



Effets immédiats et retardés de l'exposition à la neurotoxine  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) durant le développement du killifish des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) sur les traits de croissance, le comportement et la méthylation de l'ADN

---

Emma Wauthier

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Université de Namur

Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive

Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology

Promoteur : Frédéric Silvestre (URBE, UNamur)

Encadrante journalière : Valentine Chapelle (URBE, UNamur)

Année académique 2019-2020

## Remerciements

Je tiens à remercier les personnes de l'URBE pour les toutes les conversations intéressantes ces 8 derniers mois, celles autour d'un thé à la cafétaria ou du vendredi après-midi au laboratoire. Merci également pour les séminaires intéressants auxquels j'ai eu la chance d'assister, comme celui de Ryan Earley de l'Université d'Alabama. Et aussi toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce mémoire. Je pense plus particulièrement à Valentine Chapelle, merci pour ta patience avec mon éternelle distraction, tes conseils, ta disponibilité à toute heure de la journée, tes corrections très constructives et ton encadrement. Ainsi qu'à Jérôme Lambert, merci pour ton aide lors des manipulations moléculaires (le pyroséquençage n'a plus aucun secret pour toi), tes blagues en « espagnol » et, por supuesto, tes sages citations familiales.

Merci aussi à mes parents pour les relectures, et à Eva, Thomas, Meggie, Sophie, Alexia, Laurélène, Elise, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont apporté du positif, du calme et des conseils lors de la rédaction. Et surtout, merci à mes parents de m'avoir donné l'opportunité de faire des études qui me passionnent, sans cesser de me soutenir malgré les moments de doutes et de remise en question.

Et enfin, un grand merci à Frédéric Silvestre pour son accueil au sein de l'équipe, sa confiance et son optimisme qui ont grandement contribué à ma motivation et ma détermination ces 8 derniers mois. Grâce à cette expérience, j'ai appris à devenir plus rigoureuse, améliorer mes compétences en laboratoire et mieux cerner l'équilibre entre esprit critique et confiance en soi. J'ai aussi réalisé de nombreuses facettes de la recherche fondamentale, y compris le fait que la curiosité et l'envie de comprendre sont des atouts inépuisables dans le monde de la recherche.

*« L'évolution biologique n'est du reste qu'un cas particulier de l'universelle évolution, car rien n'est stable : nébuleuses, étoiles, continents, climats, sociétés, mœurs, religions, tout est en perpétuelle transformation »*

L. Cuénot et Tétry A., 1951.

## Résumé

L'approche écotoxicologique de ce mémoire est une étude sur la potentielle plasticité développementale induite par de la neurotoxine (BMAA) durant stade larvaire sur l'espèce *Kryptolebias marmoratus*, au niveau comportemental et épigénomique. L'intérêt de ce modèle réside dans sa capacité d'autofécondation, presque unique au monde chez les vertébrés. La variabilité des réponses phénotypique au sein d'une même lignée isogénique peut être alors directement liée à l'influence de l'environnement sur l'épigénome du poisson car la variabilité génétique est très faible.

Pour cela, les effets immédiats et postposés de cette neurotoxine ont été investigués sur un groupe de larves âgés de 14 jours et un groupe de juvéniles âgés de 70 jours. Les larves sont exposées durant les 14 premiers jours après leur éclosion. Trois conditions sont réalisées : Condition C (Contrôle), Condition A (20 µg/L de BMAA) et Condition B (15 mg/L de BMAA).

La BMAA est une neurotoxine produite principalement par des cyanobactéries. Ces phytoplanctons se retrouvent en grandes quantités dans l'environnement notamment lors des eutrophisations. Cette molécule agit comme un analogue du glutamate et est connue pour ses capacités d'excitotoxicité des récepteurs synaptiques. Les actions moléculaires de la BMAA peuvent endommager les neurones de manière irréversibles et induire une hyperactivité chez les individus exposés. La neurotoxine est susceptible de s'accumuler dans les cellules nerveuses et pourrait rester active dans l'organisme à long terme. Des analyses de taux de méthylation sont réalisées afin de caractériser les potentielles épimutations induites par la BMAA durant le développement, ce qui pourrait affecter le phénotype de l'organisme à long terme. Ces analyses se concentrent sur des sites CpG de régions spécifiques de gènes liés aux mécanismes moléculaires de la BMAA ou au comportement d'activité chez les vertébrés, à savoir, les gènes *DRD4*, *Gabrb2*, *RTN4* et *Maoa*.

Selon les résultats des traits de croissance, la BMAA a eu un impact délétère sur la taille et le poids des individus exposés jusqu'à 70 jours post-éclosion. Les traits de croissance reflètent la morphologie qui s'avère très importante pour l'activité de nage car elle peut influencer les stratégies de survie des poissons dans leur milieu naturel. Des tests comportementaux sur l'anxiété, ou thigmotaxie, et l'activité de nage ont été réalisés via des tests de 10minutes en nage libre, analysés sur le logiciel Ethovision. La distance parcourue et la vitesse moyennes sont significativement plus élevées pour les individus juvéniles exposés à la BMAA, ce qui reflète une augmentation de la mobilité induite par la BMAA à long terme. Ces effets pourraient être dûs à des marques épigénétique induite par la BMAA durant le développement. Concernant les analyses de taux de méthylation, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les traitements ni les stades de vie, ce qui pourrait suggérer l'implication d'autres mécanismes épigénétique en tant que source de flexibilité phénotypique chez le *K. marmoratus* pour les gènes sélectionnés, ou l'implication d'autres gènes dans la réponse à ce type de stress chez le *K. marmoratus*.

## Abstract

The ecotoxicological approach of this thesis is a study on the potential neurotoxin-induced developmental plasticity (BMAA) during the larval stage in the species *Kryptolebias marmoratus*, at behavioural and epigenomic levels. The interest of this model resides in its capacity for self-fertilization, which is almost unique in the world among vertebrates. The variability of phenotypic responses within the same isogenic lineage can then be directly linked to the influence of the environment on the fish epigenome because genetic variability is very low.

To this end, the immediate and delayed effects of this neurotoxin were investigated on a group of 14-day old larvae and a group of 70-day old juveniles. Individuals are exposed during the first 14 days after hatching. Three conditions are achieved: Condition C (Control), Condition A (20 µg/L BMAA) and Condition B (15 mg/L BMAA).

BMAA is a neurotoxin produced primarily by cyanobacteria. These phytoplankton are found in large quantities in the environment, particularly during eutrophication. This molecule acts as a glutamate analogue and is known for its ability to excitotoxicity of synaptic receptors. The molecular actions of BMAA can irreversibly damage neurons and induce hyperactivity in exposed individuals. The neurotoxin is susceptible to be accumulated in nerve cells and may remain active in the body over the long term. Methylation rate analyses are performed to characterize the potential epimutations induced by BMAA during development, which could affect the phenotype of the organism in the long term. These analyses focus on CpG sites of specific gene regions related to the molecular mechanisms of BMAA or activity behaviour in vertebrates, namely, the *DRD4*, *Gabrb2*, *RTN4* and *Maoa* genes.

According to the results of growth traits, BMAA had a deleterious impact on the height and weight of exposed individuals up to 70 days post-hatching. Growth traits reflect morphology, which is very important for swimming activity as it can influence survival strategies of fish in their natural environment. Behavioural tests on anxiety, or thigmotaxis, and swimming activity were performed using 10-minute freestyle tests analysed on Ethovision software. Average distance travelled and speed were significantly higher for juvenile individuals exposed to BMAA, reflecting an increase in BMAA-induced mobility over the long term. These effects could be due to epigenetic markings induced by BMAA during development. Regarding methylation rate analyses, no evidence of differences between treatments or life stages could be found, suggesting the implication of other epigenetic mechanisms as a source of phenotypic flexibility in *K. marmoratus* for the selected genes, or involvement of other genes in the response to this type of stress in *K. marmoratus*. The Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) technique could be used to identify genes affected by BMAA via DNA methylation changes.

## Table des matières

Page de garde .....	1
Remerciements .....	2
Résumé .....	3
Abstract .....	4
Lexique.....	8
Partie I : Introduction .....	9
1. Génétique fonctionnelle et épigénétique .....	9
1.1 Définition.....	9
1.2 Mécanismes moléculaires.....	10
1.2.1 Modification des histones.....	10
1.2.2 Les ARN non codants courts (ncRNAs) .....	12
1.2.3 Méthylation de l'ADN.....	13
1.3 Plasticité phénotypique et écotoxicologie .....	15
2. Modèle.....	17
2.1 Caractéristiques générales et cycle de vie .....	17
2.2 Génétique et plasticité phénotypique.....	17
2.3 Aire de répartition et environnement.....	19
2.4 Reproduction .....	20
2.5 Chaîne trophique et comportement naturel .....	21
2.6 Intérêts du modèle .....	22
3. Ecotoxicologie.....	23
3.1 $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) .....	23
3.1.1 Famille des phycotoxines .....	23
3.1.2 Pertinence écologique.....	24
3.2 Mécanismes d'action.....	26
3.2.1 Mode d'action et voie de contamination .....	26
3.2.2 Excitotoxicité.....	26
3.2.3 Incorporation protéique .....	28
3.3 Toxicité et bioaccumulation .....	31
3.4 Ecotoxicité en milieu aquatique .....	32
3.5 Comportement et phénotype.....	36
4. Méthylation .....	38
4.1.1 RTN4.....	38
4.1.2 Maa.....	39

4.1.3	DRD4.....	39
4.1.4	Gabrb2.....	41
1.	Objectifs .....	43
Partie II : Matériel & Methodes .....		44
1.	Elevage .....	44
1.1	Conditions d'élevage.....	44
1.2	Nourriture.....	44
2.	Exposition des larves à la BMAA .....	45
2.1	Design expérimental.....	45
2.2	Récolte des œufs.....	45
2.3	Préparation de la solution mère de BMAA et des différentes conditions d'exposition.....	46
2.4	Conditions contrôle et groupes exposés à la BMAA.....	46
3.	Traits de croissance .....	47
3.1	Test locomotion et thigmotaxie des larves (groupe « effet immédiat ») .....	47
3.2	Test locomotion et thigmotaxie des juvéniles 70 dph (groupe « effets retardés ») .....	49
4.	Euthanasie .....	49
5.	Analyses moléculaires .....	49
5.1	<i>Sélection des individus</i> .....	49
5.2	<i>Choix des primers</i> .....	49
5.3	<i>Extraction d'ADN</i> .....	50
5.4	<i>Evaluation de l'extraction d'ADN</i> .....	50
5.4.1	Nanodrop.....	50
5.4.2	Electrophorèse sur gel .....	51
5.5	<i>Traitement Bisulfite</i> .....	52
5.6	<i>PCR</i> .....	52
5.7	<i>Evaluation de la PCR</i> .....	53
5.8	<i>Pyroséquençage</i> .....	53
6	Analyses statistiques.....	54
6.1	Tailles .....	54
6.2	Poids des larves .....	54
6.3	Taux de croissance .....	54
6.4	Comportement .....	55
6.5	Analyses moléculaires.....	55
Partie III : Résultats.....		56
1.	Traits d'histoire de vie.....	56
1.1	Taille et poids .....	56

1.2	Taux de croissance .....	58
2	Comportement.....	60
3	Analyses moléculaires.....	65
3.1	Détails des primers .....	65
3.2	Méthylation par pyroséquençage.....	65
Partie IV : Discussion.....		68
1.	Traits d'histoire de vie.....	68
2.	Comportement.....	71
3.	Analyses moléculaires.....	75
3.1	RTN4.....	76
3.2	DRD4.....	77
3.3	Mao.....	78
3.4	Gabrb2.....	79
Partie V : Conclusion et perspectives.....		83
Bibliographie.....		85
Annexes I.....		108
I a.	Protocole de préparation de la BMAA - Valentine Chapelle .....	108
I b.	Protocole d'exposition des larves – Valentine Chapelle.....	111
I c.	Protocole test locomotion et thigmotaxie du <i>Kryptolebias marmoratus</i> (stade larvae) – Julie Hétru.....	111
I c. 1	Préparation du test locomotion et thigmotaxie.....	112
I c. 2.	Déroulement du test locomotion et thigmotaxie .....	112
I d.	Protocole test locomotion et thigmotaxie du <i>Kryptolebias marmoratus</i> (stade juvénile) – Valentine Chapelle et Emma Wauthier .....	112
I d. 1	Préparation du test locomotion et thigmotaxie.....	113
I. d.2.	Déroulement test locomotion et thigmotaxie .....	113
I e.	Protocole euthanasie et dissection du <i>Kryptolebias marmoratus</i> – Valentine Chapelle.....	114
I g.	Protocole de traitement bisulfite de l'ADN du <i>Kryptolebias marmoratus</i> larve et juvénile .	116
I h.	Design des amorces (Pyromark Assay Design 2.0 Qiagen).....	117
I i.	Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du <i>Kryptolebias marmoratus</i> larve et juvénile .....	118
I j.	Protocole de pyroséquençage de l'ADN du <i>Kryptolebias marmoratus</i> larve et juvénile.....	120
Annexe II.....		123

## Lexique

ADHD : Attention Deficit Hyperactivity Disorder

AEG : N-(2-aminoethyl)-glycine

BCF : Bioconcentration factor

BMAA :  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine

BMF : Biomagnification factor

CTPs : Cyanobacteria toxin poisonings

DA : Omoic acid

DAB : 2,4-diaminobutyric acid

DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane

Dph : Day post-hatching

DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning

EAAAs : Excitatory amino acids

FST : Porsolt forced swim test

HAB : Harmful Algal Bloom

HOPs: Halogenated organic pollutants

HPA : Hypothalamic–pituitary–adrenal

KARs : Kainate acid receptors

LC50 : Lethal Concentration 50%

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level)

MAGE : Melanoma-associated antigen

OA : Okadaic acid

PBDEs: Polybrominated diphenyl ethers

PSP : Paralytic Shellfish Poisoning

ROS : Reactive oxygen species

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

STX : Saxitoxin

TSS : (Transcription Start Site)

## Partie I : Introduction

### 1. Génétique fonctionnelle et épigénétique

La génétique a longtemps été l'élément principal de réponse aux questions évolutives et adaptatives des espèces. En 1940, le scientifique Conrad Hal Waddington a réuni pour la première fois les notions de transmission non-mendélienne des gènes et leur interaction avec l'environnement. Le terme « épigénétique » est né (Waddington, 1940 ; Van Speybroeck, 2002). Aujourd'hui, le lien du génome avec les conditions environnementales via des mécanismes autres que la génétique est de plus en plus étudié. En effet, les variations environnementales, de plus en plus nombreuses, entraînent un besoin de réponse d'adaptation individuelle rapide et efficace. En réponse aux changements environnementaux comme la température, la pollution et la disponibilité de nourriture, l'épigénétique orchestre l'expression des gènes au travers des différenciations cellulaires, et surtout durant l'embryogenèse (Head, 2014). L'épigénétique joue un grand rôle adaptatif car elle permet l'apparition de nouveaux phénotypes dans les populations (Deans & Maggert, 2015). La relation entre les gènes et le comportement est illustrée par l'équation :

$$V_p = V_G + V_E + V_G \times E$$

Où  $V_p$  correspond à la variabilité phénotypique ( $V_p$ ), qui est influencée par la variabilité génétique ( $V_G$ ), la variabilité environnementale ( $V_E$ ) et l'interaction des gènes avec l'environnement ( $V_G \times E$ ) (Conrad et al., 2011). Les traits phénotypiques dépendent d'une combinaison d'expressions de gènes différents et un gène peut influencer plusieurs traits phénotypiques (pléiotropie). La génétique et l'épigénétique sont donc susceptibles de contribuer à la variabilité phénotypique, et leurs influences respectives précises restent souvent difficile à déterminer (Fellous et al., 2018 ; Réale et al., 2007).

#### 1.1 Définition

L'épigénétique vient du préfixe grec « *epi* » qui signifie « sur » et du terme *genetikós* (« propre à la génération ») (Waddington, 1940 ; Van Speybroeck, 2002). En effet, le domaine étudie la nature et le processus des mécanismes moléculaires qui régulent l'activité du génome sans altération directe dans la séquence d'ADN. En d'autres mots, les différents types de modifications épigénétiques sont situées directement sur les séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) et peuvent influencer leur structure tridimensionnelle. Ces modifications épigénétiques n'induisent pas de modification dans la composition en acide nucléique de la séquence d'ADN (Nilsson et al., 2018 ; Vandegehuchte & Jassen, 2011). Les mécanismes épigénétiques sont caractérisés par la somme de tous les mécanismes nécessaires au développement du programme génétique pour le développement de l'individu (Holliday, 2006). L'épigénome peut être modifié de manière non-héritables et héritable, ainsi que de façon pérenne ou transitoires. Les modifications non-héritables se situent au niveau mitotique, *i.e.* modifications intragénérationnelles. Ces marques épigénétiques ont un impact sur la vie de l'individu principalement

au niveau de la reproduction, du développement, et de la croissance. Tandis que la transmission de manière héritable au niveau méiotique, *i.e.* épigénétique germinale, permet la transmission potentielle de marques épigénétiques au travers des générations (Brander et al., 2017 ; Vandegehuchte & Jassen, 2011). Cette transmission se déroule lorsque l'individu est exposé à un stade précoce de son développement et lorsque la marque est présente dans la lignée germinale (Head, 2014).

## 1.2 Mécanismes moléculaires

Il existe plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Les trois mécanismes les plus étudiés sont la modification d'histones, les ARN non-codants et la méthylation de l'ADN (Brander et al., 2017 ; Nilsson et al., 2018).

### 1.2.1 Modification des histones

Les histones sont des protéines se situant dans le noyau des cellules eucaryotes. Elles sont liées aux chromosomes et permettent la structure hiérarchique de l'ADN en chromatine, plus ou moins condensée. La chromatine est constituée par un réseau de protéines qui permet de maintenir l'ADN en 2 formes distinctes : l'euchromatine, forme la moins condensée, ou l'hétérochromatine, forme la plus condensée. Il existe également des formes de chromatine intermédiaires entre ces deux structures, régulées par des mécanismes protéiques complexes (Sacharowski & Sarnowski, 2019).

La compaction de l'ADN se réalise avec la création de nucléosomes formés chacun d'un octamère de 4 histones H2A, H2B, H3 et H4 (**Figure 1**) (Turner, 1998). L'interaction forte entre les histones et l'ADN s'explique par le fait que les histones sont riches en lysine et arginine, des acides aminés chargés positivement. Ces acides aminés interagissent avec les groupements phosphates de l'ADN, chargés négativement (Gavery & Roberts, 2017 ; Hergeth & Schneider, 2015). Des archées aux eucaryotes supérieurs, la structure dimérique du domaine C-terminal globulaire d'un nucléosome est très conservée, tandis que les extrémités N-terminales projetées à l'extérieur du domaine globulaire sont sujettes à des modifications par ajout ou suppression de groupements chimiques (**Figure 2**) (Bannister & Kouzarides, 2011). Les enzymes responsables de ces modifications sont, entre autres, les histone acétylases (HAT), les histones désacétylases (HDAC), les histones méthyltransférases (HMT) et les histones déméthylases (Gavery & Roberts, 2017 ; Lee & Workman, 2007). Des exemples de modifications particulièrement connus sont la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) et l'acétylation du site H3K27 (Brander et al., 2017).

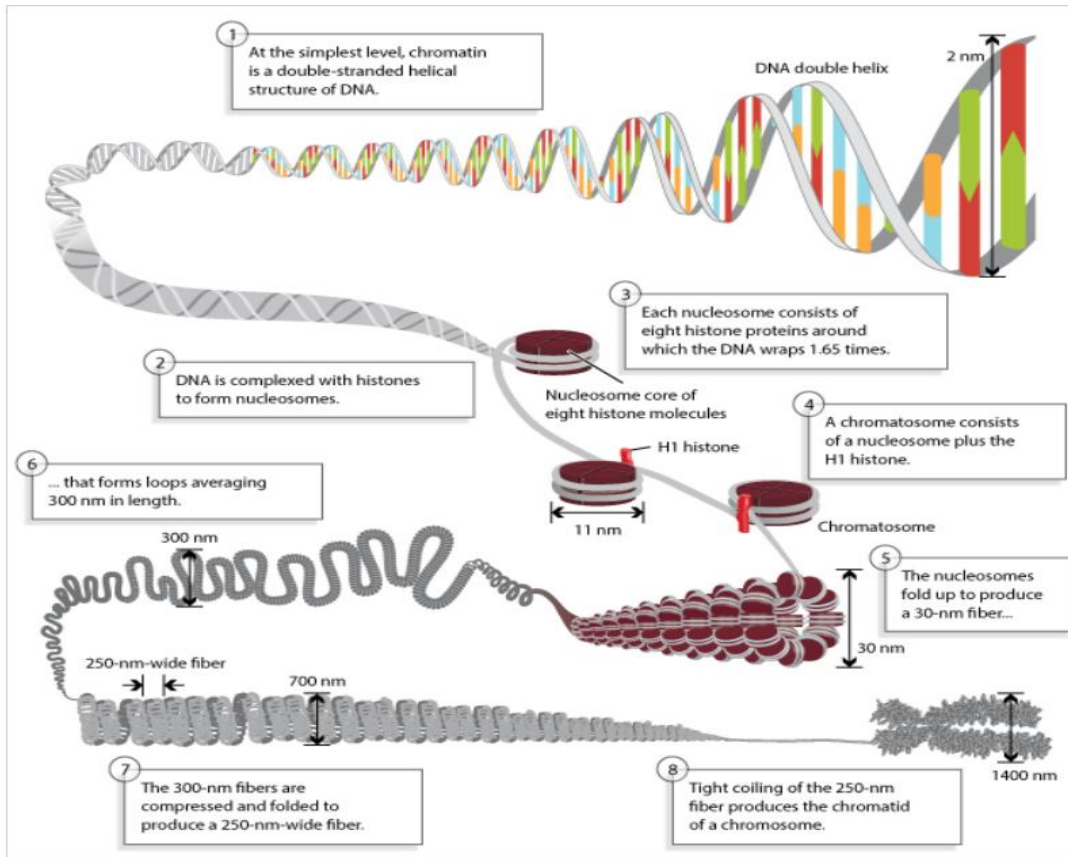


Figure 1 – 1. L'ADN structuré en double-hélice. 2. Les histones, des protéines chargées positivement, qui adhèrent fortement à l'ADN chargé négativement. Ces liaisons entre les protéines et l'ADN forme des complexes appelés nucléosomes. 3. Chaque nucléosome est composé d'ADN enroulé autour de huit protéines histones (longueur 11nm). 4. Un chromatosome est constitué d'un nucléosome avec un sous-domaine de l'histone, H1. 5. Les nucléosomes se replient pour former une fibre de chromatine de 30 nanomètres... 6. qui forme elles-même des boucles d'une longueur moyenne de 300 nanomètres. 7. Les fibres peuvent être comprimée et pliées à leur tour pour produire une fibre de 250 nm de large, qui est étroitement enroulée dans la chromatide d'un chromosome. 8. Un chromosome a généralement une largeur de 1400nm (Pierce, 2012).

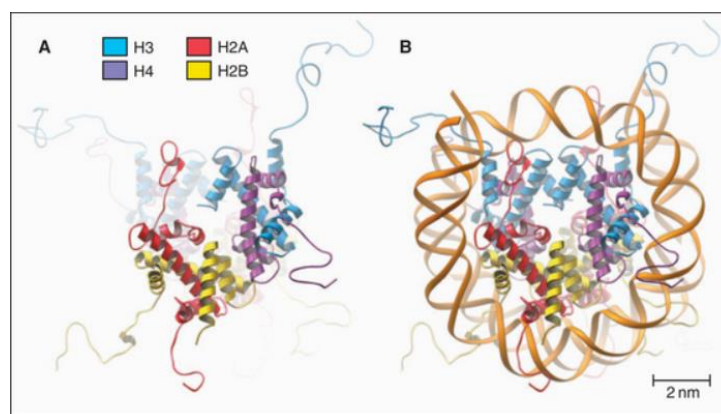


Figure 2 – Structure secondaire des histones à l'intérieur du domaine central. A : Représentation des protéines histone du noyau octamérique du nucléosome. Chaque nucléosome contient une structure caractéristique  $\alpha$ -hélicique, aussi appelé le pli histone. Les parties flexibles des N-terminales se trouvent à l'extérieur du domaine globulaire et jouent un rôle critique dans la régulation de la structure de la chromatine. B : Représentation de l'octamère histone est entouré par l'un des deux tours de l'ADN (Luger et al., 1997).

L'action de ce mécanisme épigénétique est impliqué au niveau de la modulation d'activité de gène(s) par une modification de la structure de la chromatine (Brander et al., 2017). En effet, l'hétérochromatine, au contraire de l'euchromatine, ne permet pas l'accès de l'ADN à l'ARN polymérase II ni aux divers facteurs de transcription impliqués dans la régulation des activateurs et répresseurs de récepteurs nucléaires dimères et monomères (ex : récepteurs glucocorticoïdes). Cela rend donc l'ADN et les régulateurs d'expression de gène difficiles d'accès (Allis & Jenuwein, 2016). Les effets de ces modifications post-traductionnelles réversibles affectent les interactions internucléosomales, et donc la condensation de la chromatine, ce qui influence directement l'expression génique (Bannister & Kouzarides, 2011). Une déacétylation des histones va plutôt réprimer l'expression des gènes en restreignant l'accès des facteurs de transcription à la séquence d'ADN, tandis qu'une acétylation va l'augmenter (Fagiolini et al., 2009).

### 1.2.2 Les ARN non codants courts (ncRNAs)

Cette classe d'ARN a une taille de 20 à 30 nucléotides. Les ARN interférants et les micros ARN (miRNA) qui la composent interfèrent avec l'ARN messager transcrits en s'y liant sous la forme d'un complexe appelé RISC (**Figure 3**). De cette manière, ils empêchent la traduction (Vandegheuchte & Janssen, 2011). Une étude en 2015 a mis en évidence qu'en injectant des ncRNAs, une réduction de transcription maternelle chez des zygotes de souris est induite. De ce fait, une reprogrammation du phénotype se produit via une dysfonction de l'axe hypothalamique - pituitaire - surrénal (HPA). Cela mène à une nette réduction de la réactivité de l'axe du stress HPA chez la progéniture (Rodgers & al, 2015).

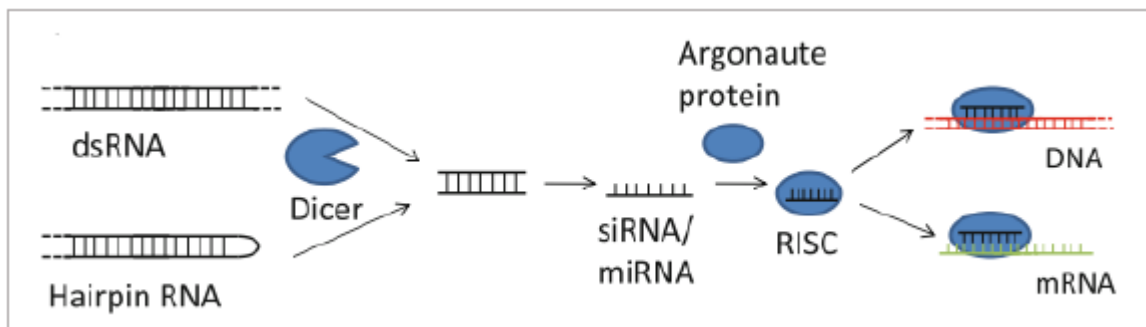


Figure 3 - Les molécules d'ARN non codant comme le microARN (Mirna) et le petit ARN interférent (siRNA) sont formées à partir de molécules d'ARN double brin (dsRNA) ou d'ARN à épingle à cheveux (Hairpin RNA). Le complexe silencieux induit par l'ARN (RISC) cible l'ARN messager complémentaire (ARNm) ou l'ADN et interfère avec la traduction ou la transcription (Vandegheuchte & Janssen, 2011).

### 1.2.3 Méthylation de l'ADN

La méthylation est le mécanisme le plus étudié et le mieux connu pour la caractérisation de l'épigénétique transgénérationnelle. Ce mécanisme consiste en l'addition d'un groupement méthyl sur l'anneau pyrimidine d'une base cytosine, amenant à la création d'une 5-méthylcytosine (5-mC) (Brander et al., 2017). Cette catalyse est réalisée par la dinucléotide méthyl-transférase (DNMT) (Vandegheuchte & Janssen, 2011 ; Zakhari, 2013). Chez les eucaryotes, deux familles d'enzymes DNMT1 et DNMT3A/B sont impliquées dans ce mécanisme. La DNMT1 assure le maintien des marques épigénétiques pendant la division cellulaire. La DNMT3A/B, elle, assure la méthylation de novo de l'ADN. Chez les vertébrés, la méthylation est répartie uniformément sur presque tout le génome, à l'exception notable des îles CpG, trouvées à la position 5' d'un grand nombre de gènes qui sont généralement non méthylés (Suzuki et Bird, 2008). Dans la plupart des cas, la méthylation se produit sur une cytosine précédée d'une base guanine (Moore et al., 2012). Cette tendance forme des sites appelés îlots CpG, ou « 5'-CpG-3' ». Les îlots CpG sont souvent présents dans la région promotrice d'un gène où se lient les facteurs de transcriptions (Bossdorf et al., 2018 ; Nilsson et al., 2018). Les gènes contenant les îlots CpG sont généralement des gènes régulant les fonctions cellulaires de base. Le maintien de leur expression est donc crucial dans toutes les cellules et sous différentes conditions (Eisenberg & Levanon, 2013, Xu et al., 2019). Mais la méthylation de gènes ne se fait pas uniquement sur des îlots CpGs. Une cytosine suivie d'une adénine, d'une thymine ou d'une seconde cytosine peut également être méthylée (Jang et al., 2017). Une autre source de méthylation à prendre en compte est l'hydroxyméthylation de l'ADN (Richa & Sinha, 2014). L'enzyme Ten-Eleven Translocation (TET) de la famille des méthylcytosines dioxygénases se charge de produire la 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) à partir de l'oxydation du 5mC. Cette hydroxyméthylation induirait une augmentation de l'expression des gènes (Tampe et al., 2014)

La répression génique, *l'imprinting*, la suppression d'éléments génétiques répétitifs ou encore l'inactivation du chromosomes X ont un lien avec ce mécanisme de méthylation (Bogdanović & Veenstra, 2009 ; Juan & Bartolomei, 2019). L'inactivation du chromosome X et *l'imprinting* impliquent le silence d'un seul allèle, laissant l'autre intact. Un ensemble inhabituel de gènes actifs dans la lignée germinale, dont la plupart sont liés par le chromosome X, semble utiliser la méthylation pour le silençage complet dans les cellules somatiques. Par exemple, plusieurs gènes MAGE (melanoma-associated antigen) humains et murins ont des promoteurs d'îlots CpG qui sont exempts de méthylation dans les cellules germinales, mais qui sont méthylés dans les cellules somatiques de l'adulte. Récemment, une hypothèse de l'implication des gènes MAGE dans la tumorigenèse a été avancée (Weon & Potts, 2015). Son expression peut être induite par le traitement des cellules non-expressives par des agents déméthylants. Cette stimulation soutient l'idée que la méthylation est un élément important de la répression de ces gènes dans les cellules somatiques (Ando et al., 2019 ; Bird, 2002).

