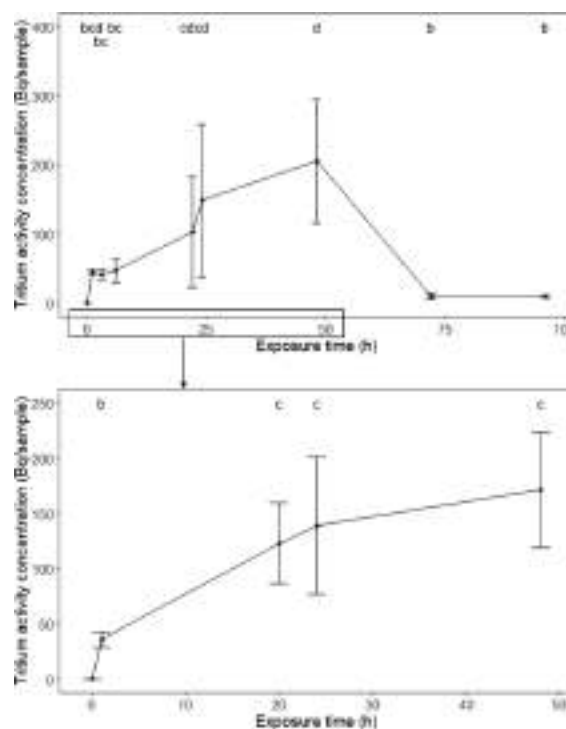


FIG. 2. Tritium activity (Bq/sample, mean \pm SD, $n = 9-10$) measured in individual samples after various exposure times to a tritium at an activity concentration of 4.5×10^4 Bq/mL (top panel). The experiment repeated (bottom panel) on 15 individual zebrafish embryos after a 1, 20, 24 and 48 h of exposure to a tritium at an activity concentration of 4×10^4 Bq/mL [Kruskal-Wallis, $a < b < c < d$, $P < 0.05$, a corresponds to the basal tritium levels in the individual ($<DL$)].

the results are presented in Table 4. Tritium incorporation in the DNA was visible even at the lowest external activity concentration measured (3.46×10^3 Bq/mL). The results also showed that as for the tritium incorporation in the whole embryo and larvae, the internalization process seemed to be complete after 24 h of exposure, as there was no significant differences between the tritium activity concentrations in the DNA at 24 and 96 h of exposure ($P > 0.05$).

Microdosimetry of Tritium in Zebrafish Cells

The microdosimetric spectra of the different geometries studies presented in this article are show in Fig. 6. For ease of interpretation, the imparted energy spectra are also presented in Fig. 7. As can be shown in the first spectra, the highest specific energy that can be obtained increases when the radius of the cell decreases. The second spectrum also shows that the highest probability was reached for the lowest imparted energy per disintegration (0–50 eV), and this was observed for all cells, with no effect of their shape or their size. For all cells, the probability rapidly decreased

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

TABLE 2
External Activities (Bq/mL, n = 2–3 crystallizers) and Dose Rates (μGy/h, n = 10–15) Measured in the Water and the Zebrafish Embryos and Larvae after 24 and 96 h of Exposure

Starting activity (10 ³ Bq/mL)	After 24 h of exposure		After 96 h of exposure	
	External activity (10 ³ Bq/mL)	Dose rate (μGy/h)	External activity (10 ³ Bq/mL)	Dose rate (μGy/h)
2.21	2.42 ± 0.38	15.50 ± 8.41	2.73 ± 0.56	6.03 ± 1.48
3.46	2.61 ± 0.30	17.38 ± 4.29	3.32 ± 0.08	15.19 ± 13.16
6.87	7.08 ± 1.29	22.09 ± 9.01	7.06 ± 0.36	22.75 ± 15.99
30.73	31.11 ± 0.20	121.58 ± 67.59	31.30 ± 1.96	65.36 ± 13.62
36.26	30.96 ± 0.23	120.48 ± 34.82	35.26 ± 0.31	76.80 ± 8.89
36.92	42.77 ± 4.97	234.78 ± 157.76	-	-
39.52	39.94 ± 0.06	263.34 ± 117.59	-	-
41.15	40.02 ± 1.15	252.06 ± 134.36	40.36 ± 4.99	98.88 ± 46.88
45.35	39.03 ± 3.73	282.21 ± 209.45	46.46 ± 2.70	83.36 ± 21.09
65.77	-	-	59.09 ± 3.41	103.76 ± 36.23
67.22	66.71 ± 1.19	267.36 ± 134.98	-	-
90.61	82.89 ± 1.65	615.71 ± 196.04	105.85 ± 10.58	70.14 ± 26.25
111.78	102.84 ± 3.00	785.28 ± 285.75	118.49 ± 5.68	146.24 ± 90.39
321.45	311.15 ± 8.15	907.86 ± 472.67	324.77 ± 10.16	663.98 ± 102.49
594.79	659.06 ± 28.91	1328.94 ± 485.48	627.40 ± 53.41	592.27 ± 60.42

Notes. Results are expressed as mean ± SD. - means that these data were not acquired during the corresponding experiment, or that the data could not be kept because of an issue in the experiment.

while the energy increased, until the imparted energy reached 250 eV.Bq⁻¹. At this point, the probability increased, reaching a maximum for imparted energies of 250 and 350 eV.Bq⁻¹ in ellipsoidal and spherical cells, respectively. After this point, the probability decreased exponentially while the imparted energy increased. For both cell shapes, the increase of the cell radius was linked to a decrease in the probability linked to the smallest deposited energies. Cells with the lowest radius also reached a null probability for lower energies than cells with higher radii.

For both cell shapes, the specific energy per Bq computed with Geant4-DNA could be linked to the cell radius (R² ≥ 0.99; Fig. 8). The equations computed for the spherical and ellipsoidal cells can be found in Eqs. (3) and (4), respectively. z is the mean specific energy and r is the cell

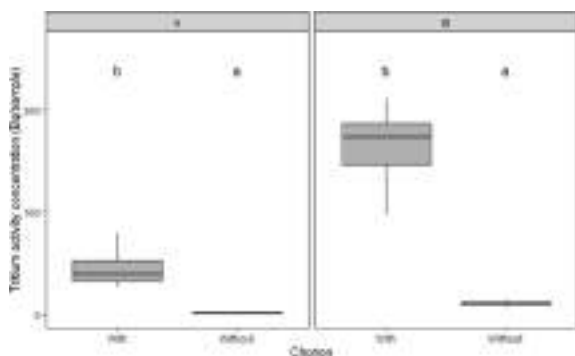


FIG. 3. Tritium activity (Bq/sample, n = 15) measured in 51 hpf zebrafish embryo before and after the chorion removal. Those individual zebrafish embryos were sampled after a 48 h exposure to tritium at activity concentrations of 2.4×10^3 (A, left panel) and 4.0×10^4 (B, right panel) Bq/mL (statistical analysis: t test, $a < b$, $P < 0.05$).

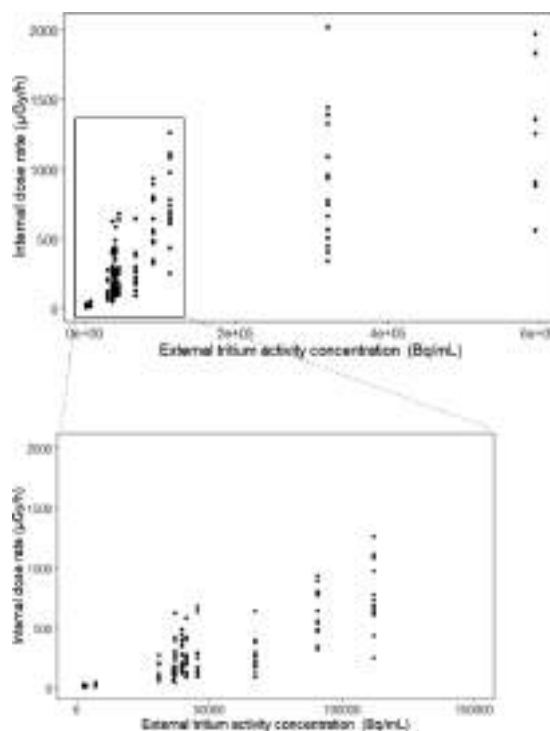


FIG. 4. Variations in the internal dose rate (μGy/h, n = 10–15) measured in zebrafish embryos after 24 h of exposure to tritiated thymidine activity concentrations ranging from 2×10^3 to 6×10^5 Bq/mL. The graph was also zoomed around the 0 to 1.5×10^5 Bq/mL region.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

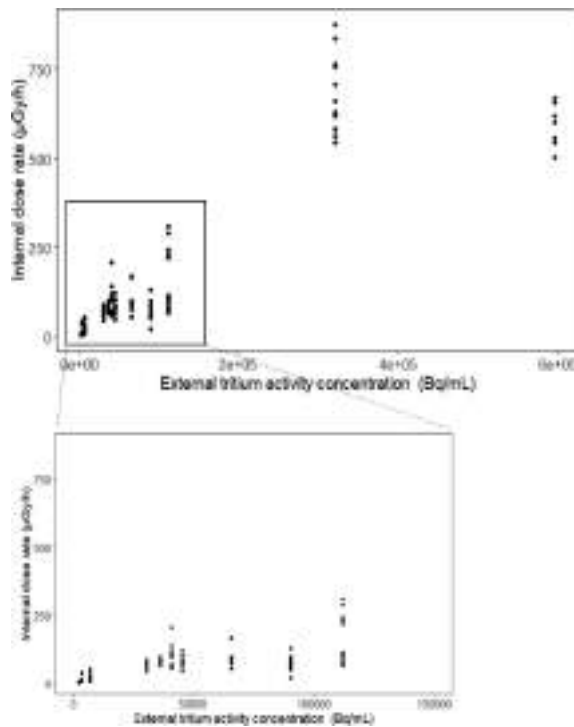


FIG. 5. Variations in the internal dose rate ($\mu\text{Gy/h}$, $n = 10\text{--}15$) measured in zebrafish larvae after 96 h of exposure to tritiated thymidine activity concentrations ranging from 2×10^3 to 6×10^5 Bq/mL. The graph was also zoomed around the 0 to 1.5×10^5 Bq/mL region.

radius. For an equivalent radius, the specific energy for 1 Bq of tritium in a spherical cell was lower than the specific energy in an ellipsoidal cell. For both cell shapes, the specific energy decreased when the cell radius increased.

$$z = 0.0956x^{-2.607} \quad (3)$$

$$z = 0.2766x^3 \quad (4)$$

TABLE 3
Total Tritium and OBT Dose Rates ($\mu\text{Gy/h}$, $n = 10\text{--}15$) Measured in the Zebrafish Embryos after 24 h of Exposure

Starting activity concentration (Bq/mL)	Total tritium dose rate ($\mu\text{Gy/h}$)	Total tritium dose rate ($\mu\text{Gy/h}$)
3.63×10^3	120.48 ± 34.82	131.08 ± 49.82
3.21×10^3	907.86 ± 472.67	1046.63 ± 485.67
5.95×10^3	1328.94 ± 485.48	1462.89 ± 597.58

Note. Results are expressed as mean \pm SD. - means that these data were not acquired during the corresponding experiment, or that the data could not be kept because of an issue in the experiment. (t test or Wilcoxon test, $P < 0.05$).

TABLE 4
Tritium Activity Concentration Measured in the DNA (Bq/ μg , $n = 3\text{--}5$) Extracted from Zebrafish Embryos and Larva after 24 and 96 h of Exposure, Respectively

Starting activity concentration (Bq/mL)	Tritium activity concentration in the DNA after 24 h of exposure (Bq/ μg)	Tritium activity concentration in the DNA after 96 h of exposure (Bq/ μg)
3.46×10^3	0.25 ± 0.19^a	0.16 ± 0.05^A
7.04×10^3	0.31 ± 0.08^{ab}	0.25 ± 0.07^{AB}
3.69×10^4	1.22 ± 0.65^b	1.24 ± 0.49^B

Notes. No significant difference was found between 24 and 96 h per exposure for each activity concentration. (Kruskal-Wallis, $a < b < c$, $A < B < C$, $P < 0.05$).

DISCUSSION

Tritium Internalization Kinetics

The results highlighted that there are three steps in the internalization kinetics of tritiated thymidine in embryos and larvae. Briefly, the results showed a first internalization between 0 and 1 h of exposure, and a second significant internalization between 6 and 24 h of exposure. The internalization can then be considered as complete as there

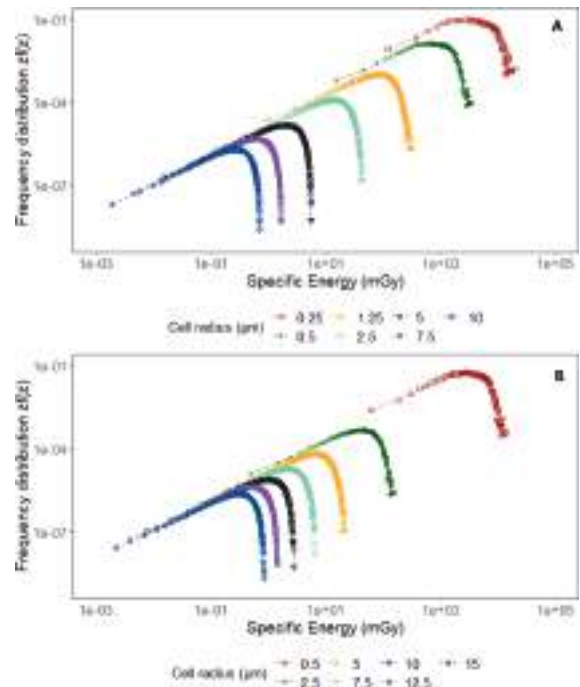


FIG. 6. Frequency distribution ($zf(z)$) of the specific energy (mGy) induced by 1 Bq of tritium in spherical (panel A) and ellipsoidal (panel B) cells of various cell radii (μm). Those results were obtained by the simulation of 10^6 electrons in those same cells and their direct neighbors.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

380

SCHIANO DI LOMBO ET AL.

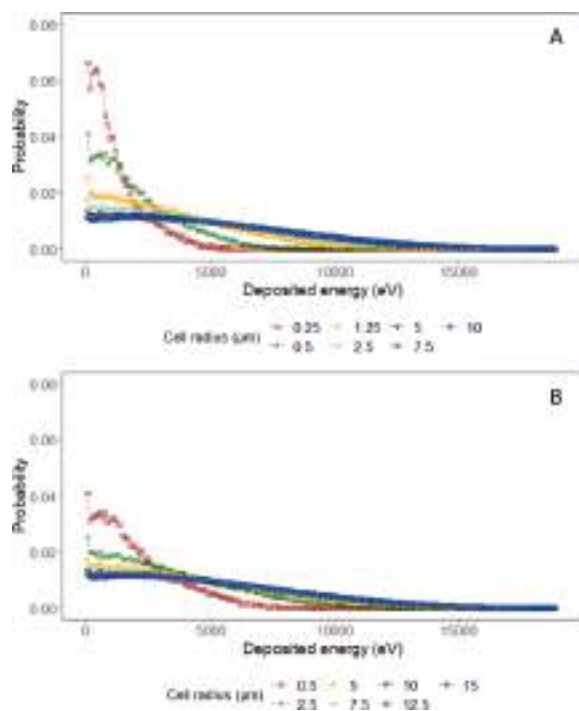


FIG. 7. Energy deposited (eV, probability) in spherical (panel A) and ellipsoidal (panel B) cells of different radius (μm) by 1 Bq of tritium. Those results were obtained by the simulation of 10^6 electrons released in those same cells and their direct neighbors.

were no statistical differences between the activity concentration after 24 and 48 h. These results are in accordance with another study made on HTO, where tritium internalization kinetics showed that a steady-state appeared between 1 and 24 h of contamination (3). These results are even more interesting considering that the embryos were exposed from the same time (3 to 3.5 h post fertilization), showing that despite differences in behavior between OBT and HTO, internalization kinetics stay the same (8, 12).

The last part of the kinetic was the significant decrease between 48 and 72 h of exposure. This could be explained by the hatching that occurred between 48 and 72 hpf, transforming embryos into larvae. We hypothesized that the main fraction of tritium was adsorbed on the chorion, and not internalized in the embryo, which would show a barrier effect of the chorion. This hypothesis was confirmed by the second part of the experiment, with tritium levels being significantly higher in embryos with chorion compared to dechorionated embryos. This result was in accordance with previous studies. The zebrafish chorion has a $3.5 \mu\text{m}$ thickness and is divided between 3 different layers of different compositions (56). It also contains pores that have a size of $0.17 \mu\text{m}^2$, and its structure is consistent with the roles that have been assigned to its different compartments: diffusive exchange of gases and physical protection, flexible filter for transport of materials and protection against

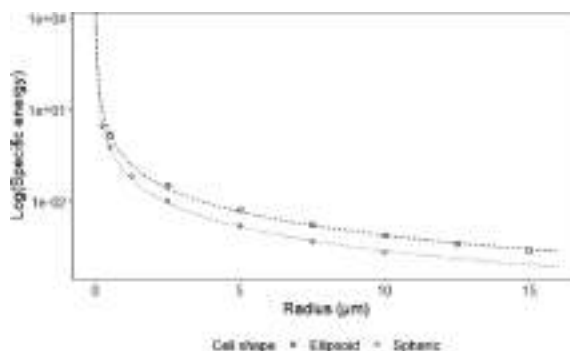


FIG. 8. Logarithm of the specific energy (Gy) computed in spherical (circle) and ellipsoidal (square) cells of different radii (μm). The lines correspond to the equation representing the specific energy as a function of the radius of the spherical (dotted line) and ellipsoidal (dashed line) cells.

microorganisms (27, 57). Considering its composition, its possible barrier function in case of external exposure to pollutants has been investigated, and multiple studies demonstrated that intake of pollutants as polystyrene nanoparticles, lindane or depleted uranium was limited by the chorion (27, 58, 59).

Tritium Internalization in Whole Zebrafish Embryos and Larvae

While studying the tritium internalization, measurements after 24 h of exposure also showed that tritium is nearly totally internalized in its organic form, which is not surprising considering that tritiated thymidine is an organically bound tritium form. In general, the fact that tritium seemed to be mainly internalized in its organic form strictly differs from HTO studies performed on fish species as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (3, 12). Indeed, in the rainbow trout study, Kim et al. showed that significant OBT levels were only obtained after feeding the trout with OBT-spiked food, while a simple HTO exposure in the medium led to high total tritium levels, but no OBT. Arcanjo et al. also showed that the OBT levels were lower after 24 h of exposure compared to 96 h of exposure, and that at both times, OBT levels were significantly lower than total tritium ones (3). Those results confirm the main hypothesis of differences in the internalization of OBT and HTO in zebrafish embryos and larvae. These findings are in accordance with a study focusing on tritiated glycine internalization in the mussel (8). It showed that the internalization pattern was different from the one observed in the case of HTO, with a repartition between the different body compartments being different between tritiated glycine and HTO. A few studies focusing on the internalization of OBT through the food chains in different species of fish are also in accordance with our results (9–11). Indeed, those studies, performed on the field and in the laboratory, showed that OBT activity concentra-

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

tions measured in the fish were higher after the fishes were fed tritiated feed, and that the exposure to HTO did not lead to the measurement of significant OBT levels compared to TFWT. All those studies also confirmed that the depuration rates were lower for OBT compared to HTO.

Relationship between the Internal Dose Rate and the External Activity Concentration

Our study showed that the internal dose rate increased exponentially with the external activity concentration before reaching a saturation point. Such results are not surprising, considering those findings had already been made by different studies based on the tritiated thymidine incorporation in different cells. For example, a study focusing on tritiated thymidine internalization in hyperploid Ehrlich ascites tumor cells showed that in the process of incorporating thymidine in the DNA, a precursor pool is formed (19). One study focusing on the same tumor cells found that there was an exponential increase in the tritium internalization when the pool activity concentration increases (16, 60). The literature also described the existence of a saturation point. A study showed that when the thymidine concentration increased in the external medium, the DNA internalized fraction decreased exponentially, thus showing that even at large concentration of thymidine, the internalization will saturate. This is in accordance with the assumption that DNA synthesis depends on a balanced supply of 4 nucleotides, and that the excess of one of those same nucleotides should not cause unbalanced synthesis. Those findings were then confirmed by two other studies, one of them specifying that the excess thymidine might be released out of the cell by a feedback mechanism (15, 60). A special care has to be put in such comparisons, as the studies presented above were made using synchronous cell suspensions, which is different from a living organism during its development, where cells are being created at a fast rate (29). It is also important to consider that the internalization measured in these studies was the direct DNA internalization, while our study mainly focused on the internalization in the whole fish.

Tritium Internalization in the Zebrafish DNA

Our study highlighted the fact that even after an exposure to the lowest tritium activity concentration, a significant tritium incorporation could be measured in the DNA. This is in accordance with a study focusing on the incorporation of tritiated glycine in the marine mussel. It showed that after an exposure to an activity concentration close to our lowest activity concentration, the tritium activity concentration measured in the DNA was similar to the ones we measured in our embryos and larvae (0.05 to 0.2 Bq/μg vs. 0.16 to 0.25 Bq/μg, respectively) (8).

Multiple *in vitro* studies have focused on the DNA synthesis rate by using tritiated thymidine incorporation as a synthesis marker (15–17, 19, 60). In the present study,

tritium incorporation in DNA was completed after 24 h of exposure. Other studies confirmed a rapid incorporation of tritium in DNA (less than one h) (19, 60). A study also highlighted the fact that after 1 h of incubation, the radioactivity present in the medium was no longer available for the cell, which could explain the fact that even after the renewal of the medium after 48 h, no more incorporation was induced (19).

The literature also enabled us to obtain more information on the potential mechanisms leading to the tritiated thymidine incorporation into the zebrafish DNA. Most studies mention the formation of a phosphorylated thymidine pool (16, 19, 60). This formation is an intermediate step towards the DNA incorporation. A study showed that the pool size is dependent on the tritium external activity concentration, and that an equilibrium is formed between this pool and the external medium in terms of activity concentration (60). Another study also highlighted that while the thymidine is transformed into phosphorylated derivatives before being incorporated into the DNA, there is a competing mechanism in which thymidine is directly transformed into thymine, the latter then being degraded and pushed out of the cell (19). Thymidine is usually mainly transformed into thymine, and only a smaller fraction is incorporated into the DNA.

An important factor to consider was that two studies (16, 60) also showed that the cell cycle has a crucial role in the DNA synthesis and the tritiated thymidine incorporation into the DNA. Indeed, it seems that the precursor pool activity varies with the cell cycle, and that there is a significant increase in the S phase and a small decrease in the G2 phase. Those observation, combined with the fact that the G1 cells are unable to take up thymidine, show that only cells in the S phase can incorporate tritiated thymidine into the DNA. As mentioned above, our study focused on the *in vivo* exposure of zebrafish embryos and larva to tritiated thymidine, while most studies used to understand the underlying incorporation mechanisms were *in vitro* studies, most of them using synchronous cell suspensions. Differences in mechanisms could be discovered, as our study focuses on zebrafish embryos and larvae, organisms that undergo multiple cellular divisions, and that have a high renewal cell rate (29) More experiments would thus be needed in order to confirm the mechanisms associated with the tritiated thymidine incorporation in the whole fish and its DNA.

Microdosimetry

The simulations highlighted that low energy deposits had the highest probability, and that this probability decreased when the energy deposit increased. The spectrum also showed that the cells with the smallest radii have a higher probability of being a target for low energy deposits. Indeed, the maximum probability, only observed for the lowest energy deposit values, decreased when the cell radius

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

382

SCHIANO DI LOMBO ET AL.

increased (e.g., the probability of observing a small energy deposit for a spherical cell with a 0.25 μm radius was around 3 times higher than the one measured for a spherical cell with a 1.25 μm radius). After comparison of our spectrum with the one representing the kinetic energy of tritium (Supplementary Fig. S1;² <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00157.1.S1>), it seemed that, as highlighted by Morstin et al. in a microdosimetry study focusing on tritium, the low energy deposits were caused by low-energy electrons (24). Other microdosimetry studies also showed that for a same volume, the number of deposition events decreased when the energy increased (61–63), which explains the results obtained in this study. In the smallest volumes (i.e., the cells with the lowest radius), only the low-energy electrons deposited their energy, because their deposit events were closer to each other. For electrons with a higher energy, the deposit events were farer from each other, meaning the risk of leaving the cell before depositing a significant amount of energy increased.

Those studies also explained another fact observed in our studies. After a small decrease of the probability when the imparted energy increased, an increase was observed, with the probability reaching a maximum at around 250 and 350 $\text{eV}\cdot\text{Bq}^{-1}$ (for spherical and ellipsoidal cells, respectively). This increase was only visible for smaller cells (0.25–0.5 and 0.5 μm for spherical and ellipsoidal cells, respectively). After comparison of those spectrum with simulations made on cells with "no neighbors" (i.e., the electrons were only released in the cell of interest; Supplementary Fig. S2; <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00157.1.S1>), it seemed that this increase was due to the presence of electrons in the neighbor cells. The microdosimetry studies presented above highlighted the fact that for a same volume, the number of deposition events decreased when the electron energy increased (24, 61–63). This shows that the increase mentioned above should be caused by electrons with a slightly higher energy than the electrons causing the maximum probability.

Considering those two information, the increase reaching a maximum at around 250 and 350 $\text{eV}\cdot\text{Bq}^{-1}$ should be caused by electrons with a slightly higher energy. Indeed, electrons with a higher energy travel longer paths between two interactions (i.e., energy deposits), causing a high proportion of the deposits to be out of the cell of interest. But when the electron starts its path in neighbor cells, the chances that it ends its path, and thus deposits more energy, in the cell of interest, increases with increasing kinetic energy, thus increasing the probability of an energy deposit as shown in the spectrum. But as explained above, this increase was only visible for small cells. This is due to the fact that high-energy electrons could also deposit more energy in larger cells, considering that the cell radius was

sometimes bigger than the distance that electrons released by tritium during its decay can travel (i.e., 6 μm) (55). Thus, the deposits caused by electrons released in the neighbor cells that ended their path in the cell of interest represent a smaller proportion of the total energy deposit measured in the cell, which explains that the increase was not visible on the final spectrum.

The simulations also highlighted the fact that there was a non-linear relationship between the specific energy calculated in the cell and its radius. This is very interesting as it means that the specific energy can be calculated using the formula presented in Eqs. (3) and (4) for cells with radii ranging from 0.25 to 10 μm and from 0.5 to 15 μm (for spherical and ellipsoidal cells, respectively). Finally, the relationship between the specific energy and the cell radius showed that for an equal radius, the specific energy was lower in a spherical cell compared to an ellipsoidal one. This was expected, considering that the higher the mass of the target, the lower the specific energy will be. In the case of the cells studied here, for a same radius r , the volume of our ellipsoid is smaller than the volume of our sphere ($\frac{1}{3}\pi r^3$ vs. $\frac{4}{3}\pi r^3$, respectively), which means that its mass is also smaller than the mass of the sphere.

Since smaller cells present a higher probability of being the target of energy depositions closer to each other, it seems that those cells would be at a greater radiological risk than others. Indeed, several studies showed that low-energy electrons and more specifically tritium caused deleterious effects in zebrafish and other aquatic species (8, 64–67). Considering the dimensions of the different cell types in the early-life stages of the zebrafish, the hypothesis is that smaller cells as dermal cells, chondrocytes or eye cells would be at a greater risk than notochord or mesodermal cells (i.e., 0.5 to 2 and 10 to 20 μm radii, respectively), considering that the energy deposits would be closer to each other (42, 44, 48, 49, 68).

CONCLUSION

This study successfully gave supplementary information on tritiated thymidine internalization in living organisms. We confirmed that after exposure of zebrafish early life stages to different tritiated thymidine activity concentrations, significant tritium levels could be measured in the whole fish and its DNA. We also confirmed that as for HTO, the internalization process is rapid, with the maximum activity concentration being measured in the sample after 24 h of exposure. We also proved that tritium is completely internalized in its organic form, but that the chorion acts as a barrier to prevent the entrance of tritiated thymidine in the embryos. Though, significant levels could still be measured in the embryos once the chorion was removed. We also showed that the internal dose rate calculated for the embryos and larvae increased after a sigmoidal trend when the external activity concentration increased. This showed that there does not seem to be a gap

² Editor's note. The online version of this article (DOI: <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00157.1>) contains supplementary information that is available to all authorized users.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

TRITIATED THYMIDINE INTERNALIZATION IN ZEBRAFISH

383

between in vivo and in vitro studies when it comes to the tritiated thymidine internalization in the cells. Microdosimetric studies confirmed that the energy deposition probability and the mean energy deposited depend on the size of the cell considered, as well as its shape. It was shown that the energy imparted to the smallest cells came from the electrons with the lowest energy, thus increasing the risk of observing damages in those cells. It was also possible to find a linear fit between the mean imparted energy in the cell and the logarithm of its radius, highlighting that the quantity of energy deposited is proportional to the volume of the cell.

This study, being a part of a larger project, helped setting the perspective of using three of the activity concentrations studied and presented in this article (7.5×10^3 , 4×10^4 and 1.1×10^5 Bq/mL) to study the toxic effects of tritiated thymidine on zebrafish in its early life stages. Those activity concentrations were chosen as they lead to internal dose rates already used to study HTO and chronic gamma irradiation toxicity (22, 170 and 466 μ Gy/h).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge IRSN for funding this project, as well as IRSN colleagues for their help on the experiments (Olivier Armant, Pierre Techer and Noémie Guirandy), animal care (Elsa Cantabella) and liquid scintillation measurements (Daniel Orjollet).

Received: September 1, 2022; accepted: January 24, 2023; published online: March 15, 2023

REFERENCES

1. IRSN. Tritium and the environment. 2014. (<https://bit.ly/3HLhriP>)
2. ASN. Livre Blanc du Tritium. 2010. (in french; <https://www.asn.fr/>)
3. Arcanjo C, Maro D, Camilleri V, Cavalié I, Simon O, Beaugelin-Seiller K, et al. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages: Importance of rapid isotopic exchange. *J Environ Radioact.* 2019; 203:30–8.
4. Chen J. Radiation quality of tritium. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006; 122(1–4):546–8.
5. Jaeschke BC, Bradshaw C. Bioaccumulation of tritiated water in phytoplankton and trophic transfer of organically bound tritium to the blue mussel, *Mytilus edulis*. *J Environ Radioact.* 2013; 115:28–33.
6. ASN. Livre blanc du Tritium & bilan des rejets de tritium pour les INB. 2018. (in french; <https://www.asn.fr/>)
7. IRSN. Actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement. 2017. (in french; <https://bit.ly/3XhJhsy>)
8. Jaeschke BC, Millward GE, Moody AJ, Jha AN. Tissue-specific incorporation and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ Pollut.* 2011; 159(1):274–80.
9. McCubbin D, Leonard KS, Bailey TA, Williams J, Tossell P. Incorporation of Organic Tritium (^3H) by Marine Organisms and Sediment in the Severn Estuary/Bristol Channel (UK). *Mar Pollut Bull.* 2001; 42(10):852–63.
10. Gagnaire B, Adam-Guillermin C, Festarini A, Cavalié I, Della-Vedova C, Shultz C, et al. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Sci Total Environ.* 2017; 599–600:597–611.
11. Gagnaire B, Gosselin I, Festarini A, Walsh S, Cavalié I, Adam-Guillermin C, et al. Effects of in vivo exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ Sci Pollut Res.* 2020; 27(4):3612–23.
12. Kim SB, Shultz C, Stuart M, Festarini A. Tritium uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked feed exposures simultaneously. *Appl Radiat Isot.* 2015; 98:96–102.
13. Duque A, Rakic P. Different Effects of Bromodeoxyuridine and [^3H]Thymidine Incorporation into DNA on Cell Proliferation, Position, and Fate. *J Neurosci.* 2011; 31(42):15205–17.
14. Gray JW, Pallavicini MG, George YS, Groppi V, Look M, Dean PN. Rates of incorporation of radioactive molecules during the cell cycle. *J Cell Physiol.* 1981; 108(2):135–44.
15. Hopwood LE, Dewey WC, Hejny W. Transport of thymidine during the cell cycle in mitotically synchronized CHO cells. *Exp Cell Res.* 1975; 96(2):425–9.
16. Naito K, Skog S, Tribukait B, Andersson L, Hisazumi H. Cell cycle related [^3H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Prolif.* 1987; 20(4):447–57.
17. Peterson WJ, Tachiki KH, Yamaguchi DT. Extracellular matrix alters the relationship between tritiated thymidine incorporation and proliferation of MC3T3-E1 cells during osteogenesis in vitro. *Cell Prolif.* 2002; 35(1):9–22.
18. Plagemann PGW, Richey DP, Zylka JM, Erbe J. Thymidine transport by Novikoff rat hepatoma cells synchronized by double hydroxyurea treatment. *Exp Cell Res.* 1974; 83(2):303–10.
19. Zajicek G, Bernstein N, Rosin A, Gross J. Studies on the in vitro incorporation of tritiated thymidine into ascites tumor cells. *Exp Cell Res.* 1963; 31(2):390–6.
20. Tang N, Bueno M, Meylan S, Incerti S, Tran HN, Vaurijoux A, et al. Influence of chromatin compaction on simulated early radiation-induced DNA damage using Geant4-DNA. *Med Phys.* 2019; 46(3):1501–11.
21. Cruz GAS. Microdosimetry: Principles and applications. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2016; 21(2):135–9.
22. Kellerer AM, Chmelevsky D. Concepts of microdosimetry II. Probability distributions of the microdosimetric variables. *Radiat Environ Biophys.* 1975; 12(3):205–16.
23. Chao T-C, Wang C-C, Li J, Li C, Tung C-J. Cellular- and microdosimetry of heterogeneously distributed tritium. *Int J Radiat Biol.* 2012; 88(1–2):151–7.
24. Morstin K, Kopec M, Olko P, Schmitz T, Feinendegen LE. Microdosimetry of Tritium. *Health Phys.* 1993; 65(6):648–56.
25. Ünak T, Selvi S. Microdosimetry of tritium and carbon-14 in different materials. *Appl Radiat Isot.* 1995; 46(6):559–60.
26. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev.* 2008; 83(1):13–34.
27. Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res.* 2008; 15(5):394–404.
28. Fraysse B, Mons R, Garric J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 63(2):253–67.
29. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995; 203(3):253–310.
30. Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. Institute of Neuroscience, University of Oregon; 1993.
31. Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J, Gariel JC. Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Phys.* 2006; 90(5):485–93.
32. Agostinelli S, Allison J, Amako K, Apostolakis J, Araujo H, Arce P, et al. Geant4—a simulation toolkit. *Nucl Instrum Methods Phys*

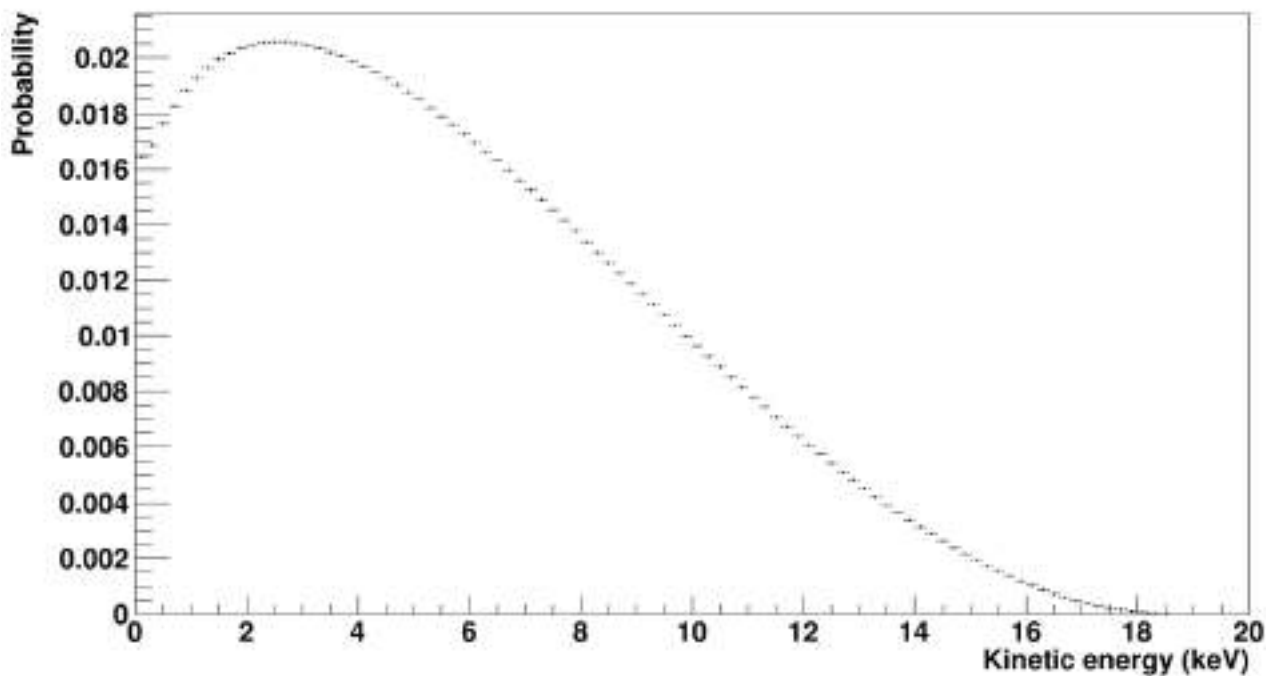
Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"

384

SCHIANO DI LOMBO ET AL.

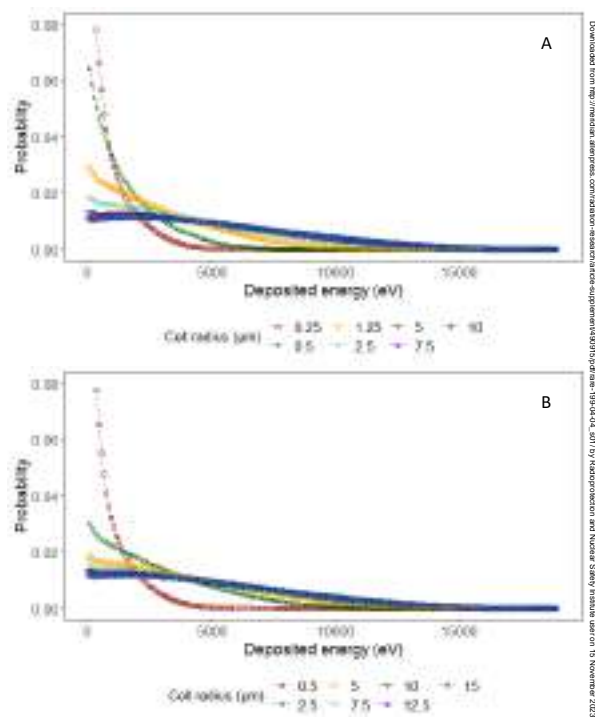
- Res Sect Accel Spectrometers Detect Assoc Equip. 2003; 506(3):250–303.
33. Allison J, Amako K, Apostolakis J, Arce P, Asai M, Aso T, et al. Recent developments in Geant4. Nucl Instrum Methods Phys Res Sect Accel Spectrometers Detect Assoc Equip. 2016; 835:186–225.
 34. Incerti S, Baldacchino G, Bernal M, Capra R, Champion C, Francis Z, et al. The geant4-dna project. Int J Model Simul Sci Comput. 2010; 01(02):157–78.
 35. Incerti S, Ivanchenko A, Karamitros M, Mantero A, Moretto P, Tran HN, et al. Comparison of GEANT4 very low energy cross section models with experimental data in water. Med Phys. 2010; 37(9):4692–708.
 36. Bernal MA, Bordage MC, Brown JMC, Davídková M, Delage E, El Bitar Z, et al. Track structure modeling in liquid water: A review of the Geant4-DNA very low energy extension of the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. Phys Med. 2015; 31(8):861–74.
 37. Incerti S, Kyriakou I, Bernal MA, Bordage MC, Francis Z, Guatelli S, et al. Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project. Med Phys. 2018; 45(8):e722–39.
 38. Salim R, Taherparvar P. Dosimetry assessment of theranostic Auger-emitting radionuclides in a micron-sized multicellular cluster model: A Monte Carlo study using Geant4-DNA simulations. Appl Radiat Isot. 2022; 188:110380.
 39. Braat AK, Zandbergen T, Water SVD, Goos HJT, Zivkovic D. Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. Dev Dyn. 1999; 216(2):153–67.
 40. Ciruna B, Jenny A, Lee D, Mlodzik M, Schier AF. Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. Nature. 2006; 439(7073):220–4.
 41. Concha ML, Adams RJ. Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. Development. 1998; 125(6):983–94.
 42. Easter Jr Stephen S, Nicola GN. The Development of Vision in the Zebrafish (*Danio rerio*). Dev Biol. 1996; 180(2):646–63.
 43. Field HA, Dong PDS, Beis D, Stainier DYR. Formation of the digestive system in zebrafish. ii. pancreas morphogenesis. Dev Biol. 2003; 261(1):197–208.
 44. Glickman NS, Kimmel CB, Jones MA, Adams RJ. Shaping the zebrafish notochord. Development. 2003; 130(5):873–87.
 45. Grandel H, Schulte-Merker S. The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*). Mech Dev. 1998; 79(1):99–120.
 46. Kane DA, Hammerschmidt M, Mullins MC, Maischein HM, Brand M, van Eeden FJ, et al. The zebrafish epiboly mutants. Development. 1996; 123(1):47–55.
 47. Kimmel CB, Miller CT, Moens CB. Specification and Morphogenesis of the Zebrafish Larval Head Skeleton. Dev Biol. 2001; 233(2):239–57.
 48. Li Q, Frank M, Thisse CI, Thisse BV, Uitto J. Zebrafish: A Model System to Study Heritable Skin Diseases. J Invest Dermatol. 2011; 131(3):565–71.
 49. Liu S, Narumi R, Ikeda N, Morita O, Tasaki J. Chemical-induced craniofacial anomalies caused by disruption of neural crest cell development in a zebrafish model. Dev Dyn. 2020; 249(7):794–815.
 50. Mizoguchi T, Verkade H, Heath JK, Kuroiwa A, Kikuchi Y. Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. Development. 2008; 135(15):2521–9.
 51. Murakami T, Hijikata T, Matsukawa M, Ishikawa H, Yorifuji H. Zebrafish protocadherin 10 is involved in paraxial mesoderm development and somitogenesis. Dev Dyn. 2006; 235(2):506–14.
 52. Schmitt EA, Dowling JE. Early-eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. J Comp Neurol. 1994; 344(4):532–42.
 53. Shin J, Park H-C, Topczewska JM, Mawdsley DJ, Appel B. Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. Methods Cell Sci. 2003; 25(1):7–14.
 54. Yin C, Solnica-Krezel L. Convergence and extension movements mediate the specification and fate maintenance of zebrafish slow muscle precursors. Dev Biol. 2007; 304(1):141–55.
 55. Carsten AL. Tritium in the Environment. In: Lett JT, Adler H, editors. Advances in Radiation Biology. Elsevier; 1979. p. 419–58.
 56. Bonsignorio D, Perego L, Giacco LD, Cotelli F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. Zygote. 1996; 4(2):101–8.
 57. Rawson DM, Zhang T, Kalicharan D, Jongebloed WL. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. Aquac Res. 2000; 31(3):325–36.
 58. van Pomeran M, Brun NR, Peijnenburg WJGM, Vijver MG. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. Aquat Toxicol. 2017; 190:40–5.
 59. Bourrachot S, Simon O, Gilbin R. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol. 2008; 90(1):29–36.
 60. Cleaver JE, Holford RM. Investigations into the incorporation of [3H]thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. Biochim Biophys Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth. 1965; 103(4):654–71.
 61. Turner JE, Paretzke HG, Hamm RN, Wright HA, Ritchie RH. Comparative Study of Electron Energy Deposition and Yields in Water in the Liquid and Vapor Phases. Radiat Res. 1982; 92(1):47–60.
 62. Liamsuwan T, Emfietzoglou D, Uehara S, Nikjoo H. Microdosimetry of low-energy electrons. Int J Radiat Biol. 2012; 88(12):899–907.
 63. Tung CJ, Chao TC, Hsieh HW, Chan WT. Low-energy electron interactions with liquid water and energy depositions in nanometric volumes. Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater At. 2007; 262(2):231–9.
 64. Arcanjo C, Adam-Guillermin C, Murat El Houdigui S, Loro G, Della-Vedova C, Cavalie I, et al. Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae: a new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species. Aquat Toxicol. 2020; 219:105384.
 65. Arcanjo C, Armant O, Floriani M, Cavalie I, Camilleri V, Simon O, et al. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. Aquat Toxicol. 2018; 200:114–26.
 66. Beaton ED, Gosselin I, Festarini A, Gagnaire B, Farrow F, Cavalie I, et al. Correlated responses for DNA damage, phagocytosis activity and lysosomal function revealed in a comparison between field and laboratory studies: Fathead minnow exposed to tritium. Sci Total Environ. 2019; 662:990–1002.
 67. Adam-Guillermin C, Pereira S, Della-Vedova C, Hinton T, Garnier-Laplace J. Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals. In: Whitacre DM, editor. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York; 2012. p. 67–103.
 68. Yin C, Kiskowski M, Pouille P-A, Farge E, Solnica-Krezel L. Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. J Cell Biol. 2008; 180(1):221–32.

Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use of experimental procedures and microdosimetry"



com/radiation-research/article-supplement/490915/pdf/are-199-04-04_s01/ by Radioprotection and Nuclear

C. AXE 1 : INTERNALISATION DU TRITIUM SOUS FORME ORGANIQUE – C.3.
Article 1 : "Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages : joint use
of experimental procedures and microdosimetry"



C.4. Discussion

La première information mise en avant par ces résultats est la différence de comportement entre le tritium libre et le tritium organique. Là où une étude a mis en avant une augmentation linéaire de l'internalisation du tritium sous forme libre, avec l'activité externe utilisée pour l'exposition, les résultats présentés ci-dessus indiquent que dans le cas de la thymidine tritiée, l'internalisation augmente de façon sigmoïdale avec l'activité externe (Arcanjo et al., 2019). Le profil observé ici correspond plus au profil d'internalisation de la thymidine tritiée dans différentes cellules telles que les cellules de lignée L ou les cellules d'Ehrlich (Cleaver and Holford, 1965; Naito et al., 1987; Zajicek et al., 1963). La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a publié que le coefficient de dose efficace du tritium organique est 2,7 fois plus élevé que celui du tritium sous forme libre (ICRP, 1996). Dans le cas de la thymidine tritiée, l'absence de relation linéaire entre le débit de dose absorbée et l'activité externe rend la détermination d'un tel facteur difficile, étant donné qu'il varie avec l'activité externe. En effet, si l'on compare les activités d'HTO et de thymidine tritiée nécessaires pour atteindre un débit de dose absorbée de 30 $\mu\text{Gy/h}$, l'activité de thymidine tritiée nécessaire est 1,6 fois plus faible que celle d'HTO (Gagnaire et al., 2021). Dans le cas du débit de dose absorbée de 150 $\mu\text{Gy/h}$, l'activité de thymidine tritiée nécessaire est 3,05 fois plus faible que celle de tritium libre. Pour finir, le débit de dose absorbée de 1260 $\mu\text{Gy/h}$, atteignable en exposant les embryons de poisson zèbre à $1,22 \times 10^9$ Bq/L d'HTO, n'est pas atteignable dans le cas d'une exposition jusqu'au stade larvaire à la thymidine tritiée. En effet, les débits de dose absorbée maximaux pouvant être atteints après exposition à la thymidine tritiée dans les conditions expérimentales de l'étude présentée ici sont de 1328 $\mu\text{Gy/h}$ et de 592 $\mu\text{Gy/h}$ dans le cas des embryons et des larves, respectivement. Les valeurs de coefficients de dose efficace calculés dans le cas de la thymidine tritiée semblent donc confirmer que cette dernière ne correspond pas à la valeur moyenne documentée par CIPR.