Une des conséquences connues du mécanisme de méthylation de l'ADN est celle de réprimer la transcription de gènes. En effet, les îlots de 5-méthylcytosines encombrant ou inhibent l'accès à des facteurs de transcription, ce qui entraîne souvent une sous-expression de ces gènes (Hofmann, 2017). Cependant, des études suggéreraient que la méthylation sur la partie transcriptionnelle du gène, par opposition à la zone promotrice, corrèle parfois avec une augmentation de l'expression génique (Hong et al., 2019 ; Vandegehuchte & Janssen, 2011 ; Wu et al., 2019). Ainsi, les îlots CpGs méthylés du génome de l'abeille *Apis mellifera*, dont supposés maintenir la transcription d' « house keeping genes » nécessaires au fonctionnement basique des cellules (Foret et al. 2009).

Chez les vertébrés, une empreinte génétique acquise et transmise à sa descendance peut être modifiée durant le développement de l'individu, ce qui permet l'induction de cellules pluripotentes (Head, 2014). Peu après la fertilisation, les marques épigénétiques sont effacées et le génome est soumis à une méthylation *de novo*. Ce phénomène apparaît aux environs de l'éclosion ou de la naissance dans les cellules germinales primordiales, *i.e.* les cellules indifférenciées sexuellement et trouvées dans les gonades. Ces cellules sont potentiellement transmises à la descendance (Kamstra et al., 2015). Des similarités ont été mises en évidence entre les mammifères et les poissons soumis à des environnements aquatiques pollués (**Figure 4**) (Head, 2014).

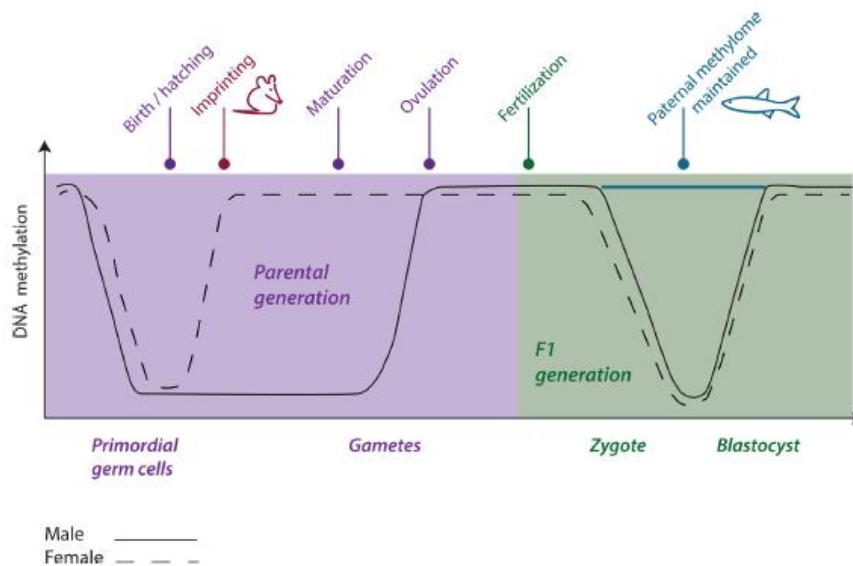


Figure 4 – Comparaison entre les reprogrammations du méthylome de l'ADN durant le cycle de vie des mammifères et des poissons. Le méthylome subit un effacement et une reprogrammation des cellules germinales primordiales au moment de la naissance ou de l'éclosion. L'empreinte épigénétique reste chez les mammifères, ce qui n'a pas encore été assez étudié chez les poissons. A la génération suivante (F1), le méthylome est de nouveau effacé et reprogrammé entre le stade zygote et blastocyste chez les individus mâles et femelles vertébrés représentés. Une différence est observée pour le méthylome parental, maintenu chez les poissons adultes contrairement aux mammifères adultes (Head, 2014).

En réalité, les taux de méthylation diffèrent énormément en fonction des espèces. Par exemple, le nématode *Caenorhabditis elegans* ne possède pas d'ADN conventionnel méthyltransférase et n'a pas de méthylation d'ADN détectable, alors qu'approximativement 5% des cytosines dans l'ADN des

mammifères et des oiseaux sont méthylées (Vandeghechuchte & Janssen, 2011). Dans le corps humain, le cerveau contient un niveau de méthylation élevé allant de 51% à 78%, contre 17 à 48% de méthylation dans les autres tissus. Généralement chez les poissons et amphibiens, seulement 10% des sites CpGs sont méthylés. Les séquences d'ADN riches en sites CpGs y sont essentiellement non méthylées et la méthylation de ces sites conduit souvent au silençage de l'expression de ces séquences d'ADN (Richa & Sinha, 2014a ; Vandeghechuchte & Janssen, 2011). Ce silençage interfère avec le recrutement de protéines MBP (methyl-CpG-Binding proteins) ou la reconnaissance enzymatique, amenant à une diminution de l'expression génique (Bogdanović & Veenstra, 2009 ; Lim et al., 2010 ; Hong et al., 2019). Néanmoins, il existe des exceptions comme le rivulus des mangroves dont le taux de méthylation peut atteindre jusqu'à 87.22% et 79.55%, dans les gonades des mâles et des hermaphrodites respectivement (Fellous et al., 2018). Une étude de 2018 caractérise la méthylation globale de l'ADN des CpGs durant le développement. D'un niveau relativement bas de méthylation dans les œufs fécondés (27,8 %), l'ADN du rivulus est devenu significativement moins méthylée jusqu'aux stades de blastule/gastrula (17,0 % et 15,8 %, respectivement). La méthylation de l'ADN a ensuite augmenté jusqu'au stade de formation du foie (70,0 %) puis est demeuré constant jusqu'à l'éclosion et pendant les 20 premiers jours du stade juvénile (74,4 %), à l'exception d'une diminution significative à 15 dph (70,8 %). Les stress subis juste après la fécondation ont donc très probablement un rôle déterminant pour le phénotype adulte (Fellous et al., 2018). Ces importantes divergences entre espèces suggèrent que la méthylation de l'ADN peut avoir des fonctions variées dans différents organismes (Ghosh et al., 2010 ; Vandeghechuchte & Janssen, 2011 ; Greenberg & Bourchi's, 2019).

### *1.3 Plasticité phénotypique et écotoxicologie*

La pollution des milieux aquatiques engendre des perturbations dans les écosystèmes et, de surcroît, dans les chaînes trophiques. Seuls les organismes dotés des phénotypes les plus flexibles et rapidement adaptables seront capables de s'acclimater à ces changements et à perpétuer leur descendance. Cette capacité d'adaptation peut être possible en partie via la plasticité phénotypique. Cette plasticité est la capacité d'un génotype à produire de multiples phénotypes. Elle est déterminée chez un individu en fonction de l'environnement dans lequel il évolue et peut dépendre des modifications épigénétiques (Agrawal, 2001 ; Mirbahai & Chipman, 2014 ; Fusco & Mineli, 2010 ; Vandeghechuchte & Janssen, 2011, 2014). La plasticité phénotypique développementale est appliquée aux individus du stade juvénile. Il existe une confusion récurrente entre le polymorphisme qui est la variation phénotypique génétiquement contrôlée, et la plasticité phénotypique qui est définie par des traits phénotypiques en fonction d'une gamme d'environnements (Fusco & Mineli, 2010).

La richesse et la stimulation de l'environnement joueraient un rôle déterminant sur l'épigénome. En 2007, une étude a démontré une augmentation des taux d'acétylation et de méthylation des histones H3 et H4 dans les cellules corticales et les cellules de l'hippocampe après trois heures d'exposition à un

milieu enrichi et stimulant (Fischer et al., 2007). La variabilité épigénétique est un potentiel de microévolution des populations naturelles, en leur permettant d'évoluer d'une manière accélérée en réponse aux pressions environnementales brutales (Bossdorf et al., 2008 ; Head, 2012). La résistance au stress peut aussi être déterminée par un changement du profil épigénétique de l'espèce, appelé « epigenetic stress adaptation » (Bossdorf et al., 2008 ; Head, 2012 ; Vandegheuchte & Janssen, 2014). Les maladies ou problèmes de santé suite à des expositions durant le développement des individus sont le résultat de l'épigénétique. En effet, les produits chimiques sont hypothétiquement susceptibles de perturber le processus de méthylation dans les cellules germinales et somatiques, et d'être ainsi la cause d'ajout et/ou de suppression de groupement méthyles sur les séquences d'ADN. Le lien entre les métaux lourds, pesticides et autres produits chimiques et le risque de développer des maladies neurodégénératives est de plus en plus étudié (Alsayyah et al., 2019 ; Collotta et al., 2013 ; Violi et al., 2019). En 2011, le produit paraquat, un herbicide, est suspecté d'être un facteur jouant de dysfonctionnement du système neuronal dopaminergique par acétylation des histones H3 et par diminution de l'activité de l'histone déacétylase HDAC (Song et al., 2011).

Une différence de méthylation en tant que marque épigénétique est hypothétiquement considérée comme un indicateur de stress chez l'organisme. Chez *Daphnia magna*, le produit pharmaceutique 5-azacytidine, le fongicide vinclozolin et le zinc induiraient une diminution globale de la méthylation à des concentrations sublétales (Berbel-Filho et al., 2019 ; Head et al., 2012 Provençal et al., 2019). Une espèce modèle en épigénétique est le poisson zèbre (*Danio rerio*), particulièrement en lien avec des stress écotoxicologiques (Vandegheuchte & Janssen, 2014). Une étude démontre qu'un composé connu pour son action d'inhibiteur de méthylation, le 5-azacytidine, a eu un impact significatif sur la méthylation globale chez le *zebrafish* après 72 jours d'exposition (Bouwmeester et al., 2016). Un autre vertébré est également envisagé comme modèle en épigénétique, le killifish des mangroves *K. marmoratus*. Cette espèce est sensible aux expositions précoces durant le développement, ce qui entraîne des conséquences sur le phénotype adulte de la génération F1 ainsi que des descendants (DeCourten & Brander, 2017 ; Voisin et al., 2016).

## 2. Modèle

### 2.1 Caractéristiques générales et cycle de vie

Le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus* ou *Rivulus marmoratus* (Ong et al., 2007), fait partie des poissons téléostéens actinoptérygiens de l'ordre des Cyprinodontiformes caractérisés par leurs nageoires rayonnées (du grec « acti » : rayon, « ptérygii » : aile) de la famille des Rivulidae (Turko & Wright, 2015). Les espèces de cette famille sont connues pour leur excellente capacité de sauts (Huber, 1992). Le cycle de vie de cette espèce ovipare est composé de trois stades : l'œuf, le stade larvaire et le stade adulte (**Figure 5**). Le stade larvaire commence au premier jour de l'éclosion jusqu'à environ 60 jours et la maturité sexuelle de l'adulte est atteinte vers 90 jours. Avant ce stade de maturité sexuelle, les individus sont considérés comme étant des juvéniles. Le nombre d'œufs pondus par individu peut aller de 10 à 15 par jour (Moore et al., 2012 ; Mourabit et al., 2011). La durée de vie d'un individu est de 3 à 4 ans (Lee et al., 2008).

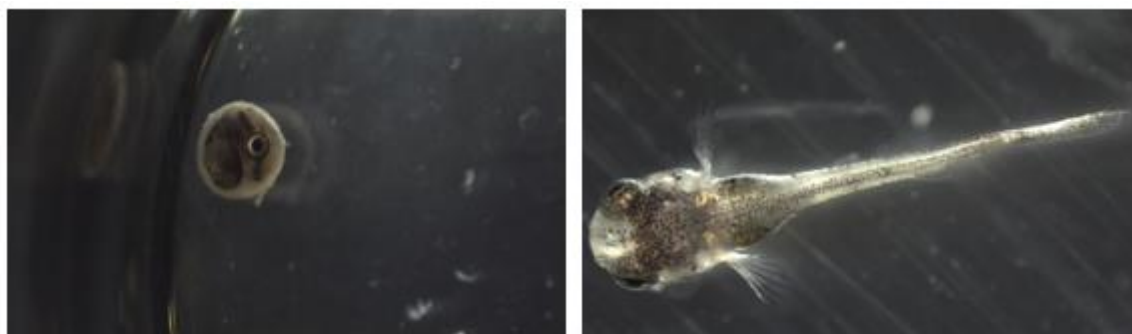


Figure 5 – Photo de droite : œuf de *K. marmoratus*. Photo de gauche : larve de *K. marmoratus* au premier jour de l'éclosion. Photos prises à l'aide du stéréomicroscope SM21270 Nikon et du logiciel associé NIS-elements le 31/05/19.

### 2.2 Génétique et plasticité phénotypique

21 lignées existent au sein de l'espèce *K. marmoratus*, avec un taux de fécondation variant en fonction de la présence de mâles dans la population (Kelley et al., 2016 ; Tatarenkov et al., 2010). Au Belize, les mâles représentent entre 2 et 25% des individus, les autres sont exclusivement hermaphrodites (Lins et al., 2017 ; Sakakura & Noakes, 2000). En Floride, seulement 1% de la population est composée de mâles, ce qui reflète un taux élevé d'homozygocie. Un troisième exemple est la population du Honduras, composée de 2% de mâles. Ceci indique un taux d'autofécondation moins élevé, et donc un taux d'homozygocité plus faible dû à une reproduction croisée plus fréquente (Moran et al., 2015 ; Weeks et al., 2006).

Après 5 à 10 cycles d'autofécondation, le taux d'homozygocité est considéré comme élevé, ce qui signifie que la variabilité interindividuelle est très faible (Earley et al., 2012 ; Mackiewicz et al., 2006.). L'autofécondation limite le risque de dépression consanguine, *i.e.* le risque de diminuer la valeur sélective de l'individu à cause d'allèles délétères révélés à l'état homozygote (malformations, baisse de la fertilité, tares génétiques...) (Charlesworth & Willis, 2009). Le rivulus des mangroves constitue un modèle pertinent pour les études en épigénétique car malgré la faible variabilité de son matériel

génétique, ce poisson est connu pour sa plasticité phénotypique très diversifiée. Cette plasticité phénotypique serait alors due à la sélection naturelle et les influences de l'environnement de manière quasi-exclusives sur le génome. Les changements phénotypiques de ces individus sont parfois extrêmes et rapidement efficaces. Par exemple, cette espèce est euryhaline, *i.e.* capable de survivre à des niveaux de salinités très variables, et supporte des températures allant de 8 à 38 °C (Taylor, 2012). Sa tolérance au manque d'oxygène (< 0.4 mg d'O<sub>2</sub>/L) ou de sulfure d'hydrogène (< 125 ppb) est possible grâce à sa capacité de respiration par la peau (Abel et al., 1987 ; Kristensen, 1970, Taylor, 2012, Turko & Wright, 2015). Par ailleurs, Blanchard et al. ont déterminé quatre gènes impliqués dans l'angiogenèse, *i.e.* la formation de nouveaux vaisseaux sanguins -*vegfa*, *angpt2*, *pecam-1* et *efna1*- qui permettent d'améliorer le transport d'oxygène dès la première heure d'acclimatation à l'air libre (Blanchard et al., 2018). D'autres mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'adaptation à l'environnement terrestre, comme l'excrétion active de NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par stimulation des protéines Rhesus type C de transport de NH<sub>3</sub> non-ionique (Rhcg1 et Rhcg2) (Nawata et al., 2010 ; Livingston et al., 2018).

### 2.3 Aire de répartition et environnement

Sa distribution géographique s'étend de l'Amérique du Sud, probablement jusqu'à la rivière Amazone, à l'Amérique Centrale (Péninsule du Yucatan et Baie de Campêche) et l'Amérique du Nord en passant par la Floride et les Bahamas. Cette large dispersion est probablement due à la grande adhésion des embryons aux feuilles flottantes et détritiques dans les mangroves, répartis dans l'ouest de l'océan Atlantique par des tempêtes et des courants océaniques (Taylor et al., 2008 ; Taylor et al., 2012). Cette hypothèse est appuyée par la découverte de quelques spécimens en Floride génétiquement similaires à la population bélizienne (Tatarenkov et al., 2007). L'entièreté du cycle de reproduction se déroule dans les mangroves, plus spécifiquement les mangroves rouges *Rhizophora mangle* (Taylor, 2012). Les mangroves sont des marais maritimes dans une zone de balancement de marées appelée l'estran. Elles sont situées le long des côtes tropicales et subtropicales peu profondes, et abritées de l'énergie des vagues. Elles sont typiquement retrouvées le long des deltas fluviaux, des lagunes, des îles et des estuaires (**Figure 6**). Les écosystèmes des mangroves sont caractérisés par une faune et une flore ayant sélectionné des adaptations particulières pour survivre dans ces milieux aux conditions instables (Maiti & Chowdhury, 2013 ; Thom, 1984). Les services écosystémiques sont, entre autres, la capacité de filtration, la prévention de l'érosion, la séquestration de CO<sub>2</sub>, le tourisme et la pêche. D'un point de vue environnemental, les mangroves sont les seuls écosystèmes ayant un rôle écosystémique aussi important. (Lewis et al., 2001 ; Maiti & Chowdhury, 2013). Elles servent aussi d'habitat à de nombreuses espèces en danger et détiennent un rôle clef dans le cycle des nutriments au niveau des côtes et des estuaires (Donato et al., 2011 ; Mitchell, 1978 ; Maiti & Chowdhury, 2013).



Figure 6 – Répartition des mangroves dans le monde (Giri et al., 2011).

## 2.4 Reproduction

*K. marmoratus* et *K. hermaphroditus*, son espèce sœur, sont les deux seules espèces étant capables de se reproduire par autofécondation (Harrington, 1961). Les lignées de ces espèces sont caractérisées par leur homozygocité et leur isogénie très importante après plusieurs générations (Earley et al., 2000 ; Lins et al., 2017). La stratégie d'autofécondation interne chez les hermaphrodites permet une assurance de reproduction rapide et peu influencée par la faible probabilité de rencontre d'un partenaire (Kelley et al., 2016 ; Moran et al., 2015). Au cours de l'évolution, l'anatomie des hermaphrodites est sélectionnée de façon à assurer au mieux le succès de cette autofécondation (**Figure 7**) (Sakukara et al., 2006). Les individus naissent hermaphrodite ou mâle, appelés mâles primaires. La morphologie de ces derniers se développe lors d'une incubation à basses températures (18°C - 20°C) (Ellison et al., 2015). Durant leur cycle de vie, une certaine proportion d'individus hermaphrodites sont susceptibles de se transformer en mâles secondaires par perte de tissus ovariens. Cette proportion dépend des conditions de température et de la photopériode (Harrington, 1975) et peut aller jusqu'à 60% (Lee et al., 2008).

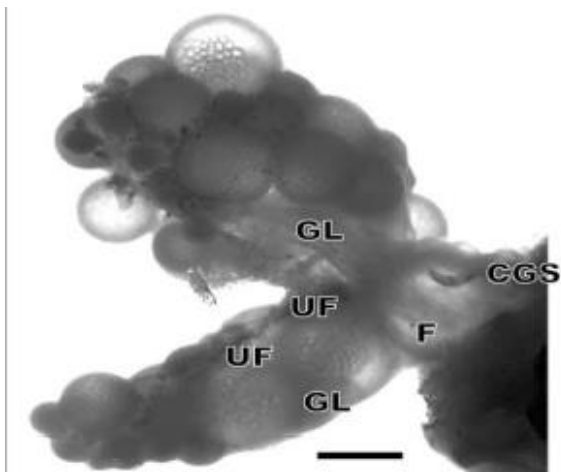


Figure 7 – Anatomie d'une gonade d'un *Kryptolebias marmoratus* hermaphrodite en vue dorsale. Un lobe antérieur est constitué de la cavité ovarienne et un lobe postérieur est constitué du tissu testiculaire. Cette structure bilobée se rejoint au niveau du sinus génital commun (CGS). Après ovulation, les œufs sont déchargés dans le lumen gonadique (GL), tout comme les spermatozoïdes.

Jusqu'à ce jour, aucune femelle n'a été identifiée dans le milieu naturel ni en conditions de laboratoire (Harrington, 1961, 1975; Farmer & Orlando 2012). Des tissus ovariens ont été observés au stade juvénile uniquement (Kelley et al., 2016a ; Sakakura & Noakes, 2000). Cependant, la fécondation de type androdioécie (Costa, 2011) est observée chez les populations où des mâles sont présents, les autres individus étant exclusivement des hermaphrodites (Lins et al., 2017 ; Sakakura & Noakes, 2000). Il existe un dimorphisme sexuel chez cette espèce au niveau de la couleur des écailles. Les poissons mâles ont une coloration orangée dans les régions ventrale et caudale et ne possèdent pas d'ocelles, tandis que les individus hermaphrodites ont une coloration brune, voire grise en laboratoire. Ensuite, 10 à 14 jours après l'éclosion, un ocelle noir proche du pédoncule caudal se développe chez les hermaphrodites (**Figure 8**) (Sakakura & Noakes, 2000; Taylor, 2000). La fonction biologique des ocelles chez les

poissons est associée au mimétisme, et permettrait d'échapper à la poursuite d'un prédateur en le trompant sur le réel emplacement des yeux.



Figure 8 – Photo d'un Killifish mâle (Frédéric Silvestre) (Gauche). Photo d'un Killifish hermaphrodite (Jean-Paul Cicéron KCF80036) (Droite).

Les adultes pondent en milieu aérien, les oeufs sont donc exposés à des conditions extrêmes en oxygène, ammonium, température, humidité et de salinité. Cette stratégie apporte certains avantages comme l'accès à des taux d'oxygène élevés et la réduction de probabilité de rencontre avec les prédateurs aquatiques (Livingston et al., 2018 ; Turko et al., 2018 ; Wright & Turko, 2016 ; Polacik & Podrabsky, 2015). Dû à l'instabilité de leur environnement, les killifish ont développé des stratégies de ponte. Les killifish annuels pondent durant la saison des pluies et entrent en diapause durant la saison sèche, tandis que les killifish non-annuels, dont le rivulus des mangroves fait partie, optent pour une ponte continue et des stades de dormance durant le développement de l'embryon. Pendant un stade de dormance, contrairement au stade de diapause, l'embryon utilise sa réserve vitelline. Il continue donc à grandir et se différencier (Thompson et al., 2017 ; Wourms, 1972).

## 2.5 Chaîne trophique et comportement naturel

Le Killifish des mangroves se nourrit de manière relativement variée, son régime alimentaire est composé d'invertébrés aquatiques et terrestres : des crustacés comme *Artemia* au stade nauplii, des rotifères, des moustiques, des gastropodes, et même parfois ses propres congénères (Gibb et al., 2008 ; Kristensen, 1970 ; Taylor, 1998 ; Taylor, 2012 ; Pandey et al., 2008). Ils sont également capables de retourner dans l'eau pour manger leur proie (Davis et al., 1990). Le mode de vie cryptique et enfouisseur du *K. marmoratus* amène des difficultés au niveau de l'observation des individus (Taylor, 2012). Cette espèce vit dans divers types de micro-environnements d'eau saumâtre pouvant être peu profonds et périodiquement secs comme les terriers de crabe, des déchets de cannettes, à l'intérieur de bûches ou de noix de coco (Taylor, 2012). Plus récemment, Pronko et al. ont déterminé trois comportements locomoteurs caractéristiques du *K. marmoratus* pour sortir de l'eau et capturer leur proies terrestres, à savoir, le bond, le tortillement et le saut (Pronko et al., 2013). Dans leur milieu naturel, l'émersion est un comportement récurrent et utilisé pour capturer des proies terrestres comme les termites, pour échapper aux manipulations humaines ou fuir la prédation (Huehner, 1985 ; Taylor, 1988). L'émersion à l'air libre des individus en laboratoire peut être plutôt causée suite à une forte compétition intraspécifique, ce qui intensifie les comportements agressifs (Taylor, 1990). En Floride et au Belize, un

serpent d'eau des mangroves (*Nerodia fasciata compressicauda*) est identifié comme son principal prédateur (Taylor, 1990). Ses autres prédateurs aquatiques sont principalement composés de poissons d'estuaires et de crustacés accédant à son habitat durant les hautes mers comme le barracuda et le crabe bleu (Taylor, 1990).

## 2.6 Intérêts du modèle

Ce vertébré est devenu une espèce modèle reconnue en écotoxicologique pour sa stratégie de reproduction. Les individus sont capables de se reproduire par autofécondation, ce qui crée une faible variabilité génétique interindividuelle au sein d'une même lignée. Grâce aux caractéristiques génétiques du *Kryptolebias marmoratus*, la variabilité des mécanismes moléculaires évolutifs est alors directement liée à l'environnement (Kelley et al., 2016). De plus, le temps de développement embryonnaire de ce poisson (2 à 4 semaines) et sa maturité sexuelle (70 à 80 jours) sont intéressants pour assurer rapidement des descendance avec un taux d'homozygotie élevé. La longévité de ce poisson assez longue (3 à 4 ans) et son taux de fécondité continu (15 à 20 œufs par jour) sont également des atouts pour l'élevage en laboratoire (Lee et al., 2008 ; Moore et al., 2012 ; Mourabit et al., 2011). De plus, *K. marmoratus* présente des réponses phénotypiques naturelles très flexibles car cette espèce vit dans les mangroves, un écosystème qui comporte des variations de conditions environnementales nombreuses et extrêmes. Les individus doivent donc pouvoir ajuster rapidement et de façon répétée leur phénotype pour s'adapter à leur environnement (Garcia, 2015). La faible variabilité génétique et le contexte environnemental très variable reflètent une adaptation rapide et efficace des individus face aux stress environnementaux, suggérant une grande plasticité phénotypique individuelle au sein d'une lignée isogénique. Ce qui fait de *K. marmoratus* un modèle particulièrement pertinent pour décrire les mécanismes épigénétiques en tant que source de flexibilité phénotypique et de plasticité développementale (Fellous et al., 2018 ; Metzger & Schulte, 2016, 2017 ; Voisin et al., 2019).

En outre, il s'agit d'un organisme avec un niveau de complexité génétique et métabolique plus avancé que des études *in vitro*. Ceci favorise la transposabilité des résultats d'expérience à d'autres organismes modèles pour des études futures. Les avancées scientifiques sur ce modèle permettent de lier la variabilité phénotypique à des mécanismes liés à l'épigénétique de façon plus directe et sont prometteuses pour la neuro-médecine.

## 3. Ecotoxicologie

Depuis les années 60, les questions écologiques ont été placées au rang des préoccupations internationales. L'augmentation de la production et de la consommation dans les domaines de l'énergie, l'agriculture et l'industrie entraîne une présence exponentielle de polluants<sup>1</sup> dans l'environnement. L'écotoxicologie est l'étude des effets toxiques directs ou indirects de ces polluants sur les écosystèmes. La pollution par gaz à effet de serre et les pollutions thermiques des eaux et autres effets écologiques qui ne résultent pas de phénomènes de toxicité en sont exclus (Walker et al., 2001).

La densité importante de polluants relâchés dans l'environnement amène à un surenchérissement en nutriment des milieux aquatiques, où la prolifération des algues nuisibles (HABs) survient de plus en plus fréquemment. De plus, leur étendue s'accroît à cause des conséquences du réchauffement climatique (élévation du niveau des eaux, changements de température, de salinité et de courants marins *etc.*) (Brand & Compton, 2007 ; Cox et al., 2005 ; Rossini & Hess, 2010 ; Van Dolah, 2000). Les HABs entraînent des empoisonnements aux toxines de cyanobactéries (CTPs) principalement dans les milieux marins, mais aussi dans les milieux d'eau douce (Carmichael, 2001). Les maladies digestives et respiratoires liées à ces empoisonnements entraînent des coûts de santé estimés à 1 235 \$ et 14 600 \$, respectivement pour les cas modérés et graves (Kouakou & Poder, 2019). Les impacts de la prolifération du phytoplancton et leur surproduction de toxines, comme la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) utilisée dans le cadre de ce mémoire est un sujet très actuel en écotoxicologie (Cox et al., 2005).

### 3.1 $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA)

#### 3.1.1 Famille des phycotoxines

D'origine naturelle, les phycotoxines sont des molécules de taille allant de 300 à 3000Da et appartiennent à de nombreux groupes chimiques moléculaires différents, produits par des algues. On y retrouve plus de 12 types de toxines, dont les acide domoïques (DA) et les saxitoxines (STX) qui altèrent des canaux et/ou pompes à ions au niveau des membranes des cellules, ce qui perturbe le fonctionnement normal des neurones (Rossini & Hess, 2010). Les cyanobactéries produisent des types de toxines variées en fonction des stress extérieurs. La majorité d'entre elles peuvent produire de la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA), un acide aminé non protéique de structure semblable au glutamate, l'alanine et la sérine (**Figure 9**) (Chiu et al., 2011 ; Cox et al., 2005). La production de BMAA par les algues bleues semble stimulée dans un milieu manquant de nitrogène (Downing et al., 2011). Découverte pour la première fois en 1967 sur l'île Guam, la BMAA ne sera identifiée qu'en 2003 chez les cyanobactéries du genre *Nostoc* (Banack & Cox, 2003 ; Vega & Bell, 1967).