L'étude de la cinétique indique qu'une exposition de moins d'1 heure est nécessaire pour que le niveau de tritium internalisé devienne significatif, et que ce dernier

continue d'augmenter jusqu'à 24 heures d'exposition. Ce profil montre que, dans le cas de la cinétique d'internalisation, la thymidine tritiée se comporte de la même manière que le tritium libre (Arcanjo et al., 2019). La cinétique d'internalisation correspond également à celle qui a été observée dans le cas de l'exposition *in vitro* de cellules CHO à la thymidine tritiée (Hopwood et al., 1975). Cependant, l'importante différence de débit de dose absorbée entre les embryons et les larves n'est visible que dans le cas de la thymidine tritiée, ce qui indique une différence de comportement entre les deux formes de tritium : le chorion des embryons agit comme une barrière uniquement dans le cas d'une exposition à la thymidine tritiée, ce phénomène n'apparaissant pas dans le cas d'une exposition au tritium libre, étant donné que ce dernier est internalisé par diffusion. Comme indiqué dans les objectifs de la thèse (*cf*, partie B.2.1), un des rôles biologiques du chorion est d'agir telle une barrière protectrice face aux agents chimiques et physiques extérieurs (Bonsignorio et al., 1996; Rawson et al., 2000). L'effet barrière du chorion a déjà été observé suite à l'exposition à des composés "physiques" (*e.g.* les microplastiques ou les nanoparticules de polystyrène), mais également après exposition à des composés chimiques (*e.g.*, le lindane ou l'uranium appauvri) (Bourrachot et al., 2008; Qiang and Cheng, 2019; Scholz et al., 2008; van Pomeroy et al., 2017).

Pour finir, l'étude de l'internalisation met en avant deux informations : le tritium est presque totalement internalisé sous forme organique, et les taux de tritium dans l'ADN sont significatifs, et ce dès la plus faible activité externe utilisée ($3,46 \times 10^6$ Bq/L). Ces constats sont d'autant plus intéressants considérant que cela confirme que la thymidine tritiée se comporte différemment du tritium libre, mais également que malgré la présence de barrières biologiques telles que le chorion et l'épithélium cutané de l'individu (*i.e.*, deux barrières protectrices), le tritium est malgré tout retrouvé incorporé dans l'ADN, probablement sous la forme de thymine. Ce résultat était attendu, étant donné que comme indiqué dans les objectifs de la thèse (*cf*, partie B.4), le tritium utilisé dans ce travail de doctorat est sous forme neOBT. En effet, les liaisons C-³H étant très difficiles à briser, tout comme les liaisons C-H, il est donc considéré que le tritium lié

à la thymidine ne peut que difficilement être séparé de sa molécule d'origine (Brown, 1988). Ainsi, une fois dans l'organisme, le tritium ne serait libéré qu'au moment de la dégradation de la molécule. Cela peut donc justifier la présence du tritium dans l'ADN.

L'étude microdosimétrique des dépôts d'énergie générés par l'exposition à 1 Bq de tritium organique permet d'obtenir plus d'informations sur ces derniers. Les dépôts de faible énergie sont plus probables que les dépôts de forte énergie, et cette probabilité diminue lorsque le rayon de la cellule augmente. Comme indiqué dans l'article présenté ci-dessus, les dépôts de faible énergie sont issus d'électrons de faible énergie, comme l'avaient déjà indiqué Morstin et ses collaborateurs dans une étude précédente (Morstin et al., 1993). La différence de probabilité entre les dépôts de faible et de forte énergies est également liée au nombre de dépôts. En effet, comme déjà indiqué dans trois études, le nombre de dépôts d'énergie dans un même volume diminue quand l'énergie de l'électron augmente (Liamsuwan et al., 2012; Morstin et al., 1993; Tung et al., 2007; Turner et al., 1982). Ceci est, entre autres, dû au fait que lorsque l'énergie d'un électron augmente, la densité d'ionisation diminue, ce qui signifie que la distance entre les dépôts d'énergie augmente. Cependant, cela implique également que, dans le cas des cellules de faible rayon, la probabilité qu'un électron de forte énergie quitte la cellule avant d'y avoir déposé une quantité significative d'énergie est élevée. Cette probabilité diminue légèrement lorsque l'on considère la présence des cellules voisines, mais elle reste malgré tout très élevée (*cf.* Annexe C).

Le fait que l'énergie spécifique augmente lorsque le rayon de la cellule diminue indique qu'il est probable que les cellules de plus faible rayon puissent être considérées comme étant plus à risque face aux rayonnements ionisants. En effet, plus l'énergie spécifique augmente, plus l'énergie déposée dans la cellule augmente également, soit par augmentation du nombre de dépôts d'énergie, soit par augmentation de l'énergie retrouvée au niveau de chaque dépôt (Li et al., 2018). Cela signifie que, dans le cas d'une répartition homogène de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre, du fait de leurs faibles rayons, les cellules rétiniennes ou neuronales

sont plus à risque que les cellules du mésoderme ou de la chorde (Easter and Nicola, 1996; Glickman et al., 2003; Liu et al., 2020; Yin et al., 2008). De même, il semblerait que les cellules de forme ellipsoïdale soient considérées comme plus à risque que les cellules de forme sphérique, étant donné que l'énergie spécifique y est plus élevée. Ce n'est pas surprenant, étant donné que le volume des cellules ellipsoïdales est plus faible que le volume des cellules sphériques ($\frac{1}{3}\pi r^3$ vs $\frac{4}{3}\pi r^3$, respectivement), ce qui signifie donc que leur masse est également plus faible. Cela signifie donc que, toujours dans le cas d'une répartition homogène de la thymidine tritiée dans les organismes, du fait de leur forme ellipsoïdale, les cellules rétiniennes sont plus à risque que des cellules pancréatiques (Easter and Nicola, 1996; Field et al., 2003).

A retenir

- Le comportement d'internalisation de la thymidine tritiée est différent de celui du tritium libre.
- L'internalisation de la thymidine tritiée est rapide, une quantité significative du tritium est mesurée dans l'organisme après une heure d'exposition.
- Le tritium est majoritairement internalisé sous forme organique, et une quantité significative de tritium est retrouvée dans l'ADN.
- Les dépôts de faible énergie, générés par les électrons de faible énergie, sont plus probables que les dépôts de forte énergie.

Hypothèses

- Le chorion des embryons de poisson zèbre, agissant comme une barrière dans le cas d'une exposition à la thymidine tritiée, est responsable de la différence d'internalisation entre cette forme organique de tritium et le tritium libre.
- Le tritium internalisé dans l'ADN des individus est présent sous forme de thymine tritiée, une forme organique du tritium, elle aussi non échangeable.
- Les cellules de faible rayon, ainsi que les cellules ellipsoïdales, sont plus à risque que les cellules qui possèdent une forme sphérique ou un rayon plus élevé.

Cet axe du doctorat, en plus d'apporter de nouvelles données essentielles sur l'internalisation du tritium, permet de confirmer que certaines cellules sont plus à risque que d'autres, mais également que la plupart des dépôts d'énergie sont issus d'électrons venant de l'ADN où la thymidine tritiée est incorporée. Etant donné que l'ADN est une des cibles principales des rayonnements ionisants, l'incorporation de tritium dans l'ADN nous permet de penser que des dommages apparaîtront chez les embryons et les larves exposés à la thymidine tritiée. Il est donc nécessaire d'étudier l'intégrité de l'ADN des individus contaminés. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN

D.1. Objectifs de l'étude

Cette étude s'intègre dans le deuxième axe de ce travail de doctorat. L'objectif principal de l'axe 2 de ce travail de doctorat est d'étudier les effets toxiques de faibles débits de dose absorbée (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$) de thymidine tritiée sur l'ADN des embryons et larves de poisson zèbre. Afin d'obtenir le plus d'informations possibles sur le sujet, comme dans le chapitre précédent, les expérimentations de contamination ont été couplées avec des simulations dosimétriques.

L'objectif expérimental de ce travail est de déterminer si l'exposition du poisson zèbre dès ses premiers stades de développement à la thymidine tritiée pendant 24 et 96 heures entraîne l'apparition de dommages à l'ADN. Les analyses sont effectuées en utilisant le test des comètes, qui détecte sans distinction les cassures simples, doubles ou complexes de l'ADN avec comme objectif de comprendre les causes de ces lésions (*i.e.*, dommages directs ou indirects), le tout grâce à l'utilisation de l'enzyme Fpg. *In fine*, l'objectif est également de pouvoir comparer les résultats obtenus après exposition à la thymidine tritiée avec ceux obtenus après exposition des embryons et larves de poisson zèbre à l'HTO et au césium (^{137}Cs).

Afin de quantifier et qualifier les dommages à l'ADN, les simulations Monte Carlo de

nanodosimétrie ont été réalisées. Ainsi, l'exposition de noyaux de cellules de poisson zèbre à 1 Bq de tritium organique est simulée, permettant de quantifier les SSB, DSB et cassures complexes, ainsi que leur origine (*i.e.*, effet direct vs effet indirect). *In fine*, l'objectif est de pouvoir lier ces effets aux quantités de tritium incorporées dans l'ADN (*cf.*, Chapitre C, partie C.2.1), mais également aux dommages mesurés au cours des expérimentations réalisées dans cette même étude.

D.2. Synthèse des résultats de l'étude

D.2.1. Axe expérimental : mesure des dommages à l'ADN

La figure D.1 représente les expériences réalisées sur les embryons et larves de poisson zèbre dans l'objectif de mesurer le taux de dommages à l'ADN induits par l'exposition à la thymidine tritiée à 22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$. L'exposition aux débits de dose absorbée 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$ a été réalisée dans une première expérience, et l'exposition à 470 $\mu\text{Gy/h}$ a été réalisée dans une seconde expérience. Le test des comètes-Fpg n'a été réalisé que sur les embryons et larves exposés aux deux premiers débits de dose absorbée.

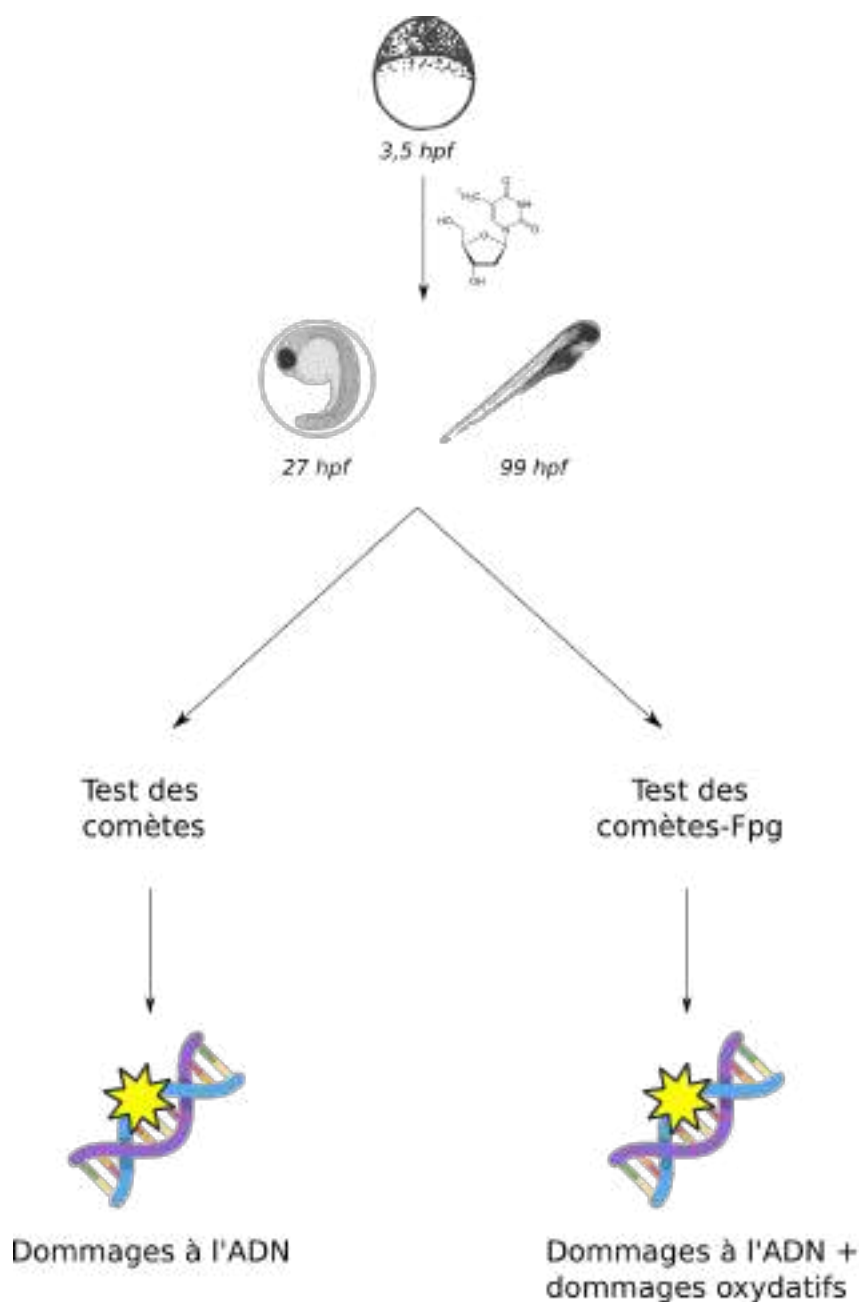


FIGURE D.1. – Schéma représentatif des expériences menées sur les cellules d'embryons et larves de poisson zèbre. Les tests des comètes et des comètes-Fpg ont été réalisés sur des cellules issues des mêmes individus afin de pouvoir comparer les résultats entre eux.

Le test des comètes, ainsi que le test des comètes-Fpg, a été réalisé sur 7 pools de 10 embryons (24 heures d'exposition) et 7 larves (96 heures d'exposition) de poisson zèbre par condition. Les individus ont été broyés afin d'obtenir une suspension cellulaire.

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.2. Synthèse des résultats de l'étude

Après fixation des cellules sur les lames de microscopie, ces dernières ont subi une lyse avant que le déroulement alcalin ne soit réalisé dans la solution d'électrophorèse ensuite utilisée afin d'entraîner la migration des fragments d'ADN. La réaction a ensuite été stoppée par le biais d'une solution de neutralisation.

Dans le cas des lames utilisées dans le test des comètes-Fpg, une étape supplémentaire a été réalisée suite à la lyse et juste avant le déroulement alcalin. Les lames ont été plongées à trois reprises dans un tampon d'enzyme Fpg avant d'être exposées à l'enzyme Fpg pendant 30 minutes. Cette incubation a permis aux dommages causés par le stress oxydant d'apparaître sous forme de cassures et, par conséquent, de migrer le long de la lame au moment de l'électrophorèse.

Toutes les lames ont ensuite été lues à l'aide d'un microscope à épifluorescence, après avoir marqué les lames à l'aide du bromure d'éthidium (BET).

Les résultats obtenus dans ce chapitre de la thèse, présentés dans l'artie présenté dans la partie D.3, peuvent être divisés en deux parties : les résultats du test des comètes et ceux du test des comètes modifié à l'aide de l'enzyme Fpg.

— Le test des comètes non modifié met en évidence deux informations :

- | Une induction significative des dommages à l'ADN est observée dès 24 heures d'exposition aux trois débits de dose absorbée. Après 96 heures d'exposition, les résultats sont similaires. Cependant, après 24 heures d'exposition, une augmentation significative des dommages est visible entre 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$, ce qui n'est plus le cas après 96 heures d'exposition, où les taux de dommages à l'ADN sont similaires entre 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$.
- | La normalisation du taux dommages à l'ADN mesurés chez les individus contaminés par le taux de dommages moyen mesuré chez les individus témoins indique qu'une diminution significative du taux de dommages à l'ADN entre 24 et 96 heures d'exposition est uniquement mesurée chez les individus exposés à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. Aucune variation significative entre 24 et 96 heures n'est observable après exposition à 22 et

470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée.

- Le test des comètes Fpg, quant à lui, indique qu'après 24 heures d'exposition à 170 $\mu\text{Gy/h}$, une induction significative des dommages à l'ADN est observée. Après 96 heures d'exposition, l'induction significative des dommages à l'ADN est visible pour tous les débits de dose absorbée (22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$).

D.2.2. Axe théorique : simulation des dommages à l'ADN

Le schéma D.2 représente, de manière simplifiée, les simulations Monte Carlo de nanodosimétrie réalisées dans le cadre de l'étude de la génotoxicité de la thymidine tritiée chez les embryons et larves de poisson zèbre. Ces dernières ont été réalisées afin de représenter les dommages induits par 1 Bq de tritium organique. Pour ce faire, 50000 particules primaires distinctes ont été simulées.

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.2. Synthèse des résultats de l'étude

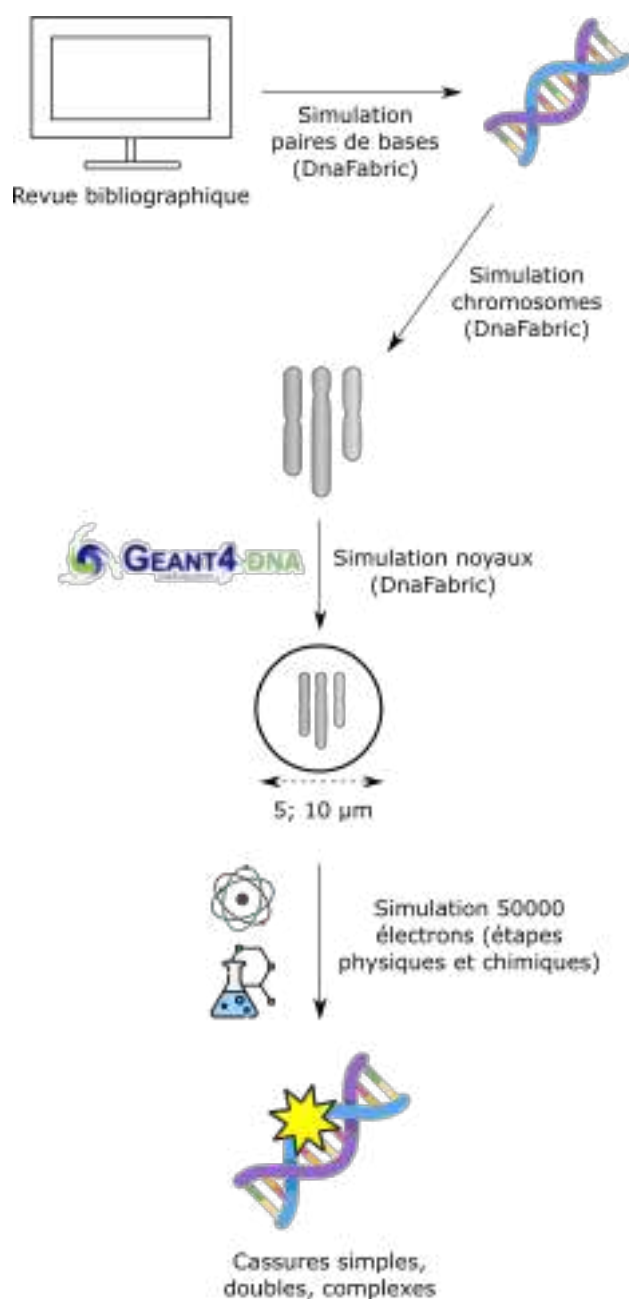


FIGURE D.2. – Schéma récapitulatif du processus suivi dans les simulations nanodimensionnelles afin de quantifier les dommages à l'ADN induits dans les noyaux des embryons et larves de poisson zèbre par l'exposition à la thymidine tritiée.

Les simulations réalisées ont permis d'obtenir de nombreuses informations sur la nature des dommages induits par le tritium organique.

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.2. Synthèse des résultats de l'étude

En premier lieu, les simulations ont permis de mettre en évidence une absence d'effets du rayon du noyau sur les résultats obtenus lorsque ces derniers sont normalisés par l'énergie déposée dans le noyau (expression en cassures/Gy/Giga paire de bases (Gpb)). En effet, tous les résultats présentés dans l'article, résumés ci-dessous, sont similaires dans le cas des noyaux de rayons 2,5 et 5 μm .

Les résultats indiquent également que les dommages induits dans l'ADN des embryons et larves de poisson zèbre apparaissent, en majorité, sous la forme de SSB (130 SSB/Gy/Gbp vs 3 DSB/Gy/Gbp dans le cas d'un noyau de 2,5 μm de rayon). Par ailleurs, l'algorithme de clustering permet de calculer le nombre de DSB. Une DSB est formée par deux cassure à l'ADN (SB) positionnées sur deux brins opposés et séparées par moins de 10 paires de bases. Une cassure double brin complexe (cDSB) est formée quand une SB, ou plus, se trouve à moins de 10 paires de bases d'une DSB, sinon on parle de cassure double brin simple (sDSB). Les simulations indiquent également que la majorité des DSB induites par le tritium organique sont des sDSB, avec un pourcentage de formation de 86 %, alors que les cDSB ne représentent que 14 % des DSB.

Pour finir, les simulations de nanodosimétrie ont permis d'en savoir plus sur l'origine des différentes cassures à l'ADN. Les cassures indirectes, c'est-à-dire les cassures induites par l'interaction des ROS avec l'ADN, sont majoritaires au niveau des dommages à l'ADN totaux, soit dans la somme des SSB et DSB. Cependant, dans le cas des DSB, une autre catégorie de dommages fait son apparition : les dommages mixtes, constitués d'au moins une SB directe et d'une SB indirecte. Dans le cas des DSB, une répartition équilibrée est retrouvée entre les trois catégories de dommages (directs, indirects et mixtes). Cependant, les DSB indirectes sont légèrement plus présentes (39 %) que les DSB directes (34 %) ou mixtes (27 %).

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

D.3. Article 2 : "Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish (*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

Article en cours de relecture par les auteurs, soumission prévue au début de l'année
2024 chez *Journal of Environmental Radioactivity*.

1 **Title: Experimental and computational analysis of the DNA damage induced in**
2 **zebrafish, *Danio rerio*, early life stages after exposure to tritiated thymidine.**

3
4 **Schiano Di Lombo Magali^{1*}, Cavalie Isabelle¹, Camilleri Virginie¹, Jérôme Cachot²,**
5 **Perrot Yann³, Gagnaire Beatrice¹**

6
7 **Affiliations**

8 **1 Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-**
9 **ENV/SERPEN/LECO, Cadarache, 13115, Saint-Paul-lez-Durance, France**

10 **2 Université de Bordeaux, Laboratoire EPOC UMR 5805, Univ. Bordeaux, CNRS,**
11 **INP Bordeaux, F-33600 Pessac, France**

12 **3 Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-**
13 **SANTE/SDOS/LDRI, 92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France**

14
15 ***Corresponding authors: Schiano Di Lombo Magali**
16 **(magali.schianodilombo@gmail.com)**

17
18 **Keywords: Tritium, zebrafish, tritiated thymidine, comet assay, DNA damage,**
19 **Geant4-DNA Monte Carlo simulations**

20

21 **Highlights**

- 22 - Exposure to tritiated thymidine induces DNA damage in zebrafish embryos and larvae.
23 - OBT induces more single strand breaks than double strand breaks.
24 - Most of the DNA damage induced by OBT is considered as indirect.

25
26 **Abstract**

27 Tritium is an ubiquitous radioactive hydrogen isotope. It has radioactive properties and
28 is found in all environmental compartments, in three different forms: tritiated water (HTO),
29 gaseous tritium (HT) and organically bound tritium (OBT). Once internalized in the
30 organism, it can either be found free in the tissues (TFWT) or bound to organic matter
31 (OBT). This study aims to assess if tritiated thymidine, an organic form of tritium, induces
32 DNA damage once internalized in a model organism and its DNA. To do so, both
33 experimental procedures and nanodosimetry simulations have been used. Zebrafish
34 embryos (3.5 hpf, hours post fertilization) were exposed to three tritiated thymidine activity
35 concentrations (7.5, 40, 110 kBq/mL) for four days. Individuals were sampled after 1 and
36 4 days of exposure. DNA damage was assessed by the comet assay, with and without the
37 formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) enzyme. Results showed that, even at the
38 lowest activity concentration, tritiated thymidine induced DNA damage in both embryos
39 (1 dpf) and larvae (4 dpf). It was also highlighted that there was no evolution in DNA
40 damage level between 1 and 4 dpf, except in the case of the exposure to 40 kBq/mL, where
41 a slight decrease was observed. Geant4-DNA Monte Carlo simulations, performed on two
42 spherical zebrafish nuclei of two different radii (2.5 and 5 μm), highlighted that organic
43 tritium mainly induced single strand breaks (SSB), and that the small amount of double
44 strand breaks (DSB) induced were considered as simple DSB (sDSB). The results also
45 showed that most of the damage was indirectly induced, meaning that it was caused by the

*D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(Danio rerio) DNA after exposure to tritiated thymidine*

46 interaction between reactive oxygen species (ROS) and DNA. Those results, combined
47 with various experimentations, can highlight tritiated thymidine's main toxic pathways
48 with both short- and long-term effects.

49

50

51 **1. Introduction**

52 Tritium (^3H) is one of hydrogen's isotope and is considered as being a radionuclide
53 (IRSN, 2014). Tritium is a beta emitter, has a radioactive half-life of 12.3 years and its
54 decay has a continuous energy spectrum, with a mean value of 5.7 keV and a maximum
55 value of 18.6 keV (Health Protection Agency, 2007). It is considered that tritium's lineal
56 energy transfer is high among electron sources, with a main value of 4,7 keV/ μm (ASN,
57 2010). Tritium's penetrating power is low, with the beta ray emitted during its decay having
58 mean distances of 1 and 6 μm in tissues and air, respectively (Hill and Johnson, 1993).
59 Considering those last properties, the only exposure considered as hazardous for tritium is
60 the internal one. In the environment, tritium exists under three main forms: tritium free in
61 the water (HTO), gaseous tritium (HT) and organically bound tritium (OBT). The latter
62 can be considered as being exchangeable (eOBT), when the tritium atom is bound to
63 oxygen, nitrogen or sulphur atom, or non-exchangeable (neOBT) when bound to a carbon
64 atom (Diabate and Strack, 1993; Hill and Johnson, 1993). Tritium has various sources in
65 the environment. Those sources can be natural, with the interaction between cosmic rays
66 and oxygen or nitrogen atoms in the upper atmosphere, but also the capture of various
67 neutrons from lithium-6 atoms in various rocks (ASN, 2010; Hill and Johnson, 1993).
68 Tritium sources can also be anthropogenic with, for example, the atmospheric nuclear
69 weapon testing than happened between 1945 and 1963, but also with various nuclear
70 facilities (Hyodo-Taguchi and Egami, 1977). Tritium environmental levels are expected to
71 increase in the upcoming decades, mainly because of the development of various nuclear
72 facilities producing tritium using fission processes (Ferreira et al., 2023). Various studies
73 have highlighted that tritium can cross biological barriers and be incorporated into living
74 organisms and their DNA (Arcanjo et al., 2019; Gagnaire et al., 2017, 2020b; Jaeschke et
75 al., 2011; Schiano Di Lombo et al., 2023b).

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

76 As for other radionuclides, DNA is the main target of tritium's deleterious effects
77 (AlAmri et al., 2012; Chen, 2006; Friedland and Kunderát, 2013; Kuzin, 1963; Minouflet et
78 al., 2005; Parisot et al., 2015; Tsyusko et al., 2007). The damage is mainly DNA strand
79 breaks and can be induced by the interaction between the energy deposit and the DNA
80 backbone (*i.e.*, its structural framework, direct damage), or by the interaction of free
81 radicals, formed during the radiolysis of the water, with the 2-deoxyribose found in the
82 DNA (*i.e.*, indirect damage) (Azzam et al., 2012). The induction of DNA damage can, for
83 example, be assessed by using the comet assay that, when done in basic conditions (pH >
84 13), reveals single-strand breaks (SSB), double-strand breaks (DSB) and alkali-labile sites
85 (ALS) (Collins et al., 1997; Hada and Sutherland, 2006; Muruzabal et al., 2021; Tice et al.,
86 2000). To reveal oxidative damage, one can use the modified comet assay with addition of
87 glycosylase enzymes. The two enzymes commonly used are the 8-oxoguanine glycosylase
88 (hOGG1) and the formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) (Muruzabal et al., 2021).
89 The main *in vivo* Fpg substrates are the oxidized purines, especially 8-oxoguanine, but not
90 the formamidopyrimidine (Fapy) residues. Though, Fpg enzyme does not only recognize
91 those damages, it also recognizes alkylating damages with, for example, ring-opened
92 guanines.

93 The comet assay gives information on the global level of DNA damage in individual
94 cell, but it cannot be used as a quantitative tool, as it does not give a specific number of
95 strand breaks. However, nanodosimetry approach can, thanks to Track Structure Monte
96 Carlo codes (Meylan et al., 2017; Sakata et al., 2019; Tang et al., 2019a, 2019b).
97 Nanodosimetry is a formalism that enables us to investigate the electron's track structures
98 and energy deposits at the nanoscale in, for example, the nucleus (Li et al., 2018). It is often
99 used to obtain a quantitative representation of the DNA damage yield induced in the
100 nucleus after exposure to various primary particles. It enables us to compute the physical,

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

101 physico-chemical, and chemical stages of irradiation. The physical stage represents the
102 track structure of the primary particle, while the physico-chemical stage represents the
103 formation of the reactive oxygen species (ROS) formation (Bernal et al., 2015; Meylan et
104 al., 2017). Finally, the chemical stage represents the interaction between ROS and DNA.
105 One of the main advantages of such simulations is that any cell type can be used, as they
106 are simulated using another tool, called DnaFabric, in which any genome can be
107 implemented in any cell (Meylan et al., 2016). Nanodosimetric simulation chains have
108 already been used with various primary particles as, for example, protons and α -particles,
109 secondary electrons from X-Ray and megavoltage irradiation (Meylan et al., 2017; Tang
110 et al., 2019b, 2019a). Other studies, while being less common, have used nanodosimetric
111 simulations to obtain more information on DNA damage, as the number and type of strand
112 breaks, that could arise from the exposure to various low-energy electrons (Lampe et al.,
113 2018; Tung et al., 2007).

114 Multiple studies have documented the effects of tritium on aquatic vertebrates and
115 invertebrates, but the main tritiated form studied was the tritiated water (HTO), which leads
116 to a lack of information on the genotoxic effects of organic tritium, as it has been reviewed
117 twice (Adam-Guillermin et al., 2012; Ferreira et al., 2023). In the present paper, DNA
118 damage induction by tritiated thymidine, an organic form of tritium, was studied in
119 zebrafish, *Danio rerio*. Zebrafish is widely used in toxicological and ecotoxicological
120 studies, because of the many advantages of this biological model. Its genome is fully
121 sequenced, and the organism is considered as being sensitive to various contaminants (Lele
122 and Krone, 1996; Li et al., 2021; Padilla et al., 2011; Pei and Strauss, 2013; Powers et al.,
123 2010; Sassi-Messai et al., 2009; Wang et al., 2019). In this study, zebrafish early life stages
124 have been chosen as they are considered as being more sensitive than adult stages, but also
125 because they are transparent, which leads to a better view of the organism's organogenesis

126 (Hagger et al., 2005; Jha et al., 2005; Kimmel et al., 1995; Shen et al., 2020; Yang et al.,
127 2016). Embryos and larvae were exposed to three activity concentrations (7.5; 40; 110
128 kBq/mL) for four days and DNA damage were measured using the comet assay and its
129 Fpg-modified assay. Nanodosimetric simulations were also computed to obtain more
130 information on the damage measured experimentally. The main objectives of this study
131 were to assess whether tritiated thymidine induced DNA damage and which types of
132 damage were induced. The last objective was to compare those results with the genotoxic
133 effects observed after exposure to HTO or to other radionuclides.

134

135 **2. Material and methods**

136 **2.1. Fish**

137 All experimentations were approved by IRSN Animal Care Committee and followed
138 French regulations for animal experimentation (protocol P2019-19; registration number of
139 IRSN laboratory: C13-013-07). Paris Sorbonne University (France) supplied three to four
140 month-old zebrafish (AB genetic background). They were kept in a zebrafish housing
141 system (Zebtec Techniplast®). The fishes were fed three times a day with Gemma Wean
142 0.3 (Sketting) and the light:dark photoperiod chosen was 12h:12h. All water parameters
143 were monitored daily (pH 7.5 ± 0.2 ; conductivity $450 \pm 50 \mu\text{S/cm}$, temperature 27.5 ± 0.5
144 °C). All mating were done in the husbandry using the water from the housing system and
145 fishes that were between 4 and 13 months old.

146

147 **2.2. Embryo exposure and tritium contamination**

148 Embryo medium (pH 7.5, conductivity $500 \mu\text{S/cm}$ in Milli-Q water) was prepared
149 using Instant Ocean® (60 mg/L) and was used as a negative control and to prepare all
150 tritiated exposure solutions (Westerfield, 1993). Tritiated thymidine solutions (185 MBq,

7

151 PerkinElmer, France) were prepared at three different activity concentrations (7.5; 40 and
152 110 kBq/mL). Those activity concentrations were chosen according to a previous study to
153 obtain three different internal dose rates (22, 170 and 470 µGy/h) (Schiano Di Lombo et
154 al., 2023b).

155 All animals were exposed to tritiated thymidine as presented before (Schiano Di
156 Lombo et al., 2023b). Briefly, 200 3.5 hpf zebrafish embryos were placed in two
157 crystallizers filled with the working solution (2 embryos/mL) and covered with Parafilm®.
158 All exposures lasted 4 days in thermo-regulated incubators (Heraterm, ThermoScientific)
159 at 27 °C. All experiments were performed in the dark and the 80 % of the exposure medium
160 was replaced after 48 h. Temperature (°C) and relative humidity (%) were monitored every
161 30 minutes during the exposure (HOBO data logger U12, Onset) and mortality was
162 recorded daily. Beakers were also filled with tritium-free water (Abatilles water, France,
163 40 mL) to monitor tritium exchanges in the incubator.

164

165 **2.3. Tritium activity concentration measurements**

166 Tritium activity concentration was measured in the beakers (1 replicate/beaker, daily
167 measurement) and in the crystallizer (3 replicates/crystallizer). The samplings and
168 measurements are presented in Table 1 and are adapted from a previous work (Schiano Di
169 Lombo et al., 2023b). All 1 mL exposure medium were diluted in 19 mL of liquid
170 scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer). All the liquid scintillation
171 measurements were done using a Quantulus (Quantulus 1220, Perkin Elmer) that was
172 monitored by WinQ (1220-307 WinQ, Perkin Elmer). Each measurement was repeated five
173 times and lasted a total of 75 minutes.

174

175 **2.4. DNA damage measurements**

176 **2.4.1. Comet assay**

177 The comet assay was performed using a protocol adapted from the ones presented by
178 Devaux et al. (1998) and Gagnaire et al. (2015). Briefly, 7 pools of 10 embryos (1 dpf) and
179 7 individual larvae (4 dpf) were sampled for each treatment and manually crushed in PBS
180 1X while being kept on ice. The resulting cellular suspensions were mixed with 1 % LMP
181 (low melting point) agarose (100 µL, 1:1 v/v) and was placed on a slide on an ice tray.
182 Once the gel had solidified, a protective layer of 100 µL LMP 0.5 % was placed on top of
183 the first gel layer. Once the second layer had solidified, all cells underwent lysis during 1
184 h in the dark, using a lysis solution (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton
185 X100 1 %, DMSO 10 %, pH 10). After lysis, slides were placed in the electrophoresis
186 buffer (NaOH 0.3 M, Na₂EDTA 1 mM) for 40 minutes to unwind the DNA, before starting
187 the electrophoresis in the same buffer (300 mA, 20 V, 24 min). After the electrophoresis,
188 all reactions were neutralized using a buffer (Tris 0.4 M, pH 7.5) twice with a 5-min waiting
189 period in between the two applications.

190

191 **2.4.2. Fpg-modified comet assay**

192 To obtain additional information on the oxidative damage caused by the exposure to
193 tritiated thymidine, the comet assay was also performed using a Fpg enzyme (English
194 BioLabs) treatment of samples, following the protocol presented by Kienzler et al.
195 (Kienzler et al., 2012). The DNA extracted from the embryos and larvae exposed to the
196 two lowest activity concentrations (7.5 and 40 kBq/mL) was treated in the same way than
197 the non-Fpg slides, except there were exposed to the Fpg enzyme right after the lysis. The
198 slides were rinsed three times with an enzyme buffer (KCl 0.1 M, Na₂EDTA 0.5 mM,
199 HEPES 40 mM, BSA 0.2 mg/mL, pH 8.0; 5 min each). Fpg (12 µL) was then added to the
200 enzyme buffer (60 mL) and the slides were left incubated in the mix for 30 minutes, in the

9

201 dark, at 37 °C. After this incubation period, the alkaline unwinding and the electrophoresis
202 were done using the same protocol than presented above.

203 Both Fpg and non-Fpg slides were analyzed in the same way. Ethidium bromide (20
204 ng/mL) was placed on the slide to analyse the DNA with a microscope (Nikon Eclipse
205 E600) equipped with a 515-560 nm excitation filter, coupled with a camera (AVT Marlin
206 F-046B). All nuclei were analyzed using the Comet IV software (Perspective Instrument).
207 On each slide, 100 nuclei were randomly chosen and the Olive tail moment was selected
208 to quantify DNA damage (Olive et al., 1990).

209

210 **2.5. Monte Carlo simulations**

211 **2.5.1. Cell nuclei models**

212 All the cell nucleus used in the simulation were modelled using DnaFabric (Meylan et
213 al., 2016). To obtain reliable results, various zebrafish nuclei have been measured using
214 microscopic images found in various papers. Two different nuclei have been modelled with
215 the DnaFabric software (Meylan et al., 2016): all of them had a spherical shape, but the
216 diameter was either 5 or 10 μm (Braat et al., 1999; Easter and Nicola, 1996; Johnson et al.,
217 2016; Landemaine et al., 2014). For the cells to be considered as zebrafish cells, the nucleus
218 was filled with an haploid genome filled with 25 chromosomes. The total number of base
219 pairs was 1.459×10^9 and the repartition between each chromosome was taken from the
220 literature, as shown in the Supplementary Information (Table S1) (Freeman et al., 2007). As
221 there was no information available regarding the heterochromatin and euchromatin
222 proportions in the zebrafish genome, a 100 % heterochromatin-filled nucleus was simulated.

223

224 **2.5.2. Simulation chain**

225 A Monte Carlo simulation chain (Meylan et al. 2017) using the Geant4-DNA extension
226 of the Geant4 Monte Carlo toolkit (version 11.1) was used to perform the nanodosimetry
227 simulations (Incerti et al., 2010; Kyriakou et al., 2022). It includes models to perform
228 simulations of physical, physico-chemical, and chemical stages within the DNA structure
229 as described above. All the contents of the cell are assimilated to liquid water. The use of
230 such models is needed as it also computes the track structure, simulation that is necessary
231 to respect the molecular scale. Also, using such models lead to the computation of indirect
232 damages, which are considered as being predominant in radiation-induced DNA damage.
233 Though, it is still important to consider that the DNA damage computed using these models
234 only represent early damage, as the simulation stops after the end of the chemical stage.
235 Thus, possible repair pathways are not considered.

236 The output of such simulation chain is the final direct and indirect DNA Single Strand
237 Break (SSB) yield. The irradiation of each cell nucleus was simulated using beta particle
238 (electrons) sampled from tritium beta spectrum. Moreover, 50,000 primary particles were
239 generated to obtain good statistics, and each of these particles were generated randomly in
240 the nucleus, as it was previously shown that during the exposure of the zebrafish embryos
241 and larvae to tritiated thymidine, a fraction of the tritium is incorporated in the DNA
242 (Schiano Di Lombo et al., 2023b).

243

244 **2.5.3. Scoring of DNA damage**

245 The DNA damage scoring was made as explained by Meylan et al. (2017). Briefly, the
246 SBs produced during the physical stage (direct SB) and the ones produced during the
247 chemical stage (indirect SB) are scored separately.

248 A direct SB is considered when the cumulative energy deposited by ionizations and
249 excitations on the DNA backbone reaches 17.5 eV or more. An indirect SB, on the other

250 hand, is considered as being formed when there is an interaction between HO[•] radicals and
251 the 2-deoxyribose, with a probability of inducing a SB of 40 %.

252 The number of DSB was then computed using a clustering algorithm. The DNA
253 damage was considered as being a DSB when two SSBs were formed on two opposite
254 strands while being less than 10 base pairs apart. When another SB was less than 10 bp
255 apart from the initial cluster, it was considered as being a complex DSB. For each cell
256 nucleus, DSB/Gy/Gbp and DSB/Bq/Gbp were computed. The first one was computed by
257 normalizing the mean number of DSB per primary particle with the energy needed to obtain
258 1 Gy inside the nucleus. The latter one, on the other hand, was computed by dividing the
259 mean number of DSB per becquerel inside the cell nucleus. In this paper, the results will
260 be presented as DSB/Gy/Gbp.

261

262 **2.6. Statistical analyses**

263 All statistical analyses and figures were made in R environment using RStudio with
264 the *PMCMR*, *PMCMRplus*, *car*, *lmtest*, *scales*, *SciViews*, *ggplot2*, *ggpubr*, *ggpmisc*, *plotly*,
265 *plot3D*, *FSA*, *rcompanion*, *multcomp*, *drc*, and *lme4* packages. The threshold chosen for
266 significance was 0.05. As two different exposures were conducted (*i.e.*, one with the two
267 lowest dose rates and another one with the greater dose rate), no statistical analyses were
268 conducted in order to compare the damage observed in both exposures. When multiple
269 graphs are presented in a single figure, all statistical analyses can be considered as being
270 individual (*i.e.*, each graph presents different statistical analyses).

271 When looking for differences in DNA damage between treatments, linear mixed
272 models (GLMM/LMM) were used, with the treatment being used as the fixed variable,
273 while other variables as the crystallizer, the Fpg enzyme, and the individual were used as
274 random ones. When either Fpg or non-Fpg results were analysed to look for differences

12

275 between treatments, the same GLMM was used, but the use of the Fpg enzyme was not
276 considered as a random variable. Finally, when analysing the differences between Fpg and
277 non-Fpg results, the use of the Fpg enzyme was used as a fixed variable, while the
278 treatment, the crystallizer and the individual were used as random variables.

279 When the normality of the residuals and the homogeneity of the variance were not met
280 ($p < 0.05$), the data was transformed using either Log10, square root or boxcox
281 transformations to meet the GLMM/LMM criteria ($p > 0.05$).

282

283 **3. Results**

284 All exposure experimentations led to cumulative mortality rates below 20 % in the
285 control condition, with a mean value of 9 %. The exposure to tritiated thymidine did not
286 induce any significant mortality ($p > 0.05$, data not shown).

287

288 **3.1. Comet assay results**

289 **3.1.1. DNA damage measurements**

290 The tail moments measured in the embryos and larva exposed to tritiated thymidine
291 for 1 and 4 days are presented in Figure 1. As can be seen on the two left panels, one day
292 of exposure was enough to lead to a DNA alteration, DNA damage being significantly
293 greater than the damage observed in control individuals for all three activity concentrations
294 (7.5; 40; 110 kBq/mL, $p < 0.01$). The damage measured in the embryos exposed to the
295 intermediate activity concentration were greater than that of the embryos exposed to the
296 lowest one ($p = 0.04$). After exposure for four days, DNA is still significantly more altered
297 in the larvae exposed to all activity concentrations compared to the control ($p < 0.01$).
298 Though, after exposure of the individuals to the intermediate activity concentration, no

299 significant difference can be observed compared to those exposed to the lowest one ($p >$
300 0.05).

301 The tail moments normalized by the controls are presented in Figure 2. After exposure
302 to 7.5 and 110 kBq/mL, no significative difference was observed between 1 and 4 days of
303 exposure ($p = 0.9$ and $p = 0.3$, respectively). However, after exposure to the intermediate
304 activity concentration (40 kBq/mL), a significant decrease was observed in the tail moment
305 between 1 and 4 days of exposure ($p = 0.02$).

306

307 **3.1.2. Oxidative damage measurements**

308 The tail moment measured in individuals exposed to the two lowest tritiated thymidine
309 activity concentrations (7.5 and 40 kBq/mL) with and without treatment of the cells with
310 the Fpg enzyme are presented in Figure 3. After exposure of the cells to the Fpg treatment,
311 a significant increase of the damage found in the DNA of the embryos exposed for one day
312 to the intermediate activity concentration, when compared to the control values, is visible
313 ($p < 0.01$). The DNA damage measured in the Fpg-treated cells of the embryos exposed to
314 the lowest dose rate are not different from either the control nor the intermediate embryos
315 (0 and 40 kBq/mL, $p > 0.05$). After exposure to tritiated thymidine for four days, the results
316 observed are similar to the ones observed in the case of the unmodified comet assay, as the
317 same statistical differences can be observed. Indeed, Fpg-treated cells of larvae exposed to
318 both activity concentrations both show damage levels that are significantly greater than
319 that of the controls ($p < 0.01$). When comparing the oxidative damage (*i.e.*, the difference
320 between the DNA damage found in the Fpg-treated cells and the damage found in the
321 untreated cells) between all treatments after exposure for both one and four days, no
322 significative difference was visible ($p > 0.05$).

323

324 **3.2. Nanodosimetry**

325 The relative number of single and double strand breaks (SSB and DSB) induced by 1
326 Bq of organic tritium in both nuclei and the complexity of the DSB are presented in Figure
327 4. The top panel shows the relative number of SSB and DSB, showing that organic tritium
328 induces more SSB than DSB (*e.g.*, 130 SSB/Gy/Gbp vs 3 DSB/Gy/Gbp in a nucleus with
329 a 2.5 μm radius). The bottom panel of the figure represents the DSB complexity and shows
330 that most DSB are considered as being simple DSB (sDSB), while a very short fraction is
331 considered as complex DSB (cDSB). Both panels also show that there is no difference
332 between both nuclei (2.5 and 5 μm), both in the case of the relative number of strand breaks
333 and in the case of the DSB complexity.