---

<sup>1</sup>altérage biologique, physique ou chimique, qui au-delà d'un certain seuil, et parfois dans certaines conditions (potentialisation), développe des impacts négatifs sur tout ou partie d'un écosystème ou de l'environnement en général.

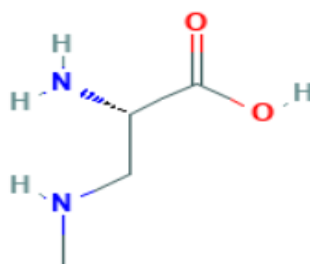


Figure 9 – Structure 2D de la Beta-N-Methylamino-L-Alanine ( $C_4H_{10}N_2O_2$ ), identifiant 15920-93-1 (ChemIDplus, 2019).

### 3.1.2 Pertinence écologique

La densité exponentielle de l'espèce humaine sur terre entraîne de lourdes conséquences environnementales, notamment l'intensification des rejets de substances dans l'environnement. Cela engendre des déséquilibres au sein des écosystèmes, dont l'eutrophisation des milieux aquatiques d'eau douce et saumâtre (Carmichael, 2001). Deux nutriments sont rejetés principalement par l'agriculture lors de l'utilisation de produits fertilisants naturels et synthétiques, l'azote et le phosphore. Ils constituent l'élément déclencheur de l'eutrophisation d'origine anthropique (Pinay et al., 2018 ; Smith, 2003). Cet apport nutritif excessif mène à une modification de l'équilibre de la chaîne trophique. Ce déséquilibre augmente la densité du phytoplancton, la turbidité de l'eau, et la densité de macrophytes. Ce enchaînement d'évènements cause la mort d'espèces zooplanctoniques par anoxie, *i.e.* insuffisance d'oxygène biodisponible, durant la nuit (Pinay et al., 2018; Smith, 2003). De nombreux cas d'anoxie ont été rapportés dans les sites du Golfe du Mexique et de la Mer Baltique (Pinay et al., 2018). En eau douce, les blooms sont plutôt composés de cyanobactéries comme cela a été observé par exemple au lac de Mascoma et aux lacs du Nebraska (Etats-Unis), au lac Winnipeg (Canada), ainsi qu'aux lacs en Nouvelles-Galles du Sud (Australie) (Al-Sammak et al., 2014 ; Bishop et al., 2018 ; Brand et al., 2010 ; Caller et al., 2009 ; Lage et al., 2015 ; Violi et al., 2019). Une quatrième conséquence de l'eutrophisation d'origine anthropique est la surproduction de toxines du phytoplancton, par exemple celles des genre *Alexandrium*, *Dinophysis*, et *Pseudonitzschia* pouvant être diarrhéiques (DSP), paralysantes (PSP), voire même mortelles pour la vie des consommateurs de coquillages. Le lien entre l'eutrophisation et l'augmentation de ces efflorescences toxiques est souvent avéré (Pinay et al., 2018). La BMAA est l'une de ces toxines. Cette substance est produite par de nombreuses espèces de phytoplanctons, y compris les eucaryotes photoautotrophes comme les dinoflagellés et diatomées (Cox et al., 2005). Dans la baie de Biscayne, de hautes concentrations en BMAA ont été relevées après la destruction de mangroves par un projet d'élargissement de route (**Figure 10**) (Brand et al., 2010). L'omniprésence de ce phytoplancton sur terre et en milieu marin ne fait qu'accroître la probabilité d'expositions des écosystèmes et des humains à la BMAA (Cox et al., 2005 ; Cianca et al. 2012a). *In fine*, ce type d'eutrophisation principalement liée aux activités humaines diminue la biodiversité ainsi

que les fonctions écosystémiques de milieux aquatiques en détériorant la qualité des eaux (Faassen, 2016).

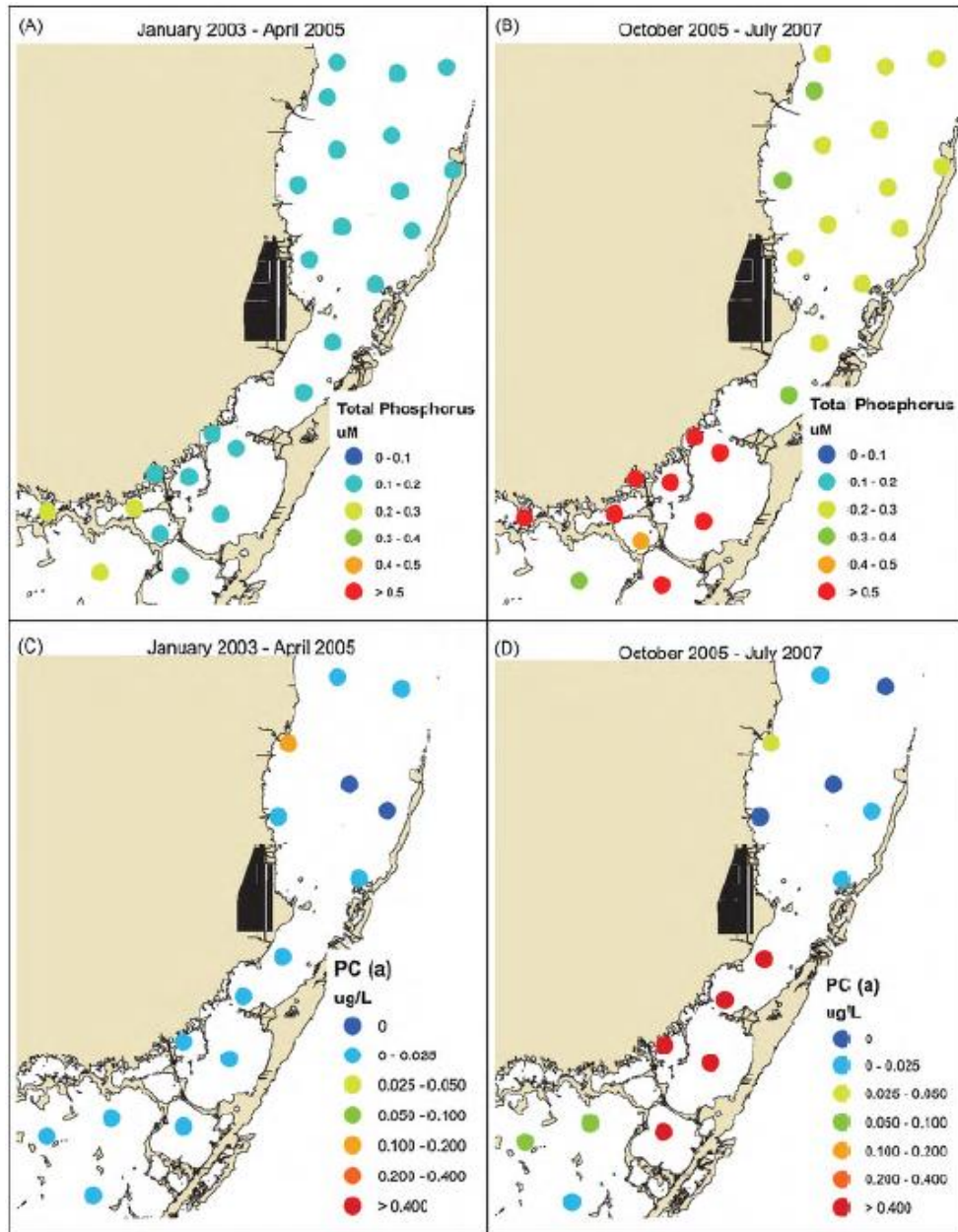


Figure 10 - Concentrations de phosphore et de cyanobactéries (mesurées sous forme de phycocyanine) dans l'est de la baie de Floride et le sud de la baie de Biscayne. (A) Quantité totale de phosphore avant la destruction des mangroves. (B) Quantité totale de phosphore après destruction des mangroves. (C) Concentration des cyanobactéries avant destruction des mangroves. (D) Concentration des cyanobactéries après destruction des mangroves (Brand et al., 2010).

## 3.2 Mécanismes d'action

### 3.2.1 Mode d'action et voie de contamination

La cinétique de transport dans le cerveau du rat a été étudiée par Smith et al. en 1992. L'absorption est compétitive avec l'afflux de l-[14C]-leucine et est inhibée lors d'un excès de leucine (Smith et al., 1992). L'hypothèse est que, quelle que soit la voie de contamination, 80% de BMAA de la dose de départ est capable de traverser la barrière hématoencéphalique (Kisby & Spencer, 2011). Son transport est indépendant du sodium, de l'excès de lysine, de glutamate et de l'acide méthylaminoisobutyrique, ce qui indique un transfert par le grand transporteur cérébrovasculaire d'acides aminés neutres (Smith et al., 1992). Génétiquement, l'affinité variable de la BMAA avec le transporteur L1 (gènes *LAT1* et *LAT2*) influence sur l'absorption ou le transport de la molécule, et donc sur sa toxicité (Bradley et al., 2013).

Les isomères naturels de la BMAA sont la glycine *N*-(2-aminoéthyl)-glycine (AEG) et l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB) (Banack & Murch, 2018). Tout comme la BMAA, l'acide DAB est neurotoxique, plus précisément hépotoxique (O'Neal et al. 1968). L'intégration de la BMAA dans le corps se fait le plus probablement par ingestion de nourriture (crustacés, poissons, plantes) ou d'eau contenant une grande densité de phytoplanctons (Caller et al., 2009). Les molécules de BMAA sont hautement solubles dans l'eau et ne s'y dégradent pas rapidement. En effet, la BMAA ne contient pas de chromophore (du grec « *chrôma* », couleur, et « *phorós* », porteur) qui absorbe à des longueurs d'ondes > 290 nm. Ces molécules ne sont donc pas susceptibles de se dégrader à la lumière par photolyse (Kuschmitz & Hess, 1982 ; Li et al., 1991).

### 3.2.2 Excitotoxicité

La BMAA est une molécule non protéique et un analogue à l'acide aminé glutamate (**Figure 11**). Il s'agit d'un dérivé de l'acide aminé alanine avec un groupe méthylamine sur sa chaîne pouvant lier et stimuler les récepteurs d'acide aminé (Botana & Alfonso, 2015 ; Lobner et al., 2007). Il existe une classe de récepteurs sensibles aux acides aminés excitateurs (EAAs) comme le glutamate ou l'aspartate, deux acides aminés jouant un rôle crucial dans l'apprentissage à long terme et la mémorisation. Ces récepteurs sont présents dans toutes les cellules nerveuses, principalement au niveau des synapses (Chiu et al., 2011). Parmi cette classe de récepteurs, les principaux ont été identifiés : l'acide  $\alpha$ -amine-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) dépendant du calcium, le N-



Figure 11 - Similarité de la structure de la toxine BMAA (A) et l'acide glutamique (glutamate) (B) (Chiu et al., 2011).

méthyl-D-aspartique (NMDA), les récepteurs ionotropiques du kainate (KARs) et le récepteur au glutamate métabolique (mGluR) (Chiu et al., 2011 ; Cucchiaroni et al., 2010 ; Frøyset et al., 2016 ; Lobner et al., 2007 ; Weiss et al., 1989). Ils sont impliqués dans la transmission synaptique en contrôlant les flux d'ions de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  (Smith et al., 1991). L'excitation des récepteurs par les EEAs peut entraîner des afflux excessifs d'ions dans la cellule, en endommageant potentiellement les neurones de manière irréversible (Dong et al., 2009). Une augmentation extracellulaire de glutamate peut également entraîner des dommages neuronaux irréversibles. Elle est due à une excrétion élevée de cet acide aminé ou une diminution de son absorption dans les astrocytes liée à une déficience des récepteurs EAAT2 (excitatory amino acid transport-2) ou GLT-1 (glutamate transport 1) (Van Den Bosch et al., 2006). Cette cascade est illustrée à la **Figure 12**. La large gamme de récepteurs sensibles aux acides aminés excitateurs rend le champ neurotoxique de la BMAA très large (Chiu et al., 2011).

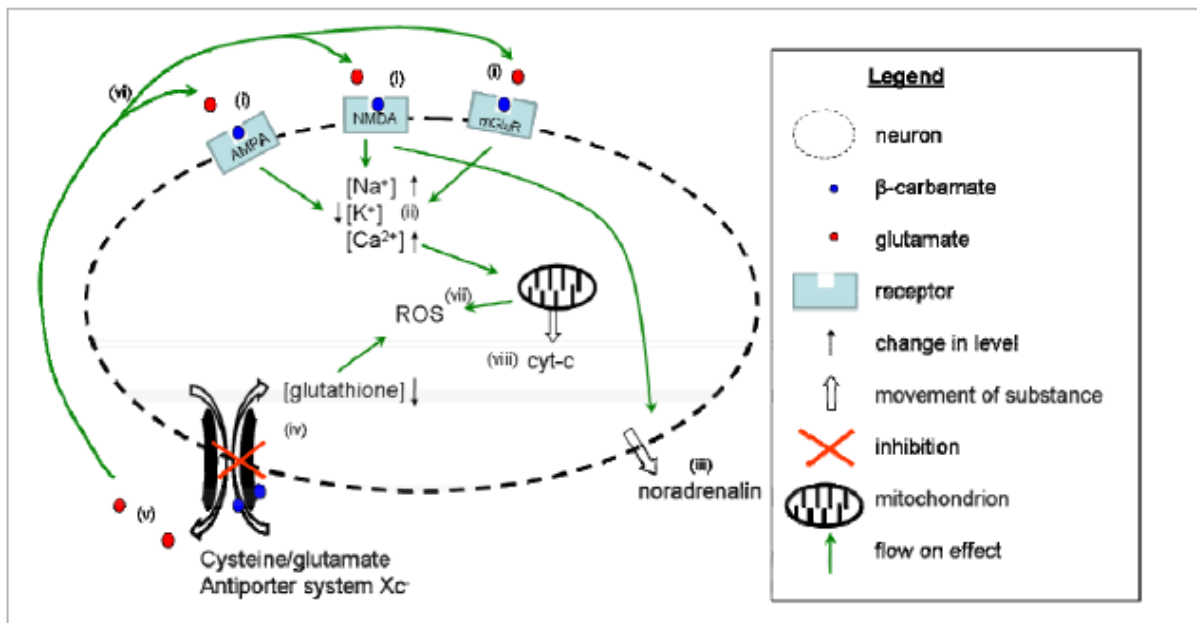


Figure 12- Résumé des modes d'action de la BMAA sur les neurones. Dans un organisme in vivo, la molécule de BMAA est sous forme de  $\beta$ -carbamate (point bleu). (i) Elle est capable de se lier aux récepteurs NMDA, AMPA et mGluR. (ii) L'activation des récepteurs glutamate résulte en une augmentation en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et une réduction en ions dans  $\text{K}^+$  dans la cellule. (iii) La cellule est dépolarisée et la membrane devient perméable (cercle pointillé). Avec la combinaison avec l'activité du récepteur NMDA, la noradrénaline est libérée hors de la cellule. (v) Le système de l'antitransporteur cystéine/glutamate  $\text{Xc}^-$  est inhibé (croix rouge) par la BMAA, ce qui entraîne une libération extracellulaire de glutamates (points rouges), lesquels se lient aux récepteurs, (vi) créant une intensification de l'excitotoxicité. (iv) Cette inhibition cause également une déplétion intracellulaire de glutathion (vii) L'ensemble de ces mécanismes cause une augmentation de production de ROS. (viii) L'augmentation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  mène à un sur enrichissement de la cellule en nombre de mitochondries et résulte en une libération massive de cyt-c dans le cytosol (Chiu et al., 2011).

Les effets de l'excitotoxicité influencent en grande partie l'augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones moteurs, couplé à une disruption de l'activité mitochondriale. L'inhibition du système  $\text{Xc}^-$  antitransporteur de cystine/glutamate induirait également

un stress oxydatif (Liu et al., 2009). Ces effets mènent généralement à une mort cellulaire neuronale, ce qui démontre clairement la présence d'un impact sur les tissus neuronaux (Chiu et al., 2011). Le rôle des effets de la BMAA sur des récepteurs a été appuyé par la régulation d'enzymes comme la cCaMKII $\alpha/\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II), la FAAH (Fatty Acid amide hydrolase) et la GADPH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), toutes trois inhibées par les toxines de cyanobactéries. La CaMKII est un senseur oxydatif crucial dans la mort cellulaire induite par phosphatases tandis que la FAAH faciliterait l'effet antagoniste de la BMAA sur le glutamate (Frøyset et al., 2016).

### 3.2.3 Incorporation protéique

En plus de sa capacité en tant qu'excitateur de récepteurs, la BMMA pourrait s'incorporer dans des structures protéiques de cellules nerveuses via des ARNt synthétases, dont la ARNt synthétase alanine (Murch et al., 2004). En 2013, Dunlop et al. ont présenté une étude démontrant que la tARN synthétase de la sérine pouvait incorporer la BMAA dans des protéines à la place de la L-sérine par erreur (Dunlop et al., 2013). Cette incorporation lui permettrait d'être stockée et de lentement se libérer durant la digestion et par des protéines du métabolisme. Sa présence dans le corps encore des années après l'ingestion est possible (Murch et al., 2004b). Plusieurs études montrent que cette incorporation d'acides aminés non protéinogène dans les protéines neuronales peut faciliter l'apoptose cellulaire via l'agrégation de protéines incorrectement repliées (Bradley, 2015 ; Murch et al., 2004 ; Dunlop et al., 2011). Une recherche in vitro aurait montré que cette association protéique de la BMAA pouvait être inhibée grâce à un excès de L-sérine (Dunlop et al., 2013).

Lors d'une étude écotoxicologique à long terme, une identification des effets neurotoxiques sur les rats adultes (2 semaines à 6mois), a mis en évidence l'activation de protéines jouant un rôle dans le complexe d'inclusion astrocytique (ex : plectine, vimentine, Hsp27, ubiquitine), aussi appelés fibres Rosenthal, connues pour leur implication dans la maladie neurodégénérative d'Alexander. Cette maladie mène à une déficience de mémoire et d'apprentissage à long terme sur les adultes (Karlsson et al., 2015). Depuis 1967, des dizaines d'autres études sur les mécanismes moléculaires de la BMAA ont été menées, dont plusieurs résultats sont résumés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 – Résumé de recherches menées *in vitro* et *in vivo* sur les mécanismes moléculaires de l'activité de la BMAA.

Modèle expérimental	Espèce	Dose et temps d'exposition	Effets et conclusion	Référence
<i>In vivo</i>	Rats	6-14 $\mu$ moles/g de poids corporel	Douleurs, convulsions et perte générale de coordination.	Vega & Bell, 1967
<i>In vivo</i>	Poules	3-7 $\mu$ moles/g de poids corporel	Douleurs, convulsions et perte générale de coordination.	Vega & Bell, 1967
Cellules corticales en culture	Souris	3000 $\mu$ M 3h	Induction de stress oxydatif dû à l'inhibition du système Xc-antitransporteur de cystine/glutamate.	Liu et al., 2009
Cerveau, foie, homogénats de reins	Rats	30000 $\mu$ M 30min pour les coupes (cerveau et foie), 1h pour les homogénats (reins)	L'acide 2,3-diaminopropionique a été formé dans le foie et les reins, et est absent dans le cerveau.	Nunn & Ponnusamy, 2009
Cellules nerveuses	Sangsue	100-3000 $\mu$ M Exposition aigüe	Action sur des récepteurs glutamate ionotropiques (non-NDMA) avec une augmentation de l'input de conductivité membranaire des cellules, une augmentation de l'activité de l'ion Na <sup>+</sup> et une diminution de l'activité de l'ion K <sup>+</sup> .	Lopicic et al., 2009
Cerveau	Rats	100-10000 $\mu$ M Exposition aigüe	BMAA active les récepteurs mGluR1 en causant des dégénération neuronales.  Libération massive de cyt-c dans le cytosol.	Cucchiaroni et al., 2010
Cellules mésencéphaliques	N.d.	30 $\mu$ M	Activation des récepteurs AMPA/kainate impliquant une vulnérabilité des neurones cholinergiques	Liu et al., 2010

<i>In vivo</i>	Rats	100-350 mg/kg/jour Day 21-26	Altérations au niveau des mitochondries et fragmentations du réticulum endoplasmique.	de Munck et al., 2013
<i>In vivo</i>	Rats	460 mg/kg/jour Day 8-9	Activation de protéines chaperonnes (clustérine, GRP-78), du cytosquelette, impliquées dans l'activation astrocytique (plectine, vimentine, Hsp27, ubiquitine).	Karlsson et al., 2015
<i>In vivo</i>	Rats	1, 10 or 100 mg/kg/jour Day 1, 5, 10	Accumulation de la BMAA dans les tissus et organes après 3 expositions, y compris le cerveau  Substitution de la BMAA par un autre acide aminé équivalent à la BMAA peu probable	Waidyanatha et al., 2018
Cellules PC12 (phéochromocytomes)	Rats	3.625–100 µM 48h	Cellules non-différenciées : Légère nécrose dans le milieu riche en arginine, pas de nécrose dans le milieu riche en sérine.  Cellules différenciées : Augmentation de l'apoptose, et des récepteurs mGluR1 après différenciation des cellules.	Van Onselen et al., 2018

### 3.3 Toxicité et bioaccumulation

L'arrivée des Américains sur l'île japonaise appelée Guam a été la première observation d'une maladie neurodégénérative nommée *Guam-complex*, étroitement liée à un syndrome de Parkinson. Cette maladie est alors soupçonnée d'être liée au régime alimentaire des habitants (Reed et al., 1966). Des concentrations de BMAA, jusqu'à l'équivalent de 1014 kg de farine de cycas ingérés, a confirmé la capacité de bioaccumulation de la BMAA dans les ailes de chauves-souris de l'époque. Cette bioaccumulation provoquait une intoxication des habitants locaux qui s'en nourrissaient (Banack & Cox, 2003 ; Cox & Sacks, 2002). La relation symbiotique de fixation d'azote atmosphérique entre les racines coralloïdes des *cycas*, utilisées pour faire de la farine dont les chauves-souris se nourrissent, et les cyanobactéries, a été prouvée (Cox et al., 2002). Deux études le confirmeront en démontrant que plus de 90% de tous les genres testés de diverses espèces de cyanobactéries, englobant les cinq sections de ce phylum, ont produit de la BMAA (Cox et al., 2005 ; Esterhuizen & Downing, 2008).

Pour être capable se lier aux graisses et/ou tissus cellulaires des organismes, la molécule doit être lipophile. Le caractère lipophile d'une molécule est défini par un coefficient de partage octanol/eau (Kow) qui mesure la solubilité différentielle de la molécule dans deux solvants. Un log Kow supérieur à 3 permet une interaction hydrophobe. Au vu de la valeur très basse du log Kow de la BMAA, la molécule ne serait tout simplement pas capable de se lier aux graisses, ni de se concentrer dans les tissus des organismes aquatiques (Brand et al., 2010 ; Lopičić et al., 2011 ; Yunger & Cramer, 1981). Deux facteurs de bioaccumulation sont également nécessaires afin de déterminer l'accumulation dans la biomasse. Tout d'abord, la bioconcentration (BCF) qui est la capacité de la molécule à s'accumuler dans la biomasse de l'individu par captation directe du milieu (eau ou sol). Ce facteur est obtenu par la valeur de la concentration dans l'organisme sur la valeur de sa concentration dans le milieu. Il est dépendant du log Kow. Ensuite, sa bioaccumulation (BMF), qui est sa capacité à s'accumuler dans la biomasse au travers de la chaîne trophique. Si le rapport de concentration entre deux organismes de niveaux trophiques différents est supérieur à 1, il y a un effet de bioaccumulation. Selon le Règlement (UE) n°830/2015, le facteur de bioaccumulation (BMF) doit être supérieur à 2000 pour que la molécule soit considérée comme bioaccumulable (Règlement (UE) n°830, 2015). Cependant, la faune aquatique étant très diversifiée, l'effet de bioaccumulation reste difficile à déterminer car chaque espèce présentera un métabolisme et une réaction à l'effet de concentrations potentiellement différents.

50 ans plus tard, la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine est encore une toxine soupçonnée d'être impliquée dans des maladies neurodégénératives, dont la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Bradley & Mash, 2009 ; Caller et al., 2018 ; Field et al., 2013 ; Spencer et al., 1987). Certains chercheurs soulignent le manque de preuves consistantes *in vivo* de cette implication (Chernoff et al., 2017). De plus, aucune corrélation génétique n'a pu être démontrée à ce jour (Chiu et al., 2011 ; Faassen, 2016). Ce sujet fait encore débat dans la communauté scientifique et il semble qu'il

est encore trop tôt pour affirmer sans aucun doute l'implication de cette phycotoxine dans les maladies neurodégénératives (Lobner et al., 2007 ; Nunn, 2017).

### 3.4 Ecotoxicité en milieu aquatique

La bioaccumulation chez les vertébrés comme les poissons, les primates et les chauves-souris est largement prouvée, ainsi que chez les invertébrés (cyanobactéries, crustacés, crabes). Dans le sud de la Floride, certains de ces organismes pouvant parfois dépasser 7000ng de BMAA par g d'échantillon (Banack & Cox, 2003). En 2009, une concentration létale à 10 jours (LC50<sub>10 jours</sub><sup>2</sup>) de 10 µg/LBMAA chez la larve de *Danio rerio* et une LOAEL<sup>3</sup> de 5 µg/LBMAA ont été déterminées (Purdie et al., 2009). Au-delà de 5 µg/LBMAA, la BMAA induirait des convulsions et une malformation de l'axe spinal (Purdie et al., 2009). Néanmoins, aucune étude n'a pu confirmer ces résultats jusqu'à aujourd'hui. En outre, peu d'informations sont accessibles concernant le mode d'exposition utilisé. Des tests écotoxiques sur diverses espèces aquatiques ont été résumés dans le **Tableau 2**.

Les concentrations de BMAA restent difficile à déterminer dans l'eau, malgré les récentes améliorations de détection (Fassen, 2016). De 2004 à 2010, les concentrations de BMAA dans 34 lacs publics du Nebraska ont été relevées et sont de 1,8 à 25.3 µg/L (Al-Sammak et al., 2014 ; Nebraska Department, 2012). Au lac Finjajsjön, en Suède, les concentrations de BMAA s'élevaient jusqu'à 6ng/g (Lage et al., 2015). Les concentrations de BMAA sont plus élevées dans le zooplancton, dont la base de la chaîne alimentaire est principalement constituée de cyanobactéries (**Figure 13**). Néanmoins, les espèces aquatiques qui se nourrissent de plancton dans la colonne d'eau (poisson argent, orphie crocodile, barracuda) n'ont pas de trace de concentration de BMAA dans leurs tissus, ce qui laisserait à penser que les cyanobactéries benthiques produisent plus de BMAA que les espèces planctoniques. Cette hypothèse est soutenue par l'étude Cox et al. de 2005 (Brand et al., 2010 ; Cox et al., 2005 ; Jonasson et al., 2010). Plusieurs études ont permis de récolter des données sur la concentration de la BMAA dans des espèces d'organismes aquatiques, mettant en évidence des valeurs plus élevées en Mer Baltique et dans l'étang de Thau, en France (**Tableau 3**).

---

<sup>2</sup> LC50<sub>10 jours</sub> (Lethal Concentration) : La concentration létale dans l'eau ou dans l'air d'un produit chimique qui causent la mort de 50% des organismes après 10 jours d'exposition.

<sup>3</sup> LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) : dose minimale à laquelle un effet est observé.

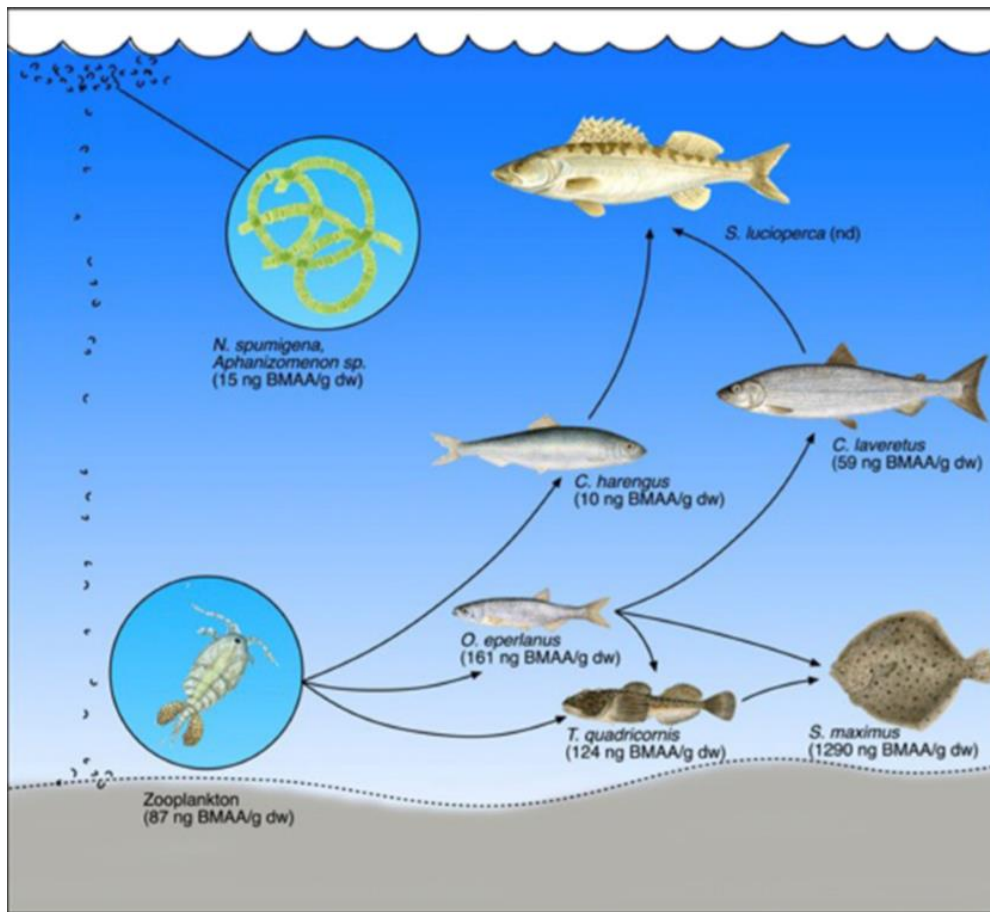


Figure 13 - Schéma illustrant les concentrations les plus hautes de BMAA (en µg par gramme de poids sec), ainsi que les interactions des espèces étudiées dans la Mer Baltique. Les concentrations en BMAA des espèces *T. quadricornis*, *S. maximus*, et *O. eperlanus* ont été déterminées à partir de tissus du cerveau, tandis que ceux de *C. harengus* et *C. lavaretus* à partir de tissus musculaires. ND, not detectable (Jonasson et al., 2010).