334 The origin of the SB and DSB is represented in Figure 5. The upper panel shows that,
335 in the case of the total number of strand breaks, most of the breaks are considered as being
336 indirect. The bottom panel, however, shows that in the case of DSB, the origin is
337 homogeneously distributed between direct, indirect and mixed (*i.e.*, both direct and
338 indirect) DSB. Indeed, the three origins are close to 30 %, even though the indirect DSB
339 are slightly more present than the other two (39 % vs 34 and 27 % in the case of the nucleus
340 with a 2.5 μm radius).

341

342 **4. Discussion**

343 Exposure experimentations and nanodosimetry simulations have been used in order to
344 obtain more information on the DNA induced by the exposure to tritiated thymidine and,
345 in the case of nanodosimetry, OBT.

346

347 The comet assay highlighted an increase on the DNA damage in the exposed embryos
348 and larvae, showing that tritiated thymidine, even at its lowest dose rate (22 $\mu\text{Gy/h}$)

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

349 significantly damages the DNA. This observation is in accordance with the fact that DNA
350 is one of the first targets of radiations in general (AlAmri et al., 2012; Friedland and
351 Kundrát, 2013; Kuzin, 1963; Minouflet et al., 2005; Parisot et al., 2015; Tsyusko et al.,
352 2007). As in the case of tritiated thymidine, tritium is incorporated in the DNA, the fact
353 that the DNA damage appears even at the lowest dose rate is not surprising, as it known
354 that tritium's decay can lead to energy deposits that have a high enough energy to lead to
355 the formation of strand breaks (Ferreira et al., 2023; Gagnaire et al., 2020b, 2020a, 2017;
356 Jaeschke et al., 2011; Jaeschke and Bradshaw, 2013). The same experiments led to the
357 knowledge that the tail moment measured in the zebrafish cells does not change between 1
358 and 4 dpf, except in the case of the exposure to 170 $\mu\text{Gy/h}$, where the DNA damage
359 decreases between the two time points. Two different processes can be responsible for this
360 decrease: either various repair mechanisms have been activated, leading to the repair of a
361 portion of the damage, or apoptotic processes led to cell death, alongside a possible death
362 caused by a degree of damage that was too high to be handled by the cell (Ferreira et al.,
363 2023; Jaeschke et al., 2011; Pei and Strauss, 2013; Sussman, 2007). It is also possible that
364 the decrease in the DNA damage is caused by both processes, as a previous study also
365 highlighted the overexpression of genes involved in various DNA repair mechanisms as
366 nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER), homologous recombination
367 (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ), but also of genes involved in apoptosis
368 (Schiano Di Lombo et al., 2023a). While previous studies did not study the DNA damage
369 evolution with time, many studies have highlighted the fact that tritium, either as HTO or
370 OBT, can lead to significant levels of DNA damage.

371 The Fpg-modified comet assay, however, did not lead to such conclusions. Even
372 though the results highlighted a significant increase in the DNA damage in larvae (4 dpf)
373 exposed to both activity concentrations (7 and 40 kBq/mL), the DNA damage induction in

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

374 embryos (1 dpf) was only significant after exposure to the highest activity concentration.
375 This result, by itself, seems surprising. Though, the results discussed above were already
376 considered as being high, which means that the use of an enzyme as Fpg could have led to
377 an overestimation of the DNA damage measured, as it is known that this enzyme is less
378 specific than hOGG1, for example (Muruzabal et al., 2021). Though, the results still
379 highlight the possible presence of oxidative damage, as treating the cells with the Fpg
380 enzyme led to an increase in the DNA damage measured. This hypothesis is confirmed
381 with the use of nanodosimetric simulations, as those simulations also compute the indirect
382 or oxidative damage (Friedland and Kunderát, 2013; Tang et al., 2019b; Tung et al., 2007).
383 As shown in the results, the damage induced by the exposure of the nucleus to organic
384 tritium is mainly considered as being indirect, with around 75 % of indirect damage. Both
385 this result and the experimental one are in accordance with a previous study that highlighted
386 an increase in the ROS production after a 4 day-exposure to tritiated thymidine (Schiano
387 Di Lombo et al., 2023a). The simulations also show that there are more SSB than DSB,
388 and that most of the latter are considered as being sDSB rather than cDSB. Those two
389 results seem to indicate that the strand breaks, even though they can reach high levels (*e.g.*,
390 140 SB/Gy/Gbp for a 2.5 μm radius nucleus), are not in the same part of the DNA. Indeed,
391 if the strand breaks were considered as being close to one another, most of the damage
392 would be recorded as being DSB, and most of those would be considered as being cDSB.
393 This result is mainly linked to the track structure of the primary particles simulated in this
394 study, as it shows that all energy deposits are separated by a distance that can be considered
395 as being long at the nanoscale.

396 The nanodosimetry results, however, cannot be considered as accurately representing
397 the damage that was measured experimentally. Indeed, even though it is used as
398 quantification tool, no experimental measurement has been made to ensure that the number

399 of DSB simulated was accurate. A way of doing so is to measure the number of γ -H2AX
400 foci, as this result could be directly linked to the DSB results from the simulations (Tang
401 et al., 2019b). As this measurement could not be done in this study, the fact that the results
402 have not been confirmed has to be taken into consideration. Another reason to consider this
403 possible discrepancy between both experimental and computational results is the difference
404 in the two designs. Nanodosimetric simulations represent a very short exposure to
405 radiation, that can be compared to an acute exposure, while the experimental design chosen
406 for this study is a chronic exposure that lasts up to 4 days (Incerti et al., 2010). The fact
407 that the chronic exposure is not considered means that, for example, the repair mechanisms
408 or cell death that have been discussed above were not considered nor simulated. Even
409 though the experimental results seem to indicate that the amount of DNA repair and
410 apoptosis mechanisms was not significant, they could still lead to discrepancies between
411 the experimental and simulation results. Also, the literature showed that while the spherical
412 nuclei could be considered as being the main nuclei found in the zebrafish embryos and
413 larvae, some nuclei had other shapes. Indeed, it is the case of extraocular muscle nuclei
414 that, as shown in various papers, have an ellipsoidal shape (Easter and Nicola, 1996). Even
415 though the nucleus' volume does not seem to affect the simulation results in this study, one
416 can hypothesize that the shape of the nucleus could. This means that, while the
417 computational results could match the experimental results in the case of some cells, there
418 could still be differences with the measurements made in other cells.

419

420 **5. Conclusion**

421 This study highlights the capacity of tritiated thymidine to induce DNA damage, even
422 at the lowest dose rate, which confirms that one of radiation's main targets is the DNA. It
423 also shows that repair and apoptotic mechanisms do not lead to a substantial decrease in

18

424 the DNA damage, except when the individuals are exposed to the intermediate dose rate.
425 The nanodosimetric simulations highlight that the damage arising from the exposure to
426 organic tritium is mainly under the form of single strand breaks, meaning that the energy
427 deposits leading to DNA damage are not close enough to one another to lead to the
428 formation of DSB. Although, while the hypothesis was made that the tritium was in the
429 DNA in the simulation, the main damage still appears as being in the indirect form,
430 meaning it arises from the ROS, and not from the energy deposits themselves. To fully link
431 the simulation and experimental results, other markers would have to be studied, with for
432 example the use of γ -H2AX, as its results would represent the number of DSB in each cell
433 nucleus, which could then be compared to the DSB quantity obtained in the nanodosimetry
434 simulations. Also, studying the same toxicity markers in further developed zebrafish could
435 lead to a better understanding of the mechanisms underlying the repair of those damage,
436 but also to have more information on the DNA damage evolution when the exposure time
437 is longer.

438

439 **6. Acknowledgements**

440 The authors would like to thank IRSN for funding this project, as well as Pierre Techer
441 for his help in the experiments and Elsa Cantabella and Olivier Simon for their help with
442 the animal care. The authors would also like to thank Daniel Orjollet for his help with the
443 liquid scintillation measurements.

444

445 **7. References**

446 Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012.
447 Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on
448 Aquatic Animals, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination
449 and Toxicology. Springer New York, pp. 67–103.

- 450 AlAmri, O.D., Cundy, A.B., Di, Y., Jha, A.N., Rotchell, J.M., 2012. Ionizing radiation-induced
451 DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus sp.* Environ. Pollut. 168,
452 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.015>
- 453 Arcanjo, C., Maro, D., Camilleri, V., Cavalié, I., Simon, O., Beaugelin-Seiller, K., Carasco, L.,
454 Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2019. Assessing tritium internalisation
455 in zebrafish early life stages: Importance of rapid isotopic exchange. J. Environ.
456 Radioact. 203, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.02.009>
- 457 ASN, 2010. Livre blanc du tritium.
- 458 Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative
459 stress and prolonged cell injury. Cancer Lett., Special Issue: Oxidative Stress-Based
460 Cancer Biomarkers 327, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- 461 Bernal, M.A., Bordage, M.C., Brown, J.M.C., Davidková, M., Delage, E., El Bitar, Z., Enger,
462 S.A., Francis, Z., Guatelli, S., Ivanchenko, V.N., Karamitros, M., Kyriakou, I., Maigne,
463 L., Meylan, S., Murakami, K., Okada, S., Payno, H., Perrot, Y., Petrovic, I., Pham, Q.T.,
464 Ristic-Fira, A., Sasaki, T., Štěpán, V., Tran, H.N., Villagrasa, C., Incerti, S., 2015. Track
465 structure modeling in liquid water: A review of the Geant4-DNA very low energy
466 extension of the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. Phys. Med. 31, 861–874.
467 <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.10.087>
- 468 Braat, A.K., Zandbergen, T., Water, S.V.D., Goos, H.J.T., Zivkovic, D., 1999. Characterization
469 of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA.
470 Dev. Dyn. 216, 153–167. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199910\)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1)
- 471 Chen, J., 2006. Radiation quality of tritium. Radiat Prot Dosim. 122, 546–548.
472 <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl411>
- 473 Collins, A.R., Dobson, V.L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R., 1997. The comet assay:
474 what can it really tell us? Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 375, 183–193.
475 [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00013-4)
- 476 Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G., 1998. Monitoring of the
477 chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and
478 cytochrome P4501a induction in chub (*Leuciscus cephalus*). Mar. Environ. Res.,
479 Pollutant Responses in Marine Organisms 46, 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00105-0)
- 481 Diabate, S., Strack, S., 1993. Organically Bound Tritium. Health Phys. 65, 698.
- 482 Easter, Jr., Stephen S., Nicola, G.N., 1996. The development of vision in the zebrafish (*Danio*
483 *rerio*). Dev. Biol. 180, 646–663. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0335>
- 484 Ferreira, M.F., Turner, A., Vernon, E.L., Grisolia, C., Lebaron-Jacobs, L., Malard, V., Jha,
485 A.N., 2023. Tritium: Its relevance, sources and impacts on non-human biota. Sci. Total
486 Environ. 876, 162816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162816>
- 487 Freeman, J.L., Adeniyi, A., Banerjee, R., Dallaire, S., Maguire, S.F., Chi, J., Ng, B.L., Zepeda,
488 C., Scott, C.E., Humphray, S., Rogers, J., Zhou, Y., Zon, L.I., Carter, N.P., Yang, F.,
489 Lee, C., 2007. Definition of the zebrafish genome using flow cytometry and cytogenetic
490 mapping. BMC Genomics 8, 195. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-195>
- 491 Friedland, W., Kundrát, P., 2013. Track structure based modelling of chromosome aberrations
492 after photon and alpha-particle irradiation. DNA Damage Chromosom. Aberrations
493 756, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.013>
- 494 Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Shultz, C.,
495 Kim, S.B., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., Farrow, F., Beaton, D., Tan, E., Wen, K.,
496 Stuart, M., 2017. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: A multi-
497

- 498 biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Sci. Total*
 499 *Environ.* 599–600, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.210>
- 500 Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Camilleri, V., Simon, O., Floriani, M., Orjollet, D.,
 501 Adam-Guillermin, C., 2020a. Tritiated Water Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*):
 502 Effects on the Early-Life Stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 648–658.
 503 <https://doi.org/10.1002/etc.4650>
- 504 Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-
 505 Guillermin, C., 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of
 506 zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 169, 69–78.
 507 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.005>
- 508 Gagnaire, B., Gosselin, I., Festarini, A., Walsh, S., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Della-
 509 Vedova, C., Farrow, F., Kim, S.B., Shkarupin, A., Chen, H.Q., Beaton, D., Stuart, M.,
 510 2020b. Effects of in vivo exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the
 511 fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Env. Sci Pollut Res* 27, 3612–3623.
 512 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3781-5>
- 513 Hada, M., Sutherland, M., 2006. Spectrum of complex DNA damages depends on the incident
 514 radiation. *Radiat. Res.* 165, 223–230. <https://doi.org/10.1667/RR3498.1>
- 515 Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and
 516 survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus*
 517 *edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.013>
- 518 Health Protection Agency, 2007. Review of risks from tritium (No. RCE-4), Radiation,
 519 chemical and environmental hazards.
- 520 Hill, R.L., Johnson, J.R., 1993. Metabolism and dosimetry of tritium. *Health Phys.* 65, 628.
- 521 Hyodo-Taguchi, Y., Egami, N., 1977. Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated
 522 water. *Radiat. Res.* 71, 641–652. <https://doi.org/10.2307/3574632>
- 523 Incerti, S., Baldacchino, G., Bernal, M., Capra, R., Champion, C., Francis, Z., Guèye, P.,
 524 Mantero, A., Mascialino, B., Moretto, P., Nieminen, P., Villagrasa, C., Zacharathou, C.,
 525 2010. The geant4-dna project. *Int J Model Simul Sci Comput* 01, 157–178.
 526 <https://doi.org/10.1142/S1793962310000122>
- 527 IRSN, 2014. Tritium et environnement.
- 528 Jaeschke, B.C., Bradshaw, C., 2013. Bioaccumulation of tritiated water in phytoplankton and
 529 trophic transfer of organically bound tritium to the blue mussel, *Mytilus edulis*. *J.*
 530 *Environ. Radioact.* 115, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.07.008>
- 531 Jaeschke, B.C., Millward, G.E., Moody, A.J., Jha, A.N., 2011. Tissue-specific incorporation
 532 and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*.
 533 *Environ. Pollut.* 159, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.033>
- 534 Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2005. Impact of low doses of tritium on the
 535 marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration.
 536 *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 586, 47–57.
 537 <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.05.008>
- 538 Johnson, K., Barragan, J., Bashiruddin, S., Smith, C.J., Tyrrell, C., Parsons, M.J., Doris, R.,
 539 Kucenas, S., Downes, G.B., Velez, C.M., Schneider, C., Sakai, C., Pathak, N.,
 540 Anderson, K., Stein, R., Devoto, S.H., Mumm, J.S., Barresi, M.J.F., 2016. Gfap-positive
 541 radial glial cells are an essential progenitor population for later-born neurons and glia
 542 in the zebrafish spinal cord. *Glia* 64, 1170–1189. <https://doi.org/10.1002/glia.22990>
- 543 Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S., 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1,
 544 and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by
 545 means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicol. In Vitro* 26, 500–510.
 546 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.001>

- 547 Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of
548 embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
549 <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- 550 Kuzin, A.M., 1963. On the Role of DNA in the Radiation Damage of the Cell. *Int. J. Radiat.*
551 *Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 6, 201–209.
552 <https://doi.org/10.1080/09553006314550271>
- 553 Kyriakou, I., Emfietzoglou, D., Incerti, S., 2022. Status and Extension of the Geant4-DNA
554 Dielectric Models for Application to Electron Transport. *Front. Phys.* 9.
- 555 Lampe, N., Karamitros, M., Breton, V., Brown, J.M.C., Sakata, D., Sarramia, D., Incerti, S.,
556 2018. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA Part 2: Electron and
557 proton damage in a bacterial cell. *Phys. Med.* 48, 146–155.
558 <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.12.008>
- 559 Landemaine, A., Rescan, P.-Y., Gabillard, J.-C., 2014. Myomaker mediates fusion of fast
560 myocytes in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 480–484.
561 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.093>
- 562 Lele, Z., Krone, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological
563 and transgenic research. *Biotechnol. Adv.* 14, 57–72. [https://doi.org/10.1016/0734-](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00004-3)
564 [9750\(96\)00004-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00004-3)
- 565 Li, S., Zhang, Y., Xue, H., Zhang, Q., Chen, N., Wan, J., Sun, L., Chen, Q., Zong, Y., Zhuang,
566 F., Gu, P., Zhang, A., Cui, F., Tu, Y., 2021. Integrative effects based on behavior,
567 physiology and gene expression of tritiated water on zebrafish. *Ecotoxicol. Environ.*
568 *Saf.* 225, 112770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112770>
- 569 Li, W.B., Hofmann, W., Friedland, W., 2018. Microdosimetry and nanodosimetry for internal
570 emitters. *Radiat. Meas.* 115, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2018.05.013>
- 571 Meylan, S., Incerti, S., Karamitros, M., Tang, N., Bueno, M., Clairand, I., Villagrasa, C., 2017.
572 Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using
573 Geant4-DNA. *Sci. Rep.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11851-4>
- 574 Meylan, S., Vimont, U., Incerti, S., Clairand, I., Villagrasa, C., 2016. Geant4-DNA simulations
575 using complex DNA geometries generated by the DnaFabric tool. *Comput. Phys.*
576 *Commun.* 204, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2016.02.019>
- 577 Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P.-M., Cotelle, S., Ferard, J.-F., 2005. Assessment of the
578 genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using *Vicia-micronucleus*, *Tradescantia-micronucleus*
579 and *Tradescantia-stamen-hair* mutation bioassays. *J. Environ. Radioact.*, A selection of
580 papers based on the 7th ICOBTE(International Conference on Biogeochemistry of
581 Trace Elements),15-19 June 2003, Uppsala, Sweden 81, 143–153.
582 <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.01.003>
- 583 Muruzabal, D., Collins, A., Azqueta, A., 2021. The enzyme-modified comet assay: Past, present
584 and future. *Food Chem. Toxicol.* 147, 111865.
585 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111865>
- 586 Olive, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E., 1990. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA
587 Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay.
588 *Radiat. Res.* 122, 86–94. <https://doi.org/10.2307/3577587>
- 589 Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor
590 activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol.*
591 *Teratol.*, Special issue: Zebrafish: Current discoveries and emerging technologies for
592 neurobehavioral toxicology and teratology 33, 624–630.
593 <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005>
- 594 Parisot, F., Bourdineaud, J.-P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2015. DNA
595 alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic

- 596 exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 163,
597 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002>
- 598 Pei, D.-S., Strauss, P.R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair.
599 *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., DNA Repair and Genetic Instability* 743–744, 151–
600 159. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.10.003>
- 601 Powers, C.M., Yen, J., Linney, E.A., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2010. Silver exposure in
602 developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival.
603 *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.01.009>
- 604 Sakata, D., Lampe, N., Karamitros, M., Kyriakou, I., Belov, O., Bernal, M.A., Bolst, D.,
605 Bordage, M.-C., Breton, V., Brown, J.M.C., Francis, Z., Ivanchenko, V., Meylan, S.,
606 Murakami, K., Okada, S., Petrovic, I., Ristic-Fira, A., Santin, G., Sarramia, D., Sasaki,
607 T., Shin, W.-G., Tang, N., Tran, H.N., Villagrasa, C., Emfietzoglou, D., Nieminen, P.,
608 Guatelli, S., Incerti, S., 2019. Evaluation of early radiation DNA damage in a fractal
609 cell nucleus model using Geant4-DNA. *Phys. Med.* 62, 152–157.
610 <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.04.010>
- 611 Sassi-Messai, S., Gibert, Y., Bernard, L., Nishio, S.-I., Lagneau, K.F.F., Molina, J., Andersson-
612 Lendahl, M., Benoit, G., Balaguer, P., Laudet, V., 2009. The Phytoestrogen Genistein
613 Affects Zebrafish Development through Two Different Pathways. *PLOS ONE* 4, e4935.
614 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004935>
- 615 Schiano Di Lombo, M., Cavalié, I., Camilleri, V., Armant, O., Perrot, Y., Cachot, J., Gagnaire,
616 B., 2023a. Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene
617 overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 265, 106766.
618 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106766>
- 619 Schiano Di Lombo, M., Cavalié, I., Camilleri, V., Perrot, Y., Gagnaire, B., 2023b. Tritiated
620 thymidine internalization in zebrafish early life stages: joint use of experimental
621 procedures and microdosimetry. *Radiat. Res.* 199, 373–384.
622 <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00157.1>
- 623 Shen, W., Lou, B., Xu, C., Yang, G., Yu, R., Wang, X., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., 2020.
624 Lethal toxicity and gene expression changes in embryonic zebrafish upon exposure to
625 individual and mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin.
626 *Chemosphere* 239, 124802. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124802>
- 627 Sussman, R., 2007. DNA repair capacity of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13379–13383.
628 <https://doi.org/10.1073/pnas.0706157104>
- 629 Tang, N., Bueno, M., Meylan, S., Incerti, S., Clairand, I., Villagrasa, C., 2019a. Simulation of
630 early radiation-induced DNA damage on different types of cell nuclei. *Radiat. Prot.*
631 *Dosimetry* 183, 26–31. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy237>
- 632 Tang, N., Bueno, M., Meylan, S., Perrot, Y., Tran, H.N., Freneau, A., Dos Santos, M.,
633 Vaurijoux, A., Gruel, G., Bernal, M.A., Bordage, M.-C., Emfietzoglou, D., Francis, Z.,
634 Guatelli, S., Ivanchenko, V., Karamitros, M., Kyriakou, I., Shin, W.-G., Incerti, S.,
635 Villagrasa, C., 2019b. Assessment of radio-induced damage in endothelial cells
636 irradiated with 40 kVp, 220 kVp, and 4 MV X-rays by means of micro and
637 nanodosimetric calculations. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6204.
638 <https://doi.org/10.3390/ijms20246204>
- 639 Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae,
640 Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for
641 in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
642 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- 643 Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T.G., Glenn, T.C., 2007.
644 Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. *Comp.*

- 645 Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol., Special issue of papers from the
646 conference "Aquatic Animal Models of Human Disease" hosted by the University of
647 Georgia, Athens, Georgia, USA, October 30-November 2, 2005 145, 103–110.
648 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.010>
- 649 Tung, C.J., Chao, T.C., Hsieh, H.W., Chan, W.T., 2007. Low-energy electron interactions with
650 liquid water and energy depositions in nanometric volumes. Nucl. Instrum. Methods
651 Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At. 262, 231–239.
652 <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2007.05.023>
- 653 Wang, H., Zhou, L., Meng, Z., Su, M., Zhang, S., Huang, P., Jiang, F., Liao, X., Cao, Z., Lu,
654 H., 2019. Clethodim exposure induced development toxicity and behaviour alteration
655 in early stages of zebrafish life. Environ. Pollut. 255, 113218.
656 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113218>
- 657 Westerfield, M., 1993. The zebrafish book : A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio*
658 (*Brachydanio*) *rerio*. Institute of Neuroscience, University of Oregon.
- 659 Yang, Y., Qi, S., Wang, D., Wang, K., Zhu, L., Chai, T., Wang, C., 2016. Toxic effects of
660 thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). J. Hazard. Mater. 307, 127–136.
661 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.055>
662

663 **Tables**

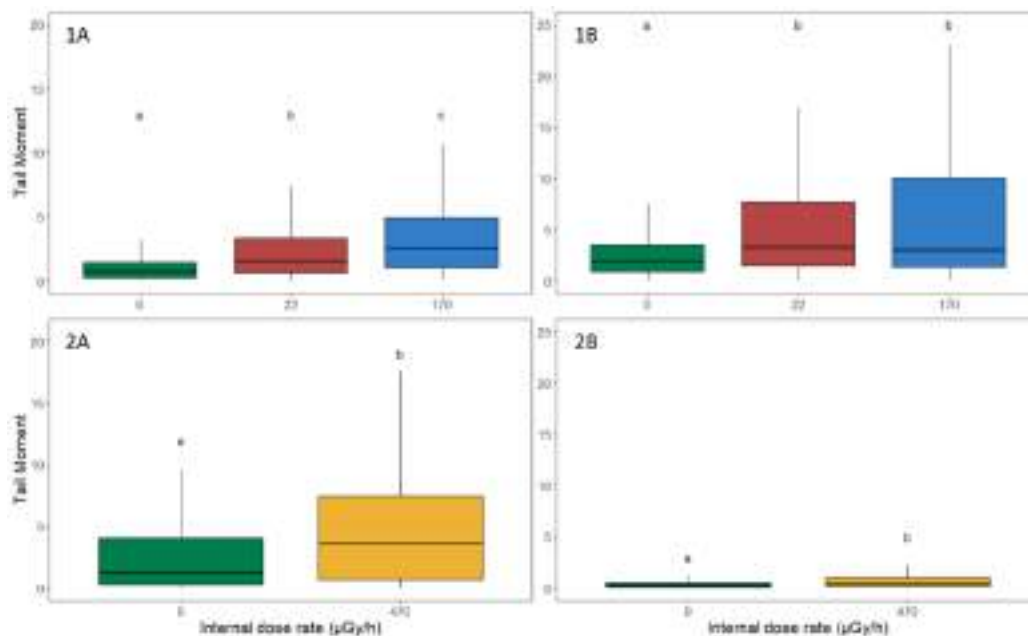
664 **Table 1.** Characteristics of the voxels used to model the heterochromatin during the
665 zebrafish nucleus simulation.

	Straight	Up	Down	Right	Left
Number of histones/nucleosomes	18	12	12	12	10
Number of nucleotide pairs	3594	2408	2415	2404	2402

666

667 **Figures**

668

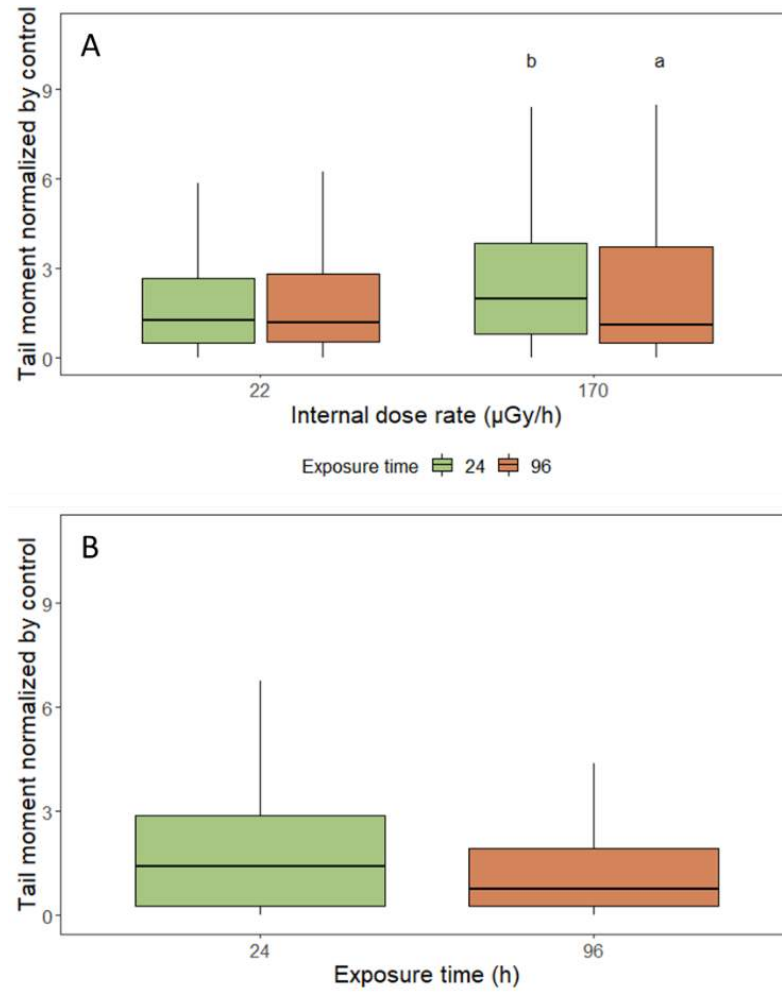


669

670 **Figure 1.** Tail moment measured in embryos (1 dpf) and larva (4 dpf) exposed to tritiated
671 thymidine at dose rates of 22 and 170 μGy/h (panel 1A: embryos; panel 1B: larva) and
672 470 μGy/h (panel 2A: embryos; panel 2b: larva). Statistics: GLMM/LMM, p < 0.05.

673

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

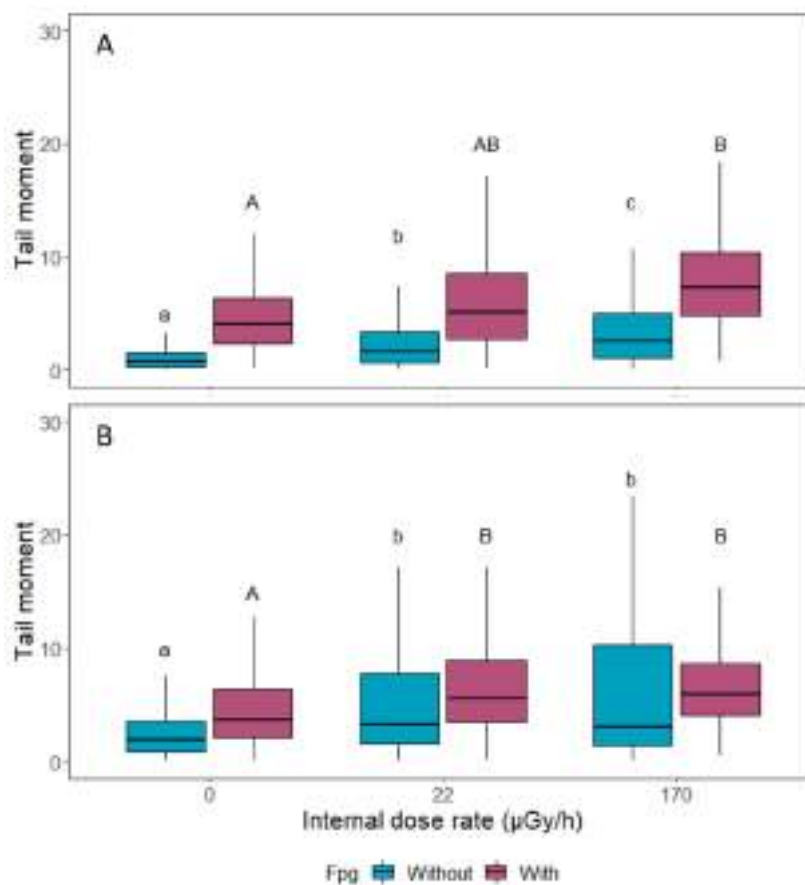


674

675 **Figure 2.** Normalized tail moment measured in embryos (1 dpf) and larva (4 dpf) exposed
676 to tritiated thymidine at dose rates of 22 and 170 µGy/h (panel A) and 470 µGy/h (panel
677 B). Statistics: GLMM/LMM, $p < 0.05$, $a < b$.

678

679



680

681

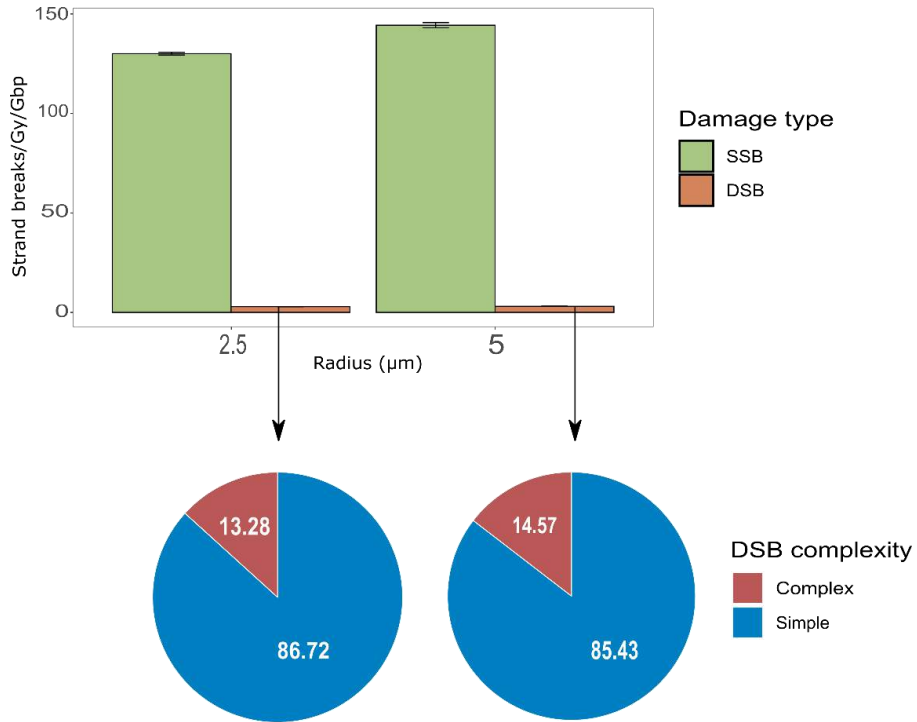
682

Figure 3. Tail moment measured in zebrafish embryos (1 dpf, panel A) and larva (4 dpf, panel B) exposed to tritiated thymidine at dose rates of 0, 22 and 170 µGy/h, with or

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

683 without incubation in the Fpg enzyme buffer. Statistics: GLMM/LMM, $p < 0.05$. For
684 untreated cells, $a < b < c$ and for treated cells, $A < B$.

685

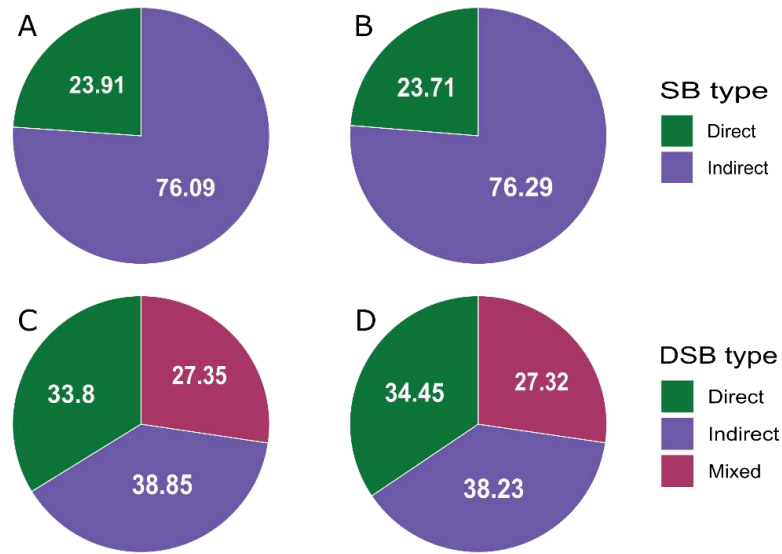


686

687 **Figure 4.** Strand breaks (SSB and DSB, Strand breaks/Gy/Gbp) induced by 1 Bq of organic
688 tritium in two zebrafish nuclei of two different radii (2.5 and 5 μm, top panel) and
689 complexity of the DSB induced (%), bottom panel) in each nucleus. Those results were
690 obtained by the simulations of 50000 primary particles in each zebrafish nucleus.

691

692



693

694

695

696

697

Figure 5. Repartition of direct and indirect strand breaks (SB, %) and of direct, indirect and mixed double strand breaks (DSB, %) induced by 1 Bq in two zebrafish nuclei and 2.5 μm (panels A and C, respectively) and 5 μm (panels B and D, respectively). Those results were obtained by the simulations of 50000 primary particles in each zebrafish nucleus.

698

Supplementary Information

Chromosome ID	Base pair number (x10⁶)
1	65
2	65
3	68
4	74
5	78
6	65
7	78
8	61
9	67
10	52
11	52
12	53
13	53
14	59
15	53
16	61
17	18
18	52
19	52
20	61
21	54
22	43

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.3. Article 2 :
"Experimental and computational analysis of the damage induced in zebrafish
(*Danio rerio*) DNA after exposure to tritiated thymidine

53	53
23	47
25	42
Total	1459

699

D.4. Discussion

Le test des comètes permet de se renseigner sur la formation de dommages à l'ADN au cours de l'exposition des individus à la thymidine tritiée. Ces derniers apparaissent après 24 et 96 heures d'exposition à tous les débits de dose absorbée. Ces résultats correspondent aux résultats attendus, étant donné qu'il est connu que l'ADN est la cible principale des radiations (AlAmri et al., 2012; Chen, 2006; Friedland and Kunderát, 2013; Kuzin, 1963; Minouflet et al., 2005; Parisot et al., 2015; Tsyusko et al., 2007). D'autant plus, comme indiqué dans le chapitre précédent, une partie du tritium internalisé dans les embryons et larves de poisson zèbre est incorporé dans l'ADN, le rendant ainsi au plus proche de ce dernier. La distance parcourue par les électrons étant courte (au maximum, 1 μm dans les tissus), la présence de ce dernier dans l'ADN rend les dépôts d'énergie sur les brins de l'ADN probables (Hill and Johnson, 1993). Ainsi, les dommages à l'ADN peuvent également être considérés comme étant probables. Les résultats permettent de mettre en évidence une diminution du taux de dommages à l'ADN entre 24 et 96 heures d'exposition chez les individus exposés à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. Cette diminution n'est visible qu'après exposition à ce débit de dose absorbée et peut être expliquée par deux processus : la mise en place de mécanismes de réparation, ou la mort cellulaire (Ferreira et al., 2023; Jaeschke et al., 2011; Pei and Strauss, 2013; Sussman, 2007). Cette dernière peut être elle-même causée par deux différents processus : l'apoptose, également appelé mort cellulaire programmée, ou la mort causée par un taux de dommages trop élevé, qui peut mener à la nécrose. Il est probable que cette diminution dans le taux de dommages à l'ADN ne soit pas uniquement due à la mort cellulaire non apoptotique étant donné que, si c'était le cas, le même effet serait observé chez les individus exposés au débit de dose absorbée le plus élevé. Les expériences réalisées dans le cadre de cette étude permettent également de mettre en évidence que les résultats du test des comètes modifié à l'aide de l'enzyme Fpg sont assez difficiles à interpréter. Cette difficulté d'interprétation est causée par deux facteurs : en premier lieu, les taux de dommages mesurés par le test des comètes non modifié sont déjà élevés, ce qui peut entraîner une forme de

D. AXE 2 : EFFETS DU TRITIUM SUR L'INTEGRITE DE L'ADN – D.4. Discussion

saturation des dommages lors du test des comètes modifié à l'aide de l'enzyme Fpg. Cependant, il est également possible que cette absence de différence soit liée à une absence de dommages causés par le stress oxydant. Malgré tout, il est important de considérer le fait que l'enzyme Fpg ne transforme pas tous les dommages oxydants en cassures à l'ADN (Muruzabal et al., 2021). Ainsi, il est également possible que le stress oxydant cause malgré tout des dommages à l'ADN, mais que cela ne soit pas visible avec le test des comètes-Fpg.

Les résultats des simulations Monte Carlo de nanodosimétrie, quant à eux, permettent d'obtenir plus d'informations sur les dommages à l'ADN induits par l'exposition à la thymidine tritiée et, de manière générale, au tritium organique. Ces derniers indiquent que les dommages à l'ADN apparaissent majoritairement sous la forme de SSB, mais également que les dommages induits par l'exposition à la thymidine tritiée sont majoritairement indirects. La formation majoritaire de SSB peut être causé par un éloignement des SB les unes par rapport aux autres, rendant la formation de DSB impossible. La formation majoritaire de dommages indirects, quant à elle, peut être liée à une incapacité des dépôts de faible énergie à entraîner la formation d'une SB (Tang et al., 2019a). Cependant, bien que les simulations aient été validées dans le cas d'irradiations aux rayons X mettant en mouvement des électrons de faible énergie, aucune expérience n'a été réalisée dans le cas du tritium afin de vérifier l'exactitude des résultats obtenus par le biais des simulations (Tang et al., 2019b). Pour cette raison, il est nécessaire d'interpréter les résultats obtenus dans cet axe du doctorat avec prudence. En effet, plusieurs différences notables sont à prendre en compte entre les expériences et les simulations. La première est liée au fait que l'expérimentation correspond à une exposition chronique, ce qui n'est pas le cas de l'exposition utilisée en nanodosimétrie, qui est considérée comme étant aiguë (Incerti et al., 2010). L'absence de prise en compte de l'aspect chronique de l'exposition peut mener à une mauvaise estimation des dommages. En effet, les processus d'accumulation des dommages, de réparation et de mort cellulaire ne sont, à l'heure actuelle, pas considérés dans

ces simulations. Par ailleurs, seuls deux noyaux, tous les deux de forme sphérique, ont été utilisés dans le cadre des simulations. Cependant, ceux-ci ne représentent pas l'intégralité des noyaux présents chez les embryons et larves de poisson zèbre (Easter and Nicola, 1996; Johnson et al., 2016; Landemaine et al., 2014). Les résultats des simulations indiquent que, pour une même énergie déposée dans le noyau, son rayon n'a pas d'impact notable sur les résultats obtenus. Cependant, l'effet de la forme du noyau n'a pas été testé et, par conséquent, n'est pas connu, alors que la densité d'ADN dans le noyau devrait avoir un impact sur le taux de dommages. Il est donc nécessaire d'envisager que les résultats obtenus puissent ne pas correspondre à ceux qui pourraient être mesurés dans tous les noyaux des embryons et larves de poisson zèbre.

A retenir

- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à la thymidine tritiée entraîne la formation de dommages à l'ADN dès le plus faible débit de dose absorbée.
- L'utilisation du test des comètes-Fpg ne met pas en évidence de dommages oxydants à l'ADN.
- Les simulations de nanodosimétrie indiquent que dans la gamme de noyaux étudiés, le rayon du noyau n'a pas d'impact sur la formation de dommages à l'ADN.
- Les dommages à l'ADN formés par le tritium organique sont majoritairement des SSB, d'après les simulations de nanodosimétrie.
- D'après les simulations, les dommages à l'ADN formés par le tritium organique sont majoritairement des dommages indirects, issus de l'interaction entre les ROS et l'ADN.

Hypothèses

- Des processus de réparation des dommages à l'ADN et de mort cellulaire semblent être en fonctionnement après exposition à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée, induisant ainsi une diminution du taux de dommage à l'ADN entre 24 et 96 heures d'exposition.
- Les cassures formées lors de l'exposition au tritium organique sont éloignées les unes des autres car certains dépôts sont de trop faible énergie pour entraîner la formation de cassures. Cet éloignement justifie la présence majoritaire de SSB.

L'ADN est reconnu comme étant une des cibles principales des radiations ionisantes, de nombreux autres processus peuvent être impactés par une contamination au tritium, tel que le développement, le stress oxydant, ou l'expression génique (Azam et al., 2012; Ferreira et al., 2023; Gagnaire et al., 2017, 2020a,b; Li et al., 2021). Cependant, l'unique étude des dommages à l'ADN ne permet pas d'obtenir assez d'informations sur la toxicité de la thymidine tritiée pour mieux en comprendre les mécanismes d'action. Ainsi, il paraît nécessaire de se tourner vers une étude multi-marqueurs et multi-échelles afin de déterminer au mieux les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée. Pour cette raison, l'effet de la thymidine tritiée sur l'expression de plusieurs gènes d'intérêt, sur la production de ROS et sur le développement a été étudié. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre suivant.

E. AXE 2 : TOXICITE DE LA THYMIDINE TRITIEE : DE LA MOLECULE A L'INDIVIDU

E.1. Objectifs de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le deuxième axe de ce travail de doctorat. Elle vise à qualifier les effets toxiques de la thymidine tritiée sur les embryons et larves de poisson zèbre. Dans cette dernière, l'investigation des effets ne se concentre pas sur une seule échelle biologique, mais sur plusieurs. En effet, l'objectif de cet axe est de déterminer si plusieurs niveaux d'organisation biologique sont impactés par une exposition chronique à de faibles débits de dose absorbée de thymidine tritiée (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$). C'est pour cette raison que les effets ont été étudiés à l'échelle moléculaire avec l'étude de l'expression de plusieurs gènes d'intérêt et la production des ROS, et à l'échelle individuelle avec l'éclosion et le développement. *In fine*, l'objectif est également de pouvoir lier les effets entre eux, quand cela est possible, afin de déterminer les mécanismes d'action de la thymidine tritiée. Un autre objectif est de comparer les effets observés au cours de cet axe du doctorat avec les effets observés pendant l'étude de la toxicité du césium (^{137}Cs) ou de l'HTO aux mêmes débits de dose absorbée. Cela devrait permettre, entre autres, de déterminer l'EBR de la thymidine tritiée en prenant les résultats obtenus après irradiation gamma comme résultats de référence, afin de déterminer le degré de toxicité de la thymidine tritiée et de le comparer à celui du

tritium libre.

E.2. Synthèse des résultats de l'étude

La Figure E.1 résume les expériences réalisées dans le cadre de cette partie de l'axe 2 du doctorat.