Tableau 2 – Tests de toxicité *in vivo* de la BMAA et les effets phénotypiques sur des espèces aquatiques

<b>Espèce</b>	<b>Concentrations</b>	<b>Stade de développement</b>	<b>Effets</b>	<b>Références</b>
<i>Danio rerio</i>	> 5 µg/L de BMAA dans l'eau	Oeufs	Augmentation de la mortalité, retard de l'éclosion, diminution de la fréquence cardiaque, œdème péricardique,	Purdie et al., 2009
<i>Danio rerio</i>	> 5 µg/L de BMAA dans l'eau	Larves	Augmentation de la mortalité, déformation de l'axe spinale et convulsions	Purdie et al., 2009
<i>Artemia salina</i>	> 300 µg/L de BMAA dans l'eau	Nauphii	Augmentation de la mortalité	Purdie et al., 2009
<i>Artemia salina</i>	> 50 µg/L de BMAA dans l'eau	Adultes	Augmentation de la mortalité et perte de réponse phototactique	Purdie et al., 2009
<i>Nassula sorex</i>	> 0.05 µg/L de BMAA dans l'eau	Adultes	Augmentation de la mortalité	Purdie et al., 2009
<i>Danio rerio</i>	6.5 ng de BMAA injectés dans le sac vitellin	Oeufs (stade une cellule)	Augmentation de la fréquence cardiaque à 3 jours post-éclosion Surexpression de GSK3 $\alpha$ et $\beta$ à 4 jours post-éclosion	Frøyset et al., 2016
<i>Killifish marmoratus</i>	20 µg/L 15mg/L	Larves (0-7 dph)	Capture des proies significativement moins efficace	Carion et al., 2018

Tableau 3 : Données des concentrations de BMAA présentes dans des organismes de diverses espèces aquatiques.

Localisation	Espèce	Tissus	Concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) de poids frais (FW), ou du poids sec (DW)	Référence
Mer Baltique	Turbot ( <i>S. maximus</i> )	Cerveau  Muscles	0.161 à 0.24 $\mu\text{g/L}$  BMF supérieure à 2000  0.008 à 0.011 $\mu\text{g/L}$	Jonasson et al., 2010
Mer Baltique	Chabot à quatre cornes ( <i>M. quadricornis</i> )	Cerveau	0.012 à 0.124 $\mu\text{g/L}$  BMF de 82	Jonasson et al., 2010
Mer Baltique	Eperlan d'Europe ( <i>O. eperlanus</i> )	Cerveau	0.161 à 0.24 $\mu\text{g/L}$	Jonasson et al., 2010
Mer Baltique	Hareng ( <i>C. harengus</i> )	Cerveau  Muscles	0.007 à 0.008 $\mu\text{g/L}$  0.010 $\mu\text{g/L}$	Jonasson et al., 2010
Mer Baltique	Corégone lavaret ( <i>C. lavaretus</i> )	Cerveau  Muscles	0.002 à 0.0019 $\mu\text{g/L}$  0.033 à 0.059 $\mu\text{g/L}$	
Mer Kattegat (Suède)	Moules ( <i>M. edulis</i> )	Totalité	0.151 à 0.201 $\mu\text{g/kg}$ (DW)	Jonasson et al., 2010
Louisiane	Huîtres ( <i>O. edulis</i> )	Totalité	1500 à 8000 $\mu\text{g kg}$ (FW)	Christenten et al., 2012
Missisipi	Huîtres ( <i>O. edulis</i> )		1200 à 1700 $\mu\text{g/kg}$ (FW)	
Floride	Crabe ( <i>C. sapidus</i> )		1080 to 3020 $\mu\text{g/kg}$	
Mer Kattegat (Suède)	Huîtres ( <i>O. edulis</i> )	Totalité	0.006 à 0.140 $\mu\text{g/g}$ de poids sec	Jonasson et al., 2010
Lac Taihu (Chine)	Phytoplancton  Cyanobactéries	Totalité	2,03– 7,14 $\mu\text{g/L}$ (DW)  4,12 $\mu\text{g/L}$ (DW)	Jiao et al., 2014
Lac Finjasjön (Suède)	Brème ( <i>A. brama</i> )  Gardon ( <i>R. rutilus</i> )  Perche ( <i>P. fluviatilis</i> )  Brochet ( <i>E. lucius</i> )	Totalité	0.00 – 0.0037 $\mu\text{g/g}$ (DW)  0.002 $\mu\text{g/g}$ (DW)  0.0001 – 0.0031 $\mu\text{g/g}$ (DW)	Lage et al., 2015

	Sandre ( <i>S. lucioperca</i> )		0.00026 – 0.0046 µg/g (DW) 0.0007 – 0.0089 µg/g (DW)	
Etang de Thau (France)	Diatomées (n..d) Moules ( <i>M. galloprovincialis</i> )	Totalité	ND – 0.75 µg/g (DW) 4,0 – 7,2 µg/g (DW)	Réveillon et al., 2015
Mer Baltique Mer Baltique Suède Mer Baltique Mer Baltique	Plie ( <i>P. platessa</i> ) Hareng ( <i>C. harengus</i> ) Omble chevalier ( <i>S. alpinus</i> ) Moules ( <i>M. adulis</i> ) Huîtres ( <i>O. edulis</i> )	Totalité	10 – 20 µg/kg (FW) ND – 20 µg/kg (FW) ND – 10 µg/kg (FW) 20 – 30 µg/kg (DW) ND – 20 µg/kg (FW)	Lance et al., 2018

### 3.5 Comportement et phénotype

Depuis des siècles, l'étude du comportement animal, ou l'éthologie, attire et fascine l'Homme. Le comportement est un flux de mouvements et d'évènements, défini comme l'ensemble des actions ou réactions d'un individu dans une situation donnée. Les unités comportementales peuvent être les mouvements, les modifications physiologiques, les expressions, les activités sociales, *etc* (Altmann, 1974 ; Martin & Bateson, 1993). Le comportement animal, y compris pour les *Homo sapiens*, est contrôlé par le système endocrinien et le système nerveux. Il existe une étroite relation entre la complexité du système nerveux et la complexité d'un organisme. Dans le but de quantifier et expliquer ce qu'il observe, l'Homme a développé de nombreuses méthodes d'observation, directes ou indirectes, et de techniques de quantification (Brown & De Bivort, 2017). L'utilisation de l'écotoxicologie est l'une de ces méthodes. En effet, l'impact de substances toxiques peut altérer certains comportements des animaux terrestres et aquatiques, comme la respiration, l'évitement, l'alimentation, les liens sociaux... De nombreuses études ont été menées à ce sujet (**Tableau 4**).

Tableau 4 – Exemples de classes de comportements étudiées sous l'effet de substances toxiques.

Substances toxiques	Espèces	Classes de comportements	Références
Divers métaux	Diverses espèces de poissons	Locomotion, Respiration, Apprentissage, Reproduction, Liens sociaux, Alimentation, Evidement des prédateurs	Atchison et al., 1987
Ethinylestradiol	<i>Gasterosteus aculaetus</i>	Agressivité, Parade nuptiale	Bell, 2001
Cuivre, Plomb, Cadmium	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Evitement	Hansen et al., 1999
Extraits alimentaires et acides aminés	<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salvelinus namaycush</i> <i>Coregonus clupeaformis</i> <i>Carassius auratus</i>	Alimentation, Activité locomotrice	Hara, 2006
Fluoxétine, Stertraline, Venlafaxine, Bupropion	<i>Pimephales promelas</i>	Evitement des prédateurs	Painter et al., 2009
BMAA	<i>Danio rerio</i>	Evasion, Activité locomotrice, Réactions par stimulation	Wang, 2015
BMAA	<i>Rattus norvegicus</i>	Ambulation, Test de suspension par la queue, Test de force musculaire	de Munck et al., 2015
BMAA	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Alimentation (capture de proies)	Carion et al., 2018
BMAA	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Audace, Agressivité	Markey, 2018

Une étude d'Al-Sammak et al. a révélé des symptômes de dyspnée, *i.e.* difficultés respiratoires, des incontinenances urinaire et fécale et des mouvement du corps altérés suite à des tests LD50 sur des souris (Al-Sammak et al., 2012). Une espèce modèle en écotoxicologie, le poisson zébré *Danio rerio*, a montré des troubles de battement de cœur et de locomotion des embryons après une exposition de 100mg/L. D'une part, il a été constaté que la BMAA accélérât l'apparition de contractions spontanées et de contractions provoquées par le toucher. D'un autre côté, la BMAA a réduit les performances d'évasion

en cas de toucher, les performances de nage libre et de réaction de sursaut (Wang, 2015). Pour le modèle *K. marmoratus*, un plus grand taux d'échec de capture de proies a été observé après exposition à la BMAA par Carion et al. Ces effets d'altération sur le phénotype peuvent être reliés aux dommages de la BMAA sur le système nerveux, réduisant l'efficacité de la prédation et des mouvements du corps. Les individus exposés à la BMAA utilisent plus d'énergie pour attraper une même quantité de proies comparé aux individus non exposés, impactant négativement le fitness de l'individu (Carion et al., 2018).

## 4. Méthylation

L'étude écotoxicologique de ce mémoire est une double approche comportementale et moléculaire de l'action de la neurotoxine (BMAA) utilisée en tant qu'inducteur de stress sur l'espèce *Kryptolebias marmoratus*. Afin de caractériser les potentielles épimutations induites par l'effet de la BMAA sur le rivulus des mangroves, les analyses moléculaires sont réalisées sur des séquences de gènes potentiellement influencés par les mécanismes moléculaires de la BMAA ou au comportement d'activité chez les vertébrés, lié au fait qu'une exposition précoce à la BMAA a induit un comportement d'hyperactivité sur différentes espèces (Karlsson et al., 2009, 2011 ; Yutaka et al., 1993).

### 4.1.1 RTN4

*RTN4* appartient à la famille des réticulons, protéines de membranes, et est impliqué dans le développement embryonnaire (Pinzon-Bolejua et al., 2014). Ce gène code pour une protéine appelée Nogo (Neurite Outgrowth Inhibitor) identifiée comme un inhibiteur des neurites spécifiques au système nerveux central (GrandPré et al., 2000). Le développement neuronal de Nogo produit un signal qui inhibe la migration et le dispersement des cellules endothéliales du CNS en réprimant la densité des vaisseaux sanguins (Yang et al., 2000). Trois isoformes existent : Nogo A, B et C (Karnezis et al., 2004). Nogo A est exprimée principalement dans le cerveau, Nogo B est ubiquitaire et Nogo C est hautement exprimé dans les muscles (Oertle et al., 2003). La diminution de l'expression de Nogo A permet d'améliorer les capacités d'apprentissage et de mémoire et pourrait causer une hyperexcitabilité via les circuits CA3 de l'hippocampe (Berry et al., 2018 ; Rickey, 2008). Une diminution de l'expression de cette protéine pourrait également diminuer l'inhibition des neurites dans le système nerveux central, et donc indirectement stimuler la croissance des neurones (Somzen et al., 2016). Tandis qu'une surexpression de la protéine Nogo A a eu des effets de dégradation similaires à la neurotoxine 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+) sur les cellules neuronales de la lignée PC12 (Zhong et al., 2016).

Après une exposition à la BMAA (20 µg/L et 15mg/L pendant 14j), une diminution de l'expression du gène a été observée sur *Kryptolebias marmoratus* au stade adulte (Article en Révision dans Neurotoxicology, URBE). La caractérisation de la méthylation des sites CpG du promoteur de ce gène après une exposition à la BMAA pourrait donc être intéressant.

#### 4.1.2 *Maoa*

La monoamine oxydase A est une flavoenzyme encodée par le gène *Maoa*. Cette enzyme dégrade les neurotransmetteurs tels que la dopamine, la norépinephrine et la sérotonine, via leur oxydation (Hotamisligil & Breakefield, 1991 ; Grimsby et al., 1991). En cas de stress, son expression est susceptible d'être régulée par les facteurs de transcriptions SP1, GATA2, et TBP via le CAMP pathway (Gupta et al., 2015). La synthèse de *Maoa* peut conduire à la synthèse de neuromélanine (Ziegler et al., 2016). La neuromélanine est un pigment principalement localisé dans les neurones catecholaminergiques (Haning & Achat-Mendes, 2017). Son rôle est d'extraire les métaux neurotoxiques induisant des maladies neurodégénératives grâce à sa capacité de séquestrer des ions de fer, de cuivre et potentiellement la molécule BMAA (Zucca et al., 2014). La séquestration de la BMAA dans ces pigments pourraient conduire à une altération de la capacité de la neuromélanine à capturer les ions de métaux lourds.

Une étude au sein de l'URBE a précédemment observé une diminution de l'expression du de *Mao* dans le cerveau des *K. marmoratus* exposé (15mg/L de BMAA) a été observée ainsi que la tendance d'une augmentation de l'expression de *Mao* à une faible dose en BMAA (20µg/L), qui pourrait consister en un mécanisme de réduction de la neurotoxicité via l'augmentation de la production de neuromélanine intracellulaire (Article en révision dans Neurotoxicology, URBE). Des délétions de 30 à 40 pdb dans une région du promoteur (P1), à environ 1000pdb en amont du TSS (site de transcription), induisent une baisse d'expression du gène (Sabol et a., 1998 ; Gupta et al., 2015). P1 semble crucial pour la régulation de l'expression de *Maoa* (Gupta et al., 2015). Déterminer les marques épigénétiques sur ce site induite après un stress environnemental pourrait être une démarche intéressante pour mieux cerner chez le *K. marmoratus*.

Au niveau comportemental, ce gène serait lié à des troubles psychiatriques comme l'autisme (Hebebrand & Klug, 1995 ; Philibert et al., 2008), la dépression (Meyer et al., 2006), l'ADHD (trouble de l'attention et de l'hyperactivité) (Gupta et al., 2015). L'augmentation de l'expression de *Maoa* jouerait également un rôle prépondérant dans les comportements d'agressivité chez les souris (Scott et al., 2008) et les humains ayant commis des actes de violence (Beaver et al., 2012 ; Guo et al., 2008, 2008b). Des mutations dans le gène *Maoa* ont d'ailleurs été corrélés avec un comportement de violence élevé chez les humains (Brunner et al., 1993).

#### 4.1.3 *DRD4*

Les récepteurs à la dopamine sont impliqués dans le fonctionnement moléculaire du système nerveux central et potentiellement impactés par l'activité neuronale de la BMAA (Wu et al., 2012). Ce gène code pour l'un des cinq récepteurs à la dopamine, le D4. Sa traduction est une G-protéine qui, couplée à un récepteur, inhibe l'adénylyle cyclase et influence ainsi l'action post-synaptique de la dopamine (Neve et al., 2004). *DRD4* exprime un nombre inhabituellement élevé de polymorphismes car il contient un VNTR (Variable Number Tandem Repeat) de 48pdb (paires de base) répété entre 2 et 11

fois sur l'exon 3, avec des répétitions plus fréquemment observées (2R, 4R et 7R) (Ptáček et al., 2013). Chez l'humain, il est composé de 4 exons et 3 introns, localisé sur le 11p15.5 avec entre 387 et 515 acides aminés en fonction du nombre de répétitions d'une boucle intracellulaire tertiaire qui contient le VNTR de 48 pdb (Ptáček et al., 2013 ; Wu et al., 2012).

Ce gène est un choix pertinent dans le cadre de ce mémoire car en plus de jouer un rôle important sur le fonctionnement du système nerveux central, l'expression et la méthylation de ce gène sont susceptibles d'induire un comportement d'hyperactivité après une exposition à une neurotoxine. Cette hypothèse est appuyée par une étude qui a observé une diminution significative de l'expression après une exposition à la BMAA pendant le développement précoce (15mg/L, 14j), chez l'espèce *Kryptolebias marmoratus* au stade adulte (Article en révision dans *Neurotoxicology*, URBE). Chez les rongeurs, une perte de cellules dopaminergique après une exposition à des polluants organiques a été démontrée (Grova et al., 2019). Une activité hypo-dopaminergique pourrait contribuer aux symptômes de l'ADHD, *i.e.* un comportement d'excitation, d'exploration et d'impulsivité (Faraone et al., 2007 ; LaHoste, 1996 ; Ptáček et al., 2013) Grova et al. ajoute que les gènes impliqués dans le système dopaminergique, comme les récepteurs *DRD4* et *DRD5* et des transporteurs de dopamine, sont susceptibles d'être liés à l'ADHD (Attention deficit hyperactivity disorder) après une exposition à une substance chimique durant le développement (Grova et al., 2019). D'autres influences liées au gène *DRD4* sur le comportement ont également été présentés dans la littérature, comme l'exploration et la peur chez les *great tits* (Fidler et al., 2007 ; Timm et al., 2015 ; Verhulst et al. 2016) et la schizophrénie et la maladie de Parkinson chez *Homo sapiens* (Ptáček et al., 2013). Les expositions à des toxines durant le développement précoce sont susceptibles d'influencer le système dopaminergique.

Des dysfonctions liées à l'épigénétique dans le gène *DRD4* pourrait aussi déclencher un trouble de l'hyperactivité (LaHoste et al., 1996 ; Munafò et al., 2008 ; Thapar et al., 2007 ; Wu et al., 2012) potentiellement héritable (Wu et al., 2012). Plusieurs études suggèrent que la méthylation de ce gène est influencée par les conditions environnementales. En 2016, Dadds et al. ont prélevé de la salive chez des patients et mis en évidence une méthylation plus élevée associée avec un trouble de l'hyperactivité plus élevé (Dadds et al., 2016). Les résultats liés au trouble de l'attention et l'hyperactivité présentent des directions opposées en fonction de l'âge, avec de bas taux de méthylation pendant l'enfance précoce et de plus hauts taux de méthylation durant la fin de l'enfance (Dadds et al. 2016). Le mécanisme de méthylation du *DRD4* jouerait aussi un rôle dans les personnalités chez la mésange charbonnière, avec une potentielle hérédabilité du comportement exploratoire (Verhulst et al., 2016). Ce comportement serait lié à la méthylation d'ilôts CpG, à cheval sur le site de départ de transcription et l'intron 1 du *DRD4* (Verhulst et al., 2016).

Deux régions du *DRD4* semblent particulièrement intéressantes à étudier, l'exon 3 et le promoteur. L'exon 3 code pour une boucle sur laquelle se lie une protéine par un nucléotide guanine, impliquée dans des psychoses (Serretti et al., 2001). Un allèle variant *DRD4\*7* (7 répétitions) est susceptible de

réduire l'affinité du récepteur avec la dopamine et serait lié au comportement d'excitation, d'exploration et d'impulsivité, qui correspondent aux symptômes de l'ADHD (LaHoste, 1996). Une étude de Faraone et al. a confirmé une différence significative pour le lien entre l'ADHD et l'allèle 7 chez les enfants (Faraone et al., 2001). Une autre étude a réalisé le séquençage de *DRD4* dans le but de déterminer le profil de méthylation de CpG et la distribution des CpG sur l'exon 3, suivi d'un pyroséquençage pour quantifier les niveaux de méthylation de chaque îlot CpG. Leurs résultats indiquent que pour tous les loci et tissus analysés, la méthylation était 1 à 4% plus élevée chez les oiseaux urbains que ceux vivant en forêt. L'exon 3 de *DRD4* exercerait une large influence sur le système nerveux central (Rivahi et al., 2015).

La région du promoteur, quant à lui, contient un site crucial pour la régulation de l'expression du gène au CpG site 1 (Hamza et al., 2019). Ce CpG pourrait également jouer un rôle dans le développement de l'ADHD, avec une méthylation affectant négativement la transcription de *DRD4* (Hazam et al., 2019 ; Xu et al., 2015). *DRD4* est susceptible d'être lié à une autre maladie neurodégénérative, l'Alzheimer (Ji et al., 2016). Le taux de méthylations était significativement plus élevé pour quatre CpG dans le promoteur des patients atteints de la maladie de l'Alzheimer, corrélé positivement avec l'âge et le sexe masculin (Ji et al., 2016). Les conditions environnementales semblent influencer la méthylation de ce gène.

#### 4.1.4 *Gabrb2*

*Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2* est un récepteur à canaux chlorure codé par le gène *Gabrb2*. Il est essentiel pour le contrôle des transmissions synaptiques rapides dans le système nerveux central (CNS). Son activité est activée par GABA, un des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs dans le système nerveux central qui induit de l'hyperpolarisation postsynaptique grâce à des flux de chlorure (Horzmann & Freeman, 2016; Miczek et al., 2003). (Srivatsava, 2014). Il existe 2 transcrits variants d'une insertion de 114 dbp dû à un épissage alternatif (Russek et al., 1994 ; Lakstygala et al., 2018).

*Gabrb2* est sensible à la neurotoxicité qui peut être induite par un stress chimique, induisant une dégénération neuronale et une perturbation de la plasticité synaptique dans le système nerveux central (Kim et al., 2017). Oyelami et al. (2016) ont observé une diminution de l'expression de différents gènes GABA, comme *Gabra1*, 3, 4, 5, *Gabrb2*, 3, et *Gabrg2*, chez des souris affectées par un déficit fonctionnel et transcriptionnel des transmissions GABAergiques dans le cortex préfrontal (Kim et al., 2017). L'expression de *Gabrb2* semble varier selon le développement, le génotype et l'état de santé du patient (Zong et al., 2017). Chez le *zebrafish*, l'expression de *Gabrb2* est associée avec la méthylation de sa séquence (Wang et al., 2016). 2 séquences associées à la schizophrénie (rs6556547 et rs1816071) sont présentes sur l'exon 9 de *Gabrb2*, ouvrant la possibilité que le statut de méthylation des sites CpG de ce gène ait un impact sur le risque de développer cette maladie neurodégénérative (Pun et al., 2011). Une augmentation de la méthylation globale et une diminution de la méthylation dans le promoteur a

été corrélé aux symptômes de schizophrénie (Wang et al., 2016). La régulation épigénétique semble réguler l'expression de *Gabrb2*.

Concernant le comportement, l'activité totale des souris et la vitesse chez les poulets ont montré une corrélation positive avec l'augmentation de l'expression de *Gabrb2* (Johnsson et al., 2016). une activité exploratoire anormalement élevée chez *Danio rerio* avec la méthylation de *Gabrb2* élevée a été démontrée par Wang et al. en 2016, qui indiquent que l'activité pourrait être influencée par la méthylation du gène. Hypothétiquement, si les tests comportementaux révèlent une différence d'activité de nage chez les individus exposés, des changements de méthylation des sites CpG pourraient être présents. Ce gène serait aussi associé aux symptômes de la schizophrénie (Lo et al., 2007 ; Pun et al., 2011 ; Wang et al., 2016) et aux symptômes de l'épilepsie chez les humains (Srivastava, 2014).

Chez le poisson zèbre, l'expression de *Gabrb2* est associée à la méthylation de sa séquence (Wang et al., 2016). Cette même étude avance que les poissons qui présentent une méthylation accrue de *Gabrb2* montrent un comportement exploratoire anormal ainsi que des déficits cognitifs et sociaux (Wang et al., 2016). D'après une autre étude récente, l'expression de ce gène varie selon le développement, le génotype et l'état de santé du patient (Zong et al., 2017). De plus, une augmentation de la méthylation globale et une diminution de la méthylation dans le promoteur a été corrélée aux symptômes de schizophrénie (Wang et al., 2016). Malgré l'absence de différence entre traitements dans les résultats, la régulation épigénétique aurait un rôle dans l'expression de *Gabrb2* et serait impliquée dans des réponses comportementales (Zong et al., 2017 ; Wang et al., 2016).

La détermination de la méthylation de ces 4 gènes, avec et sans exposition à une neurotoxine, est pertinente pour mieux caractériser les mécanismes épigénétique de réponse à un stress environnemental chez le *Kryptolebias marmoratus*, ainsi que les mieux cerner les mécanismes moléculaires sous-jacents de la BMAA.

# 1. Objectifs

Ce mémoire avait pour objectif principal la caractérisation d'une potentielle plasticité développementale induite par stress environnemental précoce (SEP) au sein de la lignée DC4 de *K. marmoratus*, au niveau de la croissance, du comportement et de l'épigénomique. Dans le cadre de cette étude, le SEP était une exposition à la BMAA durant les 14 premiers jours post-éclosion des individus. La variabilité génétique inter-individuelle d'une lignée isogénique est très faible, ce qui permet d'ancrer le phénotype d'un individu à son épigénome puisque les confusions liées à la variabilité génétique sont fortement réduites.

Actuellement, peu d'études essayent de lier les traits de croissance, le comportement et l'épigénome de *K. marmoratus*. Cet objectif transversal vise à mieux cerner les stratégies comportementales en réponse à un SEP et les liens avec le mécanisme de méthylation de l'ADN chez *K. marmoratus*.

Pour cela, des objectifs spécifiques au niveau de la croissance, du comportement et de l'épigénome ont été déterminés :

1. Détermination de deux types de variabilités au niveau morphologique, comportementale et du méthylome, à savoir, (a) une variabilité « basale » (groupe contrôle), et (b) une variabilité induite par modification environnementale. L'hypothèse avancée est l'observation d'un effet dose-réponse en fonction du traitement (C : contrôle, A : 20 µg/L, B : 15 mg/L).
2. Etude des effets immédiats (stade larvaire) et postposés (stade juvénile) de la neurotoxine BMAA. L'observation de ces effets impliquerait des réponses phénotypiques flexibles au cours du temps de vie. Une des sources de cette variabilité phénotypique pourrait être des changements de taux de méthylation de l'ADN, un des mécanismes les plus décrits et connus en épigénétique.

Approfondir les connaissances épigénétiques et écotoxicologiques sur le Killifish des mangroves en l'exposant à la BMAA permet de mieux caractériser son comportement et sa capacité d'adaptation lors d'un stress précoce en milieu naturel.

Dans un premier temps, les traits d'histoire de vie (taille et poids) ont été mesurés à différent *time point*, depuis l'éclosion (0 dph, *day post-hatching*) jusqu'au stade larvaire (14 dph) pour un premier groupe et depuis l'éclosion (0 dph) jusqu'au stade juvénile (70 dph) pour un second groupe. Dans un second temps, le comportement (anxiété et mobilité) a été déterminé par 5 variables via des analyses sur le logiciel Ethovision XT de Noldus ©. La dernière partie des résultats était l'analyse des taux de méthylation de l'ADN, réalisée en trois étapes : (1) l'extraction de l'ADN du corps des larves et du cerveau des juvéniles, (2) le traitement au bisulfite et (3) le pyroséquençage sur 5 régions de gènes spécifiques riches en CpG, à savoir, le promoteur de *DRD4*, le promoteur de *Mao*, le promoteur de *RTN4*, le promoteur de *Gabrb2* et l'exon 9 de *Gabrb2*.

## Partie II : Matériel & Methodes

### 1. Elevage

Dans le cadre d'un partenariat avec l'Université d'Alabama, le Laboratoire de Physiologie Evolutive et Adaptative (LEAP) de l'Université de Namur a fait l'acquisition de trois lignées de *K. marmoratus* : DC4, DC11 et DC22. Dans ce mémoire, seuls les poissons issus de la lignée DC4 sont utilisés.

#### 1.1 Conditions d'élevage

Les poissons vivent à une température constante de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$  dans des boîtes en plastique individuelles. La photopériode est de 12/12h. Lors de la confection d'un nouveau stock reproducteur, les larves sont placées juste après l'éclosion dans des bocaux contenant 200 mL d'eau salée ( $26 \text{ ppt} \pm 1$ ,  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , Instant Ocean<sup>TM</sup> 25 g pour 1 litre d'eau). A l'âge de 60 dph (*day post hatching*), les juvéniles sont déplacés individuellement dans des boîtes en plastique qui contiennent 400 mL d'eau salée ( $25 \text{ ppt} \pm 1$ ,  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ ). Les adultes sont capables de s'auto-féconder à partir d'environ 90 jours. Du rembourrage pour coussin en coton est placé à 70 dph pour permettre aux poissons d'y pondre ses œufs ou de s'y cacher, servant ainsi d'enrichissement du milieu.

#### 1.2 Nourriture

Les poissons sont nourris avec des crustacés *Artemia salina* au stade *nauphii*. La quantité de nourriture quotidienne que reçoivent les poissons varie en fonction de l'âge : 1 mL à moins de 60 dph, 2mL de 60 à 120 dph et 3 mL au-delà de 120 dph

## 2. Exposition des larves à la BMAA

### 2.1 Design expérimental

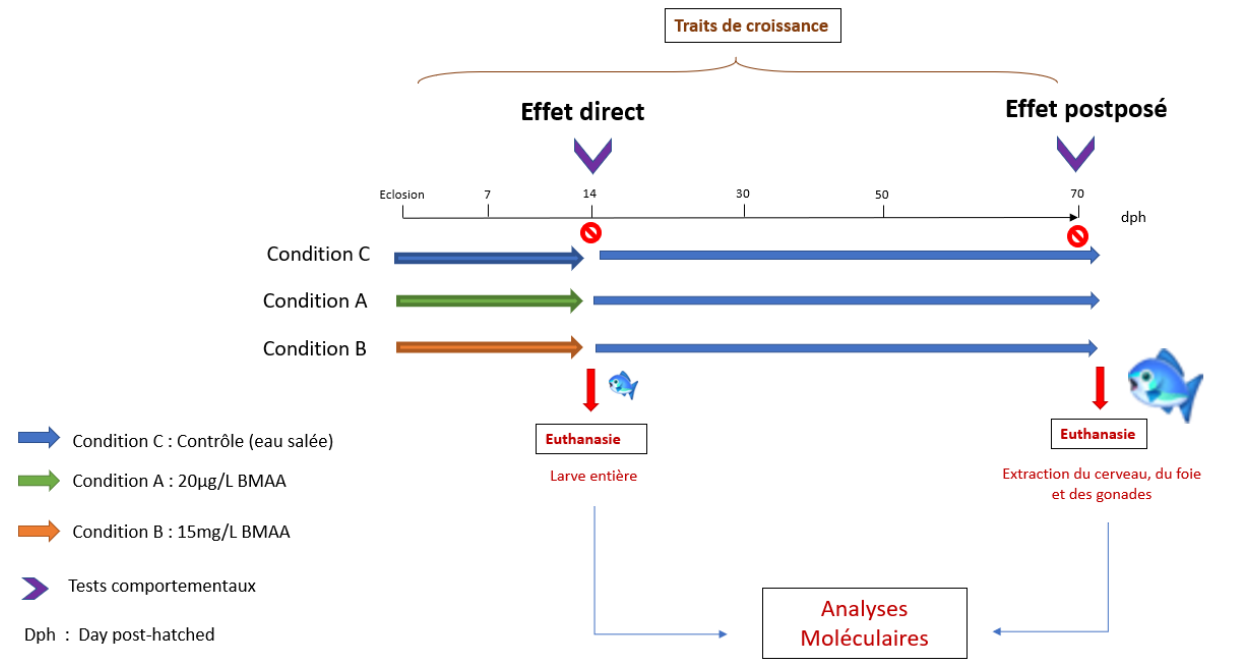


Figure 14 - Dès l'éclosion, 270 larves sont placées dans les conditions A, B et C : (A) condition 20 µg/L de BMAA, (B) condition 15 mg/L de BMAA, (C) condition contrôle contenant de l'eau de mer reconstituée (25 ppt, Instant Ocean™, à 26 ± 1°C). Le solvant utilisé pour les re-suspendre la BMAA est de l'eau salée identique au groupe contrôle. Grâce au logiciel GPower, le nombre total d'individus (N) est fixé à 270 avec une puissance de 90% pour un effet size de 0.25. Dans les conditions A et B, 90 larves sont exposées 14 jours à la BMAA. Au quatorzième jour, chacune des trois conditions sont scindée en deux sous-groupes de tailles égales. Le premier sous-groupe est composé de 45 larves euthanasiées juste après l'exposition à la BMAA pour les analyses moléculaires. Le second groupe expérimental est composé de 45 larves, placés dans les mêmes conditions que les poissons d'élevage, qui sont euthanasiée au 70<sup>ème</sup> jour après éclosion afin d'étudier les effets retardés. Les traits d'histoire de vie (taille) sont relevés aux jours 0, 7, 14, 30, 50, 70 après éclosion. Le test de thigmotaxie se déroule au J14 pour le groupe de larves et au J70 pour les juvéniles.

### 2.2 Récolte des œufs

Environ 400 œufs ont été récoltés dans le coton se trouvant les boîtes et disposés dans les plaques 6 puits de manière individuelle. Chaque poisson est identifié par un numéro unique, une date de naissance, une lignée, une génération et le numéro de son parent (**Figure 15**). Les parents de ces œufs proviennent des générations 7, 8 et 9 de la lignée DC4.

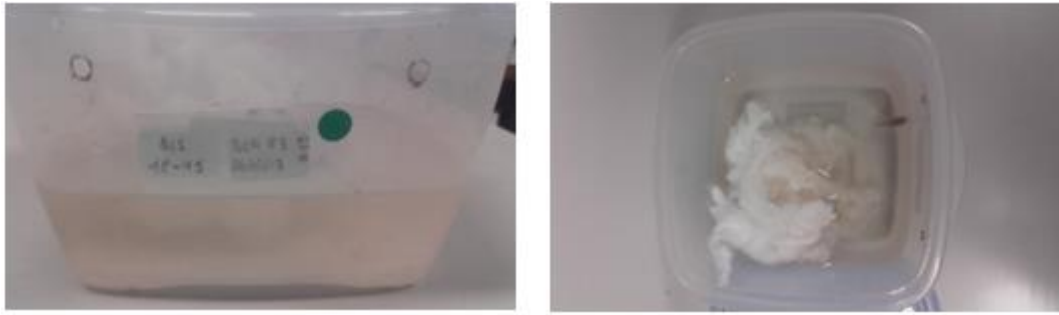


Figure 15 – **Photo de gauche** : Etiquettes d'identification individuelle. Etiquette de gauche : numéro du poisson. Etiquette de droite : Lignée, génération, date de naissance. #69 : numéro du parent. **Photo de droite** : boîte en plastique dans lequel est placé l'individu et du rembourrage pour coussin à partir de 70 dph.

Le nombre d'individus par condition est déterminé à l'aide de données comportementales précédentes et du logiciel G\*Power 3.1©. Pour une puissance de 90% avec un effect size de 0.25, le N total sélectionné est de 270 individus, soit 45 poissons par condition pour chaque groupe.

### 2.3 Préparation de la solution mère de BMAA et des différentes conditions d'exposition

La  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine Hydrochloride (BMAA HCl) lyophilisée a été reçue dans un contenant de 50 mg. Tant qu'elle est sous forme de poudre, les équipements suivants sont obligatoires : lunettes, gants en nitrile, tablier, vêtements adaptés et masque pour le risque d'inhalation ainsi que pour le risque de contact oculaire et cutané. La poudre de BMAA est d'abord dissoute à même le flacon avec de l'eau salée (25 ppt  $\pm$  1, 26°C  $\pm$  1). Le poids réel de BMAA est considéré en prenant compte la masse molaire de la BMAA HCL moins la masse molaire de HCl. Un tube de BMAA HCl de 50mg contiendra donc 38,208g de BMAA pure (Calculs voir Annexe I a). Elle est ensuite placée dans un berlin pour récupérer un maximum de BMAA. La solution stock est conservée à -20°C dans des aliquots de 50mL (voir Annexe I a). A partir de la solution mère, des aliquots de 50mL contenant soit une concentration de 20  $\mu$ g/L, soit 15 mg/L, sont préparés et conservés à -20 °C. Au total, 2000 mL par condition sont préparés et répartis en 45 aliquots de 45 mL respectivement (Calculs voir Annexe I a). La veille du début d'une exposition ou d'un renouvellement des milieux, les aliquots sont placés dans le frigo ( $\pm$  4°C) afin de les décongeler puis dans un incubateur à 27 °C, température du milieu à laquelle sont placés les poissons expérimentaux (Protocole voir Annexe I b).

### 2.4 Conditions contrôle et groupes exposés à la BMAA

Le jour de l'éclosion, les larves sont placées aléatoirement dans une des trois conditions (A, B et C) dans un puit contenant 6mL de solution (respectivement 20  $\mu$ g/L, 15 mg/L et 0 mg/L de BMAA). Le renouvellement d'un tiers des milieux (4 mL) est réalisé aux jours 4 et 12 du traitement. Au 8ème jour, l'entièreté du milieu est renouvelée (6 mL). Les larves sont nourries quotidiennement avec 40  $\mu$ mL concentrés *ad libitum* d'*Artemia salina* vivants au stade *nauplii* (entre 30 et 50 artémias par puit). Au

14<sup>ème</sup> jour, les 3 groupes expérimentaux sont scindés chacun en deux sous-groupes : « effets immédiats » et « effets retardés ». Les larves du groupe « effets immédiat » sont sorties de leur condition expérimentale et passent un test comportemental décrit ci-dessous, ce avant d’être euthanasiées et stockées à -80°C. Les larves du groupe « effets retardés » sont placées individuellement dans des boîtes en plastique remplies de 400 mL d’eau salée (25 ppt) dans l’incubateur à 27 °C jusqu’à 40 dph. De 40 à 70 dph, les boîtes sont placées dans la chambre d’élevage à 27°C ± 1. A 70 dph, les poissons désormais juvéniles passent un test comportemental similaire à celui des larves du groupe « effets immédiats » et sont euthanasiées, disséqués et leurs organes (cerveau, foie, gonades) sont stockés à -80 °C. Le protocole du déroulement est détaillé en Annexe I b.

### 3. Traits de croissance

La mesure standard de chaque larve est quantifiée avec le stéréomicroscope SM2127 Nikon et le logiciel associé NIS-elements aux jours 0, 7, 14, 30 et 50. La longueur standard LS est la distance du museau du poisson à la base de la nageoire caudale (**Figure 16**). Pour chaque individu et point temporel, la moyenne se base sur 3 mesures. Une latte est placée sur chaque photo pour fixer l’échelle. Au jour 70 post-éclosion, la taille des poissons est mesurée individuellement via le logiciel Image J©. Le poids des individus est mesuré une fois juste après leur euthanasie.

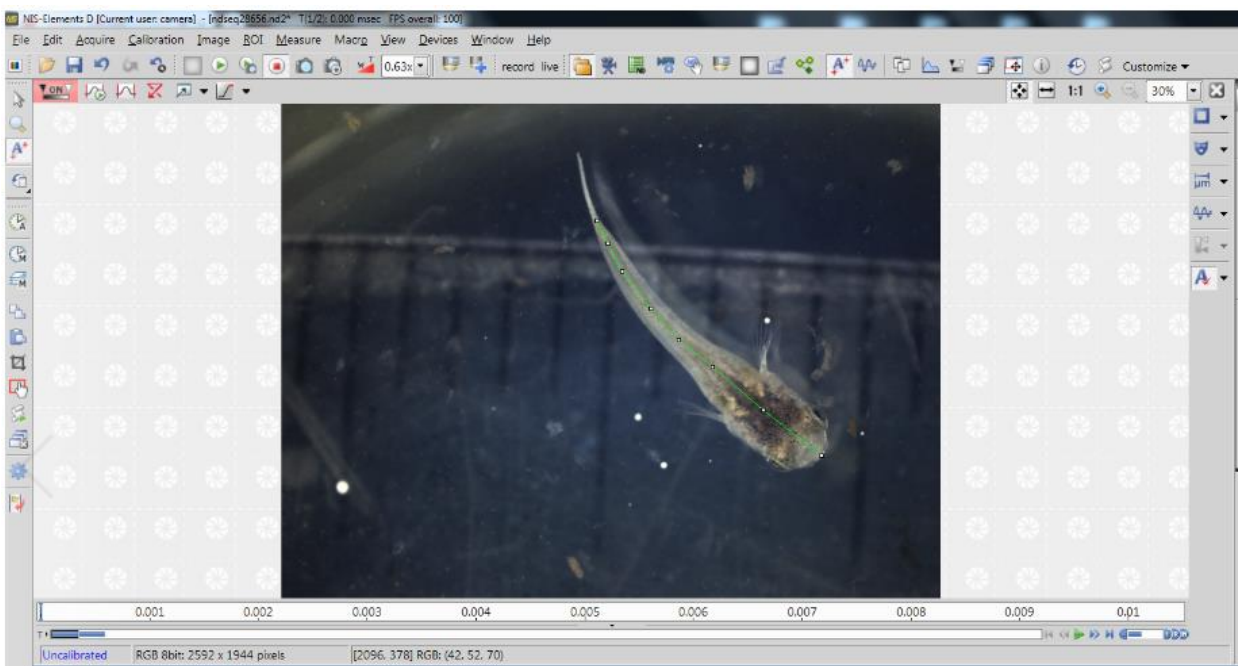


Figure 16 – Illustration du logiciel NIS-elements pour la mesure de la taille en µm.

## Tests comportementaux

### 3.1 Test locomotion et thigmotaxie des larves (groupe « effet immédiat »)

Avant le test, la pièce est chauffée à 25 °C. Le test est filmé à l’aide d’une caméra (Sony, HDR-CX625) Les bords de la plaque 6 puits sont peints en blanc afin d’éviter les contacts visuels et autres interactions entre les poissons. Les puits sont remplis avec 6 mL d’eau salée 25 ppt à 25 °C ± 1.

Le protocole utilisé est celui de Norton et al. (2012) pour la locomotion et la thigmotaxie des poissons ainsi que l'analyse comportementale durant un temps déterminé arbitrairement par l'expérimentateur. La thigmotaxie représente le temps que la larve passe à proximité des parois du puit par rapport au temps total du test. Ce comportement peut caractériser une forme d'anxiété de l'individu. La zone de contact avec la paroi est au moins aussi grande que la taille de la larve à 14 dph (Correia et al., 2019 ; Norton et al., 2012 ; Schnörr et al., 2012). La zone de thigmotaxie est donc fixée à 80 mm. Le diamètre de la zone centrale est fixé à 2.20 cm (Correia et al., 2019). L'expérimentateur et l'ordinateur se trouve à plus de 2m de la plaque durant l'expérience.

Après 5 minutes d'acclimatation, la caméra est allumée pendant au moins 12 minutes. Les 2 premières minutes d'enregistrement ne sont pas prises en compte dans l'analyse étant donné que l'approche de l'expérimentateur lors de l'allumage de la caméra peut stresser les individus. Les variables sont enregistrées avec 10 minutes de test (600 secondes). Les données enregistrées sont traitées par plaque multi-arènes et analysées via le logiciel Ethovision XT de Noldus © (**Figure 17**). Le protocole suivi pour la réalisation du test comportemental se trouve en annexe I c.



Figure 17 – Illustration de l'analyse des vidéos avec le logiciel Ethovision XT de Noldus ©. Les puits sont calibrés à 4 cm de diamètre. 6 arènes de 4 cm de diamètre sont visibles en orange. La zone verte nommée « intérieur » fait 3,85 cm. Les larves à 14 dph sont placées individuellement dans les puits d'une plaque dont les bords sont peints en blanc et filmés durant 12 minutes après une acclimatation à la pièce comportementale de 5 minutes. La détection des larves est réalisée manuellement dans la section « Detection settings ». Au total, 31 vidéos sont réalisées et analysées. 17 variables sont analysées statistiquement, dont le nombre d'entrées et de sortie dans la zone, la distance parcourue totale, l'immobilité et le temps passé à l'intérieur de la zone.

### 3.2 Test locomotion et thigmotaxie des juvéniles 70 dph (groupe « effets retardés »)

Les conditions de la pièce sont les mêmes que pour les tests comportementaux des larves. Le poisson est placé individuellement dans une arène de forme ronde de 22 cm de diamètre avec une zone de thigmotaxie de 1.5 cm. L'arène est remplie d'eau d'une hauteur de 2 cm, environ 700 ml, salée 25 ppt  $\pm 1$  à température 25 °C  $\pm 1$ . La hauteur de l'eau est limitée pour éviter que le poisson ne se déplace verticalement, ce qui ne serait pas visible sur la vidéo et biaiserait les données. L'eau est changée à chaque test car les phéromones présentes dans l'eau pourraient affecter le comportement des poissons. Après 5 minutes d'acclimatation, la caméra filme durant 12 minutes, dont 2 minutes d'acclimatation et 10 minutes de test (600 s). Les données enregistrées sont traitées par plaque multi-arènes et analysées via le logiciel Ethovision XT de Noldus ©. L'expérimentateur et l'ordinateur se trouve à plus de 2 m de l'individu durant l'expérience. Le protocole suivi pour la réalisation du test comportemental se trouve en annexe I d.

## 4. Euthanasie

Après le test comportemental, les poissons sont plongés dans de l'eau glacée 4 °C à 25 ppt afin d'éviter un choc osmotique. La confirmation de la mort se fait via la décapitation après une période d'hyperactivation de quelques secondes dans l'eau, suivie de quelques secondes d'immobilité totale des branchies. Leur poids est ensuite mesuré. Pour les larves, l'entièreté des corps est conservée à -80°C pour les analyses moléculaires. Dans le groupe des juvéniles, les poissons sont pris un à un afin de ne pas communiquer un stress potentiel. Ils sont plongés dans l'eau froide puis pesés et mesurés. La tête de l'individu est séparée du corps. Le cerveau, le foie et les gonades seront placés dans des eppendorfs annotés préalablement et maintenus à -80 °C dans de l'azote liquide.

## 5. Analyses moléculaires

### 5.1 Sélection des individus

Entre 19 et 21 individus par condition ont été choisis de manière aléatoire pour l'extraction d'ADN avec le protocole Quiagen Blood & Tissue©. La méthylation de 30 larves et 30 cerveaux de juvéniles est analysée sur 4 gènes différents et 5 régions différentes par pyroséquençage, choisis sur base de la quantité d'ADN présente dans l'échantillon estimée par la technique du nanodrop.

### 5.2 Choix des primers

Les gènes d'intérêt ont été retrouvés dans la banque de données d'«Ensembl»<sup>4</sup> du génome du rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus*. Ensuite, les régions riches en CpG ont été identifiées en

---

<sup>4</sup> <http://www.ensembl.org/index.html>

insérant la séquence choisie sur le site MethPrimer<sup>5</sup>. Une fois la région à amplifier déterminée, le logiciel Pyromark Assay Design© va afficher la séquence insérée au départ, sa séquence reverse, la séquence de départ convertie après traitement bisulfite, et proposer des amorces (Forward, Reverse et Synthèse). L'étape finale est le choix des amorces se base sur un score, le plus élevé possible, qui reflète entre autres la taille de l'amplicon et la *temperature melting* optimales (Voir Annexe I h.). Ce choix est crucial car le rôle d'une amorce est double : la délimitation de la région d'ADN à amplifier en s'hybridant à l'ADN matrice, et le rôle d'amorce pour l'ADN polymérase via leur extrémité 3' OH). Il est nécessaire de choisir des amorces avec des température de demi-dénaturation (Tm) proches puisque les amorces oligonucléotidiques doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température.

### 5.3 Extraction d'ADN

Afin d'extraire l'ADNdb des tissus prélevés, le protocole Quiagen Blood & Tissue a été appliqué. Durant première étape de pré-lyse, du Buffer T1 et de la protéinase K sont ajoutés dans chaque échantillon pour la digestion des protéines libérées après la lyse. Des billes en oxyde de zircon ont été placées dans les eppendorfs contenant les larves pour favoriser la dégradation de la peau ou des tissus des organes et ainsi homogénéiser la solution. Ces eppendorfs sont ensuite placés au thermomixer à incubation 56°C entre 2h et 4h, avec un vortex toutes les 25 minutes, ce qui a permis l'activité de l'enzyme à son optimum fonctionnel. Une seconde étape avec le du tampon Buffer B3 permet la lyse des résidus et donc de libérer le contenu des cellules. Une seconde incubation au thermomixer (5 minutes à 70°C) est réalisée. Les échantillons contenant les tampons T1 et B3 sont plongés dans d'éthanol pour leur conservation, ce qui favorise la lyse des résidus. Les échantillons ont été lavés sur les colonnes du kit avec le tampon Buffer B5, ce qui a finalisé l'isolation complète de l'ADN obtenu. La dernière étape consistait en une élution avec l'utilisation du tampon BE (Buffer Elution) pour récupérer l'ADN dans un tube collecteur. Après chaque ajout de wash buffer, les échantillons sont centrifugés. L'ADN est finalement conservé à -20 °C dans le labo d'épigénétique de l'URBE à l'UNamur (Qiagen, 2006) (voire Annexes I f.).

### 5.4 Evaluation de l'extraction d'ADN

#### 5.4.1 Nanodrop

Afin de vérifier la qualité et la quantité de l'ADN extrait, la quantification en acides nucléiques de nos échantillons est mesurée par un spectromètre appelé nanodrop (Thermo Scientific). Cette technique est basée sur la fluorescence ou l'absorbance de l'échantillon à  $\lambda = 260$  nm, où l'absorbance est proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques. Une goutte de chaque échantillon est déposée sur une lentille, une à une. L'absorbance du blanc est le seuil du bruit de fond et remet la machine à zéro.

---

<sup>5</sup> <http://www.urogene.org/methprimer/>

Le blanc est vérifié et chaque échantillon est mesuré 1 seule fois, par souci de quantité limitée de matériel pour la suite des manipulations moléculaires.

Un biais possible est celui lié à la contamination de l'échantillon par des protéines ou autres composés. Pour l'éviter, un ratio de pureté 260/280 délimite une valeur minimale de 1,8. Si le ratio d'un échantillon est en-dessous de cette valeur, la présence de protéines absorbantes à environ 280 nm est envisagée, autrement dit, une contamination. Un ratio 260/230 est basé sur le même principe et fixe un seuil de contamination de molécules absorbantes autour de 230nm. Avec valeurs de ratio entre 1,9 et 2,2, la probabilité d'une contamination dans l'échantillon est considérée comme quasi nulle.

#### 5.4.2 *Electrophorèse sur gel*

Afin de vérifier l'état de l'ADN extrait et de détecter une potentielle dégradation, une électrophorèse sur gel est réalisée. Le principe se base sur la migration des brins d'ADN dans un gel d'agarose selon leur taille et leur charge. Une anode et une cathode sont placées de chaque côté du gel, créant ainsi un champ électrique. Par exemple, à pH neutre, l'ADN est chargé négativement et migrera vers l'anode. Le gel d'agarose est caractérisé par la présence de pores, de diamètre plus ou moins grand en fonction de la concentration d'agarose. Aussi, plus petit est le brin d'ADN, plus sa vitesse de migration sera élevée, donc plus grande sera sa distance de migration.

La réalisation du gel se fait par un mélange de 0.6 g d'agarose (1.5%) et 80 mL de tampon TAE 0,5x (Tris Acétate EDTA). Le tampon TAE maintient le pH de la solution. Ensuite, la solution est portée à ébullition à l'ajout de 2mL de SYBR safe pour la polymérisation. Le SYBR Safe est utilisé comme agent intercalant de l'ADN, autrement dit il se fixe aux acides nucléiques, ce qui permet d'identifier l'ADN à la fin de la migration. Lors de cette manipulation, des gants en nitriles doivent être portés et les zones de contamination spécifiquement délimitées pour cette substance doivent être respectées. Les échantillons sont mélangés avec un tampon de charge (*Blue/Orange Loading Dye*) afin d'augmenter leur densité à une valeur plus élevée que celle du TAE 0,5x et éviter qu'ils ne coulent en-dehors du puits. La solution est finalement coulée dans un moule avec un peigne spécifique formant le nombre de puits souhaités. Le moulage est placé à l'abri de la lumière pendant 60 minutes, le temps de la polymérisation. Une fois le gel polymérisé, les puits sont remplis par un ladder (1kb) et un contrôle négatif par groupe, et ensuite les échantillons de chacun des deux groupes. Le ladder consiste en une sorte d'échelle permettant d'identifier la taille des brins d'ADN en fonction de leur distance de migration. Le contrôle négatif contient seulement le tampon de charge et permet de s'assurer qu'il n'y a pas de contamination dans cette solution. La migration dure 30 minutes avec une différence de potentiel de 100V pour les traitements post-traitement bisulfite.

Après la migration, le gel récupéré est placé dans un transilluminateur à UV où une photographie sera prise. Cette photographie permet la mise en évidence des zones émettant de la fluorescence grâce au SYBR safe, l'agent intercalant sur l'ADN.

## 5.5 Traitement Bisulfite

Ce traitement vise à transformer les cytosines non méthylées en uraciles par une désamination due au réactif CT Convergent Reagent. Les cytosines méthylées sont donc protégées et facilement identifiées par le séquençage. Ce séquençage permet de déterminer un profil de méthylation de l'ADN amplifié et séquencé. Le kit utilisé se nomme le EZ DNA Methylation-Gold™ Kit de Zymo Research®.

Une première étape de reconstitution des réactifs est réalisée. Ces réactifs sont ajoutés dans les échantillons contenant une concentration entre 200 ng à 500 ng/μL. Ensuite, les échantillons seront placés dans un thermocycleur sur une plaque ou dans des eppendorfs et un des programmes proposés est sélectionné. Une binding solution est ajoutée dans l'eppendorf. L'échantillon est placé sur colonne, centrifugé, suivi d'une étape de wash buffer suivie d'un buffer de désulfonation. L'ADN est prêt pour une analyse immédiate en séquençage ou peut être stocké à -20 °C pour une prochaine analyse. Pour un stockage à long terme, une conservation à -80 °C est conseillée (Protocole détaillé en Annexe I g.).

## 5.6 PCR

Une étape d'amplification précède l'étape de séquençage. Après la décongélation et la préparation des différents réactifs, le Reaction mix est préparé et contient :

- le PyroMark PCR Master
- le CoralLoad
- la primer solution
- la RNA-free water

(Protocole Annexe I i.).

Le tampon PyroMark PCR Master contenu dans le Reaction mix sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg<sup>2+</sup> et de cations monovalents (K<sup>+</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.

Le reaction mix est ensuite placée dans le puit/le tube (24 μL/puit). 1 μL d'échantillon par puit y sera ajouté. Pour les mises au point du reaction mix, deux conditions sont testées : une condition sans enrichissement, et une condition avec un ajout d'un 1 μL de MgCl<sub>2</sub> par échantillon. Les cations bivalents Mg<sup>2+</sup> sont cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. Juste après, la plaque/le tube est scellé et spinné, puis placé(e) dans le thermocycleur. Le protocole complet est détaillé en Annexe I i.

Trois étapes constituent un cycle de PCR et sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. La première étape de dénaturation (95°C) permet une dissociation complète des deux brins d'ADN. La seconde est une étape d'hybridation. Cette étape se fait à une

température  $T_a$  (annealing temperature) et sera définie selon la nature des amorces. Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.

Pour terminer le cycle, l'étape de polymérisation est réalisée à 72 °C qui est la température optimale de l'ADN polymérase thermorésistante. Lors de la polymérisation, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3' OH libres des amorces hybridées. De manière standard, le nombre de cycle est limité entre 40 et 50 car en fin de PCR, l'activité enzymatique atteint une saturation dû à la viscosité du milieu réactionnel. Les quantités d'oligonucléotides amorces et de dNTP deviennent alors limitantes. De plus, l'accumulation de pyrophosphates, une conséquence de la synthèse d'ADN, inhibe la Taq polymérase.

### *5.7 Evaluation de la PCR*

La vérification de l'amplification spécifique se fait sur gel d'agarose par électrophorèse, selon même principe qu'au point « 4.3.2. Evaluation de l'extraction d'ADN ». Le gel d'agarose pour cette étape est plus concentré (2%) et chargé avec 2 µL d'échantillon. La migration dure 45 minutes avec une vitesse de migration égale à 80 V. L'ajout du Blue/Orange Loading Dye n'est pas nécessaire car les échantillons contiennent du Coral Load présent dans le MixPCR (voir point 4.5 PCR). Les produits PCR doivent présenter une bande unique marquée qui reflète la spécificité de la séquence amplifiée.

### *5.8 Pyroséquençage*

Le pyroséquençage est une méthode de séquençage rapide et qui permet la lecture directe de séquences d'ADN ciblées. La taille des séquences est de 300 à 500 nucléotides maximum. Il s'agit d'un « séquençage par synthèse » qui inclut la détection du nucléotide incorporé par une ADN polymérase. Le pyroséquençage fonctionne par une quantification de la lumière lors de la libération du pyrophosphate pendant la réaction de la chaîne. L'intensification de la lumière permet de déterminer si aucun, un ou plusieurs nucléotides ont été incorporés. Les séquences amplifiées ont été spécifiées dans le programme PyroMark©. Les nucléotides sont insérés un à un durant le pyroséquençage. Ces ajouts sont visibles en temps réel.

Plus concrètement, le pyroséquençage est réalisé en quatre parties. La première est la constitution du mix Pyro contenu dans chaque puit :

- Streptavidine
- Denaturation solution
- Wash Buffer
- Binding buffer
- Annealing Buffer
- Nucleotides

La seconde étape est la dilution des primers synthèse dans de l'eau, suivie d'une dilution dans de l'annealing buffer. L'utilité d'un primer synthèse se trouve dans sa fonction d'amorce spécifique et capable de supporter les conditions du pyroséquençage.

La troisième est le remplissage de la cartouche avec un mix E-enzyme, un mix S-enzyme et des quantités de nucléotides prédéfinies. La dernière étape est le remplissage et la manipulation des différents bains (Mix Pyero, éthanol 70%, Denaturation Buffer, Wash Buffer, eau bidistillée stérile, primers) avec la pompe (Protocole détaillé voir Annexe I. j.). Après une incubation de 5min sur plaque chauffante, la plaque qui contient tous les réactifs et les échantillons de la PCR est placée dans le pyroséquenceur. La séquence est enregistrée sur une clef usb préalablement branchée à la machine. Le matériel est vidé et lavé à la fin de la manipulation (Voir Annexe I j.).

## 6 Analyses statistiques

### 6.1 Tailles

Les données aberrantes ont été mises à l'écart via la « règle 3 sigma » de Shewhart qui consiste à éliminer les valeurs excédant la valeur de la moyenne  $\pm 3 * \sigma^6$  (Bernard, 2002). Cette méthode a été appliquée pour les groupes de distribution non-paramétriques (groupes J50 et J70) sur Excel®. Les valeurs B-15 et de B-19 ont été écartées.

La normalité des résidus des groupes de tailles (J0, J14, J30, J50, J70) a été testée avec le test d'Agostino & Pearson (intervalle de confiance de 95%). Après l'élimination des deux données aberrantes, tous les groupes présentent une distribution normale et ont suivi une Anova I avec comparaison multiple des moyennes (Tukey's test) (intervalle de confiance 95%, p-value = 0.05) appliqués avec le logiciel GraphPad Prism 8™.

### 6.2 Poids des larves

Les poids des larves et des juvéniles ne présentent pas de distribution normale d'après un test d'Agostino & Pearson). Les données ont été testées statistiquement avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple (Dunn's test, p-0.05%, confiance 95%) appliqués avec le logiciel GraphPad Prism 8™.