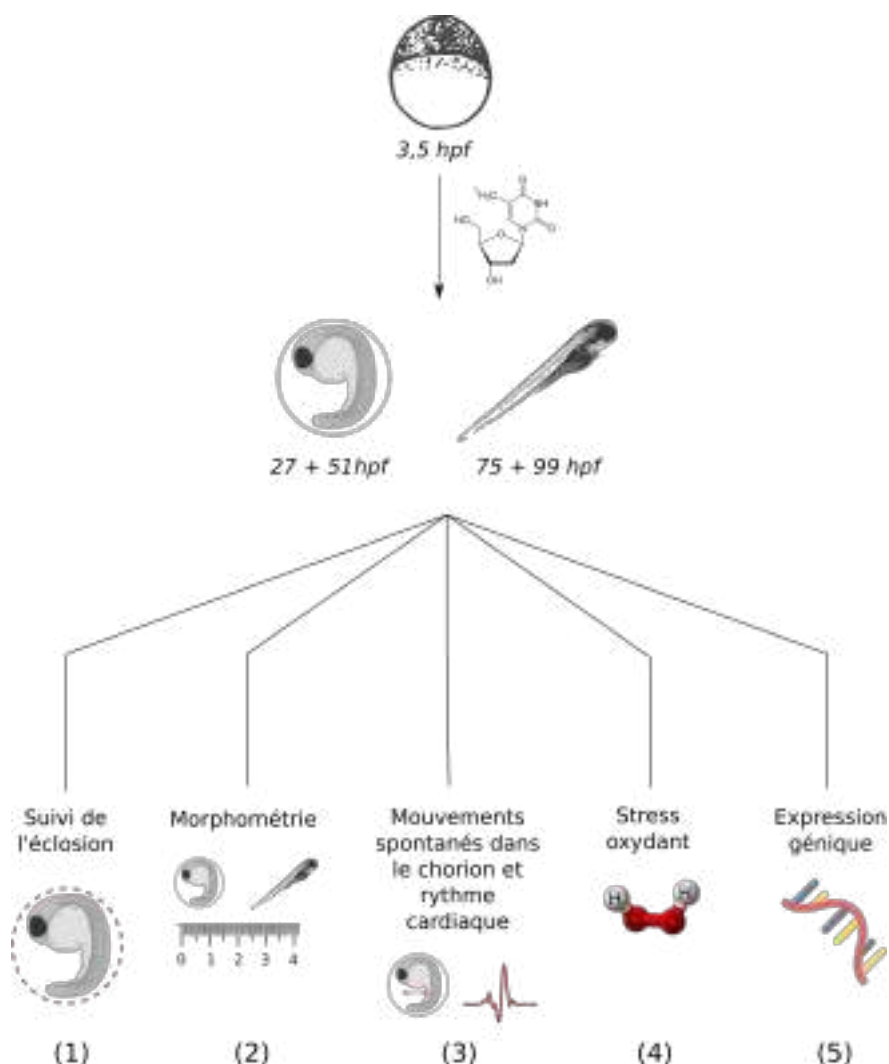


FIGURE E.1. – Schéma récapitulatif des expériences réalisées dans le cadre de l'étude des effets toxiques de la thymidine tritiée chez les embryons et larves de poisson zèbre. Les effets sont étudiés à différents niveaux d'organisation biologique, de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle.

Dans cette partie de l'axe 2 du doctorat, les effets toxiques de la thymidine tritiée ont été étudiés à différents niveaux d'organisation biologique. Les expériences et résultats sont présentés ci-dessous du niveau d'organisation le plus élevé au niveau d'organisation le plus faible.

- (1) Dans une microplaque de 25 puits, 8 pools de 5 embryons ont été déposés dans du milieu témoin ou du milieu contaminé en début d'expérience (1 pool/puits). L'éclosion des individus a été suivie tout au long de l'expérience. Toutes les données ont été compilées à l'aide du logiciel REGTOX[®] (n = 500 simulations). Les résultats indiquent qu'un retard d'éclosion est significativement visible dans le cas des individus exposés aux deux débits de dose absorbée les plus élevés (170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$). Au plus faible débit de dose absorbée (22 $\mu\text{Gy/h}$), une tendance à un retard d'éclosion est observée, mais cette dernière n'est pas confirmée par les analyses statistiques.
- (2) Dans une seconde microplaque de 25 puits, 4 pools de 5 embryons ont été incubés dans du milieu témoin ou du milieu contaminé. Chaque jour, tous les individus ont été pris en photo individuellement. A l'aide du logiciel ImageJ, les diamètres des œufs et de leur vésicule vitelline ont été mesurés chez les individus de 27 et 51 hpf, et la longueur des larves et les diamètres de leur vésicule vitelline et de leurs yeux ont été mesurés chez les individus de 75 et 99 hpf. Les résultats indiquent un ralentissement temporaire du développement, uniquement observable après 72 heures d'exposition. A ce stade de développement (77 hpf), les larves exposées aux deux plus faibles débits de dose absorbée (22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$) sont significativement plus petites que les larves témoins, et les larves exposées au débit de dose absorbée intermédiaire (170 $\mu\text{Gy/h}$) présentent des yeux et une vésicule vitelline significativement plus petits. Les larves exposées au débit de dose absorbée le plus élevé (470 $\mu\text{Gy/h}$) ne présentent aucune différence de taille avec les individus témoins. De même, après 96 heures d'exposition, aucune différence morphométrique n'est observable entre les individus témoins et les individus contaminés aux trois débits de dose absorbée.

- (3) La mesure des mouvements spontanés des embryons dans le chorion a été réalisée, après 24 heures d'exposition, sur 6 pools de 10 individus par condition, immobilisés dans de la méthylcellulose à 2 % (w/v), par le biais d'enregistrements vidéo de 5 minutes. Les résultats indiquent que l'activité totale, la durée totale du mouvement, ainsi que le nombre total de mouvements et le nombre de mouvements par minute augmentent significativement chez les embryons exposés au plus haut débit de dose absorbée (470 $\mu\text{Gy/h}$) pendant 24 heures. Le rythme cardiaque a, quant à lui, été mesuré chez 6 pools de 5 individus exposés à la thymidine tritiée pendant 72 heures. Les individus ont été déposés dans du MS-222 (tricaine, 0,02 % (w/v)) et de la méthylcellulose à 2 % (w/v). Les enregistrements mettent en avant que l'exposition de 72 heures à la thymidine tritiée au plus haut débit de dose absorbée (470 $\mu\text{Gy/h}$) entraîne une diminution significative du rythme cardiaque. Après exposition au débit de dose absorbée intermédiaire (170 $\mu\text{Gy/h}$), une tendance à l'augmentation du rythme cardiaque est observée chez les individus, mais la différence avec le rythme cardiaque des larves témoins n'est pas significative.
- (4) L'indice de production des ROS, et plus spécifiquement du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , a été mesuré chez vingt larves exposées pendant 96 heures à la thymidine tritiée. L'indice de production est calculé comme étant le quotient de la fluorescence mesurée chez les individus exposés au PMA et au H_2DCFDA et de la fluorescence mesurée chez les individus exposés au diméthylsulfoxyde (DMSO) et au H_2DCFDA . Les résultats indiquent que seuls les individus exposés au débit de dose absorbée intermédiaire (170 $\mu\text{Gy/h}$) présentent une augmentation significative de l'indice de production des ROS. L'exposition à tous les débits de dose absorbée (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$) entraîne une augmentation significative du niveau de fluorescence mesuré chez les larves stimulées par le PMA. Le niveau basal de fluorescence (larves exposées au DMSO) n'est pas impacté par l'exposition à la thymidine tritiée.
- (5) L'expression génique de 27 gènes d'intérêt impliqués dans des processus bio-

– E.3. Article 3 : "Trititated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

logiques tels que l'assemblage des myofibrilles, les processus apoptotiques, la réparation des dommages à l'ADN, le stress oxydant, ou encore le rythme circadien a été mesurée chez les individus exposés à la thymidine tritiée pendant 24 et 96 heures. Les résultats indiquent que seule l'exposition pendant 24 heures aux deux débits de dose absorbée les plus faibles (22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$) entraîne une dérégulation de l'expression de certains gènes. Après exposition à 22 $\mu\text{Gy/h}$, les gènes *ache*, *casp9*, *crx*, *cry5*, *cyp1a*, *elf1a*, *gstp1*, *hspb9*, *lyz*, *saga*, *sod2*, *tbpl1* et *xrcc1* sont significativement surexprimés ($p < 0,05$), alors que les gènes *aanat2*, *bax*, *bbc3*, *bcl2*, *cryba*, *ddb2*, *h2ax*, *mmp13*, *mpx* et *xpc* présentent une tendance à la surexpression, mais sans significativité ($0,05 < p < 0,1$). Après exposition à 170 $\mu\text{Gy/h}$, une tendance à la surexpression est également observée dans le cas des gènes *casp9*, *cyp1a* et *sod2*, mais également sans significativité ($0,05 < p < 0,1$).

Ces résultats sont présentés dans l'article joint ci-après, et seront discutés par la suite.

E.3. Article 3 : "Trititated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

Article (et données supplémentaires) soumis le 12 Juillet 2023 au journal *Aquatic Toxicology*, accepté le 10 Novembre 2023 et publié le 11 Novembre 2023.



Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)

Magali Schiano Di Lombo^{a,*}, Isabelle Cavalié^a, Virginie Camilleri^a, Olivier Armant^a, Yann Perrot^b, Jérôme Cachot^c, Béatrice Gagnaire^{a,*}

^a Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PSE-ENV/SERPEN/LECO, Cadarache, 13115, Saint-Paul-lez-Durance, France

^b Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SDOS/LDRI, 92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France

^c Université de Bordeaux, Laboratoire EPOC UMR 5805, Univ. Bordeaux, CNRS, INP Bordeaux, F-33600 Pessac, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Tritium
Zebrafish
Tritiated thymidine
Development
Hatching
Cardiac rhythm
Genic expression
Taqman

ABSTRACT

Tritium is a beta emitter radionuclide. Being an isotope of hydrogen, it is easily transferred to different environmental compartments, and to human and non-human biota. Considering that tritium levels are expected to rise in the upcoming decades with the development of nuclear facilities producing tritium using fission processes, investigating the potential toxicity of tritium to human and non-human biota is necessary. Tritiated thymidine, an organic form of tritium, has been used in this study to assess its toxicity on fish embryo development. Zebrafish embryos (3.5 hpf; hours post fertilization) have been exposed to tritiated thymidine at three different activity concentrations (7.5; 40; 110 kBq/mL) for four days. These experiments highlighted that zebrafish development was affected by the exposure to organic tritium, with smaller larvae at 3 dpf after exposure to the two lowest dose rates (22 and 170 µGy/h), a delayed hatching after exposure to the two highest dose rates (170 and 470 µGy/h), an increase in the spontaneous tail movement (1 dpf) and a decrease in the heartbeat (3 dpf) after exposure to the highest dose rate. The results also highlighted an increase in ROS production in larvae exposed to the intermediate dose rate. A dysregulation of many genes, involved in apoptosis, DNA repair or oxidative stress, was also found after 1 day of exposure to the lowest tritium dose rate. Our results thus suggest that exposure to tritiated thymidine from a dose rate as low as 22 µGy/h can lead to sublethal effects, with an effect on the development, dysregulation of many genes and increase of the ROS production. This paper provides valuable information on toxic effects arising from the exposure of fish to an organic form of tritium, which was the main objective of this study.

1. Introduction

Tritium is a radioactive isotope of hydrogen (IRSN 2014). In the environment, it comes from different sources: the interaction between the cosmic rays and atmospheric oxygen and nitrogen atoms is the only natural source of tritium, while there are more types of anthropogenic releases, including nuclear power plants, nuclear reactors, but also nuclear incidents or weapon testing (IRSN 2014; ASN 2010). Despite those numerous anthropogenic sources of tritium, those releases are still being closely monitored, those monitoring mostly focusing on the activity concentrations in the different environmental compartments. In France, for example, in non-nuclearized aquatic ecosystems, tritium levels range from 3 to 4 Bq/L, while in nuclearized areas, those levels rise and reach 2.5 to 12.85 Bq/L, with a mean value of 6.31 Bq/L (Ferreira et al., 2023).

In the environment, tritium can be found in three different forms: free in the water (HTO), atmospheric tritium (HT) or organically bound tritium (OBT) (IRSN 2014). This last form can be separated into two different ones: the exchangeable OBT (eOBT), where tritium is weakly bound to oxygen, sulphur or nitrogen atoms, and the non-exchangeable OBT (neOBT), where tritium is strongly bound to a carbon atom (Ferreira et al., 2023). Numerous studies have shown that tritium can be transferred to biota, accumulate in living tissues and, depending on its chemical form (free or organic), can be incorporated in the DNA during its synthesis (Arcanjo et al., 2019; Schiano Di Lombo et al., 2023; Gagnaire et al., 2017; Gagnaire et al., 2020a; Jaeschke et al., 2011; Kim et al., 2015; Gagnaire et al., 2020b). This ability made the study of its possible toxic effects even more relevant. Considering that radiations emitted by tritium have a low penetrating power, the only exposure

* Corresponding authors.

E-mail addresses: magali.schianodilombo@gmail.com (M. Schiano Di Lombo), beatrice.gagnaire@irsn.fr (B. Gagnaire).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106766>

Received 12 July 2023; Received in revised form 7 November 2023; Accepted 10 November 2023

Available online 11 November 2023

0166-445X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

M. Schiano Di Lombo et al.

Aquatic Toxicology 265 (2023) 106766

source considered in this study is the internal exposure (i.e., the exposure to the tritium that has been translocated in the embryos and larvae).

As for many other contaminants, tritium effects on early development stages have been studied on numerous species. For example, it was shown that tritium induced a delay in hatching of zebrafish embryos (*Danio rerio*), no matter what chemical form was used (Gagnaire et al., 2021; Li et al., 2021). Literature also reports that tritium can induce a delay in development in species like zebrafish, blue mussel (*Mytilus edulis*) and grass puffer (*Fugu niphobles*), while it seems to have the opposite effect on the prussian carp (*Carrasius gibelis*) (Ferreira et al., 2023; Gagnaire et al., 2020b; Jha et al., 2005). While affecting the macroscopic development, it seems that it can also affect microscopic and molecular processes. For example, a study showed that the spontaneous tail movement in 24 hpf zebrafish embryos decreased after an exposure to HTO at 3.7 kBq/mL, while the same exposure increased the heartbeat of the individuals at 60 and 120 hpf (Li et al., 2021).

Other studies also highlighted that exposure to tritium leads to an increase in the reactive oxygen species (ROS) in bacterial cells, fathead minnow (*Pimephales promelas*) and zebrafish, while the GPx activity also increased with the tritium dose rate in fathead minnows (Gagnaire et al., 2020a; Gagnaire et al., 2020b; Rozhko et al., 2019). Finally, it was shown that genes involved in detoxication and neuro-transmission in zebrafish were affected after exposure to tritium, but only in a transient way, while a RNA sequencing study carried out on zebrafish embryos and larvae showed that many genes were either over- or under-expressed after exposure (Gagnaire et al., 2021; Arcanjo et al., 2018). Genes involved in somite differentiation, oxidative reduction processes and peripheral nervous system axonogenesis were down-regulated. In contrast, genes involved in the response to oxidative stress, circadian rhythm, response to light stimulus, and regulation of DNA methylation were up-regulated (Arcanjo et al., 2018). Genes involved in processes linked to the muscle contraction or the sarcomere assembly were up- and down-regulated depending on both the developmental stage and the dose rate used for the exposure. Thus, when studying the toxic effects of various compounds on living organisms, multiple biological scales should be used, as it could give more information on the possible modes of action of the contaminant to induce toxicity (Ferreira et al., 2023; Frayse et al., 2006; Parisot et al., 2015).

Even though all those studies give multiple information on HTO toxic effects on various aquatic species, very few studies focused on the toxic effects that could arise from an exposure to organic tritium, which is the main objective of our study (Jaeschke et al., 2011; Adam-Guillermin et al., 2012). Another objective was to determine and confirm toxic mechanisms specific to tritium and, more generally, radiations, by comparing the toxicity induced by tritiated thymidine to the toxicity induced by HTO or gamma irradiation. To do so, three tritiated thymidine dose rates were used (22, 170 and 470 $\mu\text{Gy/h}$). Zebrafish is used as a biological model because it is a convenient species, with adults being able to lay hundreds of eggs, but also because these eggs are transparent, easy to handle, and because its genome is fully sequenced (Spence et al., 2008; Scholz et al., 2008). Early development stages were also chosen as it is well known that those are usually considered as being more sensitive to most contaminants, but also because it is a commonly used model in toxicological studies (Ferreira et al., 2023; Gagnaire et al., 2020b; Gagnaire et al., 2021; Arcanjo et al., 2018; Sassi-Messai et al., 2009; Pei and Strauss, 2013; Pereira et al., 2011; Arcanjo et al., 2020; Arcanjo et al., 2023; Icoflu Aksakal and Ciltas, 2018). Zebrafish embryos were exposed to three activity concentrations (7.5; 40; 110 kBq/mL) to study toxicological effects than can be classified in three different categories depending on the biological scale concerned. First, the macroscopic part of the study will focus on the development of the larvae, while a second part of the study will focus on toxicity markers as the spontaneous tail movement and the heartbeat. Finally, molecular studies will focus on the ROS production index and the expression of 30 different genes. The selected genes are involved in multiple biological processes such as DNA repair, apoptosis, oxidative stress regulation and eye development. As

multiple effects have already been observed after the exposure of fish to different radionuclides, with for example the deregulation of various genes involved in the response to oxidative stress and DNA damage, but also with disruption of the development, the main hypothesis behind this study is the induction of disruptions by tritiated thymidine on the same biological targets, but with different severities.

2. Material and methods

2.1. Fish

All experimentations presented in this paper were previously approved by IRSN Animal Care Committee and followed French regulations for animal experimentation (protocol P2019-19; registration number of IRSN laboratory: C13-013-07). Three to four months old wild-type zebrafish (AB genetic background) were supplied by Paris Sorbonne University (France) and were kept in a zebrafish housing system (Zebtec Techniplast® Stand Alone). The light:dark photoperiod chosen was 12h:12 h and fishes were fed three times a day with Gemma Wean 0.3 (Sketting). All water parameters were monitored daily (pH 7.5 ± 0.2 ; conductivity $450 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, temperature $27.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$). As males and females were kept in separated tanks to increase the effectiveness of the mating process, the mating was also done once every three weeks during the periods during which no experimental procedures were planned. All matings were done in the husbandry using the water from the housing system and using fishes that were between 4 and 13 months old.

2.2. Embryo exposure and tritium contamination

Embryo medium (pH 7.5, conductivity $500 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ in Milli-Q water) was prepared using InstantOcean® sea salt at a concentration of 60 mg/L and was used to dilute the tritiated thymidine solution and as a negative control (Westerfield, 1993). Tritiated thymidine solutions (97% purity, 185 MBq, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) were prepared in three different activity concentrations (7.5; 40 and 110 kBq/mL), chosen according to a previous study in order to obtain 3 different internal dose rates: 22; 170; 470 $\mu\text{Gy/h}^5$. As multiple experiments were necessary to study the effects of tritiated thymidine at one dose rate, a 10% variability was accepted in the initial measured activity concentration between each experiment.

All animals were exposed to tritiated thymidine as presented elsewhere (Schiano Di Lombo et al., 2023). Briefly, at 3.5 hpf, zebrafish embryos were placed in two to three glass crystallizers covered with Parafilm at a density of two eggs per mL of working solution for four days. Each crystallizer was considered as an exposure replicate. The embryos were kept in the dark in thermo-regulated incubators (Herterm, ThermoScientific) at $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and 80% of the working solution was replaced after 48 h of exposure. Temperature ($^\circ\text{C}$) and relative humidity (%) were monitored every 30 min during the exposure (HOBO data logger U12, Onset), and beakers were filled with tritium-free water (Abatilles water, France, 40 mL) to monitor tritium exchanges in the incubator.

For both development and hatching studies, two 25-well plastic plates were added in the incubators. In the development plate, 4 wells were filled with 5 embryos each in 2.5 mL of working solution, while the wells that did not contain any embryos were kept empty. In the hatching plate, 8 wells were also filled with the same amount of embryos and working solution. Both plates were covered with Parafilm® to avoid any significant evaporation of the medium.

2.3. Tritium activity concentration measurements

In order to monitor the evaporation of the medium from both the crystallizers and the plates, tritium activity concentration was measured in the beakers (1 replicate/crystallizer, once a day) and in the

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

M. Schiano Di Lombo et al.

Aquatic Toxicology 265 (2023) 106766

crystallizers (3 replicates/crystallizer, after 0; 24; 48 and 96 h of exposure). The sampling and the measurement was adapted from Schiano Di Lombo et al. (2023). The water sampling, differing depending on the activity concentration used in the experiment, is presented in Table 1. All 1 mL samples were diluted in 19 mL of the liquid scintillation cocktail (Ultima Gold LLT, PerkinElmer). The liquid scintillation measurements were done using a Quantulus (Quantulus 1220, Perkin Elmer) monitored by WinQ (1220–307 WinQ, Perkin Elmer). Each measurement was done five times and lasted 75 min.

2.4. Monitoring of the embryo-larval development

2.4.1. Hatching and morphometric measurements

After 24; 48; 50; 52.5; 69; 71; 73; 75; 77; 93 and 96 h of exposure, embryos and larvae were counted in each well of the plate. Hatching time 50% (HT50, time at which 50% of the individuals have hatched for a same replicate) has been calculated using REGTOX® ($n = 500$ simulations, <http://www.normalesup.org/~vindimian/fr.index.html>) and was used in the statistical analyses.

Morphometric measurements were made by following the procedure already presented (Gagnaire et al., 2015). Briefly, 1 to 4 dpf individuals were pictured every day at the same hour using a camera (Nikon D5000) connected to a binocular microscope (ZEISS SteREO Discovery V20, magnification 93x). Pictures were first analysed to qualify if the individual was normal or malformed, and the egg and yolk sac diameters (1 to 2 dpf) were measured using ImageJ, as well as the total length of the larvae, the yolk sac and the eye diameters (3 to 4 dpf).

2.4.2. Spontaneous tail movements of 1 dpf embryos

The spontaneous tail movement was measured in 1 dpf embryos using a protocol adapted from the one presented by Murat El Houdigui et al. (2019). Six pools of 10 embryos per condition were used and, in a room set at 28 °C, 10 embryos were immobilized in 2% w/v methylcellulose in PBS and set under the light on a stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to a high-resolution camera (acA1300–60 gm, Basler, Germany). After two min of acclimatation, a 5 min-video was recorded using EthoVision XT16 (Noldus, Netherlands). The burst activity (%), the burst duration (s), and the burst count was determined using DanioScope (Noldus, Germany).

2.4.3. Heart rate of 3 dpf larva

Measurement of the heart rate was measured in 3 dpf larvae using a protocol adapted from Murat et al. (Murat El Houdigui et al., 2019). Six pools of 5 larvae per condition were used. In a room set at 28 °C, 5 larvae were immobilized in 2% w/v methylcellulose with 0.02% MS-222 (Sigma-Aldrich, France) in a 55 mm petri dish. After an acclimatation period of 2 min under the light on the stereomicroscope (Nikon SMZ800) connected to the high-resolution camera (acA1300–60 gm, Basler, Germany), a 25 s video was recorded using EthoVision XT16 (Noldus, Germany). Heart rate (BPM) was measured using DanioScope (Noldus, Germany).

Table 1

Amount of solution sampled in the beakers (1 replicate/beaker) and the crystallizers (3 replicate/crystallizer) depending on the activity concentration (Bq/mL, $\pm 10\%$) used during the experiment.

Nominal activity concentration ($\times 10^3$ Bq/mL)	Beaker sampling	Crystallizer sampling
7.5 \pm 0.8	1 mL	10 μ L diluted in 990 μ L of tritium-free water
40 \pm 4.0	1 mL	10 μ L diluted in 990 μ L of tritium-free water
110 \pm 11.0	100 μ L diluted in 900 μ L of tritium-free water	10 μ L of a 1:10 solution in 990 μ L of tritium-free water

2.5. Gene expression analysis

2.5.1. RNA extraction and quantification

RNAs from the samples were extracted following the protocol published previously (Murat El Houdigui et al., 2019). Briefly, 3 pools of 25 to 30 embryos (1 dpf) and 3 pools of 15 larvae (4 dpf) were grinded using 300 μ L of Trizol in ceramic beads tubes (CK14 tubes, Bertin Instruments, France) with the Precellys 24 grinding machine (Bertin Instruments, France). After homogenisation, all samples were stored at -80 °C. For RNA extraction, samples were thawed, and all sample handling and centrifugations were done at 4 °C. Chloroform (60 μ L) was added to the homogenized samples in Trizol, followed by vortexing and centrifugation at 13,000 g for 15 min at 4 °C. The upper aqueous phase was collected in a new tube and 60 μ L of chloroform was added before centrifuging in the same conditions as before. The upper aqueous phase was collected in a new tube and 150 μ L of isopropyl alcohol was added before the samples were vortexed and stored at -80 °C for 30 min. The samples were then centrifuged during 30 min at 13,000 g. The supernatant was removed, and the RNA sample was washed using 150 μ L of ethanol 80% (v/v) by centrifuging the sample for 5 min at 13,000 g. The supernatant was then removed and once the RNA sample had been air-dried, it was diluted in 15 μ L of RNase and DNase free water. All RNA concentrations (ng/ μ L) and quality (RNA Integrity Number, RIN) were assessed using RNA Nano Chips (BioAnalyzer 2011, Agilent Technologies). All samples were used as all RINs were above 9.

2.5.2. cDNA synthesis and preamplification and Taqman assay

Reverse transcription was done on 1 μ g of extracted RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. After the reverse transcription was completed, 100 of cDNA were used for the rest of the experiment. The cDNA samples were preamplified using Custom TaqMan PreAmp Pool and TaqMan PreAmp Master Mix (2X; Applied Biosystems) while following the manufacturer's instructions. Gene expression was quantified using the preamplified cDNA samples in a 384-well microfluidic TaqMan Array Card in which the expression of 31 genes was measured for 4 samples with 3 analytical replicates (32 format). The array cards were processed in the QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All Ct results were combined on the ExpressionSuite Software for QuantStudio 6 & 7 Flex Real Time PCR System and exported to DataAssist v3.01 (Applied Biosystems) for analysis while using the 18S RNA gene expression as an endogenous control. Ct values were used to obtain Δ Ct values, each value corresponding to the gene expression of each biological replicate, normalized using the reference gene. Δ Ct were then used to calculate $2^{(-\Delta Ct)}$, which was in turn used to determine the fold change. All genes studied in this experiment are presented in Supplementary Information (Table S1).

2.6. Oxidative stress measurements

Oxidative stress was studied by measuring ROS production. The protocol used was the one presented elsewhere (Gagnaire et al., 2013). Briefly, for each condition, 20 larvae were sampled after 96 h of exposure. All larvae were individually placed in 96-well plates. All of them received 100 μ L of HBSS buffer (ThermoFisher) and 50 μ L H₂DCFDA (2 mg/L in DMSO 0.4%). The first ten larvae received 50 μ L DMSO at 0.4% while the other ten larvae received 50 μ L Phorbol myristate acetate (PMA, 0.8 mg/L in DMSO 0.4%). Fluorescence emitted by the reaction between H₂DCFDA and ROS was measured over 300 min (TECAN Infinite M1000). Basal and stimulated levels were calculated on the linear part of the curves for larvae incubated with DMSO and PMA, respectively. ROS production index was calculated as the ratio PMA/DMSO.

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

M. Schiano Di Lombo et al.

Aquatic Toxicology 265 (2023) 106766

2.7. Statistical analyses

All statistical analyses and figures were made in R environment using RStudio with the *PMCMR*, *PMCMRplus*, *car*, *lmtest*, *scales*, *SciViews*, *ggplot2*, *ggpubr*, *ggpmisc*, *plotly*, *plot3D*, *FSA*, *rcompanion*, *multcomp*, *drc* and *lme4* packages. The threshold chosen for significant results was 0.05.

For all development and oxidative stress analyses, linear mixed models (GLMM/LMM) were used. The treatment was set as the fixed variable, while the crystallizer was used as a random variable. In more specific experiments as the measurement of the spontaneous tail movement and the heartbeat, the trial was also added as a random variable, which was also the case for the larval position when performing statistical analyses on the larval yolk measurement. For other developmental and hatching analyses, basic GLM were used as there were no variables identified as random. When the normality of the residuals and the homogeneity of the variance were not met ($p < 0.05$), data was transformed using either Log10, square root or boxcox transformations. The treatment effect was then checked and, when necessary, the Tukey-HSD post-hoc test was used. For the gene expression data, all analyses were made using Data Assist 3.01, where Ct were used to obtain the fold change by calculating ΔCt and $2^{(-\Delta Ct)}$. All ΔCt were compared to the control values with the use of a *t*-test, and all *p*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate.

Except for the gene expression, all results have been represented as boxplots. Regarding the horizontal lines, the lowest one represents the

first quartile, while the middle one represents the median value, and the highest one represents the third quartile. When data points are outside of the boxplot lines, they are considered as being outliers, but were not removed from the statistical analysis when there was no experimental reason to do so. In the boxplots, the dots correspond the data points obtained during the experiments. When different graphs are presented for the same analysis, it means the results come from different experiments, and different batches of embryos.

3. Results

All exposure experimentations led to cumulative mortality rates below 20% in the control condition. Exposure to tritiated thymidine at all dose rates tested did not induce any significant induction of mortality (data not shown).

3.1. Hatching

The hatching results are presented in Fig. 1. Even if a complete hatching was observed after 96 h of exposure, the hatching was delayed when the larvae were exposed to the intermediate and the greater tritiated thymidine activity concentrations (4×10^4 and 1×10^5 Bq/mL; 170 and 470 μ Gy/h) when compared to the control ($p = 0.02$ and $p < 0.01$, respectively). Even if the larvae exposed to the lowest activity concentration (7.5×10^3 Bq/mL; 22 μ Gy/h) did not show a significantly longer hatching time compared to controls, it also did not show any

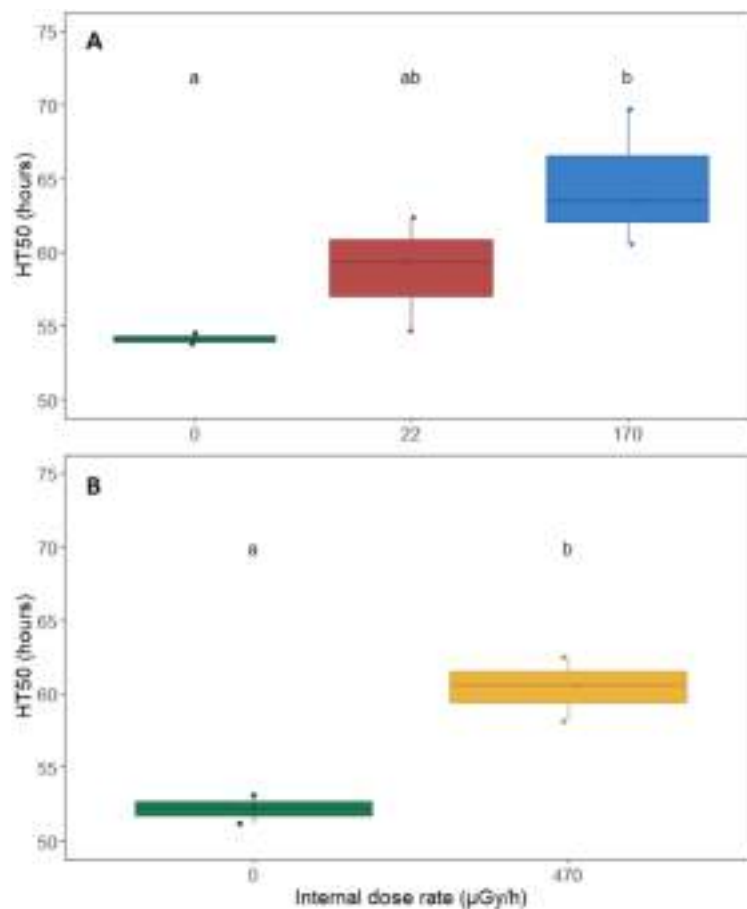


Fig. 1. Average hatching time (HT50, hours, $N = 8$) measured in control and exposed zebrafish embryos to tritiated thymidine (panel A: 22 and 170 μ Gy/h; panel B: 470 μ Gy/h). ANOVA, $a < b$, $p < 0.05$.

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

M. Schiano Di Lombo et al.

Aquatic Toxicology 265 (2023) 106766

significant differences with the hatching time of the larvae exposed to the intermediate activity concentration.

3.2. Developmental defects

3.2.1. Development measurements

The exposure of the embryos and larvae to tritiated thymidine at all dose rates tested did not induce any skeletal malformations, nor peri-cardiac or peri-vitelline oedema (data not shown).

The egg and yolk sac diameters measured on controls and embryos exposed to 22 $\mu\text{Gy/h}$ and 170 $\mu\text{Gy/h}$ for 1 and 2 days are presented in Table 2, alongside the yolk sac and eye diameters and total length of the larvae exposed to those same dose rates for 3 and 4 days. First, it is seen that the embryos exposed to the lowest activity concentration for 1 day had a larger yolk sac than the control embryos ($p = 0.02$). This effect was only transient as it is not observed after 4 days of exposure. Most of the morphometric differences were observed for the 3 dpf larvae. Indeed, larvae exposed to both the lowest and the intermediate activity concentrations were shorter than the control larvae ($p = 0.03$ and $p < 0.001$, respectively). The yolk sac and eye diameters were also smaller for the larvae exposed to the intermediate activity concentration when compared to the control ($p = 0.006$ and 0.004 , respectively). All those differences were only temporary as no significant differences were observed for the 4 days old larvae. Through the whole experiment, no significant differences were observed between both thymidine activity dose rates (22 and 170 $\mu\text{Gy/h}$).

The egg and yolk sac diameters measured on embryos exposed to 0 and 470 $\mu\text{Gy/h}$ for 1 and 2 days are presented in Table 3, alongside the yolk sac and eye diameters and lengths of the larvae exposed to those same dose rates for 3 and 4 days. When larvae were exposed to tritiated thymidine at this high dose rate, no significant morphometric changes were observed ($p > 0.05$).

3.2.2. Spontaneous tail movement

After exposure to the two lowest activity concentrations (22 $\mu\text{Gy/h}$ and 170 $\mu\text{Gy/h}$), no significant changes in the spontaneous tail movement were observed compared to the control individuals (data not shown). After exposure to the highest activity concentration (470 $\mu\text{Gy/h}$, Fig. 2), a significant increase was observed in the burst activity, the

Table 2

Developmental characteristics (mm) measured on control and contaminated zebrafish early life stages (0, 22 and 170 $\mu\text{Gy/h}$). Measurements were made on embryos (1 and 2 dpf) and larvae (3 and 4 dpf), and the number in parenthesis corresponds to the number of individuals used for each measurement. Bold numbers and * indicate a significant difference with the control (GLM and GLMM, $p < 0.05$).

Measurement (mm)	Control	22 $\mu\text{Gy/h}$	170 $\mu\text{Gy/h}$
Egg diameter (1 dpf)	1.25 \pm 0.06 (19)	1.26 \pm 0.06 (20)	1.25 \pm 0.05 (19)
Yolk sac diameter (1 dpf)	0.52 \pm 0.03 (19)	0.55 \pm 0.04* (20)	0.52 \pm 0.04 (19)
Egg diameter (2 dpf)	1.26 \pm 0.07 (11)	1.24 \pm 0.03 (12)	1.22 \pm 0.05 (11)
Yolk sac diameter (2 dpf)	0.50 \pm 0.03 (11)	0.49 \pm 0.04 (12)	0.50 \pm 0.04 (11)
Larva length (3 dpf)	3.22 \pm 0.16 (17)	3.03 \pm 0.21* (14)	2.97 \pm 0.13* (16)
Yolk sac diameter (3 dpf)	0.42 \pm 0.06 (17)	0.39 \pm 0.06 (14)	0.37 \pm 0.07* (16)
Eye diameter (3 dpf)	0.26 \pm 0.02 (17)	0.25 \pm 0.04 (14)	0.22 \pm 0.04* (16)
Larva length (4 dpf)	3.22 \pm 0.16 (15)	3.30 \pm 0.18 (16)	3.31 \pm 0.20 (17)
Yolk sac diameter (4 dpf)	0.35 \pm 0.08 (15)	0.37 \pm 0.04 (16)	0.38 \pm 0.05 (17)
Eye diameter (4 dpf)	0.26 \pm 0.04 (15)	0.27 \pm 0.02 (16)	0.27 \pm 0.03 (17)

Table 3

Developmental characteristics (mm) measured on control and contaminated zebrafish early life stage (0 and 470 $\mu\text{Gy/h}$). Measurements were made on embryos (1 and 2 dpf) and larvae (3 and 4 dpf), and the number in parenthesis corresponds to the number of individuals used for each measurement. No significant differences were observed between both conditions (GLM and GLMM, $p < 0.05$).

Measurement (mm)	Control	470 $\mu\text{Gy/h}$
Egg diameter (1 dpf)	1.21 \pm 0.07 (18)	1.19 \pm 0.06 (16)
Yolk sac diameter (1 dpf)	0.51 \pm 0.04 (18)	0.50 \pm 0.03 (16)
Egg diameter (2 dpf)	1.20 \pm 0.06 (15)	1.20 \pm 0.07 (13)
Yolk sac diameter (2 dpf)	0.48 \pm 0.05 (15)	0.45 \pm 0.05 (13)
Larva length (3 dpf)	3.46 \pm 0.23 (16)	3.32 \pm 0.29 (17)
Yolk sac diameter (3 dpf)	0.47 \pm 0.09 (16)	0.44 \pm 0.09 (17)
Eye diameter (3 dpf)	0.30 \pm 0.04 (16)	0.28 \pm 0.04 (17)
Larva length (4 dpf)	3.61 \pm 0.26 (15)	3.56 \pm 0.17 (17)
Yolk sac diameter (4 dpf)	0.37 \pm 0.09 (15)	0.35 \pm 0.04 (17)
Eye diameter (4 dpf)	0.30 \pm 0.04 (15)	0.31 \pm 0.04 (17)

total burst duration, the burst count, and the burst count per minute. The mean burst duration was the only spontaneous tail movement measurement that was not affected by the exposure to tritiated thymidine (data not shown).

3.2.3. Heart rate

Heart rate was measured in 3 dpf larvae exposed to 0, 170 $\mu\text{Gy/h}$ and 470 $\mu\text{Gy/h}$ of tritiated thymidine (Fig. 3). After exposure to tritiated thymidine at the lowest dose rate (22 $\mu\text{Gy/h}$, data not shown), no significant change was observed in the heart rate compared to the control. After exposure to the intermediate dose rate (170 $\mu\text{Gy/h}$), there were no significant changes in the heart rate, but a marginal increase was still observed ($p = 0.07$). Finally, after exposure to the highest dose rate (470 $\mu\text{Gy/h}$), a significant decrease in the heart rate was observed ($p < 0.01$).

3.3. Gene expression analysis

The gene expression analysis results are presented in Fig. 4. The number of dysregulated genes decreased when the tritiated thymidine dose rate increased. When embryos were exposed to the highest dose rate of tritiated thymidine (470 $\mu\text{Gy/h}$), the changes in gene expression were not significant. At 170 $\mu\text{Gy/h}$, a marginal of over-expression was observed for *casp9*, *cyp1a* and *sod2* ($p < 0.1$, 1.5 to 2.5-fold increase). Finally, embryos exposed to the lowest dose rate (22 $\mu\text{Gy/h}$) showed genes that were dysregulated, with all genes being overexpressed. Genes as *aanat2*, *baxa*, *bbc3*, *bcl2*, *cryba*, *ddb2*, *h2ax*, *mmp13*, *mpx* and *xpc* showed a marginal overexpression ($p < 0.1$, fold changes varying between 1.4 and 4.4), while genes as *ache*, *casp9*, *crx*, *cry5*, *cyp1a*, *efl1a*, *gstp1*, *hspp9*, *lyz*, *saga*, *sod2*, *tbpl1* and *xrcc1* were all significantly overexpressed ($p < 0.05$, fold changes between 1.4 and 4.4). Other genes as *atp1a1l*, *ee1a2*, *gadd45bb*, *oxt*, *per2* and *tmi2b.2* were also studied, but no significant variations were observed ($p > 0.1$, data not shown).

The same genes were also studied after 4 days of exposure, but no significant dysregulation was observed in the gene expression, for all three dose rates ($p > 0.1$, data not shown).

3.4. Oxidative stress measurements

The ROS production index measured in larvae after exposure to tritiated thymidine is presented in Fig. 5, as well as the fluorescence levels measured after exposure of the larvae to PMA. The ROS production index only significantly rose after the exposure to the intermediate dose rate (170 $\mu\text{Gy/h}$, $p = 0.001$). The basal fluorescence level (larvae only exposed to DMSO) and the stimulated fluorescence level (larvae exposed to PMA) were also analysed to obtain more information. The basal fluorescence level did not change with any of the tritiated thymidine dose rates ($p > 0.05$, data not shown), while the stimulated fluorescence level increased significantly after exposure to all three dose

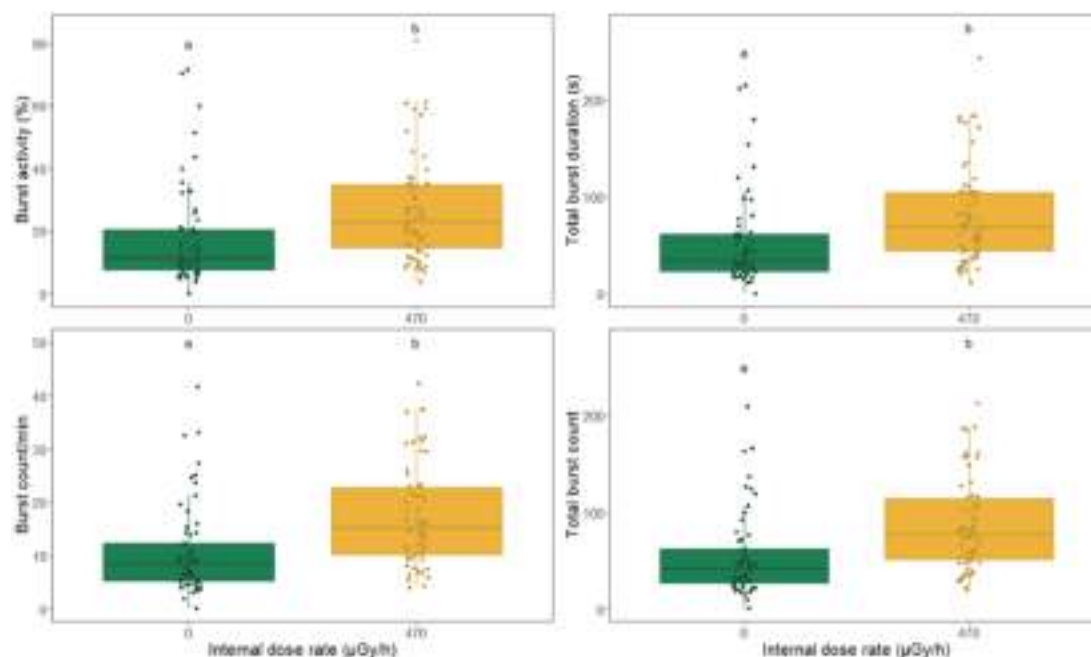


Fig. 2. Burst activity (%), total burst duration (s), burst count per minute and total burst count measured in control and contaminated zebrafish embryos (0 and 470 $\mu\text{Gy/h}$) after 24 h of exposure to tritiated thymidine. GLMM/LMM, $N = 60$, $a < b$, $p < 0.05$.

rates ($p < 0.01$). The stimulated level found in larvae exposed to 170 $\mu\text{Gy/h}$ was also greater to the one measured in larvae exposed to 22 $\mu\text{Gy/h}$ ($p < 0.01$).

4. Discussion

To assess tritiated thymidine effects on zebrafish development, hatching success, embryo and larva morphometry, as well as their spontaneous tail movements and heartbeat were studied. ROS production and expression of different genes of interest were also monitored.

This work showed that tritiated thymidine, while not causing a significant increase of the embryo-larval mortality, does affect the development of zebrafish. Indeed, the embryonic development seemed to be slowed down, even if this effect was only transient, with larvae being smaller after 3 days of exposure at the two lowest dose rates. These observations were expected, as radiations are known to have early effects on development, with zebrafish larvae being small after being irradiated for 24 h at a dose rate of 41.6 $\mu\text{Gy/h}$ of Cs-137 (Pereira et al., 2011). The only difference is that in the case of that study (Sassi-Messai et al., 2009), the effect increased with the dose rate, while in the present study, effects only increased up to the intermediate dose rate and no differences were found after exposure to the highest dose rate. More specifically, these observations have already been reported in the case of tritium, where zebrafish larvae exposed for 3 days to HTO presented smaller yolk sacs and shorter lengths after exposure to a dose rate of around 150 $\mu\text{Gy/h}$. These results show that tritiated thymidine might have a higher toxicity than HTO, considering this effect appeared at lower dose rate for organic form of tritium (Gagnaire et al., 2020b). However, the fact that the yolk sac was smaller in contaminated larvae compared to control ones does not match with a slower development. Indeed, if the embryo development was reduced, the yolk sac in irradiated embryos would be bigger than in the control, which is not the case here. Our results indicated that more yolk has been consumed by embryos after exposure while the development was not accelerated, leading to the hypothesis that the energy allowance is different after exposure, with more energy being allowed to possible metabolic

processes induced by the exposure, as the repair or renewing of damaged cells, as those processes have already been observed in individuals exposed to radiations (Gagnaire et al., 2017; Gagnaire et al., 2021; Arcanjo et al., 2020; Murat El Houdigui et al., 2019). Though, this change in the energy allowance seems to be reverted when the dose rate used in the exposure reached a high value: the individuals exposed to the highest dose rates seemed to develop at the same rate than the control ones, while still showing a delay in hatching. Considering that there is a strong relationship between ATP production and energy use, quantifying this production could help identify if this hypothesis is correct (Roy et al., 2021). This could, for example, be done by measuring the NADH_2 in zebrafish embryos and larvae, considering that this compound is strongly linked to the ATP production (Williams and Renquist, 2016). This could mean that, the contamination becoming too strong, the individuals stopped trying to fight its possible deleterious effects, their energy allowance thus returning to a control level.

The delay of the hatching is also in accordance with the development being slowed, and this effect has also already been observed after exposure to gamma radiations and tritium (Ferreira et al., 2023; Li et al., 2021; Pereira et al., 2011). In teleost fish, hatching is the result of the combination of two processes: the chorion digestion by two enzymes, the high- and low choriolytic enzymes (HCE and LCE), and the tearing of the egg membrane by the twisting of the embryo once the membrane has been digested (Frayse et al., 2006). The analysis of the spontaneous tail movements showed an increase of the burst activity, the burst duration and the burst count in the embryos exposed to the highest dose rate, while the exposure to the two lowest dose rates did not induce any changes. This result means that the hatching delay could result from a defect of the synthesis or efficiency of chorionases as the embryos either twisted in a similar way than the control ones, or even more than those. An analysis of the choriolytic enzymes synthesis or activity would thus help understand more about the mechanisms leading to the effect that was observed on the hatching kinetic. Regarding the increase in the burst activity, such effect has already been observed after exposure to gamma radiation at a dose rate of 5000 $\mu\text{Gy/h}$ but not at lower or higher dose rates, while this effect was not observed after exposure to HTO,

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

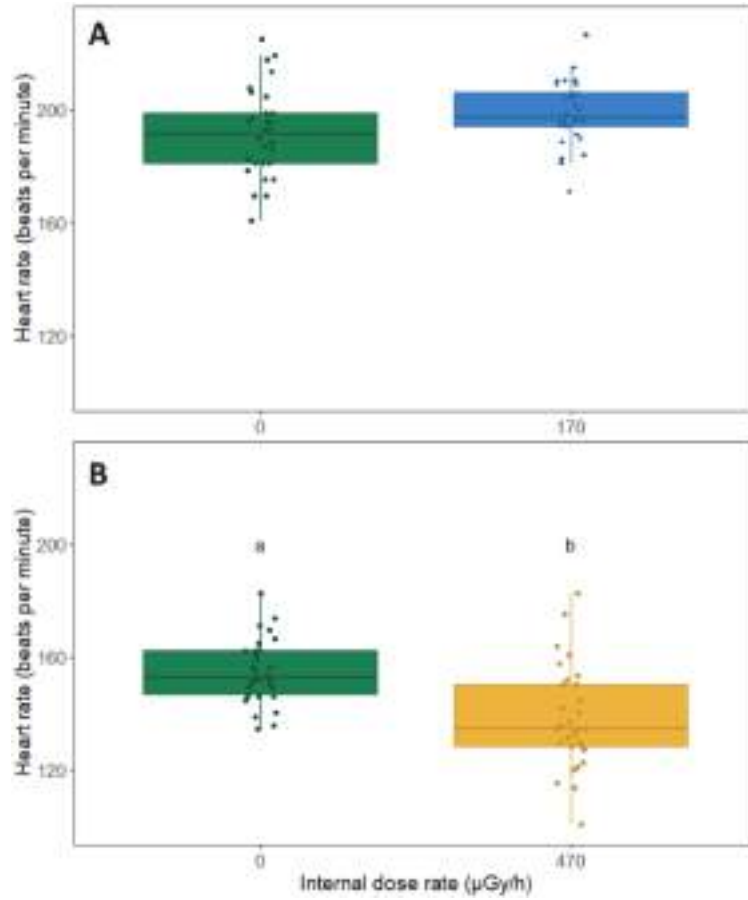


Fig. 3. Heart rate (BPM, $N = 30$) measured in control and contaminated 3 dpf zebrafish larvae (0, 170 $\mu\text{Gy/h}$, panel A and 470 $\mu\text{Gy/h}$, panel B) after three days of exposure to tritiated thymidine. GLMM/LMM, $a < b$, $p < 0.05$.

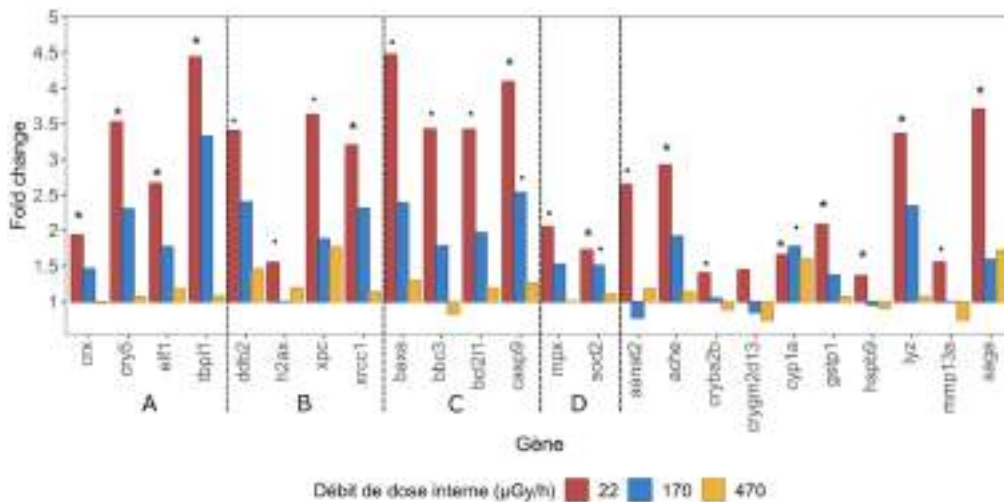


Fig. 4. Fold change in gene expression in comparison to controls of 24 different genes in 1 dpf fish embryos exposed for 24 h to tritiated thymidine (22, 170 and 470 $\mu\text{Gy/h}$). Genes studied are involved in different biological processes such as DNA binding (A), DNA repair (B), apoptosis (C) and response to the oxidative stress (D). Statistics: t -test and adjustment of the p -value using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate ($p < 0.1$; * $p < 0.05$ when comparing to the control).

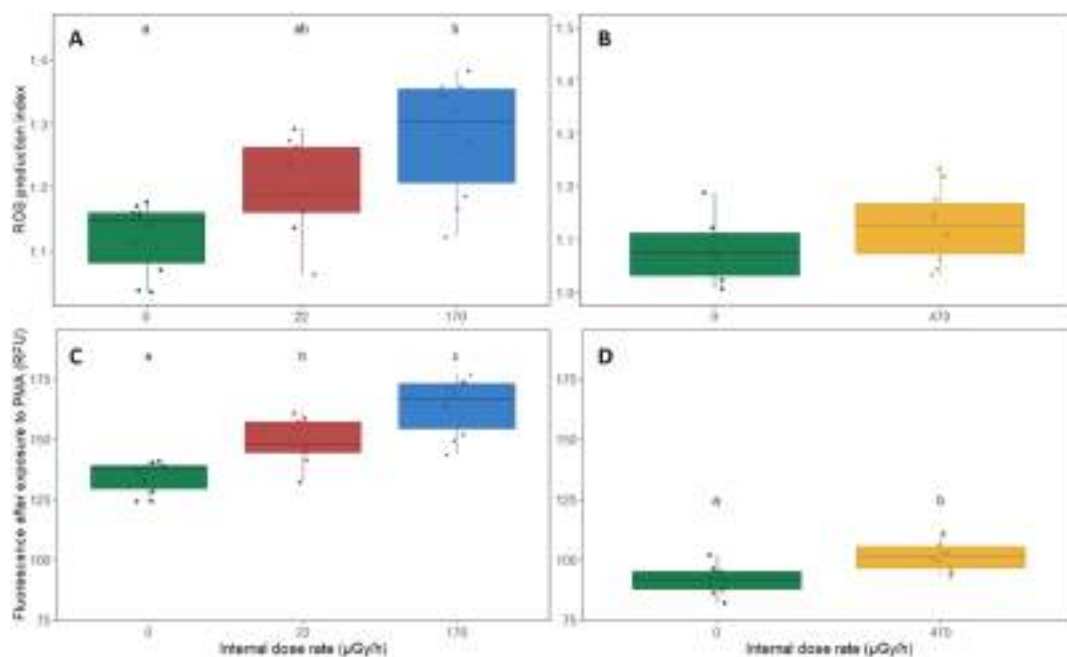


Fig. 5. ROS production index (panels A and B) and fluorescence measured after exposure to PMA (panels C and D) in control and contaminated zebrafish larvae (left panels: 22 and 170 $\mu\text{Gy/h}$, right panels: 470 $\mu\text{Gy/h}$) after 4 days of exposure to tritiated thymidine. ANOVA, $a < b < c$, $p < 0.05$. Each point represents a data point acquired during the experiment.

which means that in the case of this effect, tritiated thymidine seems to behave like gamma radiation, but at a lower dose rate (Arcanjo et al., 2020; Murat El Houdigui et al., 2019).

Exposure to the highest dose rate of tritiated thymidine led to a significant decrease of the heart rate. Even though the larvae were not smaller at this time point, this effect could indicate a delay in the development as it is known that in the case of zebrafish, the heart rate gradually increases with time (Arcanjo et al., 2020; Yang et al., 2016). The decrease of the heartbeat after exposure to a contaminant has already been observed after exposure to gamma radiations at a dose rate equivalent to the one used in this study (i.e. 500 $\mu\text{Gy/h}$), but also after exposure to some organic contaminants as butyl benzyl phthalate, propranolol, thifluzamide, and penconazole (Frayse et al., 2006; Icoğlu Aksakal and Ciltas, 2018; Yang et al., 2016; Sun and Liu, 2017). No other markers studied in this work can help understand the mechanisms lying under the appearance of such an effect, but as the cardiac development in zebrafish is quite a complex system, we could for example hypothesize that there was an issue during the development, or that the thyroid gland was affected by tritium, as it has an important role on the regulation of the heartbeat and is also one of the targets already identified in the case of radiations (Ferreira et al., 2023; Li et al., 2021; Glickman and Yelon, 2002; Scott and Sloman, 2004).

While this work highlighted different macroscopic effects that tritiated thymidine had on zebrafish in its early life stages, it also showed the presence of an increase in the ROS production and of a dysregulation of many genes. Such an increase of the ROS production has already been observed after exposure to radiation dose rates as low as 134 $\mu\text{Gy/h}$ (Cs-137), but also after exposure of fathead minnows to HTO and organic tritium (25 and 180 kBq/L) (Gagnaire et al., 2020a; Gagnaire et al., 2021). In a more general way, several studies reported that low-dose radiations had effects that have been associated with ROS production (Smith et al., 2012; Matsumoto et al., 2007). ROS are considered as being unstable and highly reactive compounds, including O_2^- or H_2O_2 , and these compounds are also considered as being able to induce oxidative stress and oxidative damage, which is thus in accordance with

the hypothesis that organic tritium could lead to the induction of oxidative stress in zebrafish (Ezraty et al., 2017). Though, considering that using H_2DCFDA as a probe only gives an indirect information on the H_2O_2 production, that means that our results only showed a part of the response to oxidative stress.

Regarding the gene expression measured after 24 h of exposure, the results indicated that there is a significant over-expression of the genes only after exposure to the lowest dose rate, while the exposure to the intermediate dose rate only led to a tendency towards the over-expression of a few genes, and the exposure to the highest dose rate led to no gene dysregulation. This result, alongside the absence of a significant increase in the ROS production index could, for example, highlight a decrease in the metabolic activity of the individuals. This discussion will only focus on the results observed after exposure to the lowest dose rate. The analysis of the genes being over-expressed ($p < 0.05$) or nearly overexpressed ($p < 0.1$) showed that many of those genes are involved in the same processes. For example, the apoptotic process (*baxa*, *bbc3*, *cas9*, *bcl2*), DNA binding (*cry5*, *crx*, *efl1*, *h2ax*, *tbpl1*) and repair (*cry5*, *ddb2*, *h2ax*, *xpc*, *xrcc1*) seem to be affected, as most of the genes involved in these processes and studied here are overexpressed (either significantly or only as a tendency). These observations are in accordance with results obtained in various studies that showed that processes linked to DNA synthesis or repair are easily affected by the exposure to tritium or other radionuclides, even if in most studies, the gene expression is also dysregulated in later development stages (e.g. 96 hpf) (Arcanjo et al., 2018; Parisot et al., 2015). This seems to indicate that DNA might be damaged as a result from the exposure, which was expected considering the fact that it has been shown that a significant portion of the tritium ends up bound to the DNA (Schiano Di Lombo et al., 2023). However, no conclusions can be drawn concerning DNA integrity since DNA damage was not experimentally measured in the present study. Besides, two genes, *mpx* and *sod2*, involved in the regulation of oxidative stress were also upregulated, confirming that there might be ROS overproduction in zebrafish embryos following tritiated thymidine exposure. This would also be in accordance with different

studies where genes involved in the oxidative stress regulation were overexpressed after exposure to HTO (Gagnaire et al., 2020b; Arcanjo et al., 2018). In contrast, it differs with the downregulation of the *mpx* gene that was observed in zebrafish embryos and larvae after being irradiated at a dose rate of 1240 $\mu\text{Gy/h}$ (Cs-137), thus showing that tritiated thymidine might behave more like HTO, even though all genes showed dysregulation at low dose rates only, which was not the case after exposure to HTO. (Gagnaire et al., 2021; Arcanjo et al., 2018).

5. Conclusion

The toxicity of tritiated thymidine on early life stages at different biological levels was investigated herein. While this study reported that tritiated thymidine did not induce any significant mortality, it was also shown that it can affect zebrafish embryo-larval development in different ways. Indeed, organic tritium affected hatching kinetic, with hatching being delayed and a transient decrease in the development kinetics. Those developmental effects were observed at all dose rates tested, even though the nature of the effect depended on the tritiated thymidine activity concentration. This work also showed an increase in the ROS production levels after four days of exposure. This study also highlighted a dysregulation of many genes after one day of exposure, even if the latter was only transient, as no effect were observed after four days of exposure and after exposure to greater dose rates. The dysregulated genes are involved in different cellular processes, *i.e.*, development, oxidative stress, DNA repair and apoptosis. It confirms that tritium does have an effect on zebrafish individuals at different molecular scales and, more specifically, on various molecular targets and processes. Linking all the results presented in this paper is not possible, as the investigation of other markers as, for example, the protein levels, would be needed to do so. The study of other biological markers, as the protein expression, is also considered necessary to confirm the gene dysregulation results presented in this paper. This study does not highlight any specific toxic effects arising from the exposure to tritium in its organic phase. As the experimental design of this study limited the exposure length to four days, later development stages could not be studied. Those stages should be the focus of a later study to confirm the results presented in this paper. The study of the same toxicity markers and other ones, as for example carcinogenic effects or reproductive behaviour, could also give more information on tritiated thymidine toxicity and possible specific effects.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to thank IRSN for funding this project, as well as Pierre Techer for his help in the experiments and Elsa Cantabella and Olivier Simon for their help with the animal care. The authors would also like to thank Daniel Orjollet for his help with the liquid scintillation measurements.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.aquatox.2023.106766](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106766).

References

- Adam-Guillermin C., Pereira S., Cavalié I., Orjollet D. *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 GGPEnvironnement, Fich V1-102)*; 2012.
- Arcanjo, C., Armant, O., Floriani, M., et al., 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>.
- Arcanjo, C., Maro, D., Camilleri, V., et al., 2019. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages: importance of rapid isotopic exchange. *J. Environ. Radioact.* 203, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.02.009>.
- Arcanjo, C., Adam-Guillermin, C., Murat El Houdigui, S., et al., 2020. Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae: a new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species. *Aquat. Toxicol.* 219, 105384 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105384>.
- Arcanjo, C., Frelon, S., Armant, O., et al., 2023. Insights into the modes of action of tritium on the early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*, using transcriptomic and proteomic analyses. *J. Environ. Radioact.* 261, 107141 <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2023.107141>.
- ASN. *Livre Blanc Du Tritium*; 2010. <https://www.asn.fr/sites/tritium/>.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.-F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>.
- Ferreira, M.F., Turner, A., Vernon, E.L., et al., 2023. Tritium: its relevance, sources and impacts on non-human biota. *Sci. Total Environ.* 876, 162816 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162816>.
- 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 (2), 253–267. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.015>.
- Gagnaire, B., Cavalié, I., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2013. Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification, and defence parameters of zebrafish *Danio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64 (1), 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9814-z>.
- Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., et al., 2015. 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., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., et al., 2017. 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., Gosselin, I., Festarini, A., et al., 2020a. Effects of *in vivo* exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (4), 3612–3623. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3781-5>.
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., et al., 2020b. Tritiated water exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): effects on the early-life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 39 (3), 648–658. <https://doi.org/10.1002/etc.4650>.
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., et al., 2021. Effects of gamma ionizing radiation exposure on *Danio rerio* embryo-larval stages - comparison with tritium exposure. *J. Hazard. Mater.* 408, 124866 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124866>.
- Glickman, N.S., Yelon, D., 2002. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13 (6), 507–513. <https://doi.org/10.1016/S1084952102001040>.
- İcoğlu Aksakal, F., Ciltas, A., 2018. Developmental toxicity of penconazole in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere* 200, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.094>.
- IRSN. Tritium et environnement. Published online 2014.
- 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 (1), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.033>.
- 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 Toxicol Environ Mutagen* 586 (1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.05.008>.
- Kim, S.B., Olfert, J., Baglan, N., et al., 2015. Canadian inter-laboratory organically bound tritium (OBT) analysis exercise. *J. Environ. Radioact.* 150, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.08.021>.
- Li, S., Zhang, Y., Xue, H., et al., 2021. Integrative effects based on behavior, physiology and gene expression of tritiated water on zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 225, 112770 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112770>.
- Matsumoto, H., Hamada, N., Takahashi, A., Kobayashi, Y., Ohnishi, T., 2007. Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 48 (2), 97–106. <https://doi.org/10.1269/jrr.06090>.
- Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Loro, G., et al., 2019. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. *Sci. Rep.* 9 (1), 20241. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w>.
- Parisot, F., Bourdineaud, J.-P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquat. Toxicol.* 163, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002>.

– E.3. Article 3 : "Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

M. Schiano Di Lombo et al.

Aquatic Toxicology 265 (2023) 106766

- Pei, D-S, Strauss, P.R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 743-744, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.10.003>.
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., et al., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (12), 2831–2837. <https://doi.org/10.1002/etc.695>.
- Roy, A.L., Mazué, G.P.F., Metcalfe, N.B., Seebacher, F., 2021. Diet and temperature modify the relationship between energy use and ATP production to influence behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecol. Evol.* 11 (14), 9791–9803. <https://doi.org/10.1002/ece3.7806>.
- Rozhko, T.V., Nogovitsyna, E.I., Badun, G.A., Lukyanchuk, A.N., Kudryasheva, N.S., 2019. Reactive oxygen species and low-dose effects of tritium on bacterial cells. *J. Environ. Radioact.* 208-209, 106035 <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106035>.
- Sassi-Messai, S., Gibert, Y., Bernard, L., et al., 2009. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PLoS ONE* 4 (3), e4935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004935>.
- Schiano Di Lombo, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Perrot, Y., Gagnaire, B., 2023. Tritiated thymidine internalization in zebrafish early life stages: joint use of experimental procedures and microdosimetry. *Radiat. Res.* 199 (4), 373–384. <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00157.1>.
- 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 (5), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68 (4), 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>.
- Smith, J.T., Willey, N.J., Hancock, J.T., 2012. Low dose ionizing radiation produces too few reactive oxygen species to directly affect antioxidant concentrations in cells. *Biol. Lett.* 8 (4), 594–597. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0150>.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83 (1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.
- Sun, G., Liu, K., 2017. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 192, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.020>.
- Westerfield M. *The Zebrafish book : a guide for the laboratory use of Zebrafish Danio (Brachydanio) Rerio.*; 1993.
- Williams, S.Y., Renquist, B.J., 2016. High throughput *Danio Rerio* energy expenditure assay. *J. Vis. Exp. JoVE* (107). <https://doi.org/10.3791/53297>.
- Yang, Y., Qi, S., Wang, D., et al., 2016. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *J. Hazard. Mater.* 307, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.055>.

Supplementary Information**Table S1.** Genes chosen for the Real Time PCR Analysis and their corresponding Assay IDs. All genes were chosen by using the gene library provided by ThermoFisher.

Gene Name	Assay_ID
<i>aanat2</i>	Dr03432880_m1
<i>ache</i>	Dr03093481_m1
<i>atp2a1l</i>	Dr03085336_m1
<i>baxa</i>	Dr03432977_m1
<i>bbc3</i>	Dr03168831_s1
<i>bcl2l1</i>	Dr03080274_m1
<i>casp9</i>	Dr03121787_m1
<i>crx</i>	Dr03131743_m1
<i>cry5</i>	Dr03138452_m1
<i>cryba2b</i>	Dr03160512-m2
<i>crygm2d13</i>	Dr03426056_gH
<i>cyp1a</i>	Dr03112444_m1
<i>ddb2</i>	Dr03429621_m1
<i>eef1a2</i>	Dr03076192_m1
<i>elf1</i>	Dr03118707_m1
<i>gadd45bb</i>	Dr03083476_m1
<i>gstp1</i>	Dr03118988_m1
<i>h2ax</i>	Dr03145737_s1
<i>hspb9</i>	Dr03436228_s1
<i>lyz</i>	Dr03099437_m1

E. AXE 2 : TOXICITE DE LA THYMIDINE TRITIEE : DE LA MOLECULE A L'INDIVIDU

– E.3. Article 3 : "Trititated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*)"

<i>mmp13a</i>	Dr03438515_g1
<i>mpx</i>	Dr03075659_m1
<i>oxt</i>	Dr03112593_m1
<i>per2</i>	Dr03093697_m1
<i>plekhs1</i>	Dr03093697_m1
<i>saga</i>	Dr03435203_m1
<i>sod2</i>	Dr03100019_m1
<i>tbpl1</i>	Dr03088430_m1
<i>tnni2b.2</i>	Dr03111539_g1
<i>xpc</i>	Dr03148843_m1
<i>xrcc1</i>	Dr03115324_m1

E.4. Discussion

La première information mise en évidence par cette étude est un retard d'éclosion après exposition à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. L'éclosion des embryons de poisson zèbre est le résultat de deux processus :

- La synthèse d'enzymes choriolytiques : leur production, entre autres liée au processus de respiration, permet de digérer le chorion de l'individu, le rendant ainsi plus facilement cassable, mais aussi moins épais (Frayssse et al., 2006; Kim et al., 2005; Osman et al., 2007),
- Les mouvements de l'embryon dans l'œuf : ces mouvements spontanés apparaissent à l'âge de 18 hpf et deviennent de plus en plus fréquents jusque 28 hpf, âge à partir duquel la fréquence des mouvements diminue. Ce sont ces mouvements qui permettent, une fois le chorion fragilisé par les chorionases, l'éclosion de l'œuf (Drapeau et al., 2002; Frayssse et al., 2006; Melançon et al., 1997; Saint-Amant, 2006).

Afin de comprendre quelle part du processus d'éclosion est impactée par l'exposition à la thymidine tritiée, il est nécessaire d'étudier d'autres marqueurs de toxicité : ici la croissance des individus, les mouvements spontanés des embryons, et le rythme cardiaque de la larve, car tous ces marqueurs permettent de se renseigner sur le développement du poisson zèbre. D'autant plus, considérant que l'éclosion n'est qu'un marqueur préliminaire de toxicité, compléter l'étude de ce marqueur par celle d'autres marqueurs (tels que ceux présentés au-dessus) est nécessaire (Bourrachot et al., 2008). Il est également nécessaire de considérer le fait que le chorion agit comme une protection contre plusieurs contaminants, ce qui signifie qu'un retard d'éclosion pourrait donc être une réponse liée à une protection prolongée de l'individu (Brinkman and Hansen, 2007; Dave and Xiu, 1991; Frayssse et al., 2006; González-Doncel et al., 2003; Grierson and Neville, 1981; Stehr and Hawkes, 1979). La mesure de l'activité des embryons dans leur chorion, quant à elle, indique que le mouvement des individus n'est pas le processus qui justifie le retard d'éclosion. En effet, si c'était le cas, l'activité

et la fréquence de mouvements seraient plus faibles, et ce dès le débit de dose absorbée intermédiaire (170 $\mu\text{Gy/h}$). Cela semble donc indiquer que c'est la synthèse des enzymes choriolytiques, ou leur efficacité, qui est impactée par l'exposition à la thymidine tritiée.

Le suivi de la croissance des individus met en avant un retard temporaire du développement, mais également l'absence de malformations. Il semblerait donc que seule la cinétique de développement soit impactée par l'exposition à la thymidine tritiée. Il est également important de mettre en avant que ce retard de développement n'est pas induit par l'utilisation d'une quantité de réserve vitelline plus faible par l'individu, étant donné que la vésicule vitelline de ces derniers est soit de taille similaire, soit plus petite que celle des individus non contaminés. Cela pourrait donc indiquer une plus grande consommation d'énergie par les individus contaminés au débit de dose absorbée intermédiaire, avec la possibilité qu'une part significative d'énergie soit utilisée afin d'éliminer le tritium de l'organisme, ou afin de lutter contre les effets toxiques causés par cette exposition (Arcanjo et al., 2020; Gagnaire et al., 2017, 2021; Murat El Houdigui et al., 2019). L'étude des mouvements spontanés de l'embryon et du rythme cardiaque des larves après 24 et 72 heures d'exposition, respectivement, permet également de caractériser la toxicité développementale de la thymidine tritiée. Pour ces deux marqueurs, les seules différences significatives sont observées au débit de dose absorbée le plus élevé (470 $\mu\text{Gy/h}$), seul débit de dose absorbée n'ayant pas d'impact au niveau développemental d'après les mesures de taille. En effet, l'activité des embryons est significativement plus élevée chez les individus les plus contaminés, alors que leur rythme cardiaque est significativement plus faible au stade larvaire. Les résultats de l'activité cardiaque ne correspondent pas aux résultats indiqués par les mesures de taille et ne peuvent donc pas être justifiés par ces derniers. En effet, le rythme cardiaque du poisson zèbre augmente au fur et à mesure de son développement (Arcanjo et al., 2020; Yang et al., 2016b). Si cette diminution du rythme cardiaque était liée à un retard de développement, un effet devrait être observé au niveau de la morphométrie des individus et, par conséquent, les larves mesurées après expo-

sition à 470 $\mu\text{Gy/h}$ seraient plus petites que les larves témoins. Le fait que les larves contaminées aient une taille similaire aux larves témoins semble donc indiquer que la thymidine tritiée impacte le rythme cardiaque par le biais d'un autre mécanisme.

Les résultats expérimentaux indiquent une augmentation de l'indice de production des ROS, mais également une augmentation de la fluorescence mesurée dans le cas des larves stimulées à l'aide du composé PMA. Ces résultats, en premier lieu, indiquent une augmentation de la production de H_2O_2 . Ce composé est une des principales sources d'espèces réactives de l'oxygène mais, comparé à d'autres espèces telles que le O_2^- (ion superoxyde) ou le HO^\cdot (radical hydroxyl), elle n'est pas un radical mais un composé électriquement neutre (Azzam et al., 2012; Barillet et al., 2007; Circu and Aw, 2010). L'augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène peut mener à une augmentation du stress oxydant, et cette augmentation peut mener à des dommages au niveau cellulaire, mais aussi à l'apoptose quand les dommages sont considérés comme étant irréparables (Azzam et al., 2012; Circu and Aw, 2010; Gagnaire et al., 2020a; Han et al., 2014; Lee and Steinert, 2003; Pei and Strauss, 2013). Ces processus biologiques, ainsi que les processus de réparation des dommages à l'ADN, de maintenance de l'intégrité cellulaire, du rythme circadien, mais également du développement et plus précisément du développement oculaire sont des processus qui ont été étudiés à l'aide de l'étude de l'expression des gènes. La présente étude indique que la surexpression génique est uniquement transitoire, considérant qu'elle apparaît uniquement après exposition des individus aux deux plus faibles débits de dose absorbée, mais également seulement après 24 heures d'exposition. Parmi les gènes surexprimés, les gènes *bax*, *bbc3*, *casp9* et *bcl2* sont des gènes impliqués dans l'apoptose, alors que les gènes *crx*, *cry5*, *efl1a*, *h2ax* et *tbpl1* sont intégrés dans la synthèse et l'intégrité de l'ADN, et les gènes *cry5*, *ddb2*, *h2ax*, *xpc* et *xrcc1* sont liés à la réparation des dommages à l'ADN. Ces résultats concordent avec les résultats présentés dans le chapitre précédent, ces derniers indiquant une augmentation significative des dommages à l'ADN. Cependant, il reste important de considérer que

plusieurs différences restent observables, étant donné que les dommages à l'ADN sont observables à tous les débits de dose absorbée (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$) et après tous les temps d'exposition (1 et 4 jours d'exposition), alors que la surexpression de ces gènes n'est observable qu'après 1 jour d'exposition au débit de dose absorbée le plus faible. D'autres gènes, tels que *mpx* et *sod2* sont impliqués dans la régulation du stress oxydant, ce qui semble indiquer que la surproduction de peroxyde d'hydrogène entraîne du stress oxydant. Pour finir, les gènes *aanat2* et *cry5*, également surexprimés, sont impliqués dans le rythme cicardien, alors que plusieurs gènes surexprimés sont également impliqués dans la perception visuelle et le développement de l'œil (*aanat2*, *crx*, *cryba2b*).

A retenir

- L'exposition des embryons de poisson zèbre à 22 $\mu\text{Gy/h}$ pendant 24 heures entraîne une surexpression de gènes impliqués dans le développement, la lutte contre le stress oxydant, l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN.
- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à la thymidine tritiée entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène dans les cellules des individus.
- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre entraîne un ralentissement temporaire du développement à 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$ et un retard de l'éclosion à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$.
- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 24 et 72 heures entraîne une augmentation des mouvements spontanés des embryons dans leur chorion et un ralentissement du rythme cardiaque des larves, respectivement.

Hypothèses

- Par le biais de la formation du peroxyde d'hydrogène, la thymidine tritiée entraîne l'induction du stress oxydant chez les larves exposées à la thymidine tritiée.
- La thymidine tritiée entraîne un dysfonctionnement du système endocrinien, entraînant ainsi l'hyperactivité et la diminution du rythme cardiaque observées chez les embryons et larves exposés à 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée, respectivement.
- La thymidine tritiée affecte le métabolisme des embryons et larves de poisson zèbre, avec une plus grande consommation d'énergie, mais également une diminution de l'énergie allouée à la croissance.

Cet axe du doctorat permet de mettre en évidence que des effets toxiques sont observables à plusieurs niveaux d'organisation biologique, de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle. De plus, la diversité des effets observés confirme la nécessité d'étudier la toxicité de la thymidine tritiée à plusieurs niveaux d'organisation biologique. Les atteintes observées au niveau des gènes impliqués dans la perception visuelle pourraient avoir des conséquences négatives sur le comportement des individus, ces dernières pouvant, sur le long terme, entraîner des effets délétères au niveau de la population, avec par exemple un déséquilibre de la prédation, de la fuite, de la recherche de nouveaux habitats, mais également de la reproduction (Drapeau et al., 2002; Little and Finger, 1990; Von Westernhagen, 1988). Pour cette raison, l'étude des atteintes comportementales a été étudiée et est présentée dans le chapitre suivant.

F. AXE 2 : EFFETS DE LA THYMIDINE TRITIÉE SUR LE COMPORTEMENT NATATOIRE DES LARVES DE POISSON ZÈBRE

F.1. Objectifs de l'axe

Cette étude s'inscrit dans le deuxième axe de la thèse. Elle vise à caractériser les effets de faibles débits de dose absorbée (22, 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$) de tritium sous forme organique sur le comportement du poisson zèbre. Cette étude a été mise en place avec deux sous-objectifs. Le premier est d'étudier le comportement des larves, après quatre jours d'exposition à la thymidine tritiée, lorsque ces dernières se trouvent dans des conditions considérées comme non stressantes (*i.e.*, dans des conditions similaires à la condition témoin, dans l'obscurité). Le second est d'étudier la réaction des individus à deux facteurs de stress : l'alternance brutale entre la luminosité et l'obscurité, ainsi qu'une vibration se propageant dans le milieu. *In fine*, l'objectif est de pouvoir lier les résultats obtenus dans le cadre de cette étude aux résultats présentés dans les deux chapitres précédents, et de les comparer aux résultats déjà obtenus après exposition d'embryons et larves de poisson zèbre au tritium libre et au césium (^{137}Cs).

F.2. Matériel et méthodes

F.2.1. Enregistrement des mouvements des individus

Toutes les analyses comportementales ont été réalisées dans l'appareil DanioVision (Noldus, Hollande). L'eau circulant dans l'appareil a été réglée à 28 °C à l'aide de l'unité de contrôle de température DanioVision (DanioVision Temperature Control Unit, Noldus). Les larves (48 par condition), âgées de 99 hpf (*i.e.*, exposées pendant quatre jours) au moment de l'analyse, ont été individuellement disposées dans des plaques de 24 puits, et leur milieu a été remplacé par 2 mL de milieu embryon (60 mg/L d'Instant Océan dans l'eau Milli-Q, (Westerfield, 1993)). Toutes les analyses ont été réalisées entre 13 h et 16 h et toutes les conditions utilisées au cours de l'expérience étaient représentées dans la même plaque afin que l'heure d'enregistrement des vidéos n'influence pas les résultats obtenus. Les vidéos ont été enregistrées et traitées grâce au logiciel EthoVision XT16 (Noldus) et ont permis de mesurer la distance parcourue par les individus, ainsi que leur vitesse de nage.

La figure F.1 représente une version simplifiée du protocole utilisé dans le cadre des analyses comportementales. Les trois marqueurs mesurés sont représentés et numérotés sur cette figure et leur protocole est individuellement développé dans la suite de cette partie.

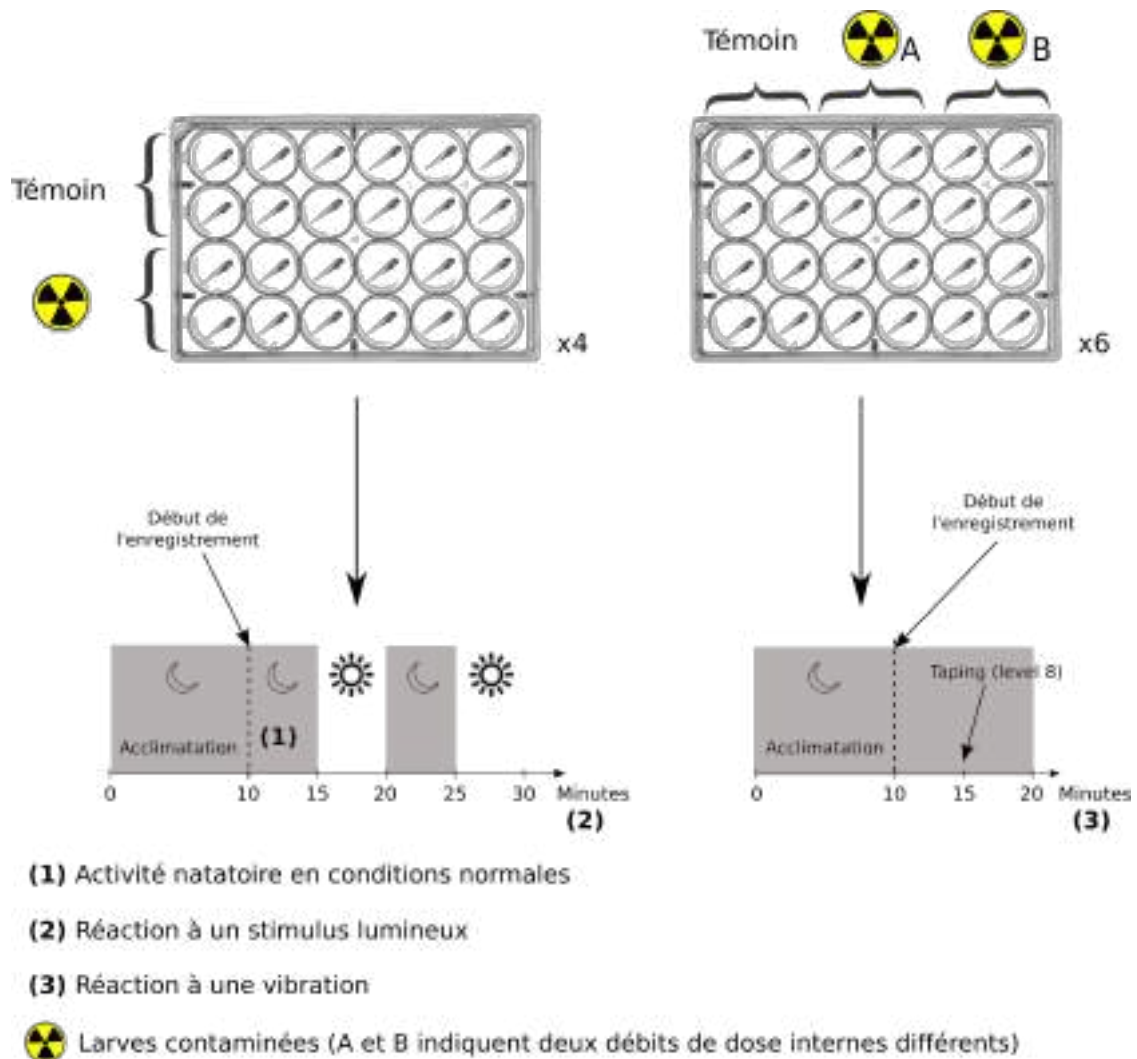


FIGURE F.1. – Représentation simplifiée du protocole de mesure comportementale. Trois marqueurs sont mesurés chez les larves exposées pendant 4 jours : l'activité natatoire en conditions normales d'exposition (1), la réaction à un stimulus lumineux (2) et la réaction à une vibration (3). Ils seront tous les trois développés dans le texte, chacun dans une partie différente.

F.2.2. Mesure de l'activité natatoire en conditions normales d'exposition

Ce protocole correspond à la mesure (1) représentée dans la Figure F.1. Dans le cas de cette mesure, trois expériences distinctes ont été réalisées, soit une par débit de dose absorbée.

Afin d'obtenir plus d'informations sur les effets du tritium organique sur l'activité natatoire du poisson zèbre, il est nécessaire d'étudier son comportement dans des conditions n'induisant pas de stress. Pour cette raison, l'activité natatoire des larves a été mesurée après 10 minutes d'acclimatation réalisées dans l'appareil, dans des conditions similaires à celles de l'exposition (*i.e.*, à l'obscurité, luminosité réglée à 0 %). L'enregistrement vidéo était d'une durée de 5 minutes, dans l'obscurité également. Le choix de l'obscurité pour la condition non stressante est basée sur la littérature, où il a été décrit que la présence de lumière induisait une baisse dans l'activité natatoire des larves de poisson zèbre (MacPhail et al., 2009). La distance parcourue pendant 5 minutes par les individus contaminés et non contaminés est la variable qui a été exportée des enregistrements. Elle permet d'avoir une vision globale du comportement des larves sur cette période de temps.

F.2.3. Mesure de la réaction à un stimulus lumineux

Le protocole présenté dans cette partie correspond à la mesure (2) représentée sur la Figure F.1. Cette mesure a été réalisée au cours des mêmes expériences que la mesure de l'activité natatoire basale. En effet, la mesure de l'activité basale des individus correspond aux cinq premières minutes d'enregistrement, alors que la mesure de la réaction à un stimulus lumineux correspond à la totalité de l'enregistrement (*i.e.*, 20 minutes).

Comme indiqué dans la partie précédente, l'intensité lumineuse a un effet sur l'activité natatoire du poisson zèbre (MacPhail et al., 2009). Pour cette raison, il est considéré qu'un changement brusque d'intensité lumineuse, soit le passage de l'obscurité à la lumière ou inversement, a la capacité d'induire un stress chez les individus. Il a été choisi d'étudier la réaction des larves de poisson zèbre à ce dernier. Pour ce faire, un enregistrement de 20 minutes a été réalisé suite à 10 minutes d'acclimatation dans le DanioVision et dans l'obscurité. Ces 20 minutes étaient divisées en quatre séquences : une première période de "Nuit" (sans lumière, intensité 0 %) de 5 minutes, correspondant à l'enregistrement utilisé pour la mesure de la nage basale des indi-

vidus, une première période de "Jour" (avec lumière, intensité 100 %) de 5 minutes, puis d'une seconde période de "Nuit" et d'une seconde période de "Jour", chacune de 5 minutes. Tous les changements d'intensité lumineuse ont été réalisés grâce à la lampe LED présente à l'intérieur du DanioVision, qui est contrôlée automatiquement par le logiciel EthoVision XT16. Dans le cadre de cette mesure, deux variables ont été mesurées :

- La distance parcourue par les individus pendant chaque période de 5 minutes. L'utilisation de cette variable permet d'avoir une vision globale du comportement des larves face aux différentes intensités lumineuses.
- La réponse de fuite, et donc la réponse au stress, initiée au moment où la lumière s'éteint (*i.e.*, au moment de la transition entre le Jour 1 et la Nuit 2). Deux calculs ont été réalisés :

- l La différence de distance parcourue par les individus pendant la première minute de Nuit 2 et la dernière minute de Jour 1. Cette mesure permet d'étudier la réaction immédiate des larves lors de l'extinction brutale de la lumière. Si le delta de la distance est positif, cela signifie que les individus ont initié un comportement de fuite.

- l La différence entre les distances parcourues pendant la Nuit 2 et le Jour 1. Cette mesure permet de vérifier si une modification de la réponse de fuite est de courte ou de longue durée. Par exemple, si la réponse de fuite mesurée par le delta présenté plus haut est différente chez les individus contaminée, mais qu'aucune différence n'est observée sur ce delta, cela signifie que l'atteinte comportementale est temporaire.

Par exemple, dans le cas d'une réponse significative sur le test statistique précédent et d'une réponse non significative sur cette mesure, l'atteinte comportementale n'est que temporaire.

F.2.4. Mesure de la réaction à une vibration

Ce protocole correspond à la mesure (3) représentée sur la Figure F.1. Ce dernier a été utilisé dans le cadre d'expériences différentes de celles présentées dans la partie précédente. Pour cette mesure, deux expériences différentes ont été réalisées : une première avec les individus non contaminés et les deux débits de dose absorbée les plus faibles (22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$), et une seconde avec les individus non contaminés, issus d'un autre lot de poissons, et le débit de dose absorbée le plus élevé (470 $\mu\text{Gy/h}$).

Comme indiqué dans l'introduction (*cf.*, Objectifs de la thèse, partie B.2.4.4), l'apparition soudaine de vibrations dans le milieu peut induire un stress chez les larves de poisson zèbre. Dans le cadre de la mesure de la réaction des larves de poisson zèbre à ce dernier, un enregistrement de 10 minutes a été réalisé après une période d'acclimatation de 10 minutes. L'acclimatation et l'enregistrement ont été réalisés à l'obscurité afin de ne pas induire de stress supplémentaire chez les larves. Le stimulus a été mis en place par le biais d'un marteau qui frappait le support de la microplaque, et le fonctionnement de ce marteau est automatisé à l'aide du logiciel EthoVision XT16. Dans le cadre de cette expérience, le bras mécanique a tapé une fois contre la microplaque après cinq minutes d'enregistrement, soit quinze minutes après le début de l'acclimatation. Deux variables ont été mesurées :

- La différence entre la vitesse de nage une seconde après le stimulus et une seconde avant ce dernier. Cette mesure permet une évaluation de la réaction instantanée de l'individu à la vibration, et ainsi de la réaction au stress induit par ce dernier.
- La vitesse maximale atteinte par l'individu dans la seconde suivant le stimulus. Cette mesure permet d'avoir une évaluation plus précise du comportement de la larve face au stress induit par la vibration. En effet, cela permet d'observer si la réponse des larves exposées est différente en intensité est en durée de celle des témoins.

F.3. Résultats

F.3.1. Activité de nage à l'obscurité

La Figure F.2 représente la distance parcourue par les larves exposées pendant 96 heures aux trois débits de dose absorbée utilisés. Comme indiqué sur cette dernière, l'exposition des larves de poisson zèbre à 22 $\mu\text{Gy/h}$ n'affecte pas l'activité natatoire des larves dans des conditions considérées comme non stressantes. Cependant, après exposition des individus à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$, des différences d'activité natatoire sont observées. Après exposition au débit de dose absorbée intermédiaire, la distance parcourue par les individus augmente (augmentation de 53 %, $p = 0,01$), alors qu'après exposition au débit de dose absorbée maximal, la distance parcourue pendant les cinq minutes de mesure diminue (diminution de 84 %, $p = 0,01$).

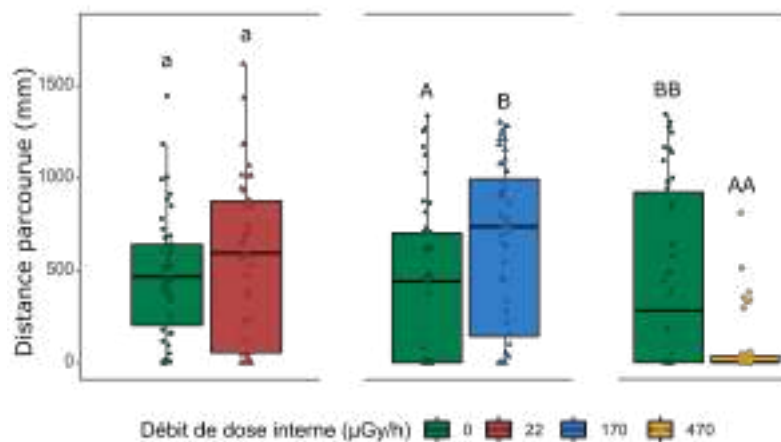


FIGURE F.2. – Distance parcourue par les individus témoins et contaminés à l'obscurité ($n = 48$) pendant les cinq premières minutes suivant l'acclimatation. Chaque boxplot vert correspond au témoin d'une expérience différente, le débit de dose absorbée correspondant est celui présenté directement à droite du témoin. $A < B$ et $AA < BB$, GLMM, $p < 0,05$.

F.3.2. Réaction à un stimulus lumineux

La Figure F3 représente la distance parcourue par les individus exposés aux trois débits de dose absorbée pendant quatre périodes de cinq minutes correspondant à différentes conditions lumineuses (Nuit - Jour - Nuit - Jour). Comme attendu, les larves nagent plus à l'obscurité qu'en condition lumineuse. Les différences significatives observées pendant la période Nuit 1 dans le cas des expositions aux débits de dose absorbée de 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$ ont déjà été présentées dans la partie précédente. Lors de la Nuit 2, les individus préalablement exposés à 22 $\mu\text{Gy/h}$ nagent significativement moins que les témoins. La diminution de la distance parcourue est de 25 % ($p = 0,01$). Ceux exposés à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$ ne présentent pas de différence significative de comportement natatoire par rapport à leur témoin respectif.

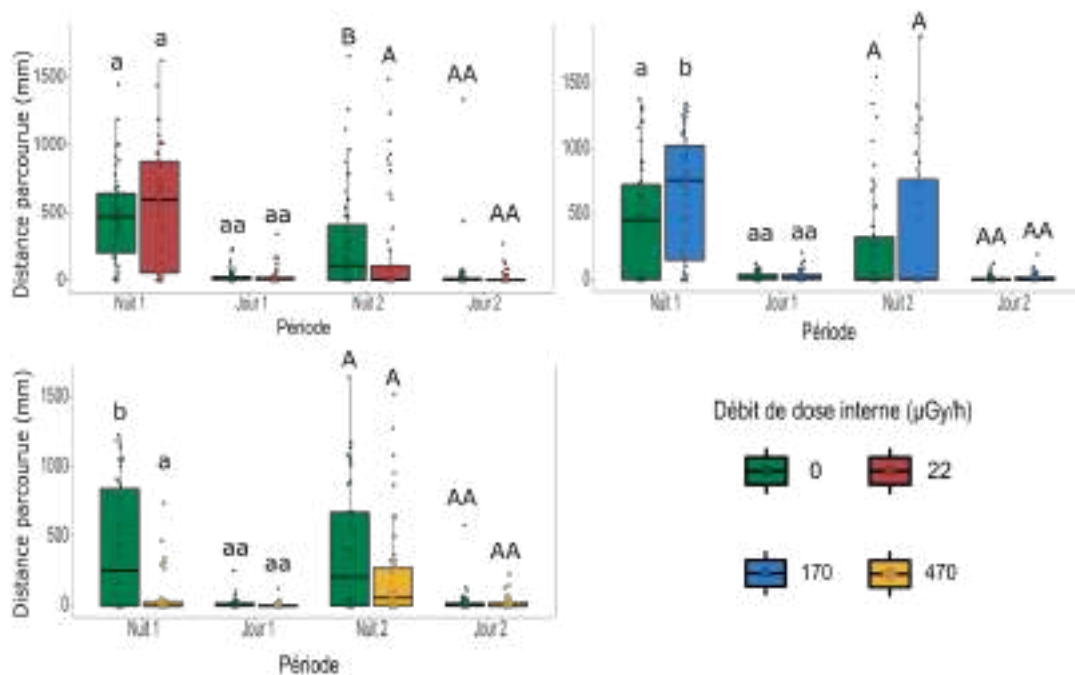


FIGURE F.3. – Distance parcourue par les individus témoins et contaminés ($n = 48$) pendant toute l'expérience 1. Chaque période d'illumination ou d'obscurité durait 5 minutes. Chaque boxplot vert correspond au témoin d'une expérience différente, le débit de dose absorbée correspondant est celui présenté directement à droite du témoin. $a < b$ et $A < B$, GLMM, $p < 0,05$.