### 6.3 Taux de croissance

Les taux de croissance ont été calculés sur Excel® avec la moyenne pondérée des taux de croissance par jour pour chaque condition pour 1. la période d'exposition (0 à 14 dph), 2. la période post-exposition (14 à 70 dph) et 3. sur toute la période de vie de des individus (0 à 70 dph).

---

<sup>6</sup> Ecart-type

#### 6.4 Comportement

6 variables ont été visualisées à l'aide d'une ACP (Analyse en Composante Principale) sur le logiciel R, à savoir : La distance totale parcourue (cm), la vitesse moyenne (cm/s), la durée à l'intérieur de la zone (s), la durée d'immobilité (s) et la durée de grande mobilité (s).

Aucune variable ne présente une distribution normale des résidus (Test d'Agostino & Pearson, GraphPad Prism 8<sup>TM</sup>). Après le test de normalité d'Agostino & Pearson, chaque variable est soit testée par le test non-paramétriques Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple (Dunn's test) (p-0.05%, confiance 95%) appliqués avec le logiciel GraphPad Prism 8<sup>TM</sup>.

#### 6.5 Analyses moléculaires

9 individus par condition ont été traités au bisulfite et passés au séquençage, avec une puissance statistique de 80% et une confiance de 95%, avec un écart-type déterminé grâce à deux études précédentes au sein de l'URBE. Au total, la méthylation de 30 larves et 30 cerveaux de juvéniles est analysée sur 4 gènes différents et 5 régions différentes.

La normalité des résidus de chaque îlot a été testée avec le test Shapiro-Milk (p value<0.05), le nombre d'individus par échantillon étant trop faible pour le test d'Agostino&Pearson. Les groupes ne suivaient pas une distribution gaussienne. Ils ont été testés via un test statistique non-paramétrique (Kruskal-Wallis' Test) suivi d'un test de comparaison multiples Dunn's Test (intervalle de confiance 95%, p-value = 0.05) sur GraphPad Prism 8<sup>TM</sup>.

## Partie III : Résultats

### 1. Traits d'histoire de vie

Six individus dans la condition contrôle, quatre dans la condition A (20 µg/L) et un dans la condition B (15 mg/L) sont morts de manière naturelle entre 3 et 5 jours post-éclosion (dph). Une mortalité dépendante de la concentration de BMAA n'a pas été observée. Un individu malformé dans la condition A (A-32) a été retiré des échantillons.

#### 1.1 Taille et poids

Les tailles (cm) à 0, 7, 30, 50 et 70 dph (*day post-hatching*) suivent une distribution normale et ont été testées via une Anova I. Les tailles à 14 dph ont été testées via un test de Kruskal-Wallis suivi du Dunn's test de comparaisons multiples de moyennes. Aucune différence significative pour les jours 0 et 7 dph n'a été mise en évidence. Les individus des conditions A (20 µg/L) et B (15 mg/L) présentent une diminution de taille par rapport à celles du groupe contrôle (condition C) à partir du jour 14 post-éclosion, dernier jour d'exposition à la BMAA (**Figure 18**). A 14 dph, les tests statistiques ont relevé une différence significative entre les conditions C et A (p-value < 0,0001) et entre les conditions C et B (p-value < 0,01). Deux différences significative ont également été observées à 30 dph entre les conditions C et A (p-value < 0,0001), et entre les conditions C et B (p-value < 0,0001). A 50 dph, une différence significative entre la condition C et la condition A (p-value < 0,05) est observée. A 70 dph, les tests statistiques ont relevé une différence significative entre les conditions C et A (p-value < 0,0001) et entre les conditions C et B (p-value < 0,01). Les valeurs des moyennes et écarts-types sont détaillées dans le **Tableau 5**. A noter que les écarts-types sont très faibles.

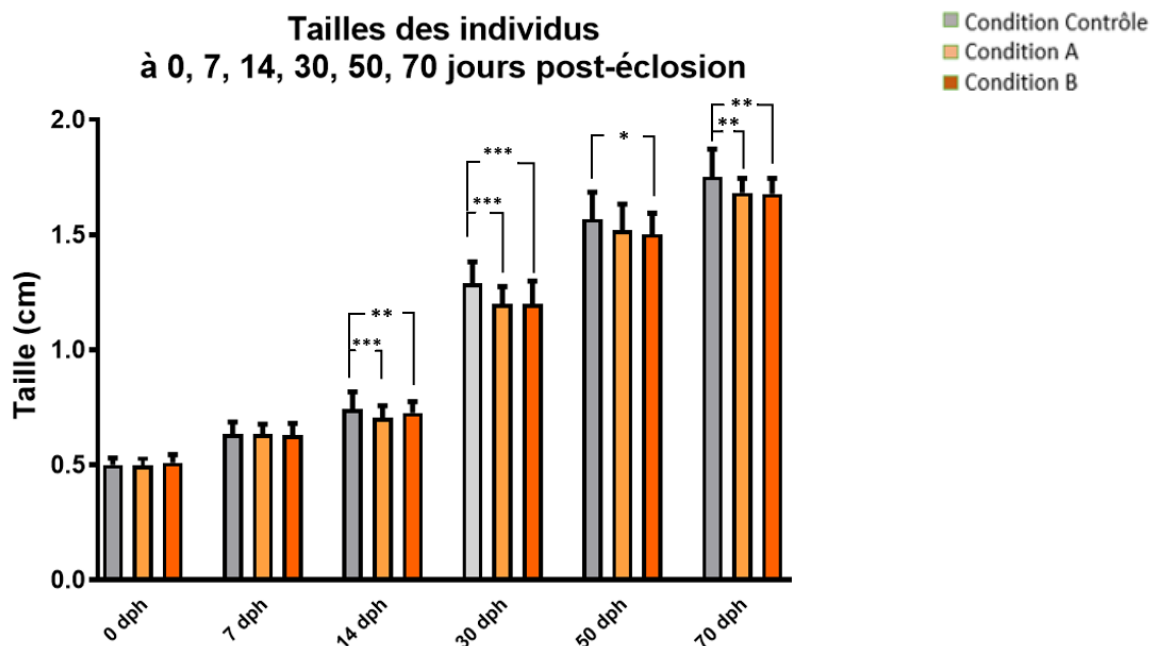


Figure 18 - : **Jours 0** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=66), A (N=84), B (N=88) sans différence significative. **Jour 7** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=82), A (N=84), B (N=87) sans différence significative. **Jour 14** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=72), A (N=78), B (N=84) avec une différence significative pour les conditions A et B, chacune comparée au contrôle. **Jour 30** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=38), A (N=39), B (N=43) avec une différence très hautement significative pour les conditions A et B, chacune comparée au contrôle. **Jour 50** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=39), A (N=42), B (N=40) avec une différence significative pour la conditions A comparée au contrôle. **Jour 70** : Comparaison des tailles des individus entre trois conditions C (N=38), A (N=37), B (N=38) avec une différence hautement significative avec une différence significative pour les conditions A et B, chacune comparée au contrôle. N = Nombre d'individus dans chaque condition. Les valeurs des moyennes et écarts-types sont détaillées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 - Valeurs moyennes ± écart-type des tailles aux 6 timepoints.

	0 dph	7 dph	14 dph	30 dph	50 dph	70 dph
Condition Contrôle	0,49 ± 0,03	0,63 ± 0,06	0,78 ± 0,09	1,29 ± 0,09	1,57 ± 0,12	1,75 ± 0,12
Condition A (20 µg/L)	0,50 ± 0,03	0,64 ± 0,05	0,72 ± 0,06	1,20 ± 0,08	1,52 ± 0,11	1,68 ± 0,06
Condition B (15 mg/L)	0,50 ± 0,04	0,63 ± 0,05	0,72 ± 0,05	1,20 ± 0,10	1,50 ± 0,09	1,68 ± 0,07

Le poids des larves a été mesuré après euthanasie à 14dph. Le test de Dunn a révélé une différence très hautement significative entre la condition contrôle et la condition A (20 µg/L, p-value < 0,0001) ainsi que la condition B (15 mg/L) (p-value < 0,0001) (**Figure 19**). Le poids des juvéniles a été mesuré à 70 dph pour les trois conditions. Le tests statistique de Kruskal-Wallis suivi du Dunn's Test a mis en évidence une différence significative entre la condition A et la condition contrôle (p-value < 0,01) ainsi qu'entre la condition B et la condition contrôle (p-value <0,05) (**Figure 19**).

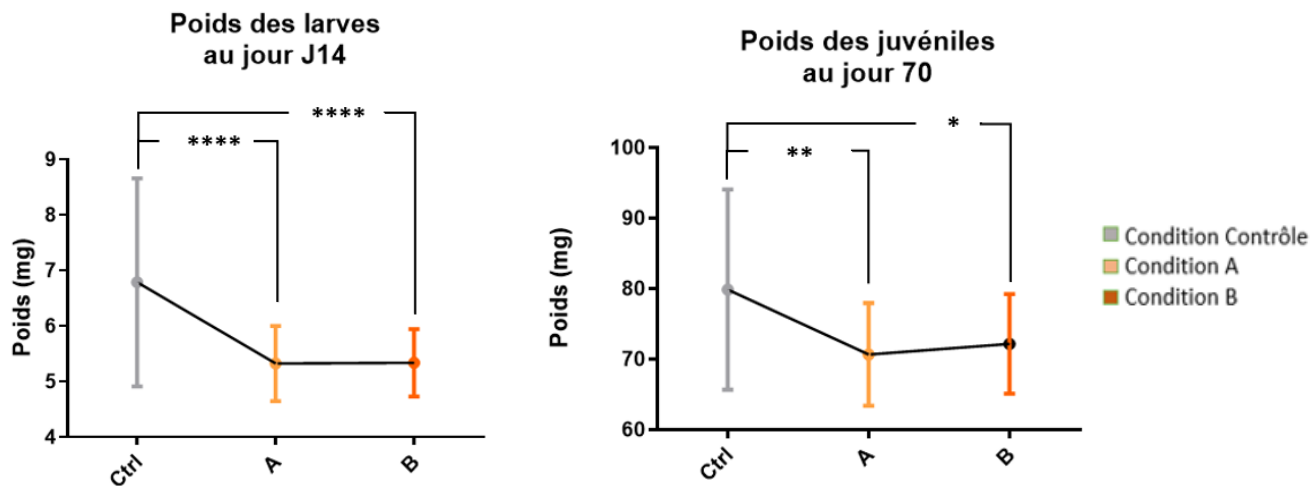


Figure 19 – **Graphique de gauche** : Comparaison des poids en mg des larves au jour 14 via un test de Kruskal Wallis suivi d'un test de comparaison multiple (Dunn's test). Chaque condition est constituée de respectivement 41, 43, et 44 larves. Deux différences très hautement significatives ont été mises en évidence, une entre le groupe contrôle et la condition A (p-value < 0.0001), et une entre le contrôle et la condition B (p-value < 0.0001). Les valeurs moyennes ± écart-type sont de 6,8 ± 1,9 pour la condition contrôle, 5,3 ± 0,7 pour la condition A, et de 5,3 ± 0,6 pour la condition B. **Graphique de droite** : Comparaison des poids en mg des individus du groupe « juvéniles » au jour 70 post-éclosion. Chaque condition contient respectivement 43, 42 et 45 larves. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple (Dunn's test) a mis en évidence une différence hautement significative entre la condition contrôle (79,8 ± 14,2) et la condition A (70,6 ± 7,2) (p-value < 0.01) ainsi qu'une différence significative entre les poids du groupe contrôle et ceux de la condition B (72,1 ± 7,1) (p-value < 0.05).

## 1.2 Taux de croissance

Les taux de croissance journaliers ont été calculés pour la période d'exposition et la période post-exposition (**Figure 20**). Ces taux de croissance sont des moyennes relatives au temps (croissance ramenée à la croissance en cm par jour et exprimée en %). Entre 0 et 14 dph (*day post-hatching*), les larves des conditions A et B ont un taux de croissance inférieur à celui de la conditions C. Entre 15 et 70, le taux de croissance journalier de la condition A est égal à celui de la condition contrôle. La tendance générale de la condition contrôle est une diminution de la croissance journalière après 14 dph, tandis que la croissance journalière des conditions A et B augmente après 14 dph. La croissance moyenne

journalière de 0 à 70 dph a également été calculée, sans mettre en évidence une différence significative entre les courbes (*Figure 21*).

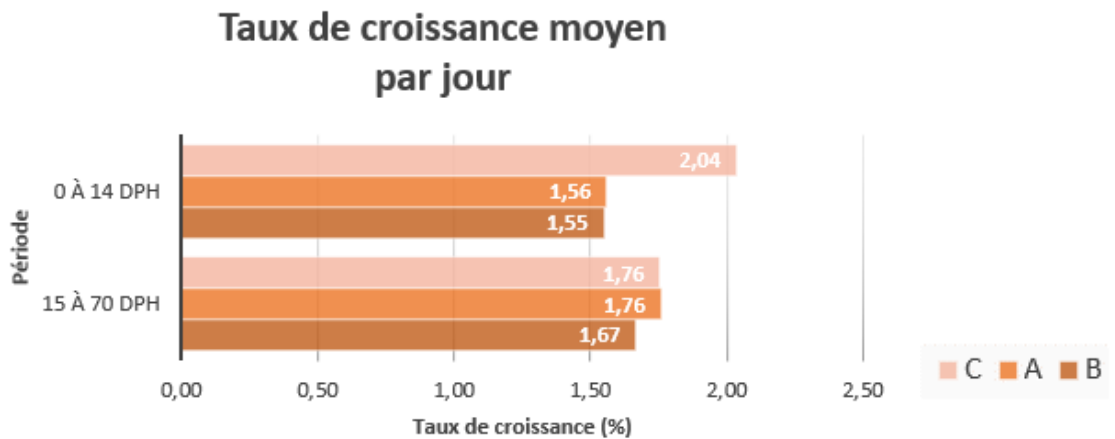


Figure 20 – Représentation du taux de croissance journalier durant la période d’exposition (0-14 dph) et post-exposition (14-70 dph). La croissance journalière des larves exposées à la BMAA est moins élevée (Condition A 20 µg/L, Condition B 15 mg/L) par rapport à celui de la condition contrôle (Condition C). Durant la période post-exposition (14 à 70 dph), le taux de croissance journalier de la condition B est moins élevé que celui des conditions C et A. Le taux de croissance journalier Dph : Day post-hatching

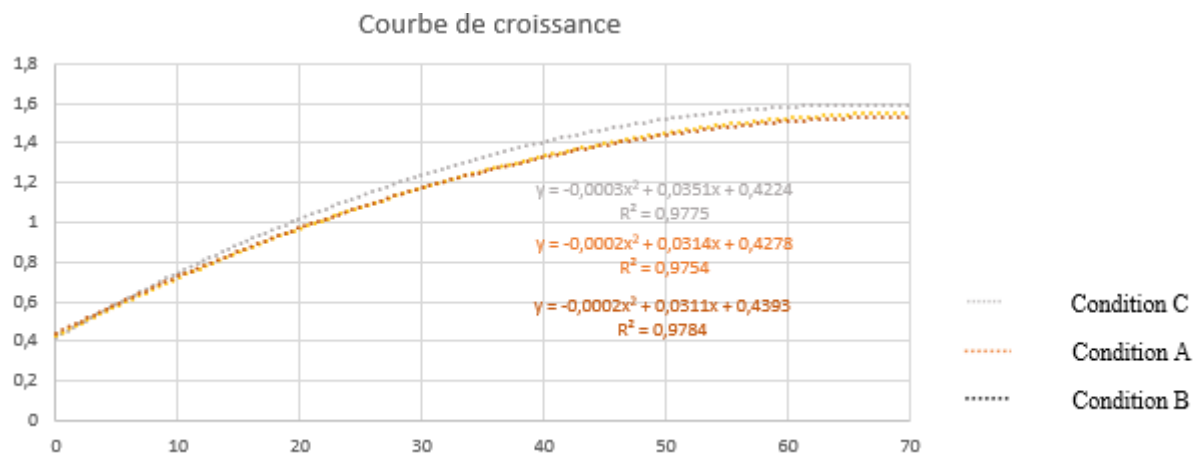


Figure 21 – Courbes de croissance des conditions C (Contrôle), A (20 µg/L de BMAA) et B (15 mg/L de BMAA). Les trois courbes sont polynomiales et présentent un R<sup>2</sup> supérieur à 97%. Il n’y a pas de différence significative entre les courbes.

## 2 Comportement

Au total, les vidéos de 126 larves (Condition contrôle N=40, Condition A N=42 et Condition B N=44) et de 128 juvéniles (Condition contrôle N=43, Condition A N=41 et Condition B N=44) ont été analysées. Dans le groupe des juvéniles, l'individu B-60 a été écarté car il est resté en-dehors de l'eau durant le test. Après l'acquisition, les détections ont été vérifiées individuellement deux fois, une première via l'onglet « heat map », qui permettent de visualiser en couleur la fréquence de chaque pixel dans l'arène, et une seconde fois via l'outil « integrated visualization » qui affiche la détection ainsi que les données de chaque variable en temps réel.

4 variables liées à la locomotion ont été testées, à savoir, la distance totale parcourue (cm), la vitesse moyenne (cm/s), la durée d'immobilité et la durée de mobilité élevée, ainsi qu'une variable liée à la thigmotaxie, *i.e.* le temps passé dans la zone intérieure de l'arène (s). La variable « vitesse moyenne » a été éliminée car elle est corrélée à plus de 90%, à la variable « distance totale parcourue ». La distance parcourue et la vitesse moyenne ont été transformées en body length (bl) et bodylength/seconde (bl/s) respectivement. La valeur *body length* est calculée en divisant les valeurs de vitesse et de distance parcourue (exprimées en centimètre/s et centimètre) par la taille moyenne des individus de chaque condition (exprimée en centimètre). Cette transformation permet d'avoir des valeurs relatives à la taille des individus (14 et 70 dph).

Une analyse exploratoire a été réalisée via deux ACP (Analyse en composantes principales) sur les comportements de locomotion et de thigmotaxie sur le logiciel RStudio® (**Figure 22 et 23**). Les coefficients de corrélation des cinq variables et les p-values sont visibles aux Tableaux 6 et 7. L'analyse sur le programme R a aussi permis de visualiser les individus avec des valeurs extrêmes. Pour ces individus, les résultats ont été vérifiées une nouvelle fois à l'aide de l'onglet « Track editor » qui permet de corriger la détection de l'individu manuellement. L'individu B-60 a été écarté car le logiciel ne le détectait pas de manière optimale.

D'après l'ACP du groupe des larves (**Figure 22**), la distance parcourue totale est corrélée positivement avec la mobilité élevée (73%,  $p$ -value < 0.001), et inversement corrélée à l'immobilité (-93%,  $p$ -value < 0.001). La durée passée au centre de la zone est indépendante des trois autres variables avec des valeurs de corrélation proches de 0 (**Figure 22**). Tableau des valeurs de corrélation et  $p$ -values associées au **Tableau 6**.

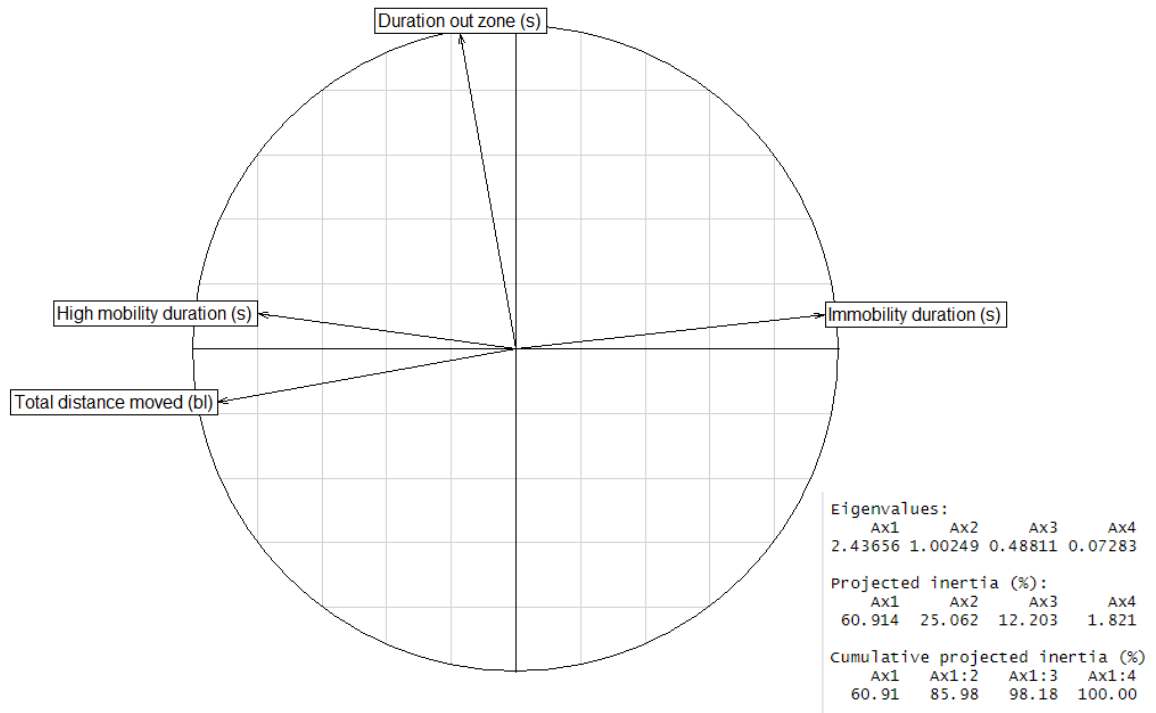


Figure 22 – Analyse en Composante Principale des variables analysées du groupe des larves (N=126). L'inertie du modèle est de 85,89%, avec une inertie de 60,91% pour l'axe1 et de 25,07% pour l'axe2. La variable de la durée hors zone centrale, « Duration out zone », est perpendiculaire aux trois autres variables, avec des valeurs de corrélation proches de 0. La durée d'immobilité est inversement corrélée avec et la variable Distance totale parcourue (valeurs de corrélation = -93%,  $p$ -value < 0.001) et la Durée de mobilité élevée. La distance totale parcourue et la durée de mobilité élevée sont très corrélées (73 % de corrélation,  $p$ -value < 0.001). Les valeurs de corrélation et les  $p$ -values associées sont détaillées au Tableau 6.

Tableau 6 - Coefficients de corrélation entre les variables de comportement de larves *Kryptolebias marmoratus* avec leur  $p$ -value associée : \*  $p$ <0,05 ; \*\*  $p$ <0,01 ; \*\*\*  $p$ <0,001.

Variables	Distance totale parcourue (bl)	Vitesse moyenne (bl/s)	Durée aux bords de l'arène (s)	Durée de mobilité élevée (s)	Durée d'immobilité (s)
Distance totale parcourue (bl)	-	0.99 ***	0.07	0.73 ***	-0.93 ***
Vitesse moyenne (bl/s)	-	-	0.07	0.73 ***	-0.92 ***
Durée aux bords de l'arène (s)	-	-	-	0.12	-0.07
Durée de mobilité élevée (s)	-	-	-	-	-0.81

Concernant l'ACP du groupe des juvéniles, illustrée à la Figure 23, les variables de Distance parcourue est corrélées avec la Durée de mobilité élevée (63%, p-value < 0.001) et inversement corrélée à l'Immobilité (89%). Dans ce modèle, la variable de thigmotaxie présente des valeurs corrélations faibles avec les trois autres variables (**Figure 23**). Les valeurs de corrélation et p-values associées est sont détaillées dans **Tableau 7**.

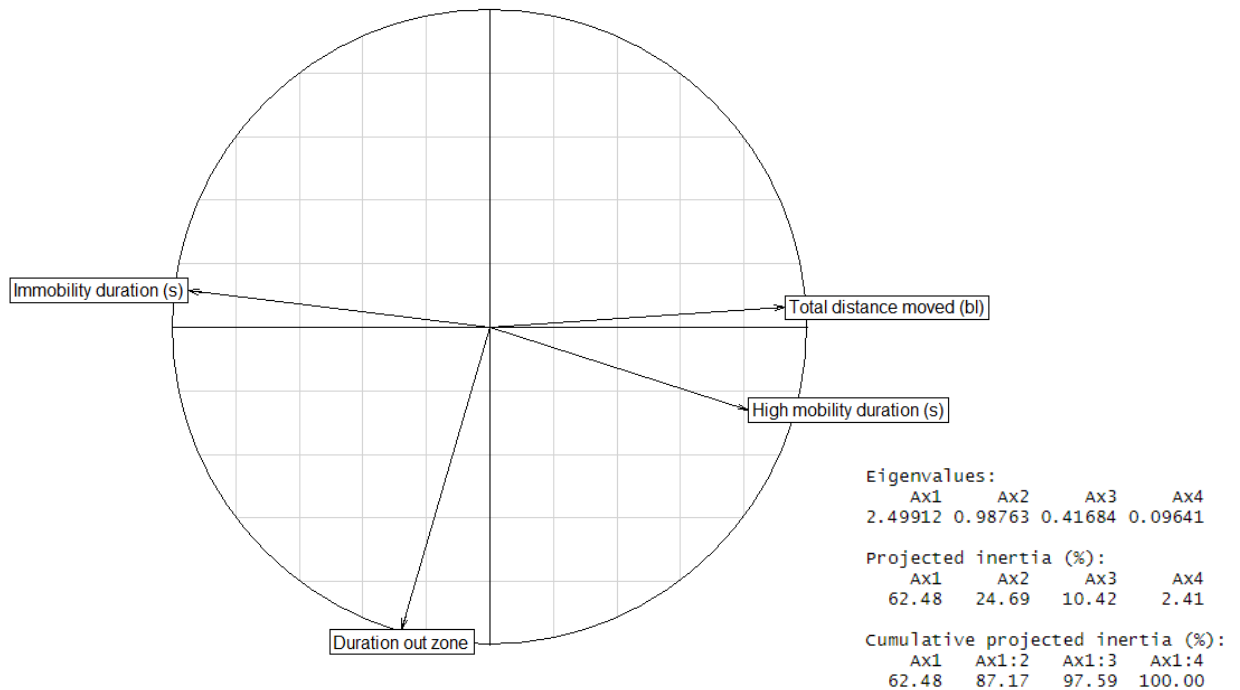


Figure 23 - Analyse en Composante Principale des variables du groupe des juvéniles (N=128). L'inertie du modèle est de 87,17%, i.e. le modèle explique 87,17% des données, avec 62,48% d'inertie pour l'axe 1 et 24,69% pour l'axe 2. La distance totale parcourue est positivement corrélées à la durée de mobilité élevée (63,00%, p-value<0.001) et inversement corrélée à l'immobilité (-89%, p-value < 0.001). Selon le modèle, le temps passé aux bords de l'arène a peu d'influence sur les autres variable. Les valeurs de corrélation et p-values associées sont détaillées au tableau 2.

Tableau 7 - Coefficients de corrélation entre les variables de comportement de juvéniles *Kryptolebias marmoratus* avec leur p-value associée : \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001.

Variabes	Distance totale parcourue (bl)	Vitesse moyenne (bl/s)	Durée aux bords de l'arène (s)	Durée de mobilité élevée (s)	Durée d'immobilité (s)
Distance totale parcourue (bl)	-	0.99 ***	-0.35 **	0.63***	-0.89***
Vitesse moyenne (bl/s)	-	-	-0.35 **	0.62 ***	-0.89***
Durée aux bords de l'arène (s)	-	-	-	-0.11	0.23**
Durée de mobilité élevée (s)	-	-	-	-	-0.71 ***

Les variables ont ensuite été individuellement observées. Des graphes ont été réalisés via le logiciel GraphPad Prism 8<sup>TM</sup>. Une différence significative entre la condition contrôle et la condition A chez les juvéniles a été observé pour les variables de Distance totale parcourue et de Vitesse moyenne, mais pas dans le groupe des larves. Aucune différence n'a été détectée pour les variables Immobilité et Durée au centre de l'arène. La Durée de mobilité élevée présente une différence significative entre la condition contrôle et la condition B pour le groupe des larves (**Figure 24**). Les valeurs moyennes  $\pm$  écart-type pour les différentes conditions à chaque time point sont résumées dans le Table au 8.

Tableau 8 - Moyennes et écart-types des variables pour chaque condition aux times points 14 et 70 dph.

Variables	J14	J14	J14	J70	J70	J70
	Condition C	Condition A	Condition B	Condition C	Condition A	Condition B
Distance totale parcourue (bl)	175,8 $\pm$ 76,99	189,9 $\pm$ 79,00	207,6 $\pm$ 96,37	99,61 $\pm$ 86,10	200,1 $\pm$ 137,3	192,7,2 $\pm$ 204,8
Vitesse moyenne (bl/s)	0,297 $\pm$ 0,1295	0,320 $\pm$ 0,1283	0,351 $\pm$ 0,1598	0,186 $\pm$ 0,1601	0,372 $\pm$ 0,2585	0,361 $\pm$ 0,3819
Durée d'immobilité (s)	552,6 $\pm$ 29,56	540,8 $\pm$ 40,51	536,3 $\pm$ 41,22	588,6 $\pm$ 13,33	581,7 $\pm$ 18,05	577,9 $\pm$ 34,47
Durée au centre de l'arène (s)	515,0 $\pm$ 57,74	493,8,2 $\pm$ 65,77	516,9 $\pm$ 47,63	418,9 $\pm$ 166,1	351,7 $\pm$ 176,2	658,7 $\pm$ 191,5
Durée de mobilité élevée (s)	2,223 $\pm$ 3,028	2,538 $\pm$ 3,597	4,488 $\pm$ 5,011	0,5879 $\pm$ 0,8706	0,6907 $\pm$ 0,8925	0,8500 $\pm$ 1,250

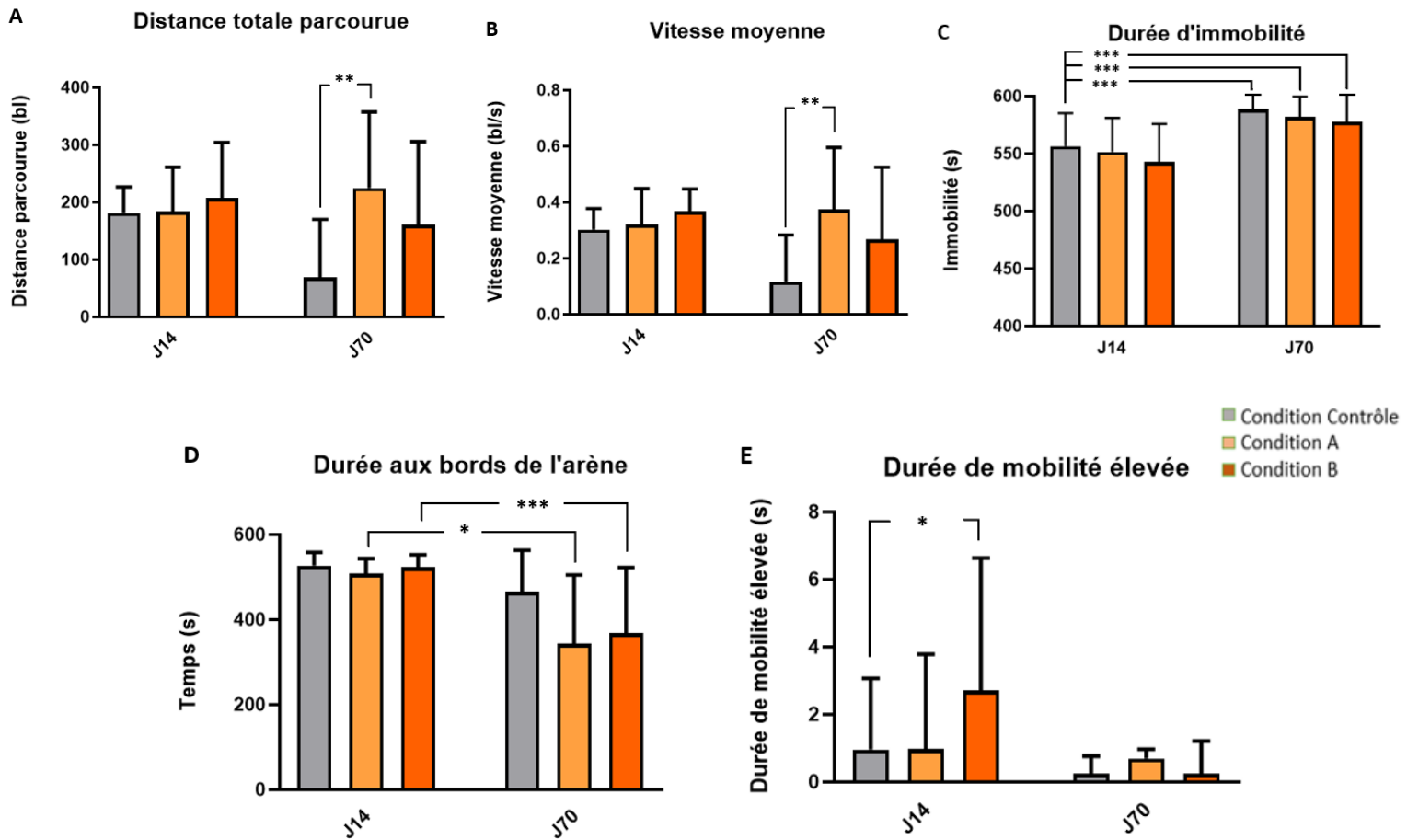


Figure 24 – Comparaison des moyennes relatives des 5 variables en fonction des trois traitements, à savoir, Condition C, Condition A (20 µg/L) et condition B (15 mg/L) à 14 jours post-éclosion et 70 jours post-éclosion. Le nombre de larves par condition s'élève à 40, 42, 44 et le nombre de juvéniles par condition à 43, 41, 44, respectivement. **A** : Comparaison des moyennes relatives de la variable Distance totale parcourue en body length, entre 3 conditions et 2 times points, testé via un test de normalité Agostino & Pearson suivi d'un test d'Anova I. **B** : Comparaison de la variable vitesse moyenne, entre 3 conditions et 2 times point, test statistique voir test du graphique A. **C** : Comparaison de la variable d'Immobilité, entre 3 conditions et 2 times point, testé via un test de normalité Agostino & Pearson suivi d'un test statistique non-paramétrique (Kruskal & Wallis). **D** : Comparaison de la variable Durée au centre de l'arène entre 3 conditions et 2 times point, test statistique voir Graphique C. **E** : Comparaison de la variable Durée de mobilité élevée, entre 3 conditions et 2 times point, test statistique voir graphique A. Les valeurs des moyennes et écarts-types sont détaillées dans le **Tableau 8**.

### 3 Analyses moléculaires

Au total, l'extraction d'ADN a été réalisée sur 60 individus (10 individus par condition et par stade). Les individus sélectionnés devaient présenter une concentration en ADN optimale avec un minimum de risque de contamination.

#### 3.1 Détails des primers

Les primers ont été sélectionnés après avoir vérifié la présence d'une amplification spécifique de la séquence par un gel d'électrophorèse. Les primers du gène DRD4 n'ont pas amplifié la séquence. Cette région a donc été retirée de la suite des manipulations de méthylation de l'ADN. Le tableau détaillant les primers utilisés se trouve ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9 – Liste des primers utilisés pour le pyroséquençage. Prom : Promoteur ; b : biotine. ; pb : Paire de base.

Gène-cible	Taille de l'amplicon		Séquence amorces	Tm (°)	Score	Taille de l'amorce (pb)
RTN4-Prom	98	F3	GGATTGTTAGGAGGTTTATTGTAGTT	59,8	65	25
		R1-b	CTTAACCAATCCAAACTCCTAAAAT	59,6		25
		S1	AGTATAAGGAGTTAATTAAGTGTG	42,4		24
MAO-Prom	117	F2	TTGAAGTTAGGATGTTTTTTAAGTATGG	58,9	84	28
		R2-b	ACTCAAAAAAATACTTTATCCACTAACA	58,4		28
		S1	GGATGTTTTTTAAGTATGGT	44,9		20
DRD4-Prom	98	F2	AAGTTTTATGTTGTTTTAGAGGATTTATTA	57,6	72	30
		R2-b	CATCAACTTTTCTCCCTAAATATAAAC	58		28
		S1	AGAGGATTTATTATTTTATTATTTG	41,8		25
DRD4-Exon3	78	F4	TAATGGGGTAGGGGATGAAGA	59,1	86	21
		R2-b	ACTCTAACCCCTAACATCACCCATCATAT	59,1		28
		S2	GGGATGAAGAAGGAGTAT	47		18
GABRB2-Prom	128	F1	AAGTTGAAGTTTTAGATATTGGGAATA	58,1	73	27
		R1-b	ACTAAATACACATCTCCAATAATTAAC	58,3		28
		S1	AGTTTTAGATATTGGGAATATG	45,4		22
GABRB2-Exon9	110	F1	GGTTTGGGATGTTTATTTGAGT	58,5	74	23
		R1-b	ATCCCCCAACACCATACTAACCTA	57,8		25
		S1	GGGATGTTTATTTGAGTT	44,9		19

#### 3.2 Méthylation par pyroséquençage

Un test de normalité Shapiro-Milk a été appliqué sur les données de méthylation. Le test non-paramétrique Kruskal-Wallis, suivi du test de Dunn, a été réalisé. Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements ni entre les larves et les juvéniles (**Figure 25 et 26**). De manière générale, les valeurs des écart-types sont plus élevées pour les sites CpG avec des taux de méthylation compris entre 20 et 80%. La taille du groupe, les moyennes et les écarts-types des 5 régions sont détaillés pour les gènes *RTN4*, *Mao* et *DRD4* dans le **Tableau a**, et pour le gène *Gabrb2* dans le **Tableau b** (Annexe II).

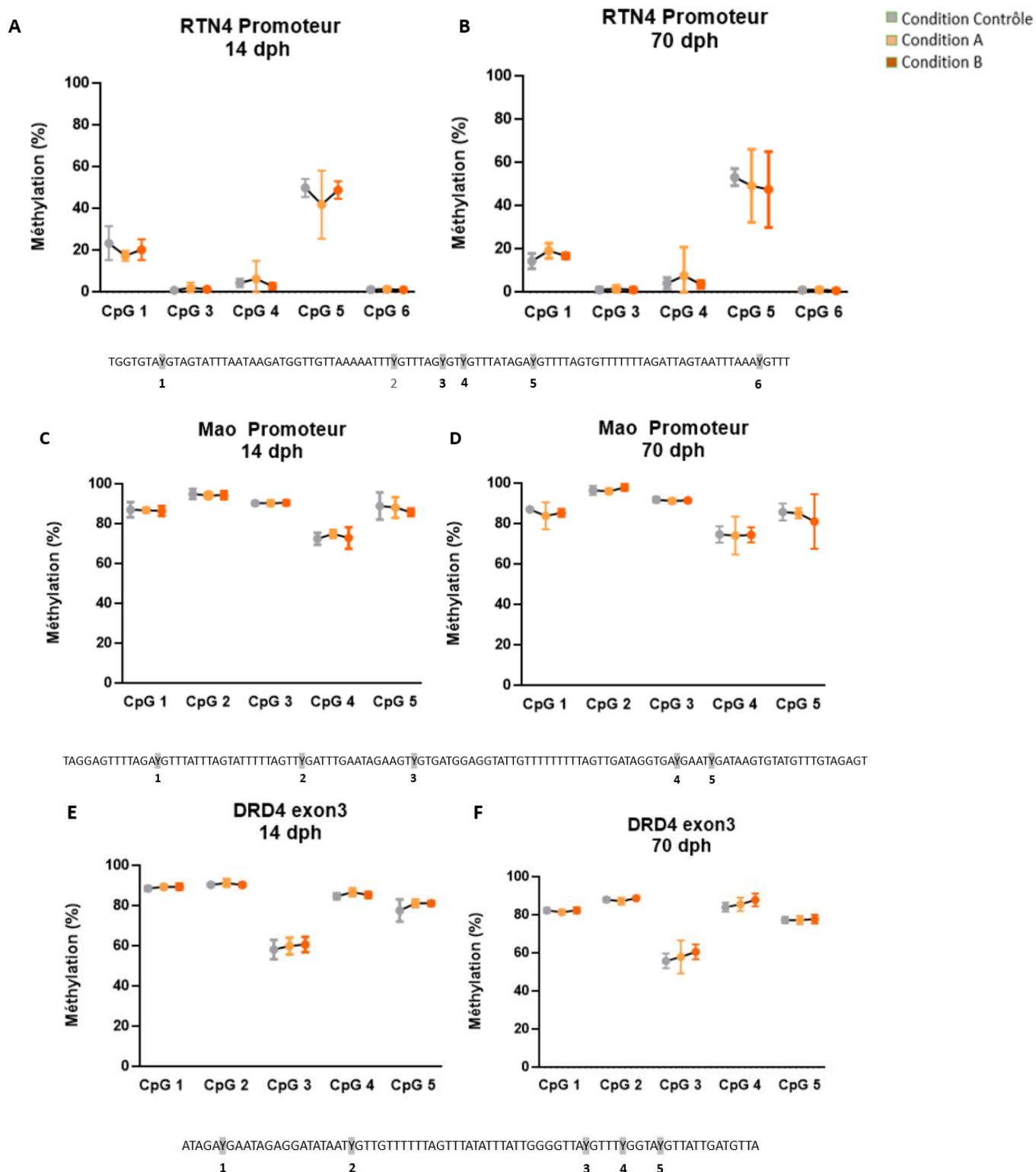


Figure 25 – A : Comparaison des taux de méthylation des CpG du promoteur de RTN4, entre 3 conditions : C (N=7), A (N=7), et B (N=6) au stade larvaire (14dph). Valeurs moyennes B : Comparaison des taux de méthylation des CpG du promoteur de RTN4 entre 3 conditions : C (N=7), A (N=7), et B (N=7) au stade juvénile (70dph). C : Comparaison des taux de méthylation des CpG du promoteur de Mao, entre 3 conditions : C (N=8), A (N=8), et B (N=8) au stade larvaire (14dph). D : Comparaison des taux de méthylation des du promoteur de Mao entre 3 conditions : C (N=8), A (N=8), et B (N=8) au stade juvénile (70dph). E : Comparaison des taux de méthylation des CpG de l'exon de DRD4, entre 3 conditions : C (N=6), A (N=6), et B (N=6) au stade larvaire (14dph). F : Comparaison des taux de méthylation des du promoteur de l'exon 3 de DRD4 entre 3 conditions : C (N=5), A (N=6), et B (N=6) au stade juvénile (70dph). **Dph** = Day post-hatching. **C** = Condition Contrôle, **A** = Condition A (20 µg/L), **B** = Condition B (15 mg/L). Les valeurs des moyennes et écarts-types sont détaillées dans le Tableau a en Annexe II.

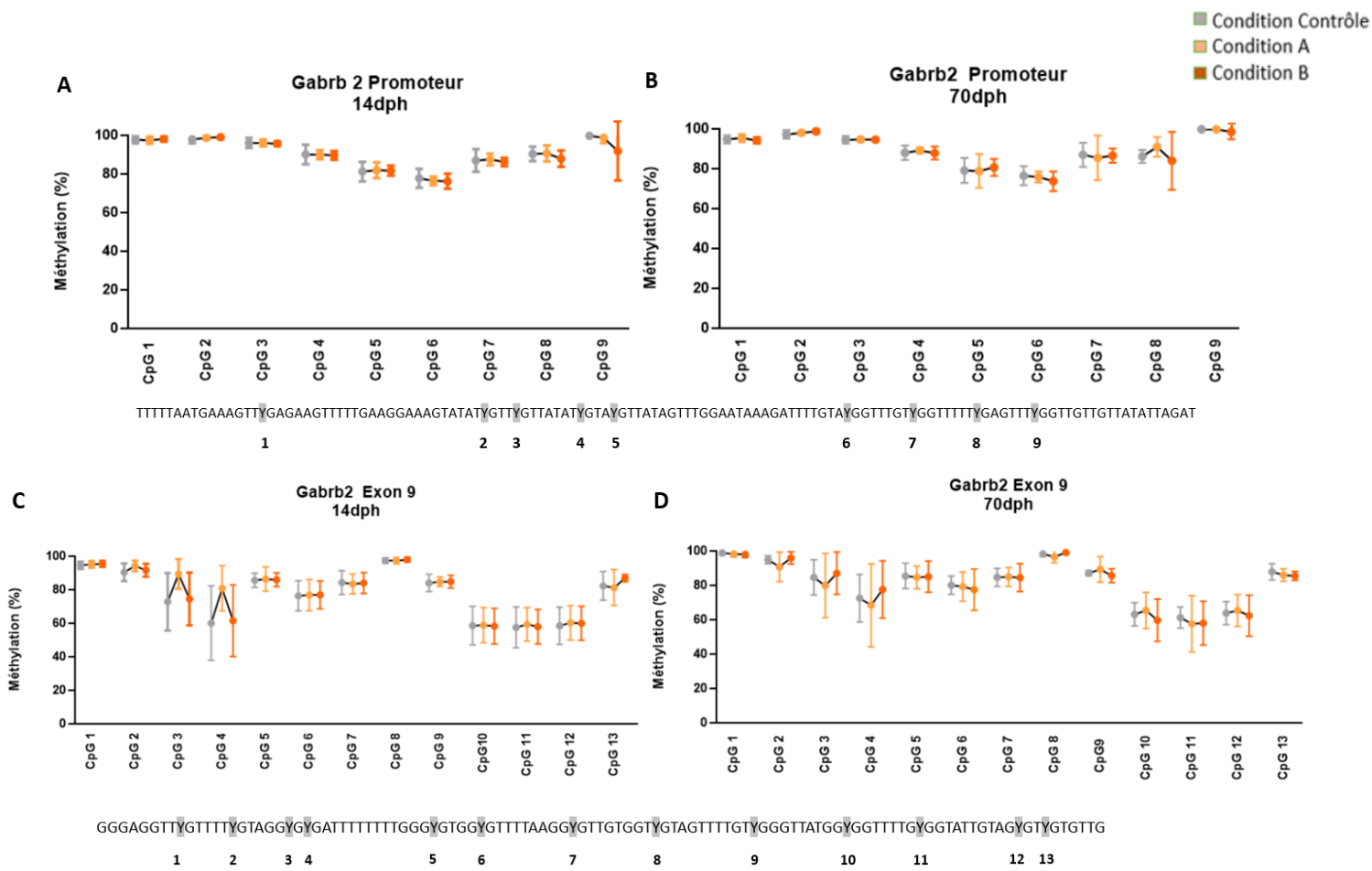


Figure 26 – A : Comparaison des taux de méthylation des CpG du promoteur de *Gabrb2* entre 3 conditions : C (N=9), A (N=9), et B (N=9) au stade larvaire (14dph). B : Comparaison des taux de méthylation des CpG du promoteur de *Gabrb2* entre 3 conditions : C (N=9), A (N=9), et B (N=9) au stade juvénile (70dph). C : Comparaison des taux de méthylation des CpG de l'exon de *Gabrb2* entre 3 conditions : C (N=9), A (N=9), et B (N=9) au stade larvaire (14dph). D : Comparaison des taux de méthylation des CpG de l'exon 9 de *Gabrb2* entre 3 conditions : C (N=8), A (N=9), et B (N=9) au stade juvénile (70dph). **Dph** = Day post-hatching. C = Condition Contrôle, A = Condition A (20 µg/L), B = Condition B (15 mg/L). Les valeurs moyennes et écarts-types sont détaillés dans le Tableau b en Annexe II.

## Partie IV : Discussion

L'objectif principal de ce mémoire était la caractérisation d'une potentielle plasticité développementale induite par stress environnemental précoce (SEP) au sein de la lignée DC4 de *K. marmoratus*, au niveau de la croissance, du comportement et de l'épigénomique. Pour ce faire, les effets immédiats et retardés de la neurotoxine BMAA ont été investigués au niveau comportemental ainsi qu'au niveau moléculaire. D'une part sur la caractérisation de la locomotion et la thigmotaxie, d'autre part sur la caractérisation de la méthylation de gènes spécifiques.

De nombreuses recherches ont démontré que les changements environnementaux pouvaient mener à des variations de phénotype au sein d'un même génotype (Blanchard et al., 2019 ; Chatterjee et al., 2019 ; Priesma et al., 2003 ; Segev et al., 2019). Cette variation est appelée plasticité ou flexibilité phénotypique. Les conséquences qui en découlent peuvent être adaptées ou mésadaptées pour l'individu, et ces conséquences sont par définition réversibles (Gillis et al., 2019 ; James et al., 2018 ; Kappeler, 2010 ; Priesma et al., 2010). Un stress environnemental précoce (SEP) pourrait avoir des conséquences considérables sur le développement nerveux de l'individu. Ce type de stress engendrerait des variations de phénotypes importantes comme une réduction des performances d'évasion (Wang et al., 2015) et des changements de morphologie (James et al., 2018 ; Lampl et al., 2019 ; Voisin et al., 2019). La variabilité phénotypique qui découle d'un SEP est appelée plasticité développementale et est induite de manière irréversible (Priesma et al., 2003). Le rivulus est un vertébré particulièrement pertinent en écotoxicologie car les individus sont capables de se reproduire par autofécondation. Les lignées isogéniques sont donc naturelles et assurent un haut pourcentage d'homozygoté. Cette réduction de la variabilité génétique au sein des descendants est une opportunité unique pour décrire les mécanismes épigénétiques en tant que source de flexibilité phénotypique et de plasticité développementale chez les vertébrés (Fellous et al., 2018 ; Metzger & Schulte, 2016, 2017 ; Voisin et al., 2019).

### 1. Traits d'histoire de vie

Les résultats sur les taux de mortalité n'ont pas indiqué de lien direct entre la concentration en BMAA (0, 20 µg/L et 15 mg/L) et la mortalité des individus. Il s'agit ici d'une concentration nominale car les résultats du test ELISA n'ont pas été exploitables pour déterminer la concentration réelle de BMAA.

Des différences entre traitements ont été observées pour les tailles et les poids des individus. Les larves aux jours 0 et 7 post-éclosion (dph) présentent une taille similaire avec un écart-type très faible. Le risque d'un biais des traits de croissance lié à l'échantillonnage est donc peu probable. A partir de 14 dph et jusqu'à 70 dph, une différence de taille a été statistiquement déterminée entre la condition contrôle et les deux conditions d'exposition à la BMAA. En revanche, même si des différences significatives de tailles existent, les taux de croissance entre les trois traitements ne sont pas significativement différents. Les individus des trois traitements présentent une augmentation de croissance semblables (**Figure 21**). Ce résultat se reflète dans la différence de taille entre le groupe

contrôle et les groupes exposés à la BMAA qui persistent jusqu'à au moins 56 jours après l'exposition. Une étude conduite selon un design expérimental identique n'a pas observé de différence de taille entre les traitements à 170 dph (Markey, 2018). Ce dernier résultat cité, comparé à ceux de ce mémoire, suggère que le retard de croissance est rattrapé durant le stade adulte. Dans le cadre de cette expérience, les individus exposés à la concentration la moins élevée (20 µg/L de BMAA), retrouvent un rythme de croissance égal à celui des individus du groupe contrôle après l'exposition, contrairement aux individus exposés à la plus haute concentration en BMAA (15 mg/L) (**Figure 20**). Dans le résultat d'A. Markey, le risque de faux négatif a été réduit par la taille élevée de l'échantillon (53 individus par condition) avec une puissance de 70 à 80%, préalablement vérifiée par G\*Power 3.1 (Markey, 2018). De plus, une autre étude a récemment observé un effet de croissance compensée chez le *K. marmoratus* après un stress environnemental précoce (James et al., 2018).

Concernant le poids, les moyennes des conditions exposées à la BMAA (20 µg/L et 15mg/L) étaient inférieures à la moyenne de la condition contrôle pour les larves âgées de 14 jours. Une différence significative de poids était encore visible 56 jours après l'exposition à la neurotoxine pour les deux traitements d'exposition à la BMAA. L'étude de Markey en 2018 a observé une différence significative de poids 156 jours après l'exposition, uniquement pour la plus haute concentration en BMAA (15 mg/L) avec le groupe contrôle. Cette différence avait une tendance inverse, où les individus de la plus haute concentration (15 mg/L) présentaient un poids plus élevé que les individus contrôles (Markey, 2018).

Récemment, le succès de capture de proie du rivulus des mangroves a été testé (Carion et al., 2018). Le taux d'échec de capture de proies était plus élevé pour les larves (7dph) exposées 7 jours à la BMAA (20 µg/L et 15 mg/L) (Carion et al., 2018). De plus, le nombre d'essais de capture de proies était plus élevé pour les larves exposées (20 µg/L et 15 mg/L) (Carion et al., 2018). Des tentatives de capture de proies plus fréquentes, avec un taux d'échec plus élevé, constituent une dépense d'énergie coûteuse et suggère un impact sur le fitness de l'individu (Carion et al., 2018). Cette hypothèse pourrait être un facteur d'explication de la différence de poids entre traitements et refléter des endommagements au niveau au système nerveux, à court terme et à long terme. Une diminution du succès de capture de proie a aussi été observée chez *Danio rerio* après une exposition précoce au TCDD<sup>7</sup> (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin). Ce résultat était visible chez les larves<sup>8</sup> et corrélé avec la croissance, la taille et la survie des poissons (Chollett et al., 2014). Dans leur contexte naturel, les organismes qui ont des difficultés à attraper des proies vivantes sont moins compétitifs et plus sujets à la prédation, ce qui diminue leur probabilité de survie (Correia et al., 2019 ; Domingues et al., 2016).

---

<sup>7</sup> 1h à 4h post-fertilisation,

<sup>8</sup> 21 dph, exposées à 50 et 100 pg TCDD/mL

Basé sur les traits de croissance, les individus exposés à une plus faible concentration en BMAA durant leur développement semblent montrer une compensation de croissance légèrement plus élevée, mais identifiable. La compensation de croissance (CG, compensatory growth) est une phase de croissance accélérée de croissance après une période partielle ou complète de privation de nourriture, une fois que les conditions environnementales sont à nouveau favorables (Ali et al., 2003). Ce phénomène est envisagé pour tenter d'expliquer la tendance des résultats des traits d'histoire de vie. Il s'agit d'un mécanisme connu chez de nombreux organismes comme les plantes (Orcutt & Nilsen, 2000), les humains (Prabhakaran et al., 2008 ; Pradeilles et al., 2019), d'autres mammifères (Rowan et al., 1996 ; Abdelraheem et al., 2019), et les poissons (Diana, 2004 ; Türkmen et al., 2012 ; Oh & Park, 2019). Ce sujet est étudié surtout dans les domaines de l'aquaculture et du management alimentaire (Ali et al., 2003 ; Gerrard & Grant, 2002 ; Lawrence & Fowler, 2002 ; Oh & Park, 2019). Une compensation de croissance a un coût métabolique et pourrait engendrer des changements importants au niveau du métabolisme et de l'activité de nage (Gerrard & Grant, 2002 ; Priesma et al., 2003). Les phénomènes de compensation et surcompensation de croissance sont à interpréter avec précaution car ils dépendent de nombreux facteurs -âge des individus, stade de vie, degré de sévérité, nature de la sous-nutrition, nature de la ré-alimentation- avec des importances relatives qui sont encore à déterminer (Lawrence & Fowler, 2002 ; Pradeilles et al., 2019 ; Winston & Osbourne, 1960). Une compensation de croissance a été observée chez le Zebra fish (*Danio Rerio*) après une exposition à des toxines hépatotoxiques de cyanobactéries (Ghazali et al., 2009) et après un stress environnemental de prédation chez *K. marmoratus* (James et al., 2018), tandis que ce mécanisme n'a pas été observé chez les têtards (Capellan & Nicieza, 2007). La présence ou l'absence de métamorphose durant le développement de l'individu influence peut-être le mécanisme de CG. Purdie et al. a mis en évidence une perte de coordination générale d'individus exposés à la BMAA, ce qui pourrait réduire les capacités de capture de proie et ainsi générer un retard de croissance chez les individus (Purdie et al., 2009). Une autre étude a démontré une réduction de capacités motrices après une exposition précoce à la BMAA (Karlsson et al., 2009).

Malgré le fait que la compensation de croissance puisse avoir un coût métabolique élevé avec un potentiel impact négatif sur la reproduction ou à la compétitivité, ce mécanisme est observé chez le rivulus des mangroves et d'autres espèces aquatiques (Ali et al., 2003 ; James et al., 2018). La croissance doit donc jouer un rôle-clef pour les capacités de survie de l'animal. Il pourrait s'agir d'une réponse de plasticité qui permet à l'animal d'atteindre ses capacités optimales de saut. Récemment, il a été prouvé que *K. marmoratus* augmente sa capacité de saut avec l'augmentation de sa taille (Styga et al. 2018). En effet, la croissance est étroitement liée à la morphologie, qui aurait elle-même un rôle décisif sur la capacité de survie pour l'espèce *K. marmoratus* : un individu plus grand serait capable de fuir ou sauter plus rapidement pour échapper à une situation de stress (Chivers & Smith 1998; Ferrari et al. 2010; Frommen et al. 2011). La compensation de croissance pourrait donc être une stratégie de développement utilisée par le rivulus des mangroves après un stress environnemental précoce.

## 2. Comportement

Pour l'étude comportementale, un test de 10 minutes a été réalisé le jour de l'euthanasie, sur des individus âgés de 14 dph (effets immédiats de la BMAA) ou 70 dph (effets retardés de la BMAA). Cinq variables comportementales ont été analysées par ACP (Analyse en composante principales), à savoir :

- Temps passé aux bords de l'arène (s)
- Durée d'immobilité (s)
- Distance totale parcourue (bodylength/s)
- Vitesse moyenne (bodylength/s)
- Durée de mobilité élevée (s)

Par définition, la thigmotaxie est la tendance des individus à longer les bords de leur nouvel environnement. L'interprétation du temps passé aux bords de l'arène par rapport au temps total du test détermine le comportement de thigmotaxie. Cette variable reflète un comportement d'anxiété (Best et al., 2017 ; Correia, 2019). Ce comportement est conservé évolutivement chez de nombreux organismes, incluant les rongeurs (Belzung & Philippot, 2007 ; Prut & Belzung, 2003) et les humains (Kallai et al., 2005, 2007). La thigmotaxie a été démontrée pour les larves et les adultes chez *Danio rerio* (Blaser et al., 2010 ; Buske & Gerlai, 2012 ; Champagne, 2010 ; Lopez-Patino et al., 2008), ainsi que chez d'autres espèces de poissons (Sharma et al., 2009 ; Millot et al., 2009 ; Patton et al., 2010).

Les analyses exploratoires en composantes principales (ACP) ont permis d'observer les associations entre les différentes variables. D'après les ACP, le temps passé aux bords de l'arène n'est pas influencé par les autres variables pour les larves et les juvéniles. Par contre, les individus âgés de 70 dph exposés à la BMAA (20 µg/L et 15 mg/L) passent moins de temps à longer les bords de l'arène que les larves exposées (résultat significatif). La condition contrôle présente la même tendance entre les larves et les juvéniles (résultat non-significatif). Ce comportement reflète une anxiété plus élevée chez les larves par rapport aux individus qui ont passé plusieurs semaines en élevage avant le test.

Aucune influence des traitements n'a été observée sur la durée d'immobilité. Globalement, les individus sont très immobiles pendant le test. Les larves sont cependant moins immobiles (**Ctrl** : 552,6±29,56 ; **20 µg/L** : 540,8±40,51 ; **15 mg/L** : 536,3±41,22) que les adultes (**Ctrl** : 588,6±13,33 ; **20 µg/L** : 581,7±18,05 ; **15 mg/L** : 577,9±34,47). Certaines études comportementales distinguent nettement l'anxiété de l'immobilité chez les rongeurs, en liant l'immobilité avec une tendance à la dépression. Le test le plus répandu est le FST (*Porsolt forced swim test*), il aide à évaluer l'efficacité de médicaments anti-dépresseurs (Kurtuncu et al., 2005). Bien que l'association de l'immobilité avec un phénotype de dépression est utilisée par de nombreuses études (Abe, 2016 ; Kurtuncu et al., 2005 ; Pudell et al., 2014 ; Shaldubina et al., 2002), cette interprétation de l'immobilité pourrait présenter un caractère anthropocentrique et elle n'est pas appliquée pour les espèces aquatiques jusqu'à ce jour. Chez les poissons, une étude propose de considérer l'immobilisation comme une réponse à un danger proche

(Maximino et al., 2010). Actuellement, la variable d'immobilité n'est pas reliée à une interprétation comportementale clairement définie chez les poissons, contrairement à la thigmotaxie.