La Figure F4 représente la réaction des individus en réponse à la diminution soudaine de luminosité. Dans le cas des larves témoins comme dans le cas des larves contaminées, la différence de distance parcourue (dans les cas d'une et de cinq minutes) est positive, ce qui correspond au résultat attendu. Ces deux temps d'analyse permettent de déterminer si la différence de réaction à l'extinction de la lumière est transitoire ou permanente. Les résultats présentés indiquent que dans le cas des larves exposées à 22 $\mu\text{Gy/h}$, la différence de distance parcourue entre la Nuit 2 et le Jour 1 n'est significative qu'entre la première minute de la Nuit 2 et la dernière du Jour 1 (diminution de 68 %, $p = 0,03$). Dans le cas où les dix minutes d'enregistrement sont prises en considération dans l'analyse, aucune différence significative n'est visible (diminution de 29 %, $p = 0,33$). Dans le cas des individus exposés à 470 $\mu\text{Gy/h}$, la seule différence significative est dans le cas où les dix minutes d'analyse sont prises en compte, aucune significativité n'est observable quand seule la minute avant et après extinction est prise en compte (diminutions de 44 % et augmentation de 8 %, $p = 0,04$ et $p = 0,87$, respectivement). Dans les deux cas (22 et 470 $\mu\text{Gy/h}$), une diminution de la réaction au changement de luminosité est observée, avec un delta de la distance parcourue plus faible dans le cas des larves contaminées que dans le cas des larves témoins.

Ces résultats semblent indiquer que dans les cas des larves exposées à 22 $\mu\text{Gy/h}$, le délai de réponse au changement de luminosité est plus long, mais que l'effet n'est que transitoire. Dans le cas des larves exposées à 470 $\mu\text{Gy/h}$, aucune différence n'est visible dans le délai de réponse. C'est au contraire le retour à la nage normale qui entraîne une diminution du delta de distance, une réponse équivalente à celle mesurée dans le cas de l'étude de l'activité natatoire basale.

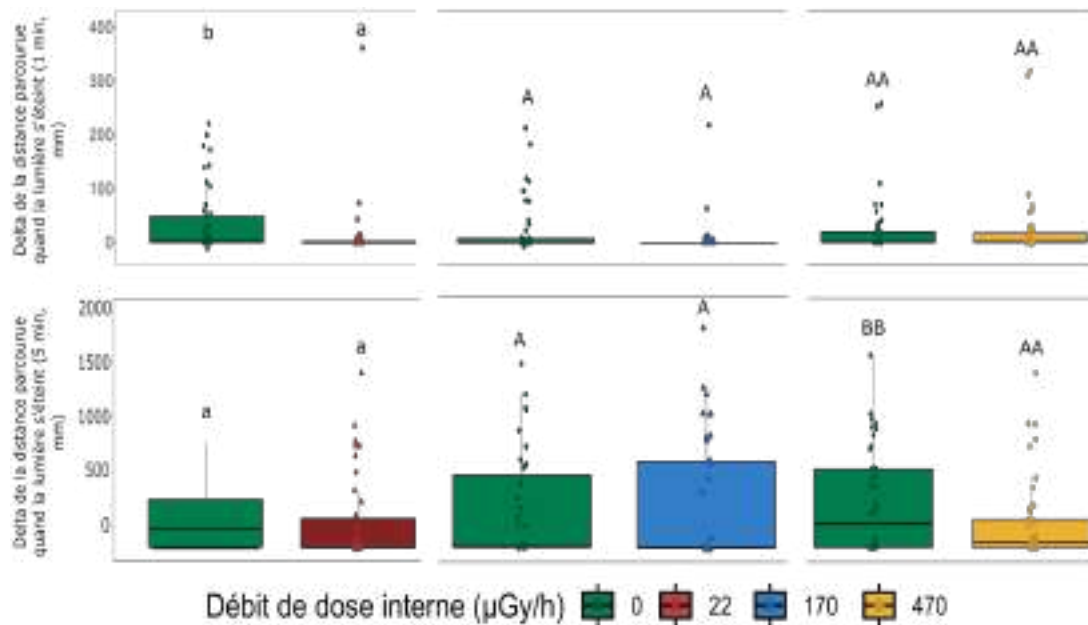


FIGURE F.4. – Delta de distance traversée par les individus ($n = 48$) entre une minute après et avant que la lumière ne s'éteigne (panel du haut) et cinq minutes après et avant que la lumière ne s'éteigne (panel du bas). Chaque boxplot vert correspond au témoin d'une expérience différente, le débit de dose absorbée correspondant est celui présenté directement à droite du témoin. $a < b$ et $AA < BB$, GLMM, $p < 0,05$.

F.3.3. Réaction à un stimulus vibratoire

La Figure E5 représente les vitesses de nage moyennes pendant les cinq minutes précédant le stimulus vibratoire, puis cinq minutes après ce dernier. Les résultats montrent que toutes les larves, exposées ou non à la thymidine tritiée, ont une vitesse de nage qui augmente significativement après la perception du stimulus vibratoire. Cette réaction peut être assimilée à un comportement de fuite pour s'éloigner de la source du stress.

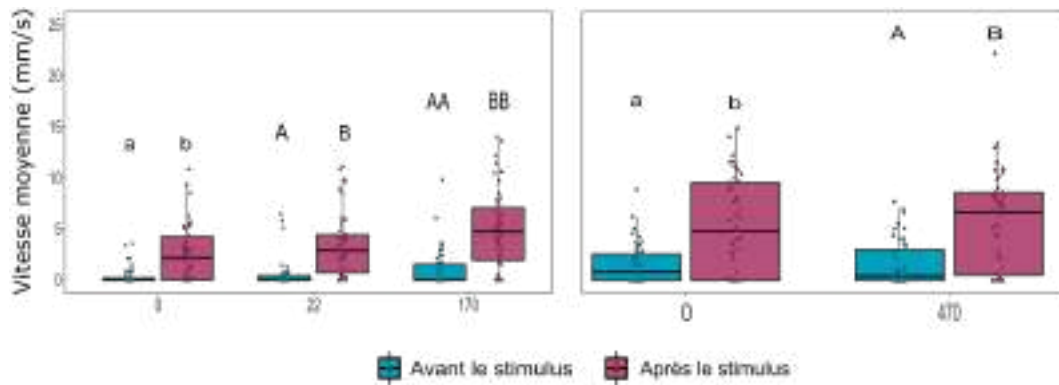


FIGURE F.5. – Vitesse de nage mesurée pendant les 5 minutes précédant et suivant le stimulus vibratoire (n = 48). Chaque encadré représente une expérimentation différente. a<b, A<B et AA<BB, GLMM, p<0,05.

Cependant, ce simple traitement de données n'est pas suffisant pour déterminer si les larves contaminées par la thymidine tritiée réagissent différemment au stimulus. En effet, pour ce faire, il est nécessaire de comparer la réaction au stimulus de chaque lot de larves contaminées avec leur témoin respectif. La Figure F.6 représente la réaction des larves d'une manière plus précise. Seul le débit de dose absorbée de 170 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ affecte la réaction au stimulus vibratoire. En effet, les analyses statistiques indiquent une augmentation plus importante de la vitesse après le stimulus chez les larves exposées par rapport aux larves témoins (augmentation de 75 %, $p = 0,007$). Le panel inférieur de la figure, quant à lui, indique que la vitesse maximale atteinte par les larves contaminées à 170 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ dans la seconde suivant le stimulus est significativement plus élevée que celle des larves témoins (augmentation de 72 %, $p = 0,04$). Ces résultats indiquent donc que la réaction des larves contaminées vis-à-vis d'un stimulus vibratoire est plus forte que celle des individus témoins, mais que cet effet n'est pas dose dépendant, considérant que la réaction des larves contaminées à 470 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ est similaire à celle des larves témoins ($p > 0,05$). La réaction des larves exposées au débit de dose absorbée de 22 $\mu\text{Gy}/\text{h}$ n'est, quant à elle, significativement différente ni des témoins, ni des larves contaminées à 170 $\mu\text{Gy}/\text{h}$.

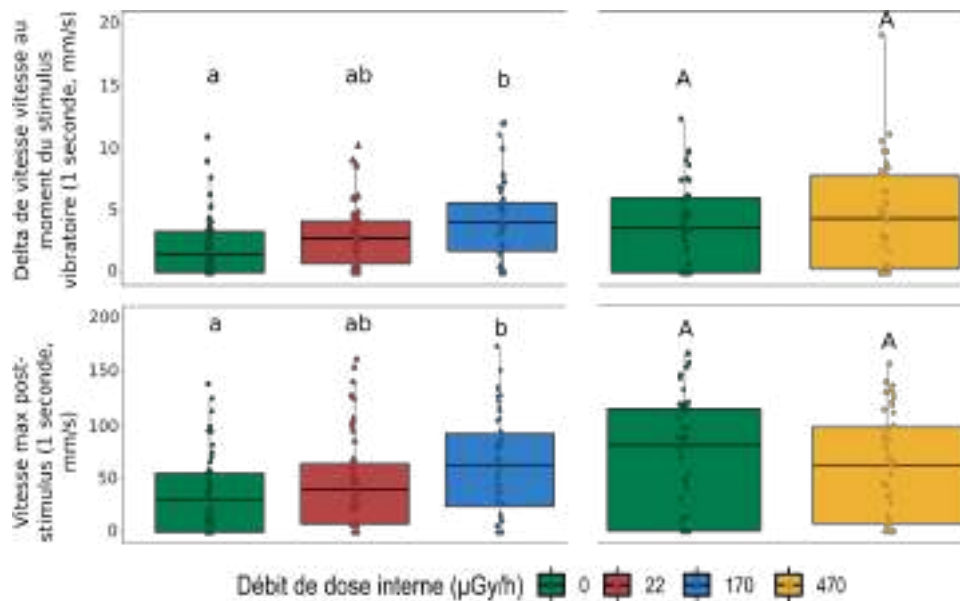


FIGURE F.6. – Delta de vitesse entre une seconde après et une seconde avant le stimulus vibratoire (panel du haut). Vitesse maximale atteinte par l’individu pendant la seconde suivant le stimulus (panel du bas). Chaque boxplot vert correspond au témoin d’une expérience différente, les débits de dose absorbée correspondant sont ceux présentés directement à droite du témoin. $a < b$, GLMM, $p < 0,05$.

F.4. Discussion

Les résultats indiquent que deux composantes de l’activité natatoire sont affectées par une exposition à la thymidine tritiée : le comportement de nage en condition d’obscurité, ainsi que la réaction aux vibrations et aux stimuli lumineux.

Il est tout d’abord important de considérer que la distance relative parcourue par les larves n’est pas à son maximum à 99 hpf. Chez le poisson zèbre, elle n’est généralement atteinte qu’après cinq à six jours de développement (MacPhail et al., 2009). Le fait que des effets soient visibles dès 99 hpf, un stade de développement pouvant être considéré comme étant précoce pour ce type d’analyses, indique que l’intensité des effets est assez élevée pour que ces derniers soient détectés malgré les faibles mouvements des individus. Il est important de considérer que l’étude du comportement natatoire permet d’obtenir de nombreuses informations sur les dysfonctionnements internes

et externes des individus, avec des dysfonctionnements internes tels que des atteintes neurologiques, musculaires ou squelettiques, par exemple, et des atteintes externes telles qu'une altération de l'œil, par exemple (Colwill and Creton, 2011; Little et al., 1990; MacPhail, 1990; Thirumalai and Cline, 2008). Pour cette raison, mais également car le comportement peut impacter les capacités de prédation et de survie de l'espèce, l'étude des effets de différents contaminants sur le comportement des vertébrés aquatiques est importante. Cependant, conclure sur les mécanismes menant à l'apparition d'un effet comportemental n'est pas possible si des études complémentaires ne sont pas menées, avec des études neurologiques et musculaires, par exemple.

La mesure de la distance parcourue pendant une période donnée est un des marqueurs les plus souvent évalués dans les études de comportement natatoire, et une différence significative au niveau de ce marqueur peut être expliquée de plusieurs manières (Saint-Amant and Drapeau, 1998). Par exemple, la diminution de la distance parcourue par les individus peut être causée par deux facteurs : un retard de développement, ou à une altération du gonflement de la vessie natatoire des individus (Powers et al., 2010). Comme présenté dans le chapitre précédent, le retard de développement observé après exposition à la thymidine tritiée à 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$ n'est visible qu'après 72 heures d'exposition, il semblerait donc que le retard de développement ne soit pas la cause de la diminution significative de la distance parcourue par les larves exposées à 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. Etant donné qu'aucune accélération du développement n'est observée après exposition au tritium organique, le développement ne peut pas non plus être la cause de l'augmentation significative de la distance parcourue par les individus exposés à 170 $\mu\text{Gy/h}$. La présence de malformations peut également être responsable d'une hypoactivité des larves de poisson zèbre, mais cela ne peut pas être le cas dans cette étude, considérant qu'aucune induction significative de malformations n'a été observée et que, lorsque les malformations causent une hypoactivité en période "Nuit", cette dernière est également présente dans la période "Jour", ce qui n'est pas le cas ici (Padilla et al., 2011). D'autres effets, tels qu'une altération du

rythme circadien ou un dérèglement hormonal, peuvent causer des effets au niveau du comportement. C'est, par exemple, le cas des dérèglement de la thyroïde (Krylov et al., 2021; Scott and Sloman, 2004). Considérant qu'une atteinte thyroïdienne peut également être responsable de la diminution du rythme cardiaque observée au plus haut débit de dose absorbée, un dérèglement des hormones thyroïdiennes peut donc être une hypothèse pertinente pour justifier les effets observés de la thymidine tritiée sur l'activité natatoire des larves de poisson zèbre.

L'étude du comportement des individus lors de brusques changements lumineux permet d'obtenir de nombreuses informations sur la réaction des larves face au stress. En effet, dans la nature, l'alternance entre l'obscurité et la lumière peut, par exemple, être indicatrice de la présence d'un prédateur (MacPhail et al., 2009; Wang et al., 2013). Cependant, la réaction au stress n'est pas la seule pouvant être étudiée par le biais de l'alternance de luminosité. En effet, plusieurs études ont mis en avant que ce test permet d'obtenir des informations sur le fonctionnement des photo-récepteurs des larves de poisson zèbre (Powers et al., 2011). Dans l'étude menée lors de ce projet de doctorat, la distance parcourue par les larves de poisson zèbre augmente quand la lumière s'éteint avant de brusquement diminuer au moment où la lumière s'allume, ce qui est conforme aux résultats de la littérature (Fernandes et al., 2012; Fitzgerald et al., 2019; MacPhail et al., 2009; Powers et al., 2011). Cela signifie donc que l'exposition des larves de poisson zèbre à la thymidine tritiée n'affecte pas directement le fonctionnement des photo-récepteurs, les individus étant encore capable de discerner l'alternance de l'obscurité et de la lumière. Cependant, le délai de réponse au changement de luminosité observé dans le cas de l'exposition au débit de dose absorbée de 22 $\mu\text{Gy/h}$ pourrait être liée à un défaut de perception de la lumière. Cette hypothèse ne semble pas être confirmée dans le cas de cette étude. En effet, malgré que le gène *cryba2b*, impliqué dans le développement de la perception visuelle, présente une tendance à la surexpression chez les larves exposées au même débit de dose absorbée pendant 24 heures, cet effet disparaît avant 96 heures d'exposition. De plus, le fait que

l'expression du gène *crygm2d13*, impliqué dans la même forme de développement, ne soit affectée à aucun des deux temps étudiés semble également réfuter cette hypothèse. Cependant, il est possible que ce délai de réaction soit causé par un retard ou un défaut de maturation des cellules ganglionnaires de la rétine, comme indiqué dans plusieurs études, étant donné que ces dernières permettent d'envoyer le signal de variation de luminosité au cerveau chez les vertébrés (Emran et al., 2007; Fischer et al., 1998; Moore and Whitmore, 2014). Il est également possible que le signal n'arrive pas jusqu'au cerveau, ou que ce dernier ne le traite pas de manière adéquate.

L'étude de la réaction d'un individu à un stimulus vibratoire peut permettre d'étudier sa capacité à s'enfuir. Le volume des puits utilisés étant limité, ce n'est pas le mouvement de rotation qui est considéré ici, mais l'accélération de l'individu, considérant que cette dernière a été étudiée dans d'autres études (Arcanjo et al., 2020; Scott and Sloman, 2004). En effet, le stimulus vibratoire, qui est réalisé sur le bord de la microplaque, entraîne des vibrations dans le milieu, ce qui, pour l'individu, peut signaler la présence d'un prédateur ou d'un congénère. Face à ce signal, la fuite est privilégiée par l'individu, ce qui est confirmé par les résultats présentés ci-dessus, avec une augmentation significative de la vitesse de nage après le stimulus vibratoire. Les résultats indiquent que la réaction à ce stimulus est modifiée dans le cas de l'exposition au débit de dose absorbée intermédiaire. S'il a déjà été indiqué dans la littérature qu'une diminution de la réaction à ce genre de stimulus peut être causée par une atteinte au niveau des neurones sensoriels, aucune étude n'a documenté l'accentuation de la réaction aux vibrations (Wang et al., 2013). Cependant, de nombreuses études indiquent l'implication d'une importante composante neurologique dans le comportement natatoire, mais d'autant plus dans le comportement de fuite avec, entre autres, l'envoi d'un signal aux cellules Mauthner (Anderson and Ingham, 2003; Brustein et al., 2003; Budick and O'Malley, 2000; Dill, 1974; Kokel and Peterson, 2008; Panula et al., 2006; Reiter, 1978; Winter et al., 2008). Une fois ces cellules activées, les muscles contractiles de la queue du poisson zèbre sont mis en action, entraînant la tentative de fuite de ce

dernier. Pour cette raison, il est important de considérer l'hypothèse d'une atteinte neurologique causée par l'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à la thymidine tritiée.

Les composantes musculaires et métaboliques ont également une importance dans la justification d'effets observables à l'échelle du comportement. En effet, le muscle impliqué dans le mouvement du poisson zèbre possède une organisation spécifique et, si cette dernière est altérée, le comportement peut également l'être (Thorsen et al., 2004). Les caractéristiques communes du muscle du poisson zèbre sont la formation striée de ce dernier, avec le reticulum sarcoplasmique encadrant les myofibrilles (Felsenfeld et al., 1990). Les myofibrilles, quant à elles, sont composées d'une succession de bandes Z (également appelées stries), avec une bande A présente entre deux bandes Z. La bande présente entre deux bandes A est également appelée bande I, et la ligne centrale de la bande A se nomme ligne M. A l'intérieur des muscles se trouvent également des mitochondries, représentantes de l'activité métabolique du poisson zèbre. Le comportement natatoire est la résultante de nombreux processus tels que les processus neurologiques, musculaires, mais aussi métaboliques et énergétiques (Sanchez et al., 2015). Le mouvement, tout comme son apprentissage, sont des processus consommateurs d'énergie (Zhou et al., 2023). Étant donné que de nombreuses fonctions biologiques consomment une grande quantité d'énergie, la répartition de cette dernière entre ces différentes fonctions biologiques est d'une grande importance. Or, si les processus métaboliques sont altérés, la répartition énergétique l'est également, pouvant ainsi impacter le comportement (Brun et al., 2019; Ghaddar and Diotel, 2022; Limonta et al., 2019; Ortiz-Villanueva et al., 2017). Cela signifie que l'hypothèse d'une atteinte métabolique ne peut pas être écartée, d'autant plus considérant qu'elle est supposée après 72 heures d'exposition à 170 $\mu\text{Gy/h}$, avec une diminution de la surface vitelline des larves.

A retenir

- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 96 h entraîne une hyper- et une hypoactivité des larves à l'obscurité, respectivement.
- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à 22 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 96 h entraîne un dysfonctionnement dans la réaction aux changements brusques de luminosité.
- L'exposition des embryons et larves de poisson zèbre à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 96 h entraîne une amplification de la réaction aux vibrations dans le milieu.

Hypothèses

- La thymidine tritiée donne lieu un dysfonctionnement du système endocrinien, entraînant ainsi l'hypo- et l'hyperactivité observées chez les individus exposés à 470 et 170 $\mu\text{Gy/h}$, respectivement.
- La thymidine tritiée affecte l'organisation des muscles des larves de poisson zèbre, justifiant ainsi les atteintes comportementales présentées dans ce chapitre.
- La thymidine tritiée affecte le métabolisme du poisson zèbre, justifiant l'hypoactivité observée chez les larves exposées à 470 $\mu\text{Gy/h}$.
- La thymidine tritiée affecte le système neurologique du poisson zèbre, justifiant ainsi les différences observées dans les réponses aux stressseurs lumineux et vibratoires.

Les résultats obtenus et présentés dans ce chapitre et les chapitres précédents sont discutés puis liés les uns aux autres dans le chapitre suivant, avec pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée. Ils sont également comparés aux résultats de toxicité d'autres radionucléides déjà documentés dans la littérature.

G. DISCUSSION GENERALE

G.1. L'intérêt et les limitations de l'étude multi-échelles de l'activité et des dépôts d'énergie issus du tritium

Ce travail de doctorat a permis d'étudier l'internalisation de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre à l'échelle de l'organisme et de l'ADN, mais également les dépôts d'énergie réalisés par les électrons libérés lors de la désintégration du tritium. Ces dépôts d'énergie ont été étudiés à l'échelle de la cellule par le biais de simulations microdosimétriques, et à l'échelle de l'ADN par le biais de simulations nanodosimétriques. Combiner les méthodes expérimentales et théoriques permet de caractériser au mieux le comportement d'internalisation du tritium, puis le comportement des électrons. Cependant, il reste important de prendre en compte le fait que l'étude de ces trois échelles (*i.e.*, échelles macroscopique, microscopique et nanoscopique) ne permet pas, à l'heure actuelle, d'obtenir toutes les informations nécessaires pour lier les effets toxiques observés sur le poisson zèbre au débit de dose absorbée mesuré, ou aux dépôts d'énergie que le tritium génère.

En premier lieu, les débits de dose absorbée ont été calculés avec l'hypothèse d'une répartition homogène du tritium dans l'organisme. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que, si une répartition homogène peut être estimée dans le cas d'une exposition à l'HTO, ce n'est pas le cas dans le cas d'une exposition à la thymidine tri-

G. DISCUSSION GENERALE – G.1. L'intérêt et les limitations de l'étude multi-échelles de l'activité et des dépôts d'énergie issus du tritium

tiée ou, de manière plus générale, au tritium organique (Adam-Guillermin et al., 2012; Ferreira et al., 2023; Jaeschke and Bradshaw, 2013; Jaeschke et al., 2011). Ainsi, il est nécessaire de prendre en considération le fait que certains organes du poisson zèbre pourraient être des cibles privilégiées par le tritium au moment de son internalisation. Cela a, par exemple, pu être observé dans le cas de la moule commune où, après exposition aux stades embryonnaires et larvaires, l'activité mesurée dans la glande digestive était plus élevée que celle mesurée dans le muscle adducteur (Jaeschke et al., 2011). Etant donné la petite taille des embryons et des larves de poisson zèbre, il n'a pas été possible d'étudier la répartition du tritium à l'échelle de l'organe, cette mesure était donc limitée à l'échelle de l'organisme entier ou à l'échelle de l'ADN, facilement extrait par le biais de protocoles robustes. Également, il est possible que le débit de dose absorbée ait été surestimé au moment des mesures. En effet, les expériences réalisées sur les embryons exposés pendant 48 heures à deux activités externes de thymidine tritiée ont mis en évidence une adsorption majoritaire du tritium sur le chorion, avec une grande majorité de l'activité mesurée sur ce dernier (environ 95 %). Cependant, le chorion n'est pas la seule barrière biologique qu'il est nécessaire de prendre en compte quand on considère l'internalisation d'un composé chimique dans les embryons de poisson zèbre. En effet, une seconde barrière biologique est le revêtement cutané de l'individu, cette fois présent à tous les stades de développement (Hisaoaka and Battle, 1958; Kimmel et al., 1995). Il est donc nécessaire, considérant l'adsorption de la thymidine tritiée sur le chorion, de se demander si une telle adsorption pourrait également avoir eu lieu sur la peau des individus. Cependant, la présence de tritium dans les embryons déchorionés et rincés (*i.e.*, dans le cas de la mesure du tritium dans l'ADN) a confirmé la présence de tritium internalisé au sein des individus et de leur ADN.

Les simulations de microdosimétrie ont mis en évidence l'importance de la prise en compte des dimensions de la cellule simulée. En effet, l'énergie spécifique du rayonnement dépendait fortement du rayon de la cellule, ici assimilée à une sphère ou

G. DISCUSSION GENERALE – G.1. L'intérêt et les limitations de l'étude multi-échelles de l'activité et des dépôts d'énergie issus du tritium

à une ellipsoïde. Dans ces simulations, il a été montré qu'une faible quantité d'énergie était déposée dans les cellules de faible rayon. Ainsi, pour une même énergie spécifique, la distribution de la fréquence des dépôts d'énergie diminuait quand le rayon de la cellule étudiée augmentait. Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans le cas de la simulation d'un Bq de tritium et, par conséquent, d'un électron. Il est également possible d'obtenir l'énergie déposée, ainsi que l'énergie spécifique, dans le cas de différentes activités. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être liés ou comparés aux résultats obtenus expérimentalement. En effet, comme indiqué ci-dessus, la mesure de l'activité dans les individus était limitée à l'échelle de l'organisme, elle ne permettait donc pas d'obtenir l'activité mesurée individuellement au niveau de chaque cellule. Pour cette raison, il est important de considérer que, dans une étude comme celle-ci, la microdosimétrie ne peut être utilisée qu'en tant que complément des expérimentations, et non pas en tant que confirmation des résultats. Cependant, considérant la puissance des modèles actuellement utilisés en microdosimétrie, ces derniers peuvent être utilisés en complément d'études *in vitro*, étant donné que dans le cas de ces dernières, le nombre précis de cellules utilisées est connu (Chao et al., 2012; Lazarov et al., 2011; Sato et al., 2022).

Pour finir, la nanodosimétrie a été utilisée en complément des expérimentations permettant la mesure des dommages à l'ADN. Celles-ci ont permis d'étudier la formation des dommages à l'échelle du noyau et, par conséquent, d'une unique cellule. Cependant, il est important de prendre en compte que la microdosimétrie et la nanodosimétrie peuvent être utilisées de manière complémentaire, permettant une meilleure interprétation des résultats obtenus à ces deux échelles (Dos Santos et al., 2020; Villagrasa et al., 2022). Dans ce travail de doctorat, par exemple, les simulations réalisées ont mis en évidence la présence d'une majorité de SSB. Cela signifie que les cassures étaient assez éloignées les unes des autres pour ne pas former un cluster de dommages, ou une DSB si les cassures étaient sur deux brins opposés. Cela est en accord avec les données obtenues par le biais des simulations de microdosimétrie.

G. DISCUSSION GENERALE – G.1. L'intérêt et les limitations de l'étude multi-échelles de l'activité et des dépôts d'énergie issus du tritium

En effet, ces dernières ont indiqué que la distance parcourue par les électrons entre chacun des dépôts d'énergie était assez grande pour qu'il soit vraisemblable que l'électron quitte la cellule avant d'y déposer une importante quantité d'énergie, ce qui est en accord avec le comportement des rayonnements de bas TEL. Ces résultats ont ainsi pu être extrapolés à l'échelle du noyau, expliquant ainsi les résultats obtenus par le biais des simulations de nanodosimétrie. De plus, l'augmentation du rayon du noyau dans la gamme étudiée ne semblait pas mener à une forte augmentation des dommages, dans le cas où ces derniers étaient exprimés en nombre de cassures/Gy/Gpb. Considérant que l'augmentation du volume considéré a entraîné l'augmentation du nombre de dépôts d'énergie retrouvés dans la cible étudiée, cela signifie qu'une partie des dépôts ne possédaient pas une énergie assez élevée pour entraîner une cassure (le seuil utilisé en nanodosimétrie est de 17,5 eV (Tang et al., 2019a)). De plus, l'étude microdosimétrique réalisée au cours de ce travail de doctorat a montré que la majorité des dépôts d'énergie issus du tritium étaient de faible énergie. En effet, pour toutes les cellules étudiées, la probabilité maximale d'obtenir un dépôt d'énergie a été obtenue pour les dépôts dont l'énergie était entre 0 et 50 eV. Les résultats obtenus par le biais des simulations de nanodosimétrie semblent donc indiquer qu'une part importante de ces dépôts ont une énergie inférieure à 17,5 eV, étant donné que le taux de cassures n'a pas présenté de forte augmentation avec le rayon du noyau simulé. Cependant, il est également important de considérer que la majorité des cassures générées par le tritium organique étaient des cassures indirectes. Cela signifie que les dépôts directs d'énergie sur les brins de l'ADN ne sont responsables que d'une faible part des dommages observés, signifiant que l'augmentation attendue quand le rayon du noyau augmente est plus faible que si les cassures directes étaient majoritaires.

Pour finir, il est nécessaire de prendre en compte le fait que les simulations nanodosimétriques, tout comme les simulations microdosimétriques, représentent des expositions aiguës (Incerti et al., 2010). Cela signifie que les dommages simulés correspondent aux dommages initialement générés par les électrons (*i.e.*, dans la limite

de la femtoseconde pour les dommages directs et de la microseconde pour les dommages indirects). Cependant, les expérimentations réalisées au cours de ce projet correspondent à une exposition chronique, allant jusqu'à une durée de 96 heures. Pendant cette période, le système de réparation des dommages à l'ADN est déjà fonctionnel, ce qui signifie que le taux de dommages à l'ADN mesuré après plusieurs jours d'exposition peut être plus faible que celui obtenu par le biais des simulations (Bassing and Alt, 2004; Cleaver et al., 1972; Falk et al., 2010; Pei and Strauss, 2013; Zhou and Elledge, 2000). Cependant, l'opposé peut également être observé dans le cas où les systèmes de réparation des dommages à l'ADN ne permettent pas de réparer ces derniers, ce qui mènerait donc à une accumulation des dommages (*i.e.*, à une augmentation de ces derniers) sur le long terme. Pour finir, la réparation des dommages à l'ADN, dans certains cas, peut mener à la formation de ROS, ce qui peut donc entraîner une formation de cassures supplémentaires (Kang et al., 2012). Cependant, ces cassures peuvent être considérées comme plus rares, considérant que, selon les seuils utilisés en nanodosimétrie, seules deux interactions du radical HO \cdot avec l'ADN sur cinq entraîne la formation d'un dommage (Tang et al., 2019a). Ces trois points confirment donc l'importance de considérer les différences entre les modèles utilisés dans les simulations et les expérimentations, afin de pouvoir interpréter au mieux les résultats obtenus par ces deux procédés.

G.2. Axe 3 : Les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée : premières hypothèses

Le Tableau G.1 résume les effets toxiques observés expérimentalement au cours de ce travail de doctorat. Pour la majorité des marqueurs, la toxicité ne semble pas augmenter de façon linéaire avec le débit de dose absorbée. En effet, il est assez fréquent d'observer des effets à de faibles débits de dose absorbée, mais de ne plus observer ces effets quand le débit de dose absorbée augmente, ce qui amène à supposer que les mécanismes de défense mis en place par l'organisme sont différents d'un débit

G. DISCUSSION GENERALE – G.2. Axe 3 : Les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée : premières hypothèses

de dose absorbée à l'autre. Également, dans le cas des marqueurs pour lesquels un effet est mesuré à tous les débits de dose absorbée, ou aux débits de dose absorbée les plus élevés, une augmentation de l'effet ne semble pas être observée, ce qui peut être indicateur d'une forme de saturation au niveau du marqueur concerné. C'est, par exemple, le cas du retard d'éclosion ou des dommages à l'ADN.

Marqueurs de toxicité	22 µGy/h	170 µGy/h	470 µGy/h
Expression génique (27 et 99 hpf)	↑ (27 hpf)	X	X
Dommages à l'ADN (27 et 99 hpf)	↑	↑	↑
Production de ROS (99 hpf)	X	↑	X
Mouvements spontanés des embryons dans le chorion (27 hpf)	X	X	↑
Rythme cardiaque (75 hpf)	X	X	↓
Éclosion	X	↓ (retard)	↓ (retard)
Morphométrie	↓ (75 hpf)	↓ (75 hpf)	X
Activité natatoire à l'obscurité (99 hpf)	X	↑	↓
Réponses aux changements lumineux (99 hpf)	↓ (retard)	X	X
Réponses aux stimuli vibratoires (99 hpf)	X	↑	X

TABLEAU G.1. – Tableau récapitulatif des effets significatifs à chaque débit de dose absorbée. X représente l'absence d'effet, ↓ représente une diminution du marqueur mesuré et ↑ représente une augmentation de ce dernier.

La Figure G.1 représente les mécanismes de toxicité mis en évidence par les études visant à caractériser la toxicité de la thymidine tritiée sur le poisson zèbre. Sur cette figure, les mécanismes d'action hypothétiques sont également représentés, même s'ils n'ont pas directement été étudiés. Trois grandes familles de mécanismes d'action sont mises en évidence.

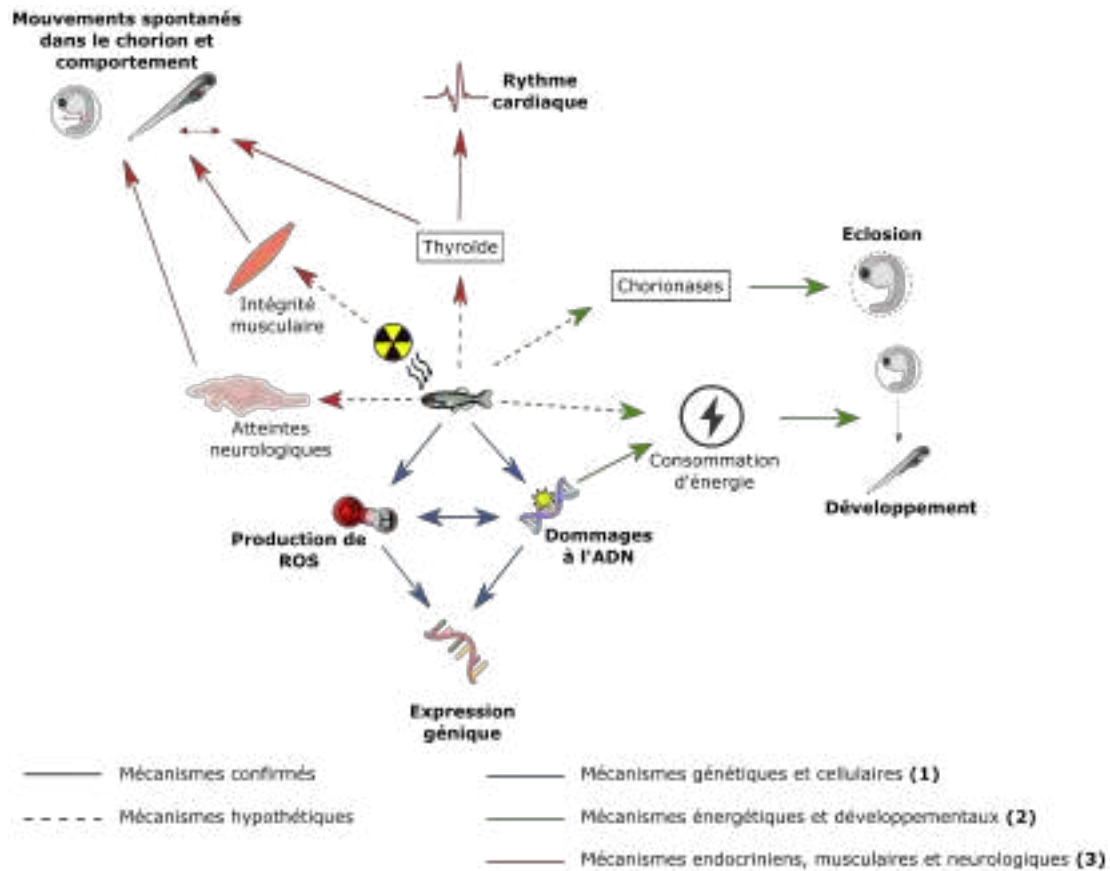


FIGURE G.1. – Représentation des effets toxiques de la thymidine tritiée sur le poisson zèbre. Les flèches pleines correspondent aux mécanismes prouvés et les flèches en pointillés correspondent aux mécanismes qui n'ont pas encore été démontrés. Trois grandes familles de mécanismes ont été mises en évidence, chacune représentée par une couleur différente, mais également numérotée dans la légende. Les marqueurs indiqués en gras correspondent à ceux qui ont été étudiés au cours de ce projet de doctorat, et ceux qui ne le sont pas correspondent à ceux obtenus par le biais de la littérature.

La première famille d'effets, annotée (1) dans la Figure G.1, correspond aux effets moléculaires et cellulaires. Les expériences ont mis en évidence une augmentation de la production des ROS, ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN. Ces deux processus sont liés entre eux, étant donné qu'il a été démontré que les ROS peuvent entraîner la formation de dommages à l'ADN, mais également car la réparation de ces derniers peut entraîner la formation de ROS (Kang et al., 2012; Lee and Steinert, 2003; Pierce et al., 1991; Simon et al., 2011). Par ailleurs, les analyses géniques ont

G. DISCUSSION GENERALE – G.2. Axe 3 : Les mécanismes de toxicité de la thymidine tritiée : premières hypothèses

mis en avant une surexpression de différents gènes liés au stress oxydant, tels que les gènes *mpx* et *sod2*, semblant ainsi indiquer la présence d'un plus haut taux de ROS dans les individus exposés pendant 24 heures à 22 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. Les gènes *ddb2*, *h2ax*, *xpc* et *xrcc1*, impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, étaient également surexprimés (Apelt et al., 2021; Kohn, 1999; Zebian et al., 2019). Les gènes *baxa*, *bbc3*, *bcl2* et *casp9*, impliqués dans le processus d'apoptose, l'étaient également (Kratz et al., 2006; Youle and Strasser, 2008). Ces résultats sont également compatibles avec la diminution des dommages à l'ADN qui a été observée entre les individus exposés à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 24 et 96 heures. Ce résultat est probablement lié à la réparation d'une partie des dommages, ou à la mise en place du processus d'apoptose ou, plus simplement, à la mort cellulaire. Cependant, ces processus ne semblent pas être suffisamment efficaces dans le cas des individus exposés à 470 $\mu\text{Gy/h}$, étant donné que la diminution observée n'était pas significative.

La deuxième famille d'effets, annotée (2) dans la Figure G.1, correspond aux effets énergétiques et développementaux. Les expérimentations ont mis en avant un retard temporaire du développement des individus exposés aux deux débits de dose absorbée les plus faibles, et à un retard d'éclosion chez les individus exposés aux deux débits de dose absorbée les plus élevés. Considérant la diminution du diamètre de la vésicule vitelline observée chez les individus exposés à 170 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée pendant 72 heures, il est supposé que la consommation d'énergie est plus élevée chez ces individus. Cela peut être causé, entre autres, par l'activation des systèmes de réparation des dommages à l'ADN. En effet, il a été mis en avant dans plusieurs études que ce processus est consommateur d'énergie, ce qui entraînerait une augmentation globale de la consommation d'énergie des individus et, dans le cas présent, une diminution de l'énergie allouée à la croissance (Meng et al., 2022; Minsky, 2003). Cependant, la diminution de la taille des larves et de la surface de leur vésicule vitelline n'a pas été observée chez les individus exposés à 470 $\mu\text{Gy/h}$. Il est donc possible qu'une quantité

plus faible d'énergie ait été allouée à la réparation des dommages à l'ADN, ce qui aurait entraîné la possibilité d'allouer une quantité d'énergie considérée comme normale à la croissance des individus. Cette hypothèse semble être confirmée par l'absence de diminution du taux de dommages à l'ADN entre 24 et 96 heures d'exposition à 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée.

La deuxième partie de ce mécanisme concerne le retard d'éclosion observé chez les individus exposés à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$ de thymidine tritiée. Comme expliqué au cours du chapitre 3 de cette thèse (*cf.* partie E.2), l'éclosion du poisson zèbre est provoquée par deux facteurs : la digestion du chorion par les enzymes choriolytiques, également appelées chorionases, et les mouvements spontanés de l'embryon à l'intérieur du chorion (Drapeau et al., 2002; Fraysse et al., 2006; Kim et al., 2005; Melançon et al., 1997; Osman et al., 2007; Saint-Amant, 2006). L'étude réalisée sur le développement du poisson zèbre au cours d'une exposition à la thymidine tritiée a montré l'absence de diminution des mouvements spontanés des individus. Au contraire, après exposition à 470 $\mu\text{Gy/h}$, une augmentation de ces mouvements et de leur fréquence a été mise en évidence. Dans le cas de ces individus, une accélération de l'éclosion devrait donc être observée dans le cas du bon fonctionnement des chorionases et de leur synthèse. Pourtant, c'est l'opposé qui a été observé, ce qui semble indiquer que la production des enzymes choriolytiques, ou leur efficacité, a été affectée par l'exposition à la thymidine tritiée.

La troisième et dernière famille d'effets mise en évidence par les résultats expérimentaux, annotée (3) dans la Figure G.1, correspond aux effets endocriniens, musculaires et neurologiques. Ces derniers sont liés aux effets observés sur le mouvement des individus dans leur chorion, le rythme cardiaque et le comportement ainsi que la réaction à différents stimuli. Le rythme cardiaque des individus exposés au débit de dose absorbée de 470 $\mu\text{Gy/h}$ était plus faible que celui des individus témoins. Cette observation peut être liée à deux facteurs : un dysfonctionnement cardiaque, potentiellement lié à une malformation, ou une altération endocrinienne, avec un atteinte

de la thyroïde. L'hypothèse d'une malformation paraît peu probable, étant donné que le taux de mortalité observé chez les individus exposés à la thymidine tritiée n'était pas supérieur à celui des individus témoins, mais également car aucun œdème péri-cardiaque n'a été observé après exposition à la thymidine tritiée. Cependant, il est possible que cette diminution du rythme cardiaque soit liée à une malformation non détectable par le biais d'analyses macroscopiques et n'induisant pas de mortalité sur le court terme. La thyroïde, quant à elle, fait partie des cibles privilégiées du tritium chez les organismes aquatiques (Ferreira et al., 2023; Scott and Sloman, 2004). Chez le poisson zèbre, comme chez de nombreux organismes aquatiques et terrestres, il a été démontré qu'elle a un impact sur le rythme cardiaque (Ferreira et al., 2023). Par ailleurs, la thyroïde a également un impact sur l'activité des individus, pouvant entraîner une hypo- ou hyperactivité en fonction de l'atteinte considérée (Li et al., 2021; Scott and Sloman, 2004). Les deux cas de figure ont été observés chez les individus exposés pendant 96 heures à la thymidine tritiée. En effet, les individus exposés au débit de dose absorbée de 170 $\mu\text{Gy/h}$ ont présenté une hyperactivité alors que les individus exposés au débit de dose absorbée de 470 $\mu\text{Gy/h}$ ont, quant à eux, présenté une hypoactivité. Considérant l'induction d'effets cardiaques et comportementaux, il est donc possible que la thyroïde des poissons zèbre ait été une des cibles du tritium. Cependant, la perturbation du système endocrinien n'est pas la seule potentielle responsable des altérations comportementales. En effet, l'hypoactivité observée à l'obscurité chez les individus exposés au plus fort débit de dose absorbée peut être liée à une altération des fibres musculaires (Han et al., 2020; Seebacher et al., 2015; Sztal et al., 2016). Il est également nécessaire de considérer la possibilité d'une atteinte neurologique ou métabolique qui pourrait, quant à elle, également justifier les effets observés au niveau de la réaction aux stimuli lumineux et vibratoires (Drapeau et al., 2002; Loring et al., 2020; Zhou et al., 2023). Pour les mêmes justifications, les processus endocriniens, neurologiques, musculaires et métaboliques peuvent également être responsables de l'augmentation des mouvements des individus dans leur chorion.

Ces résultats ont permis de confirmer que les mécanismes d'action de la thymidine tritiée sont nombreux. Cela justifie d'autant plus la nécessité de poursuivre les recherches sur les effets toxiques de la thymidine tritiée sur le poisson zèbre. De plus, les effets étudiés par le biais de ce travail de doctorat sont des effets apparaissant sur le court terme, ce qui ne permet pas, entre autres, de tester la capacité du tritium à entraîner la formation de tumeurs ou à affecter la reproduction des individus adultes.

G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

Comme indiqué dans l'introduction générale de cette thèse, la toxicité d'un radionucléide dépend de nombreux facteurs, tels que le type de rayonnement, le temps d'exposition et la répartition subcellulaire du radionucléide dans l'organisme (IRSN, 2012).

Il est donc important de prendre en considération la possible différence de toxicité de la thymidine tritiée par rapport au tritium libre qui ont le même type de rayonnement, c'est-à-dire un rayonnement β de faible énergie. Cependant, le temps d'exposition et la répartition subcellulaire peuvent être considérés comme étant différents, étant donné que la répartition subcellulaire du tritium libre est considérée comme étant homogène, ce qui n'est pas le cas de celle du tritium organique (Adam-Guillermin et al., 2012; Jaeschke et al., 2011). Par ailleurs, le tritium libre, une fois internalisé dans l'organisme, s'équilibre rapidement avec l'activité extérieure, étant donné qu'il est majoritairement internalisé sous forme de TFWT (Arcanjo et al., 2019; Diabate and Strack, 1993; Gonen et al., 2014; Hill and Johnson, 1993). La thymidine tritiée, comme indiqué dans les premiers résultats de cette thèse (*cf.* Partie C.2.1), a majoritairement été internalisée sous forme organique, c'est-à-dire sous la forme de neOBT. De plus, une internalisation au niveau de l'ADN a été mesurée. Si cette mesure

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

n'a pas été réalisée dans le cas d'une exposition du poisson zèbre au tritium libre, elle a déjà été réalisée dans le cas de l'exposition de la moule commune à l'HTO et à la glycine tritiée (Jaeschke et al., 2011). Les résultats ont montré que le taux de tritium lié à l'ADN n'était pas détectable dans le cas du tritium libre, alors qu'il l'était dans le cas du tritium organique. Pour précision, comme dans le cas du travail présenté dans ce manuscrit, aucune analyse n'a été réalisée afin d'identifier la molécule tritiée retrouvée au niveau de l'ADN.

De plus, il serait également intéressant de comparer les effets toxiques observés dans le cas d'une exposition au tritium organique avec celles obtenues dans le cas d'une exposition au césium (^{137}Cs). En effet, ce dernier est utilisé pour sa production indirecte de rayonnements γ par le biais de son descendant, le baryum (^{137}Ba), alors que le tritium est un émetteur β . Tout comme dans le cas du tritium libre, une répartition subcellulaire homogène des dépôts d'énergie est attendue, ce qui n'est pas le cas du tritium organique. Considérant les propriétés de ces trois types d'exposition, des différences de toxicité sont attendues.

Afin de vérifier cette hypothèse, les simulations de nanodosimétrie, réalisées dans le cadre de l'étude de la formation des dommages à l'ADN après l'exposition au tritium organique (*cf.* D), ont également été réalisées dans le cas d'une exposition au tritium libre et au césium. Dans le cas d'une exposition au tritium organique, les électrons ont été simulés comme étant dans le noyau, alors que dans le cas d'une exposition au tritium libre, les électrons ont été représentés comme étant hors du noyau. Dans le cas d'une irradiation gamma, les photons mettent en mouvement les électrons dans tout le milieu, les deux configurations ont donc été combinées : les particules étaient à l'intérieur et à l'extérieur du noyau. La Figure G.2 représente la répartition des SSB et des DSB par unité de dose absorbée (Gy), dans le cas de noyaux sphériques de rayons 2,5 et 5 μm . Dans cette figure, une information importante est mise en évidence : le volume du noyau (*i.e.*, son rayon) affecte les résultats obtenus. En effet, dans le cas d'un noyau de rayon 2,5 μm , aucune différence n'est visible entre les taux

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

de cassures causés par le tritium organique, le tritium libre, et le césium. Cependant, dans le cas d'un noyau de 5 μm de rayon, des différences sont observables : le tritium organique est responsable de la formation de plus de cassures à l'ADN que le césium, lui-même responsable de plus de cassures à l'ADN que le tritium libre. Ces résultats sont principalement visibles dans le cas des SSB, cassures majoritaires après les trois types d'exposition.

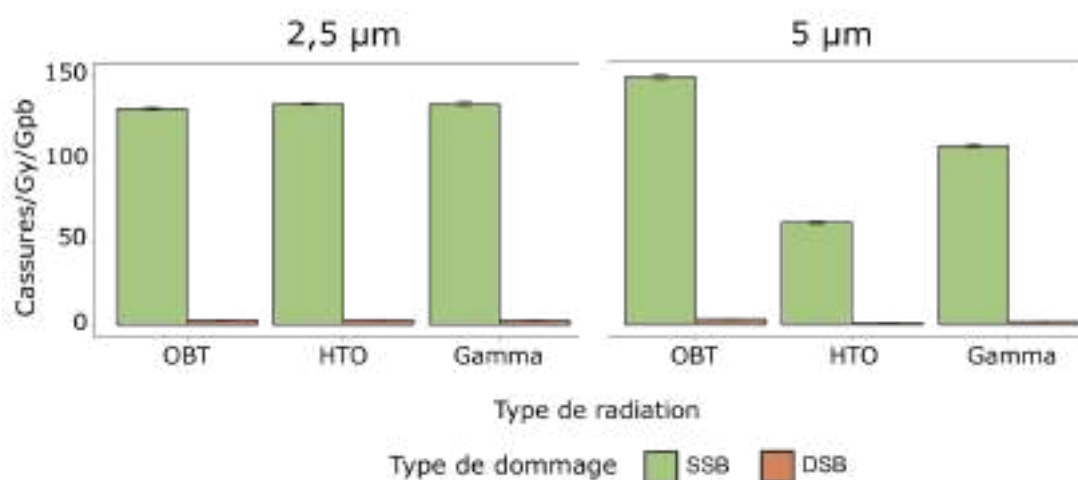


FIGURE G.2. – Taux de cassures à l'ADN induites par 1 Bq de tritium organique (OBT), de tritium libre (HTO) et de césium (Gamma) dans des noyaux sphériques de poisson zèbre de rayons 2,5 μm (panel de gauche) et 5 μm (panel de droite). Ces résultats sont issus de simulations mettant en mouvement 50000 particules ou plus.

Les DSB formées par l'exposition au radionucléide peuvent être simples ou complexes. La répartition de ces dernières est représentée dans la Figure G.3. Dans le cas de la répartition entre les sDSB et les cDSB, le rayon du noyau n'a pas d'impact sur le résultat obtenu, tout comme le radionucléide utilisé, ou sa répartition subcellulaire. En effet, dans le cas du tritium libre, du tritium organique et du césium, les résultats indiquent que les DSBs obtenues sont majoritairement simples. Cela signifie que, dans le cas des trois types d'expositions, les cassures à l'ADN peuvent être considérées comme étant éloignées les unes des autres, ce qui signifie que les dépôts d'énergie le sont également, ce qui est en accord avec le faible taux de DSB obtenu suite à ces

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

simulations.

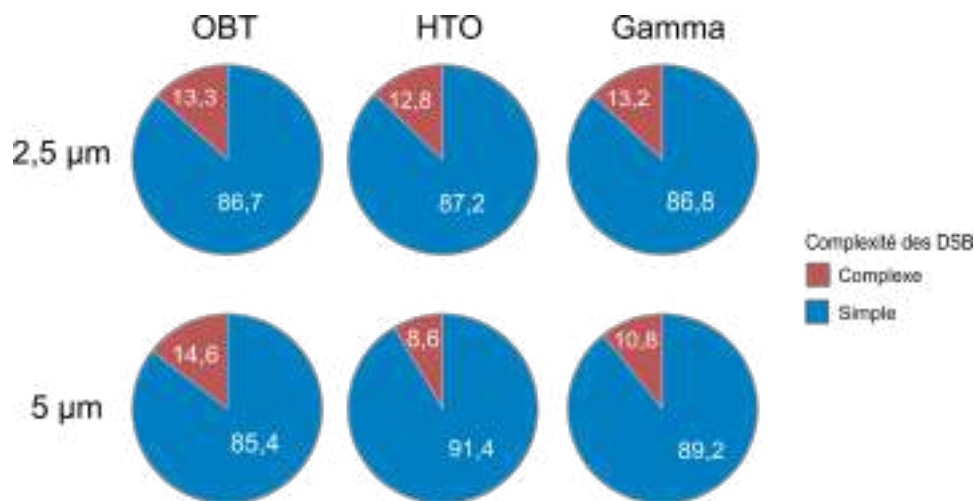


FIGURE G.3. – Complexité des DSB (simple ou complexe) formées par 1 Bq de tritium organique (OBT, colonne de gauche), de tritium libre (HTO, colonne centrale) et de césium (Gamma, colonne de droite) dans des noyaux de poisson zèbre de rayons 2,5 μm (ligne supérieure) et 5 μm (ligne inférieure). Ces résultats sont issus de simulations mettant en mouvement 50000 particules ou plus.

La répartition des cassures directes et indirectes a également été étudiée et est présentée dans la Figure G.4. Ces résultats indiquent que, dans le cas des trois types d'exposition, les répartitions entre les cassures directes et indirectes sont similaires. Dans le cas de la répartition entre les deux types de cassures, le rayon du noyau n'a pas d'impact sur les résultats. Pour les deux noyaux et pour les trois types d'exposition, les cassures indirectes (*i.e.*, causées par l'interaction entre les ROS et l'ADN) sont majoritaires. La Figure G.5 représente les différents types de DSB. Ces dernières peuvent être directes, indirectes, ou mixtes. Une DSB mixte est constituée d'au moins une SB directe et d'une SB indirecte. Dans le cas des DSB, les résultats sont les mêmes que dans le cas des cassures totales. Le type d'exposition et le rayon du noyau n'ont pas d'effet notable sur les résultats. Ici aussi, les DSB indirectes sont majoritaires, mais la répartition observée est plus équilibrée, chaque type de DSB présentant une proportion de formation proche de 33 %.

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

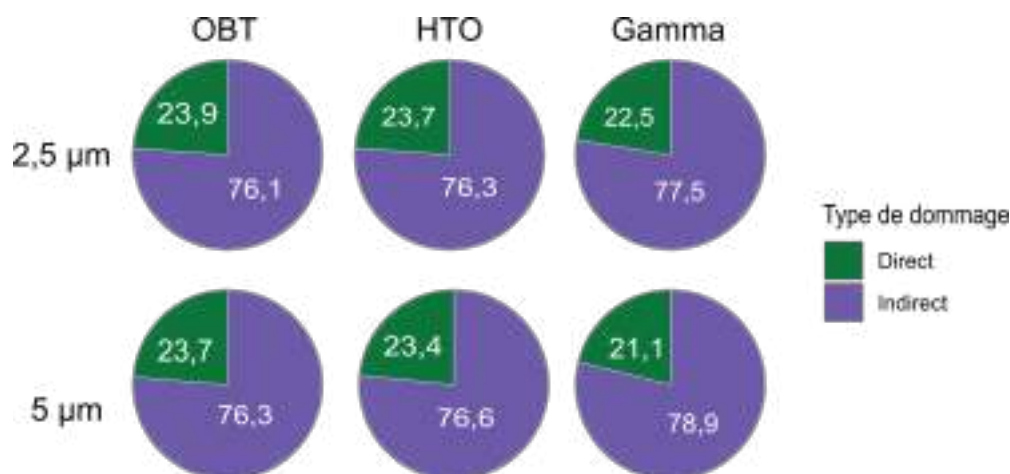


FIGURE G.4. – Origine des cassures (directe ou indirecte) formées par 1 Bq de tritium organique (OBT, colonne de gauche), de tritium libre (HTO, colonne centrale) et de césium (Gamma, colonne de droite) dans des noyaux de poisson zèbre de rayons 2,5 µm (ligne supérieure) et 5 µm (ligne inférieure). Ces résultats sont issus de simulations mettant en mouvement 50000 particules ou plus.

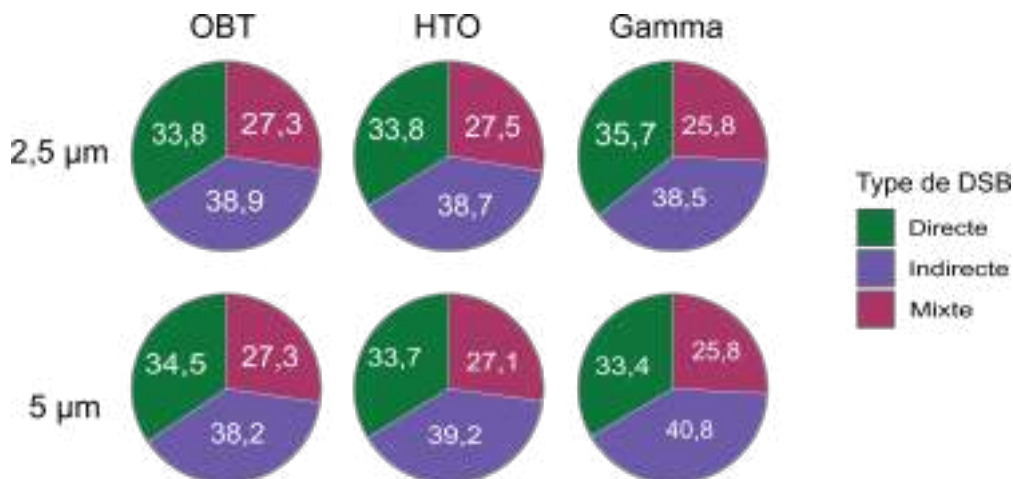


FIGURE G.5. – Origine des DSB (directe, indirecte ou mixte) formées par 1 Bq de tritium organique (OBT, colonne de gauche), de tritium libre (HTO, colonne centrale) et de césium (Gamma, colonne de droite) dans des noyaux de poisson zèbre de rayons 2,5 µm (ligne supérieure) et 5 µm (ligne inférieure). Ces résultats sont issus de simulations mettant en mouvement 50000 particules ou plus.

Les simulations nanodosimétriques ont donc mis en évidence plusieurs informa-

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

tions : dans les noyaux à rayon élevé, une différence a été retrouvée dans les taux de dommages à l'ADN formés par 1 Gy de radiation. Par ailleurs, le type de radiation n'a pas eu d'impact sur la répartition des dommages (SSB *vs* DSB, direct *vs* indirect). Cependant, les dépôts d'énergie n'étant pas uniquement retrouvés au niveau de l'ADN, et la dose absorbée dépendant du type de radiation, il est important de réaliser des comparaisons expérimentales afin de confirmer l'absence ou la présence de différences de toxicité entre le tritium organique, le tritium libre et le césium. Les résultats expérimentaux seront présentés de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle.

Plusieurs différences sont observables au niveau de l'expression des gènes des individus exposés pendant 24 et 96 heures aux radionucléides. En effet, après exposition à la thymidine tritiée, seuls les embryons exposés pendant 24 heures à 22 $\mu\text{Gy/h}$ présentaient une dérégulation de l'expression génique de plusieurs gènes, dérégulation apparaissant sous la forme de surexpression. Dans le cas d'une exposition au tritium libre, les résultats obtenus sont différents de ceux observés après une exposition à la thymidine tritiée. L'étude, publiée en 2018 par Arcanjo et al., a été réalisée par le biais d'une RNASeq couplée à l'utilisation de la méthode TaqMan. Elle indique la dérégulation de plusieurs gènes, dont certains communs à ce travail de doctorat (*casp9*, *sod2* et *xrcc1*). Cette dérégulation a été observée après 24 heures d'exposition aux débits de dose absorbée de 140 et 1240 $\mu\text{Gy/h}$, alors que dans ce travail de doctorat, aucune dérégulation n'a été observée à des débits de dose absorbée supérieurs à 22 $\mu\text{Gy/h}$. (Arcanjo et al., 2018). Par ailleurs, après 96 heures d'exposition à ces débits de dose absorbée supérieurs à 22 $\mu\text{Gy/h}$, Arcanjo et ses collaborateurs ont observé une dérégulation de l'expression de *bcl2*, *xpc* et *xrcc1*, alors que cette dérégulation n'a pas été observée dans ce travail de doctorat à des débits de dose absorbée de 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus dans ce travail de doctorat, étant donné qu'aucune dérégulation génique n'a été observée chez les individus exposés pendant 96 heures à la thymidine tritiée. Dans le cas d'une exposition au césium aux mêmes débits de dose absorbée (170 et 1240 $\mu\text{Gy/h}$), les résultats observés sont

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

différents de ceux des études où le contaminant est le tritium, qu'il soit sous forme libre ou organique (Gagnaire et al., 2021). En effet, peu de dérégulations géniques ont été observées après 24 heures d'exposition et la plupart de ces dérégulations ont été observées après 168 et 240 heures d'exposition. Il n'est donc pas possible de comparer pour ces temps d'exposition dépassant 4 jours.

Dans le cas de la mesure de la production des ROS et de la mesure des dommages à l'ADN, plusieurs différences sont également observables. En effet, après exposition à la thymidine tritiée (*i.e.*, au cours de ce travail de doctorat), une induction significative des dommages à l'ADN a été observée dès 24 heures d'exposition à 22 $\mu\text{Gy/h}$, et une augmentation de l'indice de production des ROS a été remarquée après exposition à 170 $\mu\text{Gy/h}$ pendant 96 heures, ainsi qu'une augmentation de la fluorescence émise par les individus stimulés au PMA après exposition à tous les débits de dose absorbée (22; 170; 470 $\mu\text{Gy/h}$). Après exposition au tritium libre, une diminution du taux de dommages à l'ADN a été observée chez les individus exposés pendant 96 heures à environ 30 $\mu\text{Gy/h}$, puis une augmentation après exposition pendant le même temps aux débits de dose absorbée de 140 et 1240 $\mu\text{Gy/h}$ (Gagnaire et al., 2020a). Cependant, aucune différence significative n'a été observée après exposition au tritium libre pendant 24 heures, ce qui indique une apparition précoce des dommages à l'ADN dans le cas d'une exposition au tritium organique. Ceci n'est pas surprenant, étant donné que le tritium est internalisé dans l'ADN dans le cas d'une exposition à la thymidine tritiée, ce qui ne semble pas être le cas après une exposition au tritium libre. L'indice de production des ROS, quant à lui, a augmenté après une exposition pendant 96 heures aux débits de dose absorbée de 140 et 1240 $\mu\text{Gy/h}$ de tritium libre, alors qu'une augmentation de la fluorescence mesurée chez les individus stimulés à l'aide du PMA n'était observable qu'après exposition à 140 $\mu\text{Gy/h}$. Dans le cas d'une exposition au césium, aucune variation des dommages à l'ADN n'a été mesurée (Gagnaire et al., 2021). L'indice de production des ROS, ainsi que la fluorescence mesurée chez les larves exposées au PMA, dans le cas de l'irradiation gamma, a augmenté après 96 heures d'exposition aux débits de dose absorbée de 134 et 1240 $\mu\text{Gy/h}$. Ces résultats

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

sont donc partiellement en accord avec ceux obtenus après exposition des individus à la thymidine tritiée.

Le développement a été affecté, de manière temporaire, par l'exposition à la thymidine tritiée. En effet, les mouvements spontanés de l'embryon dans le chorion ont augmenté après exposition à 470 $\mu\text{Gy/h}$ pendant 24 heures, alors que le rythme cardiaque a diminué après exposition au même débit de dose absorbée pendant 72 heures. Egalement, l'éclosion a été retardée chez les individus exposés à 170 et 470 $\mu\text{Gy/h}$, et les individus exposés à 22 et 170 $\mu\text{Gy/h}$ étaient plus petits après 72 heures d'exposition. Dans le cas des individus exposés au tritium libre, aucune variation n'a été observée dans les mouvements spontanés des embryons dans leur chorion et le rythme cardiaque des larves, et l'éclosion n'a pas été retardée (Arcanjo et al., 2020; Gagnaire et al., 2020a). Le développement, quant à lui, a majoritairement été ralenti, avec une diminution de la taille des larves et de la surface de leur sac vitellin quand ces dernières ont été exposées pendant 72 heures à 140 $\mu\text{Gy/h}$ de tritium libre. Cependant, après une exposition de 72 heures à 30 $\mu\text{Gy/h}$ de tritium libre, les larves n'étaient pas plus petites, mais la vésicule vitelline des individus était plus grande, ce qui n'était pas le cas des individus exposés à la thymidine tritiée. Dans le cas des individus exposés au césium, la seule augmentation des mouvements spontanés dans le chorion a été observée chez des embryons exposés pendant 24 heures à 5000 $\mu\text{Gy/h}$, un débit de dose absorbée bien supérieur à ceux utilisés dans le cadre de ce travail de doctorat (Murat El Houdigui et al., 2019). Le rythme cardiaque, quant à lui, a été mesuré après 48 heures d'exposition, soit plus tôt que dans ce travail de doctorat où le rythme cardiaque était mesuré après 72 heures d'exposition, et les résultats sont également différents. En effet, une diminution du rythme cardiaque a été observée après exposition à 50 $\mu\text{Gy/h}$ de césium, et une augmentation de ce dernier était ensuite visible après exposition à 500 et 5000 $\mu\text{Gy/h}$, ce qui semble indiquer une atteinte cardiaque plus précoce que dans le cas d'une exposition à la thymidine tritiée. Pour finir, l'éclosion a été accélérée suite à une exposition au césium, et ce dès 33

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

$\mu\text{Gy/h}$, indiquant une réponse opposée à celle observée chez les individus exposés à la thymidine tritiée (Gagnaire et al., 2021). Le développement, quant à lui, n'a pas été affecté de la même manière que les individus exposés à la thymidine tritiée. En effet, aucune diminution de la taille des larves, de leur vésicule vitelline ou du diamètre de leur œil n'a été démontrée et ce, quel que soit le débit de dose absorbée utilisé. Cependant, une augmentation de la taille des larves a été observée chez les individus exposés à $1240 \mu\text{Gy/h}$ pendant 96 heures.

Pour finir, l'étude comportementale a démontré qu'après exposition à la thymidine tritiée pendant 96 heures, les larves nageaient plus vite à une exposition à $170 \mu\text{Gy/h}$ et moins vite après une exposition à $470 \mu\text{Gy/h}$. Également, les individus exposés à $22 \mu\text{Gy/h}$ ont eu une réaction retardée au changement d'intensité lumineuse, alors que les individus exposés à $170 \mu\text{Gy/h}$ ont eu une réaction plus forte au stimulus vibratoire. Chez les individus exposés au tritium libre pendant 96 heures, les individus exposés à un débit de dose absorbée d'environ $140 \mu\text{Gy/h}$ nageaient moins vite que les individus témoins, et présentaient également une réaction moins forte au stimulus vibratoire (Arcanjo et al., 2020). Ces résultats sont donc opposés à ceux obtenus dans le cas d'une exposition à la thymidine tritiée. Dans le cas des individus exposés au césium, une diminution de la réaction au changement lumineux a été observée à tous les débits de dose absorbée (50 ; 500 et $5000 \mu\text{Gy/h}$) (Murat El Houdigui et al., 2019). Ce résultat concorde avec celui observé chez les individus exposés à la thymidine tritiée, à la différence que le retard de réponse persistait quand le débit de dose absorbée augmentait dans le cas d'une exposition au césium, ce qui n'était pas le cas après exposition à la thymidine tritiée.

Comme indiqué dans l'Etat de l'art (*cf.* partie A.4.5), le calcul de l'EBR (Efficacité Biologique Relative) permet également de comparer la toxicité de différents radionucléides entre eux. Pour cette raison, le calcul de ce facteur faisait partie des objectifs de ce travail de doctorat, afin de pouvoir quantifier les différences potentielles de

G. DISCUSSION GENERALE – G.3. Axe 3 : Comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et l'irradiation gamma

toxicité retrouvée entre le tritium et l'irradiation gamma, mais également entre le tritium libre et le tritium organique. Cependant, dans le cas de tous les marqueurs de toxicité mesurés, aucune relation dose-réponse linéaire n'a été observée. En effet, soit les effets étaient à "saturation", comme dans le cas de l'éclosion, où le retard ne semblait pas plus élevé au plus haut débit de dose absorbée par rapport au débit de dose absorbée intermédiaire, soit les effets disparaissaient aux plus hauts débits de dose absorbée, comme cela a pu être observé dans le cas de la mesure de l'expression génique ou dans le cas de la mesure de l'indice de production des ROS. Pour cette raison, aucun calcul d'EBR n'a été réalisé dans ce doctorat, les comparaisons entre les différents types de radiation sont donc uniquement qualitatives.

En conclusion, si les analyses nanodosimétriques indiquent une faible différence entre l'exposition au tritium libre, au tritium organique et au césium dans la gamme des dimensions des noyaux étudiée, ce n'est pas le cas des résultats expérimentaux. En effet, le tritium organique et le tritium libre n'entraînent pas les mêmes effets. Les seules atteintes communes entre ces deux formes de tritium sont celles observées sur la production des ROS et la morphométrie au cours du développement. Le même constat est observable dans le cas de l'irradiation gamma. En effet, les seuls marqueurs de toxicités présentant des résultats similaires après exposition au tritium organique et au césium sont la production des ROS et la réaction au changement d'intensité lumineuse. Cela signifie donc que les mécanismes de toxicité du tritium organique, présentés dans la partie précédente, sont différents de ceux du tritium libre et du césium.

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

H.1. Conclusion générale

Ce projet de doctorat, basé sur l'étude du comportement du tritium organique et de sa toxicité sur les stades précoces de développement du poisson zèbre, était divisé en trois objectifs. Le premier se concentrait sur l'étude de l'internalisation de la thymidine tritiée et des dépôts d'énergie pouvant être attendus dans des cellules de forme et volume différents. Le second, quant à lui, ciblait l'étude de la toxicité de la thymidine tritiée par le biais d'une étude multi-échelles complétée par une étude nanodosimétrique. Le troisième objectif consistait en la liaison des effets entre eux, afin de déterminer les mécanismes d'action de la thymidine tritiée. Ce troisième objectif se concentrait également sur la comparaison de la toxicité de la thymidine tritiée avec celle du tritium libre et de l'irradiation gamma.

H.1.1. Internalisation et dépôts d'énergie

L'étude de l'internalisation du tritium organique et des dépôts d'énergie pouvant être attendus au niveau des cellules a été réalisée par des études microdosimétriques et expérimentales. Cette étude a été un préalable indispensable à ce travail de doctorat.

Les études expérimentales ont permis de conclure à une internalisation rapide de la thymidine tritiée dans les embryons et larves de poisson zèbre, mais également à un

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES – H.1. Conclusion générale

effet barrière du chorion des embryons pendant les 48 premières heures d'exposition. Ceci a permis de confirmer la différence de comportement entre le tritium organique et le tritium libre. L'étude de l'internalisation du tritium organique a également mis en évidence une absence de linéarité dans l'évolution de l'internalisation du tritium avec l'activité présente dans le milieu. En effet, le débit de dose absorbée mesuré dans les individus augmentait de façon sigmoïdale avec l'activité externe, ce qui signifie que l'augmentation de l'internalisation était exponentielle, avant de saturer et d'atteindre un plateau après le seuil d'environ $2,5 \times 10^8$ Bq./L. Pour finir, l'internalisation du tritium du tritium organique dans la cellule était majoritairement sous forme organique, avec une partie du tritium incorporée dans l'ADN, probablement sous la forme de thymine tritiée.

L'étude microdosimétrique des dépôts d'énergie, quant à elle, a permis d'obtenir différentes informations sur le comportement des électrons émis par le tritium au cours de sa désintégration. En effet, dans le cas des cellules sphériques et des cellules ellipsoïdales, les dépôts de faible énergie étaient plus probables que les dépôts de forte énergie, et les cellules de faible rayon recevaient moins d'énergie que les cellules dont le volume était plus élevé. Pour finir, la distribution de la fréquence de dépôts d'énergie augmentait quand le rayon de la cellule diminuait, et l'énergie spécifique était plus élevée dans les cellules ellipsoïdales que dans les cellules sphériques. Cela confirme que le type de cellule a un grand impact sur les dépôts d'énergie attendus et, par conséquent, sur les effets toxiques pouvant apparaître dans cette dernière.

H.1.2. Toxicité de la thymidine tritiée

L'étude de la toxicité de la thymidine tritiée a été réalisée par le biais d'expérimentations d'exposition et de simulations nanodosimétriques. Tous les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus dans le cas d'une exposition au tritium libre ou au césium.

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES – H.1. Conclusion générale

L'étude de la toxicité de la thymidine tritiée a mis en évidence une grande variation de cette dernière avec le débit de dose absorbée. En effet, au débit de dose absorbée le plus faible (22 $\mu\text{Gy/h}$), les seules différences avec les individus témoins étaient l'expression génique après 24 heures d'exposition, avec une surexpression des gènes impliqués dans la lutte contre le stress oxydant, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose. Une augmentation des dommages à l'ADN a également été observée après 24 et 96 heures d'exposition, ainsi qu'un ralentissement temporaire du développement après 72 heures d'exposition, et une perturbation de la réaction aux stimuli lumineux après 96 heures d'exposition. Au débit de dose absorbée intermédiaire (170 $\mu\text{Gy/h}$), une augmentation de la production de ROS après 96 heures d'exposition a été observée, ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN après 24 et 96 heures d'exposition. Le développement a temporairement été retardé, avec des individus plus petits après 72 heures d'exposition, et ce retard de développement a été accompagné d'un retard de l'éclosion. Pour finir, une augmentation de la distance parcourue par les individus a également été observée, ainsi qu'une amplification de la réponse aux stimuli vibratoires, le tout après 96 heures d'exposition. Après exposition au débit de dose absorbée le plus élevé (470 $\mu\text{Gy/h}$), une augmentation des dommages à l'ADN a été démontrée après 24 et 96 heures d'exposition, ainsi qu'une augmentation des mouvements spontanés des embryons dans leur chorion et une diminution du rythme cardiaque après 24 et 72 heures d'exposition, respectivement. Un retard d'éclosion a également été observé, accompagné d'une diminution de la distance parcourue après 96 heures d'exposition.

Les analyses nanodosimétriques, quant à elles, ont indiqué un faible effet du volume du noyau étudié sur les résultats obtenus. Elles ont également mis en évidence l'induction majoritaire de SSB dans l'ADN par les électrons issus de la désintégration du tritium. Parmi les DSB formées, la grande majorité de ces dernières étaient des sDSB. Pour finir, la majorité des cassures avaient une origine indirecte. Cependant, dans le cas des DSB, la répartition entre les cassures directes, indirectes et mixtes était

plus homogène, avec un taux malgré tout plus élevé de DSB indirectes.

Pour finir, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus après exposition d'embryons et larves de poisson zèbre au tritium libre et au césium a indiqué une importante différence de spectre de toxicité entre ces trois radiations. En effet, les analyses nanodosimétriques ont mis en évidence, dans le cas des noyaux de plus fort rayon, un taux de dommages plus faible dans le cas de l'HTO, suivi de l'irradiation gamma, puis du tritium organique. Les expérimentations, ainsi que la comparaison de leurs résultats avec les données de la littérature, ont démontré que seuls deux marqueurs de toxicité ont été affectés de la même manière par la thymidine tritiée et l'irradiation gamma : la production de ROS et la réaction face au changement lumineux. Entre la thymidine tritiée et le tritium libre, seuls deux marqueurs ont également affectés de la même manière : la production des ROS et le développement. Cela confirme que le type de radiation, sa localisation dans l'organisme et le temps d'exposition sont trois facteurs ayant une grande importance quant aux effets induits.

H.2. Perspectives de recherche

Ce travail de doctorat, en plus d'avoir permis d'obtenir plus d'informations sur le comportement du tritium organique et sur sa toxicité, a permis d'élaborer de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes d'action du tritium organique. Ces dernières permettent de réfléchir aux perspectives de recherches issues de ce projet de doctorat.

H.2.1. Le développement de nouveaux modèles de simulations : une nécessité pour les expositions *in vivo* chroniques.

Les simulations de microdosimétrie ont été développées sur la base d'un choix précis de volumes cellulaires, correspondant à ceux retrouvés dans les embryons et larves de poisson zèbre à des stades de développement précis (10; 24 et 96 hpf).

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES – H.2. Perspectives de recherche

Cependant, certains volumes n'ont pas été sélectionnés car leurs formes n'étaient pas facilement réalisables avec les géométries de base du code Geant4 utilisé dans le cadre des simulations. La création de nouveaux volumes et leur utilisation dans le cadre de nouvelles simulations représente donc une nécessité afin de confirmer les résultats déjà obtenus dans ce travail de doctorat.

Les simulations de nanodosimétrie, quant à elles, ont uniquement été réalisées sur des noyaux de forme sphérique, composés en totalité d'ADN sous forme d'hétérochromatine. La simulation de noyaux de forme ellipsoïdale, mais également de noyaux composés d'euchromatine, est nécessaire afin d'obtenir plus d'informations sur l'induction de dommages à l'ADN chez le poisson zèbre. Différentes proportions d'hétérochromatine et d'euchromatine devraient également être testées, celles-ci n'étant pas encore connues chez le poisson zèbre, afin de caractériser l'importance du niveau de compaction de l'ADN du poisson zèbre dans la formation des cassures par le tritium organique. La détermination de la proportion entre l'euchromatine et l'hétérochromatine dans le génome du poisson zèbre semble également primordiale afin d'obtenir les résultats les plus pertinents au niveau biologique.

Pour finir, dans toutes les simulations, les cellules ont été considérées comme étant "hors" de l'organisme. En effet, elles ont toujours été estimées comme étant au plus proche de la source radioactive, ce qui n'est pas le cas dans la nature. En effet, comme présenté dans la discussion générale de ce manuscrit (*cf.* partie G.1), le tritium sous forme organique n'est pas réparti de manière homogène dans les organismes vivants. La mise en place d'un modèle représentant le poisson zèbre et, par conséquent, toutes les cellules le constituant serait nécessaire afin d'obtenir des résultats plus en rapport avec les expositions *in vivo*, mais cela n'est pas réalisable à l'heure actuelle. Également, comme indiqué dans la même partie de la discussion, toutes les simulations ont pris en compte une exposition de type aiguë, n'excédant pas une durée d'une microseconde. Dans le cas d'une exposition chronique, il est nécessaire de traiter ces résultats avec prudence et de prendre en compte cette différence majeure de

conditions d'exposition entre les simulations et les procédures expérimentales. La mise au point de modèles prenant en compte une exposition de plus longue durée (e.g., une exposition de plusieurs jours), permettrait également de considérer l'évolution des dépôts d'énergie avec le temps, mais aussi celle des dommages à l'ADN. Dans le cadre de l'étude de l'évolution de la formation des dommages à l'ADN par le biais de la nanodosimétrie, l'utilisation d'un modèle prenant en compte la réparation de ces lésions et l'élimination des cellules endommagées par différents processus biologiques pourrait également rendre les résultats d'autant plus pertinents dans le cas d'une contamination chronique.

H.2.2. L'étude d'un plus grand nombre de marqueurs de toxicité : une nécessité afin de déterminer les mécanismes toxiques de la thymidine tritiée.

Comme indiqué dans la discussion générale du manuscrit (cf. G.2), plusieurs mécanismes d'action de la thymidine tritiée ont été mis en avant au cours de ce travail de doctorat. Cependant, de nombreuses zones d'ombre persistent quant aux différents mécanismes de toxicité du tritium organique chez les stades précoces de développement du poisson zèbre, ce qui nécessite l'étude, dans le futur, de nouveaux marqueurs de toxicité. De manière générale, l'utilisation de la RNASeq et des analyses protéomiques permettrait d'obtenir plus d'informations sur les empreintes génomiques et protéiques des individus exposés. Cela permettrait, *in fine*, d'avoir une vision plus précise des différents mécanismes biologiques impactés par l'exposition des individus à la thymidine tritiée, mécanismes sur lesquels de futures études pourraient se concentrer. Il serait également pertinent de réaliser des analyses du marqueur γ -H2AX afin de pouvoir faire un lien entre les simulations nanodosimétriques et les résultats obtenus par le biais du test des comètes. Quant aux hypothèses formées au cours de ce travail de doctorat, l'étude de différents marqueurs hormonaux paraît pertinente, entre autres car elle permettrait d'obtenir plus d'informations sur une potentielle

atteinte thyroïdienne, hypothèse élaborée après analyse des effets cardiaques et comportementaux. Une étude plus poussée du développement cardiaque serait également nécessaire, tout comme l'étude d'autres marqueurs comportementaux, tels que la fuite ou, à un stade de développement plus avancé, le comportement de prédation. Ces analyses devraient être accompagnées d'analyses neurologiques et métaboliques, afin de pouvoir déterminer de manière plus précise les mécanismes d'action menant à l'altération comportementale observée dans ce projet.

H.2.3. L'étude de stades de développement plus avancés et d'autres formes biologiques du tritium : une nécessité pour confirmer les hypothèses formées au cours de ce doctorat.

Ce travail de doctorat s'est concentré sur les stades embryo-larvaires du poisson zèbre. Cependant, une quantité importante d'informations sur la toxicité de la thymidine tritiée a été perdue en sélectionnant ces stades de développement.

A long terme, il serait pertinent de se concentrer sur les stades adultes, avec des expositions démarrant, préférentiellement, au moment du développement embryo-larvaire. L'utilisation de poissons adultes permettrait d'obtenir plus d'informations sur l'internalisation de la thymidine tritiée avec, entre autres, une mesure de l'activité au niveau de chaque organe, afin de déterminer dans quels organes le tritium organique s'accumule majoritairement et, ainsi, quels organes peuvent être considérés comme des organes cibles. L'utilisation de cellules et noyaux de poisson zèbre adulte dans les simulations de micro- et nanodosimétrie permettrait d'obtenir plus d'informations sur les dépôts cellulaires et nucléaires d'énergie, afin de déterminer si le stade de développement de l'individu exposé a une grande importance sur ces dépôts, mais également sur les dommages à l'ADN, leurs types, et leurs origines. L'utilisation d'individus adultes permettrait également de caractériser l'internalisation, le transfert et

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES – H.2. Perspectives de recherche

la toxicité de la thymidine tritiée à moyen et long termes. L'évolution des effets avec le temps pourrait être étudiée, tout comme des effets ne pouvant pas être étudiés sur les stades précoces de développement. Cela pourrait, par exemple, être le cas de l'apparition de tumeurs et d'atteintes au niveau de la reproduction des individus. L'étude de cette dernière pourrait ainsi permettre l'étude des effets maternels, soit ceux uniquement transmis lors de la reproduction, mais aussi l'évolution des effets sur de multiples générations dans le cas d'une étude multi-générationnelle. Les études à long terme pourraient également permettre de mettre en place une étude de dépuraction, afin de déterminer la durée de dépuraction dans du milieu propre nécessaire pour atteindre un niveau de radioactivité interne inférieur à la limite de détection. Cela pourrait également permettre de déterminer l'évolution des effets toxiques au cours de cette même période de dépuraction.

Pour finir, la thymidine tritiée a été étudiée dans ce travail de doctorat, soit la molécule précurseur de la thymine, une des quatre bases azotées de l'ADN. Il pourrait être intéressant de réaliser les mêmes expériences à l'aide des molécules précurseurs des trois autres bases azotées de l'ADN, à savoir la désoxyguanosine (précurseur de la guanine), la désoxycytidine (précurseur de la cytosine) et la désoxyadénosine (précurseur de l'adénine). Cela permettrait ainsi de comparer le comportement et la cinétique d'internalisation des quatre molécules entre elles, mais également les effets toxiques pouvant être induits après exposition du poisson zèbre à différents stades de développement, ou non, par l'exposition à chacune des quatre molécules. Egalement, l'utilisation d'autres espèces aquatiques pourrait être envisagée afin de déterminer la sensibilité de ces dernières à la thymidine tritiée.

Les effets et mécanismes déterminés au cours de cette thèse pourraient également être intégrés dans une Adverse Outcome Pathway (AOP) traitant de la toxicité des radionucléides, ou dans une AOP plus spécifique traitant des effets toxiques du tritium. Si aucune Predicted No-Effect Concentration (PNEC) ne peut être calculée ici par manque de données et de linéarité entre le débit de dose absorbée et l'effet mesuré,

H. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES – H.2. Perspectives de recherche

les résultats obtenus au cours de ce travail de doctorat pourraient être utilisés dans le cadre de l'évaluation du risque. En effet, plusieurs effets toxiques ont été observés à un débit de dose absorbée de 22 $\mu\text{Gy/h}$, ce dernier étant pourtant très proche du débit de dose absorbée considéré comme valeur seuil de protection de l'environnement (10 $\mu\text{Gy/h}$). Des études supplémentaires seraient par conséquent nécessaires afin de déterminer la gravité de ces effets sur les moyen et long termes, mais également afin d'implémenter de nouvelles données dans l'évaluation du risque environnemental.

Bibliographie

- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals, in : Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 67–103. doi :10.1007/978-1-4614-3414-6_3.
- Al-Affan, I.A.M., Watt, D.E., 1987. Determination of quality factors by microdosimetry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 255, 338–340. doi :10.1016/0168-9002(87)91125-9.
- AlAmri, O.D., Cundy, A.B., Di, Y., Jha, A.N., Rotchell, J.M., 2012. Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus sp.* *Environmental Pollution* 168, 107–112. doi :10.1016/j.envpol.2012.04.015.
- Alexandrova, M., Rozhko, T., Vydryakova, G., Kudryasheva, N., 2011. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of peroxides. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 407–411. doi :10.1016/j.jenvrad.2011.02.011.
- Anderson, K.V., Ingham, P.W., 2003. The transformation of the model organism : A decade of developmental genetics. *Nature Genetics* 33, 285–293. doi :10.1038/ng1105.
- Apelt, K., Lans, H., Schärer, O.D., Luijsterburg, M.S., 2021. Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin : DNA damage detection in nucleosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 7925–7942. doi :10.1007/s00018-021-03984-7.

- Arcanjo, C., 2018. Etudes Des Effets de l'eau Tritiée Sur Les Stades de Développement Précoces Chez Le Poisson Zèbre (*Danio Rerio*) : Caractérisation Des Modes d'action. These de doctorat. Aix-Marseille.
- Arcanjo, C., Adam-Guillermin, C., Murat El Houdigui, S., Loro, G., Della-Vedova, C., Cavalie, I., Camilleri, V., Floriani, M., Gagnaire, B., 2020. Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae : A new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species. *Aquatic Toxicology* 219, 105384. doi :10.1016/j.aquatox.2019.105384.
- 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. doi :10.1016/j.aquatox.2018.04.012.
- Arcanjo, C., Maro, D., Camilleri, V., Cavalié, I., Simon, O., Beaugelin-Seiller, K., Carasco, L., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2019. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages : Importance of rapid isotopic exchange. *Journal of Environmental Radioactivity* 203, 30–38. doi :10.1016/j.jenvrad.2019.02.009.
- ASN, 2010. Livre Blanc Du Tritium.
- ASN, 2018. Livre Blanc Du Tritium & Bilan Des Rejets de Tritium Pour Les INB.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* 327, 48–60. doi :10.1016/j.canlet.2011.12.012.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 497–505. doi :10.1897/06-243R.1.

- Bassing, C.H., Alt, F.W., 2004. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 3, 781–796. doi :10.1016/j.dnarep.2004.06.001.
- Beaton, E.D., Gosselin, I., Festarini, A., Gagnaire, B., Farrow, F., Cavalié, I., Shultz, C., Kim, S.B., Walsh, S., Chen, H.Q., Adam-Guillermin, C., Stuart, M., 2019. Correlated responses for DNA damage, phagocytosis activity and lysosomal function revealed in a comparison between field and laboratory studies : Fathead minnow exposed to tritium. *Science of The Total Environment* 662, 990–1002. doi :10.1016/j.scitotenv.2019.01.261.
- Bedford, J.S., Mitchell, J.B., Griggs, H.G., Bender, M.A., 1975. Cell killing by gamma rays and beta particles from tritiated water and incorporated tritiated thymidine. *Radiation Research* 63, 531–543. doi :10.2307/3574104.
- Bonsignorio, D., Perego, L., Giacco, L.D., Cotelli, F., 1996. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote* 4, 101–108. doi :10.1017/S0967199400002975.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 90, 29–36. doi :10.1016/j.aquatox.2008.07.013.
- Braat, A.K., Zandbergen, T., Water, S.V.D., Goos, H.J.T., Zivkovic, D., 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells : Morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics* 216, 153–167. doi :10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1.
- Brinkman, S.F., Hansen, D.L., 2007. Toxicity of cadmium to early life stages of brown trout (*Salmo trutta*) at multiple water hardnesses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1666–1671. doi :10.1897/06-376R.1.
- Brown, J.E., Jones, S.R., Saxén, R., Thørring, H., i Batlle, J.V., 2004. Radiation doses to

- aquatic organisms from natural radionuclides. *Journal of Radiological Protection* 24, A63. doi :10.1088/0952-4746/24/4A/004.
- Brown, R., 1988. Assessment of the Significance of Organically-Bound Tritium in Environmental Materials. Technical Report INFO-0283. Atomic Energy Control Board.
- Brun, N.R., van Hage, P., Hunting, E.R., Haramis, A.P.G., Vink, S.C., Vijver, M.G., Schaaf, M.J.M., Tudorache, C., 2019. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval zebrafish. *Communications Biology* 2, 1–9. doi :10.1038/s42003-019-0629-6.
- 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. *Journal of Physiology-Paris* 97, 77–86. doi :10.1016/j.jphysparis.2003.10.009.
- Budick, S., O'Malley, D., 2000. Locomotor repertoire of the larval zebrafish : Swimming, turning and prey capture. *Journal of Experimental Biology* 203, 2565–2579. doi :10.1242/jeb.203.17.2565.
- CEA, 2002. Livret La Radioactivité : Définition, Origines et Applications.
- Chao, T.C., Wang, C.C., Li, J., Li, C., Tung, C.J., 2012. Cellular- and micro-dosimetry of heterogeneously distributed tritium. *International Journal of Radiation Biology* 88, 151–157. doi :10.3109/09553002.2011.595876.
- Chen, J., 2006. Radiation quality of tritium. *Radiat Prot Dosimetry* 122, 546–548. doi :10.1093/rpd/nc1411.
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 749–762. doi :10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.

- Cleaver, J.E., Holford, R.M., 1965. Investigations into the incorporation of [3H]thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 103, 654–671. doi :10.1016/0005-2787(65)90086-9.
- Cleaver, J.E., Thomas, G.H., Burki, H.J., 1972. Biological damage from intranuclear tritium : DNA strand breaks and their repair. *Science* 177, 996–998. doi :10.1126/science.177.4053.996.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R., 1997. The comet assay : What can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375, 183–193. doi :10.1016/S0027-5107(97)00013-4.
- Colwill, R.M., Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural Processes* 86, 222–229. doi :10.1016/j.beproc.2010.12.003.
- Concha, M., Adams, R., 1998. Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula : A time-lapse analysis. *Development* 125, 983–994. doi :10.1242/dev.125.6.983.
- 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 (*M. galloprovincialis*). *Journal of Environmental Radioactivity* 164, 325–336. doi :10.1016/j.jenvrad.2016.07.034.
- Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 126–134. doi :10.1007/BF01055567.
- Delistraty, D., 2008. Radioprotection of nonhuman biota. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1863–1869. doi :10.1016/j.jenvrad.2008.09.001.
- Diabate, S., Strack, S., 1993. Organically Bound Tritium. *Health Physics* 65.

- Dill, L.M., 1974. The escape response of the zebra danio (*Brachydanio rerio*) I. The stimulus for escape. *Animal Behaviour* 22, 711–722. doi:10.1016/S0003-3472(74)80022-9.
- Dos Santos, M., Delorme, R., Salmon, R., Prezado, Y., 2020. Minibeam radiation therapy : A micro- and nano-dosimetry Monte Carlo study. *Medical Physics* 47, 1379–1390. doi:10.1002/mp.14009.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology* 68, 85–111. doi:10.1016/S0301-0082(02)00075-8.
- Dumont, J.N., Brummet, A.R., 1980. The vitelline envelope, chorion, and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. *Gamete Research* 3, 25–44. doi:10.1002/mrd.1120030105.
- Easter, Stephen S., Jr., Nicola, G.N., 1996. The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology* 180, 646–663. doi:10.1006/dbio.1996.0335.
- Ehmann, U.K., Williams, J.R., Nagle, W.A., Brown, J.A., Belli, J.A., Lett, J.T., 1975. Perturbations in cell cycle progression from radioactive DNA precursors. *Nature* 258, 633–636. doi:10.1038/258633a0.
- Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., Wong, K.Y., Kraves, S., Dowling, J.E., 2007. OFF ganglion cells cannot drive the optokinetic reflex in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19126–19131. doi:10.1073/pnas.0709337104.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild : A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–40. doi:10.1089/zeb.2006.9997.
- Falk, M., Lukasova, E., Kozubek, S., 2010. Higher-order chromatin structure in DSB

- induction, repair and misrepair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704, 88–100. doi:10.1016/j.mrrev.2010.01.013.
- Felsenfeld, A.L., Walker, C., Westerfield, M., Kimmel, C., Streisinger, G., 1990. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development* 108, 443–459. doi:10.1242/dev.108.3.443.
- Fernandes, A.M., Fero, K., Arrenberg, A.B., Bergeron, S.A., Driever, W., Burgess, H.A., 2012. Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae. *Current Biology* 22, 2042–2047. doi:10.1016/j.cub.2012.08.016.
- Ferreira, M.F., Turner, A., Vernon, E.L., Grisolia, C., Lebaron-Jacobs, L., Malard, V., Jha, A.N., 2023. Tritium : Its relevance, sources and impacts on non-human biota. *Science of The Total Environment* 876, 162816. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162816.
- Field, H.A., Dong, P.D.S., Beis, D., Stainier, D.Y.R., 2003. Formation of the digestive system in zebrafish. ii. pancreas morphogenesis. *Developmental Biology* 261, 197–208. doi:10.1016/S0012-1606(03)00308-7.
- Fischer, K.F., Lukasiewicz, P.D., Wong, R.O.L., 1998. Age-dependent and cell class-specific modulation of retinal ganglion cell bursting activity by GABA. *J. Neurosci.* 18, 3767–3778.
- Fitzgerald, J.A., Kirla, K.T., Zinner, C.P., vom Berg, C.M., 2019. Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Scientific Reports* 9, 13647. doi:10.1038/s41598-019-49614-y.
- Fraysse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 253–267. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.015.
- Freeman, J.L., Adeniyi, A., Banerjee, R., Dallaire, S., Maguire, S.F., Chi, J., Ng, B.L., Zepeda, C., Scott, C.E., Humphray, S., Rogers, J., Zhou, Y., Zon, L.I., Carter, N.P.,

- Yang, F., Lee, C., 2007. Definition of the zebrafish genome using flow cytometry and cytogenetic mapping. *BMC Genomics* 8, 195. doi :10.1186/1471-2164-8-195.
- Friedland, W., Kunderát, P., 2013. Track structure based modelling of chromosome aberrations after photon and alpha-particle irradiation. From DNA Damage to Chromosomal Aberrations 756, 213–223. doi :10.1016/j.mrgentox.2013.06.013.
- Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Shultz, C., Kim, S.B., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., Farrow, E., Beaton, D., Tan, E., Wen, K., Stuart, M., 2017. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments : A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Science of The Total Environment* 599–600, 597–611. doi :10.1016/j.scitotenv.2017.04.210.
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Camilleri, V., Simon, O., Dubourg, N., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., 2021. Effects of gamma ionizing radiation exposure on *Danio rerio* embryo-larval stages - comparison with tritium exposure. *Journal of Hazardous Materials* 408, 124866. doi :10.1016/j.jhazmat.2020.124866.
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Camilleri, V., Simon, O., Floriani, M., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., 2020a. Tritiated water exposure in zebrafish (*Danio rerio*) : Effects on the early-life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39, 648–658. doi :10.1002/etc.4650.
- Gagnaire, B., Cavalié, 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*. *Aquatic Toxicology* 169, 69–78. doi :10.1016/j.aquatox.2015.10.005.
- Gagnaire, B., Cavalié, 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 Applica-

- tion Au Tritium et à l'irradiation Gamma (Action GGP-Environnement, Fiche V1-201, Année 2015). Technical Report.
- Gagnaire, B., Gosselin, I., Festarini, A., Walsh, S., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Della-Vedova, C., Farrow, F., Kim, S.B., Shkarupin, A., Chen, H.Q., Beaton, D., Stuart, M., 2020b. Effects of in vivo exposure to tritium : A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Environ Sci Pollut Res 27, 3612–3623. doi :10 . 1007/s11356-018-3781-5.
- Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailes, C., Beresford, N.A., Howard, B.J., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. Journal of Radiological Protection 30, 215. doi :10 . 1088/0952-4746/30/2/S02.
- Ghaddar, B., Diotel, N., 2022. Zebrafish : A new promise to study the impact of metabolic disorders on the brain. International Journal of Molecular Sciences 23, 5372. doi :10 . 3390/ijms23105372.
- Glickman, N.S., Kimmel, C.B., Jones, M.A., Adams, R.J., 2003. Shaping the zebrafish notochord. Development 130, 873–887. doi :10 . 1242/dev . 00314.
- 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) .
- González-Doncel, M., Larrea, M., Sánchez-Fortún, S., Hinton, D.E., 2003. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. Chemosphere 52, 75–83. doi :10 . 1016/S0045-6535(03)00227-3.
- Grandel, H., Schulte-Merker, S., 1998. The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). Mechanisms of Development 79, 99–120. doi :10 . 1016/S0925-4773(98)00176-2.
- Grierson, J., Neville, A., 1981. Helicoidal architecture of fish eggshell. Tissue and Cell 13, 819–830. doi :10 . 1016/S0040-8166(81)80016-X.

- Hada, M., Sutherland, M., 2006. Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation. *Radiation Research* 165, 223–230. doi :10.1667/RR3498.1.
- 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*. *Aquatic Toxicology* 74, 205–217. doi :10.1016/j.aquatox.2005.05.013.
- Han, E., Ho Oh, K., Park, S., Chan Rah, Y., Park, H.C., Koun, S., Choi, J., 2020. Analysis of behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) larvae caused by aminoglycoside-induced damage to the lateral line and muscles. *NeuroToxicology* 78, 134–142. doi :10.1016/j.neuro.2020.03.005.
- Han, J., Won, E.J., Lee, B.Y., Hwang, U.K., Kim, I.C., Yim, J.H., Leung, K.M.Y., Lee, Y.S., Lee, J.S., 2014. Gamma rays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 152, 264–272. doi :10.1016/j.aquatox.2014.04.005.
- Hart, N.H., Collins, G.C., 1991. An electron-microscope and freeze-fracture study of the egg cortex of *Brachydanio rerio*. *Cell and Tissue Research* 265, 317–328. doi :10.1007/BF00398079.
- Health Protection Agency, 2007. Review of Risks from Tritium. Technical Report RCE-4.
- Hill, R.L., Johnson, J.R., 1993. Metabolism and dosimetry of tritium. *Health Physics* 65, 628.
- Hisaoka, K.K., Battle, H.I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology* 102, 311–327. doi :10.1002/jmor.1051020205.
- Hopwood, L.E., Dewey, W.C., Hejny, W., 1975. Transport of thymidine during the

- cell cycle in mitotically synchronized CHO cells. *Experimental Cell Research* 96, 425–429. doi :10.1016/0014-4827(75)90279-7.
- Howard, B.J., Larsson, C.M., 2008. The ERICA integrated approach and its contribution to protection of the environment from ionising radiation. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1361–1363. doi :10.1016/j.jenvrad.2008.04.013.
- Hyodo-Taguchi, Y., Egami, N., 1977. Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated water. *Radiation Research* 71, 641–652. doi :10.2307/3574632.
- Icoglu Aksakal, F., Ciltas, A., 2018. Developmental toxicity of penconazole in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere* 200, 8–15. doi :10.1016/j.chemosphere.2018.02.094.
- ICRP, 1977. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Technical Report.
- ICRP, 1996. Age-Dependent Doses to Members of the Public from Intake of Radionuclides : Part 5 Compilation of Ingestion and Inhalation Dose Coefficients. Technical Report 72.
- Incerti, S., Baldacchino, G., Bernal, M., Capra, R., Champion, C., Francis, Z., Guèye, P., Mantero, A., Mascialino, B., Moretto, P., Nieminen, P., Villagrasa, C., Zacharatou, C., 2010. The Geant4-DNA project. *Int. J. Model. Simul. Sci. Comput.* 01, 157–178. doi :10.1142/S1793962310000122.
- IRSN, 2012. Comprendre Les Bases de La Radioactivité.
- IRSN, 2014. Tritium et Environnement.
- IRSN, 2017. Actualisation Des Connaissances Acquisés Sur Le Tritium Dans l'environnement.
- Izrael, Y.A., 2007. Chernobyl radionuclide distribution and migration. *Health Physics* 93, 410. doi :10.1097/01.HP.0000285092.10598.41.

- 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*. *Journal of Environmental Radioactivity* 115, 28–33. doi :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*. *Environmental Pollution* 159, 274–280. doi :10.1016/j.envpol.2010.08.033.
- 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586, 47–57. doi :10.1016/j.mrgentox.2005.05.008.
- Johnson, K., Barragan, J., Bashiruddin, S., Smith, C.J., Tyrrell, C., Parsons, M.J., Doris, R., Kucenas, S., Downes, G.B., Velez, C.M., Schneider, C., Sakai, C., Pathak, N., Anderson, K., Stein, R., Devoto, S.H., Mumm, J.S., Barresi, M.J.F., 2016. Gfap-positive radial glial cells are an essential progenitor population for later-born neurons and glia in the zebrafish spinal cord. *Glia* 64, 1170–1189. doi :10.1002/glia.22990.
- Kang, M.A., So, E.Y., Simons, A.L., Spitz, D.R., Ouchi, T., 2012. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death & Disease* 3, e249–e249. doi :10.1038/cddis.2011.134.
- Kellerer, A., Chmelevsky, D., 1975. Concepts of microdosimetry II. Probability distributions of the microdosimetric variables. *Radiat Environ Biophys* 12, 205–216. doi :10.1007/bf01327348.
- Kim, C.K., Byun, J.I., Chae, J.S., Choi, H.Y., Choi, S.W., Kim, D.J., Kim, Y.J., Lee, D.M., Park, W.J., Yim, S.A., Yun, J.Y., 2012. Radiological impact in Korea following the Fukushima nuclear accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 111, 70–82. doi :10.1016/j.jenvrad.2011.10.018.

- Kim, D.H., Sun, Y., Seok Yun, Ho Lee, S., Kim, B., 2005. Investigating chorion softening of zebrafish embryos with a microrobotic force sensing system. *Journal of Biomechanics* 38, 1359–1363. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.07.014.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310. doi:10.1002/aja.1002030302.
- Kimmel, C.B., Miller, C.T., Kruze, G., Ullmann, B., BreMiller, R.A., Larison, K.D., Snyder, H.C., 1998. The shaping of pharyngeal cartilages during early development of the zebrafish. *Developmental Biology* 203, 245–263. doi:10.1006/dbio.1998.9016.
- Kohn, K.W., 1999. Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2703–2734. doi:10.1091/mbc.10.8.2703.
- Kokel, D., Peterson, R.T., 2008. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Briefings in Functional Genomics* 7, 483–490. doi:10.1093/bfpg/eln040.
- Kong, E.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., 2016. Zebrafish as an in vivo model to assess epigenetic effects of ionizing radiation. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 2108. doi:10.3390/ijms17122108.
- Kratz, E., Eimon, P.M., Mukhyala, K., Stern, H., Zha, J., Strasser, A., Hart, R., Ashkenazi, A., 2006. Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death & Differentiation* 13, 1631–1640. doi:10.1038/sj.cdd.4402016.
- Krylov, V.V., Izvekov, E.I., Pavlova, V.V., Pankova, N.A., Osipova, E.A., 2021. Circadian rhythms in zebrafish (*Danio rerio*) behaviour and the sources of their variability. *Biological Reviews* 96, 785–797. doi:10.1111/brv.12678.
- Kuzin, A., 1963. On the role of DNA in the radiation damage of the cell. *International*

- Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine 6, 201–209. doi :10.1080/09553006314550271.
- Lampe, N., Karamitros, M., Breton, V., Brown, J.M.C., Sakata, D., Sarramia, D., Incerti, S., 2018. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA Part 2 : Electron and proton damage in a bacterial cell. *Physica Medica* 48, 146–155. doi :10.1016/j.ejmp.2017.12.008.
- Landemaine, A., Rescan, P.Y., Gabillard, J.C., 2014. Myomaker mediates fusion of fast myocytes in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451, 480–484. doi :10.1016/j.bbrc.2014.07.093.
- L'Annunziata, M.F., 2012. Chapter 1 - Radiation Physics and Radionuclide Decay, in : L'Annunziata, M.F. (Ed.), *Handbook of Radioactivity Analysis (Third Edition)*. Academic Press, Amsterdam, pp. 1–162. doi :10.1016/B978-0-12-384873-4.00001-3.
- Larsson, C.M., 2004. The FASSET Framework for assessment of environmental impact of ionising radiation in European ecosystems—an overview. *Journal of Radiological Protection* 24, A1. doi :10.1088/0952-4746/24/4A/001.
- Lazarov, E., Arazi, L., Efrati, M., Cooks, T., Schmidt, M., Keisari, Y., Kelson, I., 2011. Comparative in vitro microdosimetric study of murine- and human-derived cancer cells exposed to alpha particles. *Radiation Research* 177, 280–287. doi :10.1667/RR2664.1.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 43–64. doi :10.1016/S1383-5742(03)00017-6.
- Lele, Z., Krone, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 14, 57–72. doi :10.1016/0734-9750(96)00004-3.

- Li, Q., Frank, M., Thisse, C.I., Thisse, B.V., Uitto, J., 2011. Zebrafish : A model system to study heritable skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 565–571. doi :10 . 1038 / jid . 2010 . 388.
- Li, S., Zhang, Y., Xue, H., Zhang, Q., Chen, N., Wan, J., Sun, L., Chen, Q., Zong, Y., Zhuang, F., Gu, P., Zhang, A., Cui, F., Tu, Y., 2021. Integrative effects based on behavior, physiology and gene expression of tritiated water on zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225, 112770. doi :10 . 1016 / j . ecoenv . 2021 . 112770.
- Li, W.B., Hofmann, W., Friedland, W., 2018. Microdosimetry and nanodosimetry for internal emitters. *Radiation Measurements* 115, 29–42. doi :10 . 1016 / j . radmeas . 2018 . 05 . 013.
- Liamsuwan, T., Emfietzoglou, D., Uehara, S., Nikjoo, H., 2012. Microdosimetry of low-energy electrons. *International Journal of Radiation Biology* 88, 899–907. doi :10 . 3109 / 09553002 . 2012 . 699136.
- Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M.C., Panti, C., 2019. Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports* 9, 15775. doi :10 . 1038 / s41598 - 019 - 52292 - 5.
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 380–385. doi :10 . 1007 / BF01054982.
- Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 13–19. doi :10 . 1002 / etc . 5620090103.
- Little, M.P., Wakeford, R., 2008. Systematic review of epidemiological studies of exposure to tritium. *J. Radiol. Prot.* 28, 9. doi :10 . 1088 / 0952 - 4746 / 28 / 1 / R01.

- Liu, S., Narumi, R., Ikeda, N., Morita, O., Tasaki, J., 2020. Chemical-induced craniofacial anomalies caused by disruption of neural crest cell development in a zebrafish model. *Developmental Dynamics* 249, 794–815. doi :10.1002/dvdy.179.
- Loring, M.D., Thomson, E.E., Naumann, E.A., 2020. Whole-brain interactions underlying zebrafish behavior. *Current Opinion in Neurobiology* 65, 88–99. doi :10.1016/j.conb.2020.09.011.
- MacPhail, R.C., 1990. Environmental modulation of neurobehavioral toxicity, in : *Behavioral Measures in Neurotoxicity*, National Academy Press Washington, DC, Washington. pp. 184–190.
- 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. *Neuro-Toxicology* 30, 52–58. doi :10.1016/j.neuro.2008.09.011.
- Mathur-De Vré, R., Binet, J., 1984. Molecular aspects of tritiated water and natural water in radiation biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 43, 161–193. doi :10.1016/0079-6107(84)90006-3.
- McCubbin, D., Leonard, K.S., Bailey, T.A., Williams, J., Tossell, P., 2001. Incorporation of organic tritium (³H) by marine organisms and sediment in the Severn Estuary/Bristol Channel (UK). *Marine Pollution Bulletin* 42, 852–863. doi :10.1016/S0025-326X(01)00039-X.
- Melançon, E., Liu, D.W.C., Westerfield, M., Eisen, J.S., 1997. Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J. Neurosci.* 17, 7796–7804.
- Meng, W., Palmer, J.D., Siedow, M., Haque, S.J., Chakravarti, A., 2022. Overcoming radiation resistance in gliomas by targeting metabolism and DNA repair pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 2246. doi :10.3390/ijms23042246.

- Meylan, S., Incerti, S., Karamitros, M., Tang, N., Bueno, M., Clairand, I., Villagrasa, C., 2017. Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using Geant4-DNA. *Scientific Reports* 7, 1–15. doi :10.1038/s41598-017-11851-4.
- Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P.M., Cotelle, S., Ferard, J.F., 2005. Assessment of the genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *Journal of Environmental Radioactivity* 81, 143–153. doi :10.1016/j.jenvrad.2005.01.003.
- Minsky, A., 2003. Structural aspects of DNA repair : The role of restricted diffusion. *Molecular Microbiology* 50, 367–376. doi :10.1046/j.1365-2958.2003.03705.x.
- Momoshima, N., Nagasato, Y., Takashima, Y., 1990. Kinetic studies on oxidation of molecular tritium by soils. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* 41, 655–660. doi :10.1016/0883-2889(90)90080-Z.
- Moore, H.A., Whitmore, D., 2014. Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLOS ONE* 9, e86176. doi :10.1371/journal.pone.0086176.
- Morstin, K., Kopec, M., Olko, P., Schmitz, T., Feinendegen, L.E., 1993. Microdosimetry of Tritium. *Health Physics* 65, 648–656.
- Moskalev, Y.I., Zhuravlev, V.F., Istomina, A.G., Petrovich, I.K., Kazbekova, D.A., Moghissi, A.A., 1973. Relative Biological Effectiveness of Tritium. Technical Report. Messenger Graphics, Publishers, Las Vegas, NV.
- Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Loro, G., Arcanjo, C., Frelon, S., Floriani, M., Dubourg, N., Baudalet, E., Audebert, S., Camoin, L., Armant, O., 2019. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. *Scientific Reports* 9, 20241. doi :10.1038/s41598-019-56590-w.

- Muruzabal, D., Collins, A., Azqueta, A., 2021. The enzyme-modified comet assay : Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology* 147, 111865. doi :10.1016/j.fct.2020.111865.
- Naito, K., Skog, S., Tribukait, B., Andersson, L., Hisazumi, H., 1987. Cell cycle related [3H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Proliferation* 20, 447–457. doi :10.1111/j.1365-2184.1987.tb01329.x.
- Ortiz-Villanueva, E., Navarro-Martín, L., Jaumot, J., Benavente, E., Sanz-Nebot, V., Piña, B., Tauler, R., 2017. Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach. *Environmental Pollution* 231, 22–36. doi :10.1016/j.envpol.2017.07.095.
- Osman, A.G.M., Mekkawy, I.A., Verreth, J., Kirschbaum, F., 2007. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 1–13. doi :10.1007/s10695-006-9111-8.
- 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. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 624–630. doi :10.1016/j.ntt.2011.08.005.
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., Moshnyakov, M., Podlasz, P., 2006. Modulatory neurotransmitter systems and behavior : Towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 3, 235–247. doi :10.1089/zeb.2006.3.235.
- Parisot, F., Bourdineaud, J.P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 163, 27–36. doi :10.1016/j.aquatox.2015.03.002.
- Pei, D.S., Strauss, P.R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and re-

- pair. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 743–744, 151–159. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.10.003.
- Pierce, G.B., Parchment, R.E., Lewellyn, A.L., 1991. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 46, 181–186. doi:10.1111/j.1432-0436.1991.tb00880.x.
- Plagemann, P.G.W., Richey, D.P., Zylka, J.M., Erbe, J., 1974. Thymidine transport by Novikoff rat hepatoma cells synchronized by double hydroxyurea treatment. *Experimental Cell Research* 83, 303–310. doi:10.1016/0014-4827(74)90343-7.
- Powers, C.M., Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Badireddy, A.R., Padilla, S., 2011. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior : Distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 708–714. doi:10.1016/j.ntt.2011.02.002.
- Powers, C.M., Yen, J., Linney, E.A., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2010. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*) : Persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 391–397. doi:10.1016/j.ntt.2010.01.009.
- Qiang, L., Cheng, J., 2019. Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176, 226–233. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.03.088.
- Rabus, H., Nettelbeck, H., 2011. Nanodosimetry : Bridging the gap to radiation biophysics. *Radiation Measurements* 46, 1522–1528. doi:10.1016/j.radmeas.2011.02.009.
- Rawson, D.M., Zhang, T., Kalicharan, D., Jongebloed, W.L., 2000. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio* : A consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research* 31, 325–336. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00401.x.

- Reiter, L., 1978. An introduction to neurobehavioral toxicology. *Environmental Health Perspectives* 26, 5–7. doi :10.1289/ehp.78265.
- Roesch, W.C., 1977. Microdosimetry of internal sources. *Radiation Research* 70, 494–510. doi :10.2307/3574640, arXiv:3574640.
- Rossi, H.H., 1959. Specification of radiation quality. *Radiation Research* 10, 522–531. doi :10.2307/3570787, arXiv:3570787.
- Rossi, H.H., Biavati, M.H., Gross, W., 1961. Local energy density in irradiated tissues : I. Radiobiological significance. *Radiation Research* 15, 431–439. doi :10.2307/3571286, arXiv:3571286.
- Saint-Amant, L., 2006. Development of motor networks in zebrafish embryos. *Zebrafish* 3, 173–190. doi :10.1089/zeb.2006.3.173.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of Neurobiology* 37, 622–632. doi :10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S.
- Sanches, F.H.C., Miyai, C.A., Pinho-Neto, C.F., Barreto, R.E., 2015. Stress responses to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Physiology & Behavior* 149, 8–13. doi :10.1016/j.physbeh.2015.05.010.
- Santa Cruz, G., 2016. Microdosimetry : Principles and applications. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 21, 135–139. doi :10.1016/j.rpor.2014.10.006.
- Sassi-Messai, S., Gibert, Y., Bernard, L., Nishio, S.I., Lagneau, K.F.F., Molina, J., Andersson-Lendahl, M., Benoit, G., Balaguer, P., Laudet, V., 2009. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PLOS ONE* 4, e4935. doi :10.1371/journal.pone.0004935.
- Sato, T., Matsuya, Y., Hamada, N., 2022. Microdosimetric modeling of relative biological effectiveness for skin reactions : Possible linkage between *in vitro* and *in vivo*

- data. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 114, 153–162. doi:10.1016/j.ijrobp.2022.05.010.
- 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. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 394–404. doi:10.1007/s11356-008-0018-z.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour : Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016.
- Seebacher, F., Little, A.G., James, R.S., 2015. Skeletal muscle contractile function predicts activity and behaviour in zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 218, 3878–3884. doi:10.1242/jeb.129049.
- Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., Blust, R., Witters, H.E., 2013. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicology and Teratology* 37, 44–56. doi:10.1016/j.ntt.2013.01.003.
- Selivanova, M., Rozhko, T., Devyatlovskaya, A., Kudryasheva, N., 2014. Comparison of chronic low-dose effects of alpha- and beta-emitting radionuclides on marine bacteria. *Open Life Sciences* 9, 951–959. doi:10.2478/s11535-014-0331-0.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology* 218, 203–224. doi:10.1002/jmor.1052180209.
- Shen, W., Lou, B., Xu, C., Yang, G., Yu, R., Wang, X., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., 2020. Lethal toxicity and gene expression changes in embryonic zebrafish upon exposure to individual and mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 239, 124802. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124802.

- Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T.G., Gilbin, R., 2011. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of γ irradiation on zebrafish eggs. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 1039–1044. doi :10.1016/j.jenvrad.2011.06.004.
- Smith, J.T., Beresford, N.A., 2005. *Chernobyl : Catastrophe and Consequences*. Springer Praxis Books.
- Stehr, C.M., Hawkes, J.W., 1979. The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus*, and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*. *Cell and Tissue Research* 202, 347–356. doi :10.1007/BF00220430.
- 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. *International Journal of Radiation Biology* 92, 563–571. doi :10.1080/09553002.2016.1222090.
- Sun, G., Liu, K., 2017. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 192, 165–170. doi :10.1016/j.aquatox.2017.09.020.
- Sussman, R., 2007. DNA repair capacity of zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 13379–13383. doi :10.1073/pnas.0706157104.
- Sztal, T.E., Ruparelia, A.A., Williams, C., Bryson-Richardson, R.J., 2016. Using touch-evoked response and locomotion assays to assess muscle performance and function in zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* , e54431doi :10.3791/54431.
- Tang, N., Bueno, M., Meylan, S., Incerti, S., Clairand, I., Villagrana, C., 2019a. Simulation of early radiation-induced DNA damage on different types of cell nuclei. *Radiation Protection Dosimetry* 183, 26–31. doi :10.1093/rpd/ncy237.

- Tang, N., Bueno, M., Meylan, S., Perrot, Y., Tran, H.N., Freneau, A., Dos Santos, M., Vaurijoux, A., Gruel, G., Bernal, M.A., Bordage, M.C., Emfietzoglou, D., Francis, Z., Guatelli, S., Ivanchenko, V., Karamitros, M., Kyriakou, I., Shin, W.G., Incerti, S., Villagrasa, C., 2019b. Assessment of radio-induced damage in endothelial cells irradiated with 40 kVp, 220 kVp, and 4 MV X-rays by means of micro and nanodosimetric calculations. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 6204. doi:10.3390/ijms20246204.
- Thirumalai, V., Cline, H.T., 2008. Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. *Journal of Neurophysiology* 100, 1635–1648. doi:10.1152/jn.90568.2008.
- Thorsen, D.H., Cassidy, J.J., Hale, M.E., 2004. Swimming of larval zebrafish : Fin-axis coordination and implications for function and neural control. *Journal of Experimental Biology* 207, 4175–4183. doi:10.1242/jeb.01285.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay : Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T.G., Glenn, T.C., 2007. Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology* 145, 103–110. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.010.
- Tung, C.J., Chao, T.C., Hsieh, H.W., Chan, W.T., 2007. Low-energy electron interactions with liquid water and energy depositions in nanometric volumes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms* 262, 231–239. doi:10.1016/j.nimb.2007.05.023.
- Turner, J.E., Paretzke, H.G., Hamm, R.N., Wright, H.A., Ritchie, R.H., 1982. Comparative

- study of electron energy deposition and yields in water in the liquid and vapor phases. *Radiation Research* 92, 47–60. doi :10.2307/3575843.
- Ünak, T., Selvi, S., 1995. Microdosimetry of tritium and carbon-14 in different materials. *Applied Radiation and Isotopes* 46, 559–560. doi :10.1016/0969-8043(95)00090-9.
- UNSCEAR, 1996. Sources and Effects of Ionizing Radiation. volume 1. United Nations New York.
- van Pomeran, M., Brun, N.R., Peijnenburg, W.J.G.M., Vijver, M.G., 2017. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquatic Toxicology* 190, 40–45. doi :10.1016/j.aquatox.2017.06.017.
- Villagrasa, C., Rabus, H., Baiocco, G., Perrot, Y., Parisi, A., Struelens, L., Qiu, R., Beuve, M., Poignant, F., Pietrzak, M., Nettelbeck, H., 2022. Intercomparison of micro- and nanodosimetry Monte Carlo simulations : An approach to assess the influence of different cross-sections for low-energy electrons on the dispersion of results. *Radiation Measurements* 150, 106675. doi :10.1016/j.radmeas.2021.106675.
- Von Westernhagen, H., 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae, in : Hoar, W., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press. volume 11, pp. 253–346. doi :10.1016/S1546-5098(08)60201-0.
- Wang, H., Zhou, L., Meng, Z., Su, M., Zhang, S., Huang, P., Jiang, F., Liao, X., Cao, Z., Lu, H., 2019. Clethodim exposure induced development toxicity and behaviour alteration in early stages of zebrafish life. *Environmental Pollution* 255, 113218. doi :10.1016/j.envpol.2019.113218.
- 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. *Aquatic Toxicology* 142–143, 104–113. doi :10.1016/j.aquatox.2013.07.011.

- Westerfield, M., 1993. The Zebrafish Book : A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio (Brachydanio) Rerio*. Institute of Neuroscience, University of Oregon.
- Winter, M.J., Redfern, W.S., Hayfield, A.J., Owen, S.F., Valentin, J.P., Hutchinson, T.H., 2008. Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 57, 176–187. doi :10.1016/j.vascn.2008.01.004.
- Yang, M., Hu, J., Li, S., Ma, Y., Gui, W., Zhu, G., 2016a. Thyroid endocrine disruption of acetochlor on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Journal of Applied Toxicology* 36, 844–852. doi :10.1002/jat.3230.
- Yang, Y., Qi, S., Wang, D., Wang, K., Zhu, L., Chai, T., Wang, C., 2016b. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials* 307, 127–136. doi :10.1016/j.jhazmat.2015.12.055.
- Yang, Y., Tang, T.L., Chen, Y.W., Tang, W.H., Yang, F., 2020. The role of chorion around embryos in toxic effects of bisphenol AF exposure on embryonic zebrafish (*Danio rerio*) development. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 233, 106540. doi :10.1016/j.ecss.2019.106540.
- Yin, C., Kiskowski, M., Pouille, P.A., Farge, E., Solnica-Krezel, L., 2008. Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *Journal of Cell Biology* 180, 221–232. doi :10.1083/jcb.200704150.
- Yoshida, N., Kanda, J., 2012. Tracking the Fukushima radionuclides. *Science* doi :10.1126/science.1219493.
- Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family : Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 47–59. doi :10.1038/nrm2308.

- Zajicek, G., Bernstein, N., Rosin, A., Gross, J., 1963. Studies on the *in vitro* incorporation of tritiated thymidine into ascites tumor cells. *Experimental Cell Research* 31, 390–396. doi :10.1016/0014-4827(63)90015-6.
- Zajicek, G., Gross, J., 1964. Studies on the radiobiological effect of 3H-thymidine on the DNA turnover in Landschütz ascites tumour cells. *Experimental Cell Research* 34, 138–143. doi :10.1016/0014-4827(64)90190-9.
- Zebian, A., Shaito, A., Mazurier, F., Rezvani, H.R., Zibara, K., 2019. XPC beyond nucleotide excision repair and skin cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 782, 108286. doi :10.1016/j.mrrev.2019.108286.
- Zhou, B.B.S., Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response : Putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439. doi :10.1038/35044005.
- Zhou, W., Wang, Y., Wang, J., Peng, C., Wang, Z., Qin, H., Li, G., Li, D., 2023. Geosmin disrupts energy metabolism and locomotor behavior of zebrafish in early life stages. *Science of The Total Environment* 859, 160222. doi :10.1016/j.scitotenv.2022.160222.
- Zirkle, R., Marchbank, D., Kuck, K., 1951. Exponential and Sigmoid Survival Curves Resulting from Alpha and X Irradiation of *Aspergillus* Spores. Technical Report. University of Chicago. Argonne National Laboratory.

Index

A

Acide désoxyribonucléique, 5, 21, 22, 37, 40, 41, 46, 49, 50, 54–57, 59, 63, 69, 87, 89–92, 94–97, 131–134, 154, 155, 174–182, 184–187, 189, 190, 195–201

C

Chorion, 53, 54, 61, 69, 87, 90, 138, 152, 175, 182, 195, 196

Comportement, 23, 45, 50, 60, 156–158, 160, 161, 163, 168–172, 182, 183, 192, 200

D

Domages à l'ADN, 5, 21, 22, 37, 40, 41, 50, 56, 57, 59, 90–92, 94–97, 131–134, 139, 153–155, 176–182, 185–187, 189, 190, 196–200

Débit de dose absorbée, 28, 29, 42, 43, 49, 56, 57, 65, 68, 69, 86, 91, 92, 94, 95, 131, 133, 135, 137–139, 153–155, 157, 159, 162–164, 167, 170, 171, 174, 175, 178, 179, 181–183, 189–193, 195, 196, 201, 202

Développement, 5, 21–23, 42, 44, 50–52, 54, 60–63, 91, 134, 135, 137, 152–155, 169, 181, 182, 191–193, 196, 197, 200, 201

E

Echelle biologique, 49, 58, 135, 137, 156

Eclosion, 5, 45, 51, 53, 61, 69, 135, 137, 152, 155, 179, 181, 182, 191, 193, 196

Efficacité biologique relative, 45, 46, 51, 57, 135, 192, 193

Energie spécifique, 36, 49, 71, 88, 89, 175, 176, 195

Environnement, 32–35

Espèces réactives de l'oxygène, 5, 21, 42, 43, 50, 59, 60, 97, 133–135, 138, 154, 178, 180,
181, 187, 190, 193, 196, 197

Expression génique, 5, 21, 23, 41, 42, 50, 58, 59, 134, 135, 138, 139, 154, 155, 170, 171,
181, 189, 193, 196

H

Hydrogène, 5, 21, 22, 30–33

I

Internalisation, 5, 22, 23, 49, 55, 56, 65, 66, 68, 69, 86, 87, 89, 90, 92, 131, 174, 175, 184,
190, 194, 195, 200, 201

Irradiation gamma, 26, 28, 45, 46, 57, 60, 135, 185, 186, 189–194, 197

M

Macrodosimétrie, 35, 36, 66

Microdosimétrie, 5, 22, 35–37, 39, 49, 62, 66, 70, 88, 174–177, 194, 195, 197, 200

Minéralisation, 68, 69

N

Nanodosimétrie, 5, 22, 23, 35, 37, 62, 91, 92, 95, 97, 132, 133, 174, 176–178, 185, 188,
193–200

P

Poisson zèbre, 5, 22, 41–45, 49–51, 54, 57, 59–63, 65–69, 86, 88, 90–93, 95, 97, 131, 133,
135, 152, 153, 155, 157, 160, 162, 163, 170, 172–175, 179, 182–185, 194, 197–201

R

Radionucléide, 21–28, 33, 41, 48, 50, 60, 173, 184, 189, 192, 201

Rayonnements β , 21, 26, 28, 31, 39, 184, 185

S

Simulation, 23, 36, 49, 50, 62, 66, 69–71, 91, 95–97, 132, 133, 174–178, 185, 188, 195,
197–200

Stress oxydant, 23, 59, 94, 134, 154, 155, 181, 196

T

Thymidine tritiée, 5, 22, 23, 49, 50, 55–61, 65–69, 86–92, 94, 95, 131–135, 137–139,
152–156, 166–170, 172–175, 179, 181–184, 189–192, 194–197, 199–201

Transfert d'énergie linéique, 24–26, 35, 39

Tritium libre, 5, 22, 23, 32–34, 39–46, 50, 57, 59, 60, 65, 68, 86, 87, 89–91, 135, 136, 157,
174, 184–186, 189–195, 197

Tritium non échangeable, 22, 32, 33, 55, 90

Tritium organique, 5, 22, 23, 32, 34, 39–41, 46, 49, 55, 57, 65, 66, 68, 86, 87, 89, 90, 92,
95–97, 132–134, 157, 160, 169, 177, 184–186, 189, 190, 193–195, 197–200

Tritium échangeable, 22, 32, 55

ANNEXES

A. Annexe 1 : Cycle de l'hydrogène dans l'environnement

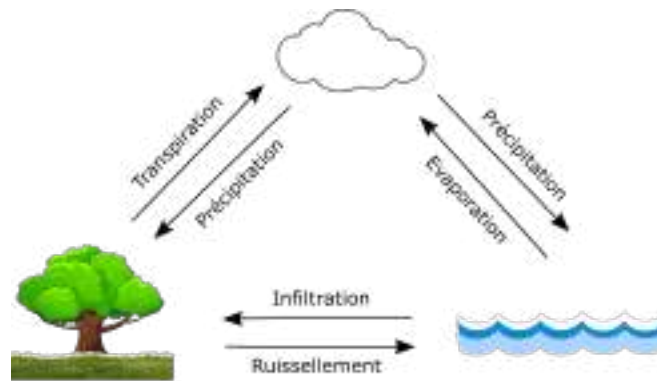


FIGURE S.1. – Cycle de l'hydrogène dans l'environnement. Il y est majoritairement retrouvé sous forme liquide et sous forme gazeuse.

B. Annexe 2 : Protocoles expérimentaux relatifs à l'axe 1

B.1. Reproduction et tri des œufs

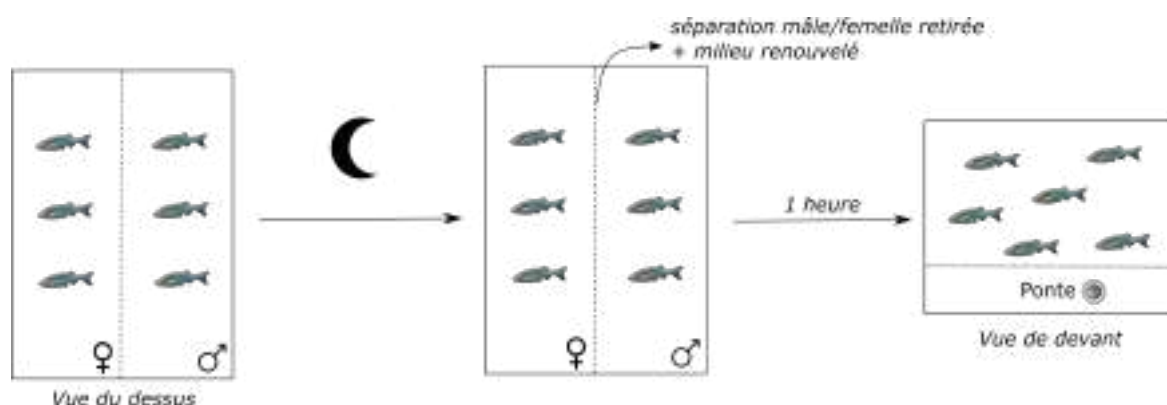


FIGURE S.2. – Représentation schématique de la mise en reproduction des poissons adultes.

Suite à la ponte, les embryons sont récupérés à l'aide d'un filtre et sont placés dans du milieu de culture pour les embryons (milieu embryon présenté par Westerfield (1993)). Après récupération, les embryons sont triés et ceux qui ne sont pas bien développés ne sont pas conservés pour l'expérience. Les embryons triés sont directement répartis dans des boîtes de Petri, chaque boîte correspondant à un réplicat d'expérimentation.

Au moment de la contamination, les embryons sont transvasés dans les cristallisoirs et le milieu de culture des embryons est remplacé par le milieu de contamination.

B.2. Séchage et minéralisation pour la mesure d'activité

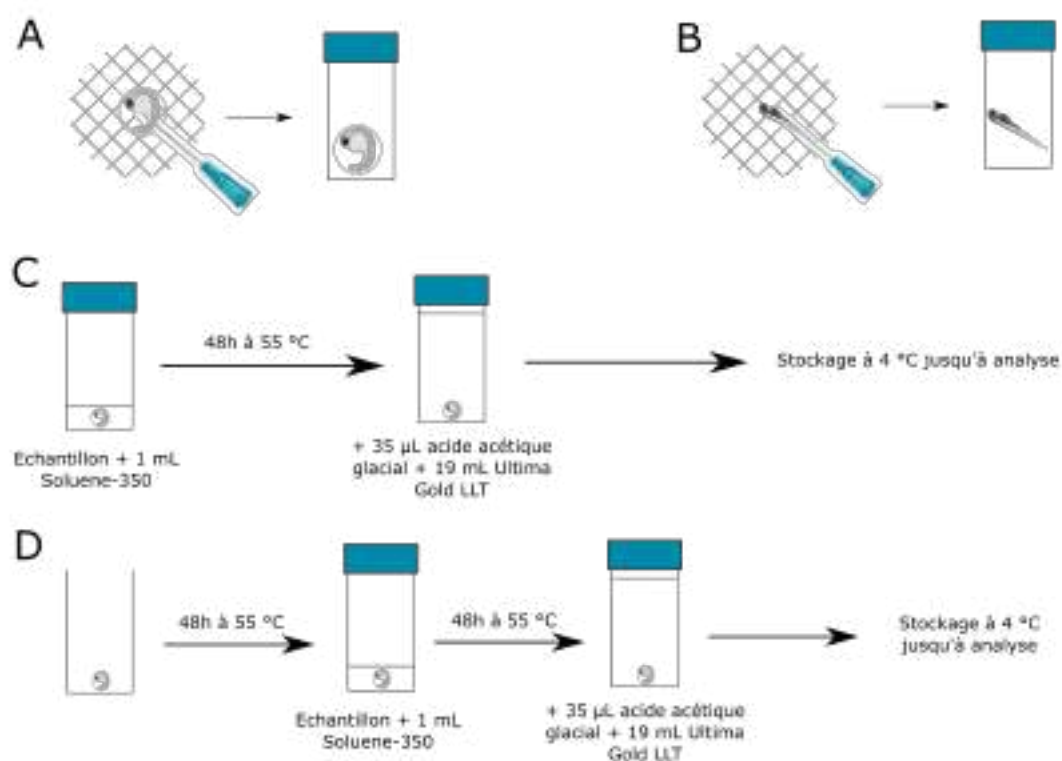


FIGURE S.3. – Protocoles de séchage des embryons (1 - 51 hpf, panel A) et des larves (75 - 99 hpf, panel B) sur filtre et de minéralisation pour mesure ultérieure du tritium total (panel C) et du tritium organique (panel D).

Suite à la minéralisation des individus, les échantillons étaient mesurés par scintillation liquide. Les mesures étaient réalisées sur le Quantulus 1220 (Perkin Elmer), appareil contrôlé par le logiciel WinQ (1220-307 WinQ, PerkinElmer). Chaque échantillon était mesuré trois fois et chaque mesure durait 20 minutes. Les données étaient ensuite traitées à l'aide du logiciel EasyView. Les résultats finaux étaient exprimés en Bq/individu.

B.3. Déchoriation des embryons de 27 et 51 hpf

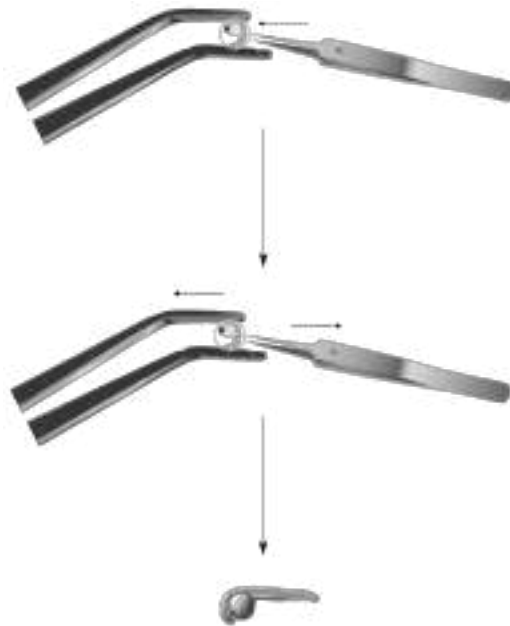


FIGURE S.4. – Représentation du processus de déchoriation des embryons de poisson zèbre.

B. Annexe 2 : Protocoles expérimentaux relatifs à l'axe 1

C. Annexe 3 : Qualification de l'importance de la prise en compte des cellules voisines pendant les simulations de microdosimétrie

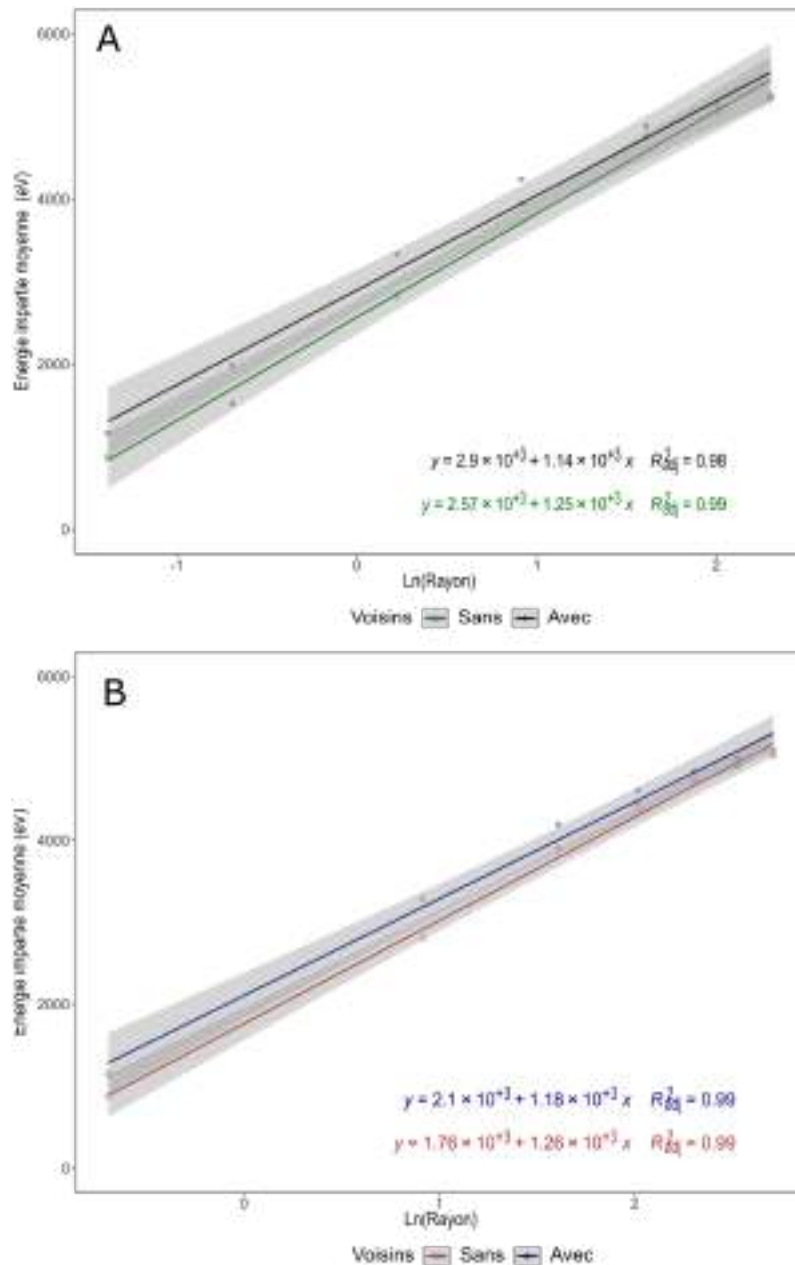


FIGURE S.5. – Energie moyenne (eV) impartie dans les cellules sphériques (A) et ellipsoïdales (B) de différents rayons (μm) par 1 Bq de tritium organique. Les résultats ont été obtenus en simulant 10^6 électrons dans la cellule d'intérêt dans un cas et, dans l'autre cas, dans la cellule d'intérêt et ses cellules voisines.