Les variables de distance totale parcourue et de vitesse moyenne, quant à elles, sont fortement corrélées pour les deux groupes d'âge, ce qui signifie que tous les individus ont tendance à se déplacer à une vitesse plus élevée lorsqu'ils parcourent plus de distance d'une manière générale. Pour référence, la vitesse de nage moyenne la plus élevée entre les trois conditions correspond à 0.4 body length/s (Condition A), soit un déplacement de 40 % de la taille de l'individu par seconde. (**Ctrl** : 99,61±86,10 ; **20 µg/L** : 200,1±137,3 ; **15 mg/L** : 192,7,2±204,8)

Une formule est donnée pour classer les poissons en fonction de leur vitesse (V) en cm/s et de leur taille (L) en cm, aussi utilisée en génie maritime pour comparer la vitesse des navires (Kreitmann, 1932):

$$x = \frac{V}{\sqrt{L}}$$

Où X est une valeur de comparaison de classement en 4 catégories, à savoir, :

80 à 100 : poissons très rapides (saumon, truite)

40 à 45 : poissons rapides (barbeau, chevaine)

10 à 15 : poissons à vitesse intermédiaire (ablette, perche)

Inférieur à 10 : poissons lents (brochet, carpe, tanche)

(Keitmann, 1932).

Avec les données sur la vitesse et la taille des individus, le ratio est proche de 0 (exemple : 0.2 cm/s avec une taille de 0.7 cm, X = 0,23). Théoriquement, ce poisson serait classé dans la catégorie de poissons lents. Néanmoins, le rivulus des mangroves est un poisson de très petite taille comparé aux espèces citées dans les catégories. Comme pour toute échelle de référence, il faut rester prudent avec les applications dans les extrêmes. La vitesse de nage peut dépendre aussi d'autres facteurs comme la surface de la nageoire caudale et la masse musculaire. Il s'agit donc ici d'une caractérisation simplifiée permettant d'avoir une idée générale de la vitesse standard des poissons en fonction de l'espèce.

Par définition, l'activité du poisson est décrite par la quantité et la fréquence de mouvements dans un endroit familier et dépourvu de danger. Dans la discussion des résultats comportementaux de ce mémoire, la locomotion se base sur la quantité de mouvements (distance totale parcourue, vitesse moyenne, durée de mobilité élevée et durée d'immobilité). Selon cette définition, une augmentation de l'activité générale chez les individus exposés, *i.e.* une augmentation de la distance parcourue, de la vitesse, de la mobilité élevée et une diminution de l'immobilité, est attendue. Cette hypothèse est basée sur plusieurs études qui ont mis en évidence une hyperactivité après une exposition précoce à la BMAA. Chez les rats, les singes, les poulets et les souris, la distance et la vitesse parcourues ont augmenté après une dose de 500 µg dans le ventricule latéral du cerveau (Yutaka et al., 1993). Une diminution de

capacités motrices, une hyperactivité et une altération de l'habitation au test comportemental a été observée chez les rongeurs exposés à la BMAA (Karlsson et al., 2009, 2011).

Les individus juvéniles exposés à la BMAA (condition 20 µg/L) sont les plus actifs, en termes de distance parcourue (**Ctrl** : 99,61±86,10 ; **20 µg/L** : 200,1±137,3 ; **15 mg/L** : 192,7,2±204,8) et de vitesse moyenne (**Ctrl** : 0,1861±0,1601 ; **20 µg/L** : 0,3720±0,2585 ; **15 mg/L** : 0,3605±0,3819), comparées au contrôle. La condition la plus concentrée (15mg/L de BMAA) présente une tendance similaire (résultat non-significatif). Plusieurs pistes de réponses sont envisageables :

D'une part, les tests de comportement réalisés aux premiers stades de vie pourraient ne rien révéler de significativement observable concernant l'influence de la BMAA. Il est important de souligner que le répertoire comportemental des premiers stades de vie pourrait être limité du fait de la maturation non aboutie du système nerveux par rapport aux stades plus avancés (Legradi et al., 2018).

D'autre part, la différence d'activité entre les individus des conditions C (contrôle) et A (20 µg/L) est observable de manière significative dans le groupe 70 dph, ce qui correspondrait à des effets retardés de la BMAA sur la locomotion des individus. Cette hypothèse pourrait s'expliquer en partie par la caractère « lent » de la neurotoxine utilisée. En effet, la BMAA est connue pour son temps de latence entre l'exposition des individus et les premiers effets observables en clinique (Cox et al., 2005; Elisabeth Johanna Faassen, 2016). En plus de sa capacité d'écotoxicité de récepteurs, cette neurotoxine aurait la capacité de s'incorporer par erreur dans les cellules nerveuses via des ARNt synthétases de la sérine (Dunlop et al., 2013 ; Murch et al., 2004). Une hypothèse est que la BMAA interagirait avec la neuromélanine, capable de la séquestrer, et serait stockée une longue période avant d'être libérée tout au long de la vie de l'organisme (Delcourt et al., 2017). Cette incorporation lui permettrait d'être stockée et de lentement se libérer durant la digestion et par des protéines du métabolisme. Sa présence dans le corps encore des années après l'ingestion serait possible (Murch et al., 2004b). Selon une étude, la quantité de BMAA liée serait de 60 à 130 fois plus importante que la molécule libre (Banack, Caller, & Stommel, 2010).

Une expérience similaire sur des individus au stade adulte avancé (300-400 dph) pourrait être menée afin d'observer une différence de l'activité dose-réponse à long terme. Basé sur la potentielle présence de la BMAA à long terme dans l'organisme, le résultat hypothétiquement attendu serait une augmentation de la locomotion durant la vie adulte des individus. Cependant, une étude a mis en évidence une réduction de l'endurance de nage chez des individus âgés de 5 mois (+-150 dph) après une exposition à la BMAA de 7 jours, à différentes concentrations (0, 2,5 et 5 µg/L) (Ghazali et al., 2009). Ce résultat soutient que les individus exposés se fatiguent plus rapidement avec une relation dose-dépendante à la BMAA (Ghazali et al., 2009). Deux ans plus tard, une autre étude avance l'hypothèse que les individus au stade adulte avancé (430 dph) ont tendance à moins se déplacer car ils seraient moins audacieux et moins explorateurs que les juvéniles (30-60 dph) (Edenbrow & Croft, 2011). Cette tendance pourrait s'expliquer par le fait que les stratégies comportementales varient en fonction des stades de vie. En effet, les enjeux de survie ne sont pas les mêmes : l'énergie allouée à la croissance et

à la survie est plus importante au stade juvénile, tandis que la locomotion favoriserait la probabilité de rencontre comme assurance de reproduction au stade adulte (150dphL). Ensuite, le succès reproducteur d'un individu âgé (430 dph) a tendance à diminuer, son activité de locomotion s'en trouverait alors aussi impactée (Gyuris, Feró, & Barta, 2012; Stamps, 2016). Une diminution de l'activité au stade adulte avancé peut donc être également envisagée, ce qui rendrait l'expérience d'autant plus intéressante.

Les mécanismes moléculaires de la BMAA qui influencent les changements comportementaux sont encore à élucider. Les mécanismes considérés sont impliqués dans l'oxydation neuronale, l'hyperactivation et la dégradation des neurones via la cascade de réaction induite par la BMAA (**Figure 27**) (Karlsson et al., 2011). Les récepteurs NMDA potentiel-dépendant et la zone de l'hippocampe

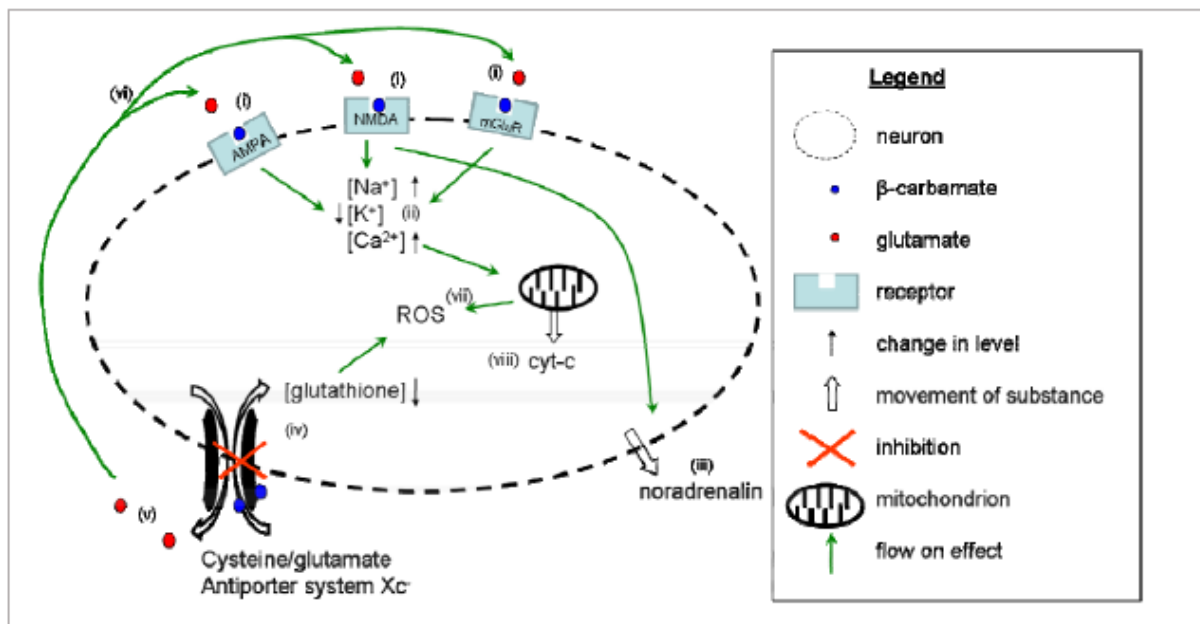


Figure 27 - Résumé illustrant les modes d'action de la BMAA sur les neurones. Dans un organisme *in vivo*, la molécule de BMAA est sous forme de β-carbamate (point bleu). Elle est capable de se lier aux récepteurs NMDA, AMPA et (i). L'activation des récepteurs glutamate résulte en une augmentation d'ions  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et une réduction d'ions  $\text{K}^+$  (ii). La cellule est alors dépolarisée et la membrane devient perméable (cercle pointillé). Avec la combinaison avec l'activité du récepteur NMDA, la noradrénaline est libérée hors de la cellule (iii). Le système de l'antitransporteur cystéine/glutamate  $\text{Xc}^-$  est inhibé (croix rouge) (iv), entraînant une déplétion intracellulaire de glutathione. Cette inhibition cause également une libération extracellulaire de glutamates (points rouges), lesquels se lient aux récepteurs, créant une intensification de l'excitotoxicité (vi). L'ensemble de ces mécanismes cause une augmentation de production de ROS (vii). L'augmentation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  mène à un sur enrichissement de la cellule en nombre de mitochondries, résultant en une libération massive de cyt-c dans le cytosol (viii) (Chiu et al., 2011).

seraient reconnues comme zone-cibles des actions neurodégénératives de la BMAA (Karlsson et al., 2011). D'autres mécanismes moléculaires liés à l'action de cette neurotoxine, comme les récepteurs à la dopamine et des gènes impliqués dans l'hyperactivité tels que *DRD4* et *Maoa* pourraient voir leur activité impactée en cas d'exposition et ainsi influencer le phénotype de l'individu (Hotamisligil et al., 1991 ; Gupta et al., 2015 ; Nevet et al., 2004 ; Ptáček et al., 2013).

D'un point de vue écotoxicologique, il serait intéressant d'investiguer les mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance à la BMAA, par exemple en caractérisant les structures moléculaires de

récepteurs dopaminergiques chez le *K. marmoratus* et chez d'autres espèces de poissons. Ou encore, en déterminant l'activité et les seuils de saturation des canaux ioniques qui interviennent dans l'accumulation du glutamate et des ROS dans les cellules neuronales. La différence de sensibilité des canaux ioniques de différentes espèces de poisson pourrait expliquer de manière plausible les différences de sensibilité du système nerveux à une neurotoxine telle que la BMAA.

Si la molécule est capable de se bioaccumuler dans l'organisme, et ce durant une longue période, les risques potentiels pour la santé humaine sont à considérer. Dès lors, une meilleure caractérisation de ces mécanismes moléculaires sont nécessaires afin de clarifier les altérations possibles au long terme chez les animaux adultes.

### 3. Analyses moléculaires

Les effets postposés de la BMAA observés aux niveaux morphologique et comportemental pourraient avoir des conséquences désavantageuses à long terme sur la mobilité des individus et sur l'énergie allouée à leur reproduction. De tels effets à long terme impacteraient négativement le fitness des individus. L'épigénétique pourrait faire partie des mécanismes qui expliquent cet effet latent via le mécanisme de la plasticité phénotypique développementale. La stratégie de reproduction par autofécondation du *K. marmoratus* donne une opportunité de lier directement l'épigénétique à l'environnement chez les vertébrés. Le mécanisme épigénétique est alors considéré comme une source de flexibilité phénotypique et de plasticité développementale (Fellous et al., 2019 ; Mill et al., 2008). Il est important de noter que les influences épigénétiques durant l'embryogenèse et la période post-natale sont particulièrement importantes. Ce sont des périodes durant lesquelles les taux de synthèse d'ADN sont élevés et où l'épigénétique pourrait établir des marques.

Dans le cadre de ce mémoire, un pyroséquençage a été réalisé sur 5 régions de gènes spécifiques riches en CpG, à savoir, le promoteur de *DRD4*, le promoteur et l'exon 9 de *Gabrb2*, le promoteur de *RTN4*, et le promoteur de *Mao*. Ces séquences sont riches en sites CpG et propices à la méthylation. Leur rôle impliquerait des changements de l'expression des gènes, généralement négativement corrélée avec le taux de méthylation (Jaenisch & Bird, 2003). La caractérisation de la méthylation après une exposition à la BMAA permettrait de mieux décrire les mécanismes moléculaires sous-jacents de la BMAA chez le *K. marmoratus*. Les données récoltées par pyroséquençage sont des taux de méthylation de sites CpG, entre 5 et 13 pour chaque région. Par limitation de temps, ces taux de méthylation n'ont pas été mis en relation avec l'expression des gènes chez les individus. Pourtant, l'expression des gènes dans un organisme a des conséquences importantes sur son métabolisme, et n'est pas toujours corrélé négativement avec le taux de méthylation. L'expression de gènes après une exposition à la BMAA a été déterminée dans une étude précédente au sein de l'URBE (Article en révision dans *Neurotoxicology*, URBE). 9 échantillons sur 40 ont été utilisés pour ces manipulations moléculaires, de futures études

pourraient envisager d'utiliser un protocole ZR-Duet™ DNA/RNA<sup>9</sup> avec les échantillons restants. La méthode ZR-Duet™ permet une extraction rapide d'ADN et d'ARN à partir de faibles quantités de cellules et de tissus. Ce kit combine la détermination des taux de méthylation et l'expression de la séquence d'ADN de chaque échantillon (Lab Wholesale, 2017), ce qui permettrait l'acquisition d'informations moléculaires plus complètes.

Concernant les résultats, aucune différence significative de méthylation n'a été observée entre les traitements ni en fonction du stade de vie. Néanmoins, les conditions contrôles permettent d'avoir une idée de la méthylation basale de ces sites CpG.

### 3.1 *RTN4*

Le gène *RTN4* de la famille des réticulons code pour une protéine appelée Nogo (Neurite Outgrowth Inhibitor). Cette protéine est identifiée comme un inhibiteur des neurites spécifiques au système nerveux central (GrandPré et al., 2000). Elle joue un rôle dans le développement embryonnaire via sa localisation dans les membranes de certains organites cellulaires (Pinzon-Bolejua, 2014). La séquence de *RTN4* est homologue à celle des mammifères, bien que l'action inhibitrice de la protéine pourrait être moins importante chez les poissons car la séquence qui correspond à la protéine Nogo-A n'est pas complète chez l'espèce modèle *Danio rerio* (Diekmann et al., 2005).

Une étude au design expérimental similaire a mis en évidence une surexpression significative du gène pour le traitement le moins concentré en BMAA (A : 20 µg/l) et une sous-expression significative pour le traitement de BMAA le plus concentré (B : 15 mg/l) (Article en révision dans *Neurotoxicology, URBE*). Une surexpression de la protéine Nogo A a des effets neurotoxiques sur les cellules neuronales (lignée PC12) (Zhong et al., 2016), tandis que la diminution de l'expression de *RTN4* serait liée à une hyperexcitabilité via les circuits CA3 (Corne d'Ammon 3) de l'hippocampe (Berry et al., 2018 ; Somzen et al., 2016). Une diminution de l'expression de cette protéine pourrait également diminuer l'inhibition des neurites dans le système nerveux central, et donc indirectement stimuler la croissance des neurones (Somzen et al., 2016).

Selon les résultats de ce mémoire, la séquence spécifique du promoteur *RTN4* présente une méthylation proche de 0%, excepté pour le site CpG 4 avec environ 50% de méthylation. D'après Smith et al. en 2017, bien que certains sites soient globalement hypométhylés, certains CpG particuliers du génome peuvent être hyperméthylés de manière isolée. Généralement, cette hyperméthylation a pour effet de bloquer la transcription des gènes concernés, et affecte de cette manière des facteurs développementaux clés (Smith et al., 2017). Ce paysage épigénétique propre est fortement similaire à celui observé lors de la transition d'une cellule somatique en cellule cancéreuse (Smith et al., 2017). Cette piste doit toutefois

---

<sup>9</sup> Lab Wholesale, 2017

être vérifiée par une étude plus globale de la méthylation du gène *RTN4* car aucune conclusion solide sur la méthylation basale de ce gène ne peut actuellement être tirée uniquement sur base de la méthylation de ces 5 sites CpG.

Une région du promoteur (P1) montre des boîtes CG et CCAAT conservés sur les 500 premières paires de base en amont du site de transcription. Cette région semble responsable de sa régulation (Oertle et al., 2003). Cependant, aucune différence majeure de méthylation de cette région P1 n'a pu être détectée par cette étude, suggérant l'implication d'éléments silencieux dans sa régulation (Oertle et al., 2003).

### 3.2 *DRD4*

Pour rappel, *DRD4* code pour l'un des cinq récepteurs à la dopamine, le D4. Sa traduction est un récepteur qui, couplé à une protéine G, inhibe l'adénylyl cyclase. Cette inhibition influence ainsi l'action post-synaptique de la dopamine (Neve et al., 2004).

Après une exposition à la BMAA durant le développement précoce (15mg/l durant 14j), une diminution significative de l'expression du gène comparé au contrôle a été observée chez les adultes (Article en révision dans *Neurotoxicology*, URBE). La sous-expression du gène *DRD4*, liée à une activité hypodopaminergique, contribuerait aux symptômes de l'ADHD, *i.e.* un comportement d'excitation, d'exploration et d'impulsivité (LaHoste, 1996 ; Faraone et al., 2007). Des mutations et des dysfonctions liées à l'épigénétique dans le gène *DRD4* pourrait aussi déclencher un trouble de l'hyperactivité (LaHoste et al., 1996 ; Munafò et al., 2008 ; Thapar et al., 2007 ; Wu et al., 2012). Cette hyperactivité pourrait être héritable (Wu et al., 2012). D'autres influences liées au gène *DRD4* sur le comportement ont également été présentés dans la littérature, comme l'exploration et la peur chez les *great tits* (Fidler et al., 2007 ; Timm et al., 2015 ; Verhulst et al. 2016), la schizophrénie et la maladie de Parkinson chez *Homo sapiens* (Ptáček et al., 2013). De plus, les gènes impliqués dans le système dopaminergique, comme les récepteurs *DRD4* et *DRD5* et des transporteurs de dopamine, sont susceptibles d'être lié à l'ADHD (Attention deficit hyperactivity disorder) après une exposition à une substance chimique durant le développement (Grova et al., 2019). Chez les rongeurs, une perte de cellules dopaminergiques après une exposition à des polluants organiques (Grova et al., 2019) ainsi qu'une accélération de l'ostéogenèse conduisant à une perte de masse osseuse à une exposition à la MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ont été observées (Handa et al., 2019). Les expositions à des toxines durant le développement semblent donc influencer le système dopaminergique.

Concernant la méthylation, l'hypothèse est que les gènes liés au système dopaminergique montrent plutôt des hauts taux de méthylation, stable dans le temps, et potentiellement sans hérabilité (Wong et a., 2010). Cette hypothèse est appuyée par les résultats du pyroséquençage qui ont permis de visualiser une méthylation proche des 90% sur une séquence riche en sites CpG, et pour quatre sites sur cinq CpG de cet exon. Néanmoins, ce résultat est à généraliser avec prudence car les CpG analysés ne sont pas réellement des indicateurs de la méthylation moyenne de l'exon, et seulement un indicateur de

méthylation de la région riche en CpG présente sur l'exon 3 de *DRD4*. Des études ont montré que la méthylation du *DRD4* est associée à une transcription plus faible du récepteur D4 (Dadds, 2016).

Suite à une PCR apparemment non-fonctionnelle, le gène *DRD4* promoteur a été retiré pour la suite des manipulations moléculaires. Un site CpG sur cette région mérite toutefois une attention particulière. En effet, le promoteur contient un site crucial pour la régulation de l'expression du gène au CpG site 1 (Hamza et al., 2019). Ce CpG pourrait également jouer un rôle dans le développement de l'ADHD, avec une méthylation affectant négativement la transcription de *DRD4* (Hazam et al., 2019 ; Xu et al., 2015). Le *DRD4* est susceptible d'être lié à une autre maladie mentale, l'Alzheimer (Ji et al., 2016). Le taux de méthylations était significativement plus élevé pour quatre CpG dans le promoteur des patients atteints de la maladie de l'Alzheimer, corrélé positivement avec l'âge et le sexe masculin (Ji et al., 2016).

Plusieurs études suggèrent que cette modification épigénétique est influencée par les conditions environnementales. En 2016, Dadds et al. ont prélevé de la salive chez des patients et mis en évidence une méthylation plus élevée associée avec un trouble de l'hyperactivité plus élevé également (Dadds et al., 2016). Les résultats liés au trouble de l'attention et l'hyperactivité présentent des directions opposées en fonction de l'âge, avec de bas taux de méthylation pendant l'enfance précoce et de plus hauts taux de méthylation durant la fin de l'enfance (Dadds et al. 2016) Le mécanisme de méthylation du *DRD4* jouerait aussi un rôle dans les personnalités chez la mésange charbonnière (Verhulst et al., 2016). Cette même étude a mis en évidence une potentielle héritabilité du comportement exploratoire. Ce comportement serait lié à la méthylation d'îlots CpG, à cheval sur le site de départ de transcription et l'intron 1 du *DRD4* (Verhulst et al., 2016). Une autre étude a réalisé le séquençage de *DRD4* dans le but de déterminer le profil de méthylation de CpG et la distribution des CpG sur l'exon 3, suivi d'un pyroséquençage pour quantifier les niveaux de méthylation de chaque îlot CpG. Leurs résultats indiquent que pour tous les loci et tissus analysés, la méthylation était 1 à 4% plus élevée chez les oiseaux urbains que ceux vivant en forêt (Rivahi et al., 2015). Les conditions environnementales semblent donc influencer la méthylation de ce gène. D'autres séquences de ce gène sur le promoteur ou une autre zone de la séquence transcriptionnelle serait pertinente à analyser en vue de mieux cerner l'impact épigénétique de la BMAA sur le système dopaminergique.

### 3.3 *Mao*

Une étude avance que l'influence de la méthylation sur le promoteur de *Maoa* module la transcription du gène, sans la supprimer complètement (Pinsonneault et al., 2006). Une région de 10dpb (P2), environ 1500dph avant le TSS, pourrait fortement influencer la régulation de l'expression. P2 contient de nombreux CpG méthylés, qui semblent être influencés par le mécanisme de méthylation uniquement chez les femmes (Philibert et al., 2011). Cette région P2 a été associée à des comportements violents ou abusifs subis par les patients antérieurement (Philibert et al., 2011). Concernant le reste de sa séquence transcriptionnelle, une hypométhylation de l'exon 1 a diminué l'expression du gène *Maoa* (Melas et al., 2015).

Une sous-régulation de l'expression du gène a été observée après un stress environnemental précoce à la BMAA (15 mg/l, 14j) comparée au contrôle avec une diminution de 42%, et comparée à la condition A (20 µg/L) avec une diminution de 37% (Article en révision dans *Neurotoxicology*, URBE). *Mao* est une enzyme de dégradation de neurotransmetteurs tels que la sérotonine et la dopamine qui peut conduire à la synthèse de neuromélanine (Ziegler et al., 2016). La neuromélanine est un pigment principalement localisé dans les neurones catecholaminergiques (Haning & Achat-Mendes, 2017). Son rôle est d'extraire les métaboliques neurotoxiques induisant des maladies neurodégénératives grâce à sa capacité de séquestrer des ions de fer, de cuivre et potentiellement la molécule BMAA (Zucca et al., 2014). La séquestration de la BMAA dans ces pigments pourraient conduire à une altération de la capacité de la neuromélanine à capturer les ions de métaux lourds. La diminution de l'expression du de *Mao* dans le cerveau des *K. marmoratus* exposé (15mg/L de BMAA) pourrait être un signal de réduction intracellulaire de la dopamine due à une plus grande perméabilité de la membrane. La tendance d'une augmentation de l'expression de *Mao* à une faible dose en BMAA (20µg/L) pourrait consister en un mécanisme de réduction de la neurotoxicité via l'augmentation de la production de neuromélanine intracellulaire (Article en révision dans *Neurotoxicology*, URBE). La diminution de l'expression de *Mao* jouerait un rôle prépondérant dans les comportements d'agressivité chez les souris (Scott et al., 2008) et des humains (Beaver et al., 2012 ; Guo et al., 2008, 2008b). L'expression de ce gène serait aussi lié à l'ADHD (trouble de l'attention et de l'hyperactivité) (Gupta et al.,2015).

### 3.4 *Gabrb2*

*Gabrb2*, *Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2*, code pour une sous-unité d'un récepteur à canaux chlorure. Ce récepteur contrôle les transmissions synaptiques rapides dans le système nerveux central (Russek & Farb, 1994). Une dysfonction de l'excitabilité neuronale peut impacter le système nerveux des organismes. Oyelami et al. (2016) ont observe une diminution de l'expression de différents gènes GABA, comme *Gabra1*, 3, 4, 5, *Gabrb2*, 3, et *Gabrg2*, chez des souris affectées par un définition fonctionnel et transcriptionnel des transmissions GABAergic dans le cortex préfrontal (Kim et al., 2017). Hypothétiquement, son expression pourrait varier en présence de BMAA, une neurotoxine qui excite et endommage les récepteurs synaptiques.

Chez le poisson zèbre, l'expression de *Gabrb2* est associée à la méthylation de sa séquence (Wang et al., 2016). Cette même étude avance que les poissons qui présentent une méthylation accrue de *Gabrb2* montrent un comportement exploratoire anormal ainsi que des déficits cognitifs et sociaux (Wang et al., 2016). D'après une autre étude récente, l'expression de ce gène varie selon le développement, le génotype et l'état de santé du patient (Zong et al., 2017). De plus, une augmentation de la méthylation globale et une diminution de la méthylation dans le promoteur a été corrélée aux symptômes de schizophrénie (Wang et al., 2016). Malgré l'absence de différence entre traitements dans les résultats,

la régulation épigénétique aurait un rôle dans l'expression de *Gabrb2* et serait impliquée dans des réponses comportementales (Zong et al., 2017 ; Wang et al., 2016).

Globalement, les taux de méthylation des sites CpG du promoteur de ce gène sont supérieurs à 70%, et ne descendent pas en-dessous de 40% dans la séquence de l'exon 9. Sur base de l'hypothèse de Wang et al., cette séquence spécifique du promoteur *Gabrb2* serait donc plus exprimée que celle de l'exon 9. Deux séquences associées à la schizophrénie (rs6556547 et rs1816071) sont présentes sur l'exon 9 de *Gabrb2*, suggérant un éventuel impact de la méthylation des sites CpG de ce gène sur les risques de développer la schizophrénie (Pun et al., 2011). La séquence *Gabrb2* présente 77,8% d'identité avec *Gabrb1* et 79,9% avec *Gabrb2*, reflétant une grande homologie des sous-unités du récepteurs acide gamma-aminobutyrique. Dû à cette conservation évolutive importante, les changements de taux de méthylation pourraient avoir des impacts semblables au niveau fonctionnel (Srivastava al., 2014).

Pour l'ensemble des 4 gènes sélectionnés, la variabilité est généralement très petite dans les sites CpG extrêmement hyper-méthylés (>90%). L'hyperméthylation pourrait fortement encombrer la séquence d'ADN et la rendre difficile d'accès aux enzymes déméthylases et aux facteurs de transcription. Cet encombrement diminuerait la variabilité de méthylation possible sur les sites CpG, ce qui signifie que les sites méthylés entre 0 et 90% CpG seraient plus accessibles pour des modifications post-traductionnelles, donc plus susceptibles de varier individuellement. La variation élevée de taux de méthylation de certains sites CpG pourrait engendrer diverses réponses au niveau métabolique, physiologie et phénotypique entre les individus.

Compte tenu de l'absence de différence significative des taux méthylation entre les traitements, d'autres mécanismes épigénétiques sont envisagés. Par exemple, la compaction de la chromatine par les acétylations, méthylations et phosphorylations des histones sont des modifications connues pour leur association avec les facteurs de transcription et les protéines de liaison au méthyle (meCP2) (Jenuwein & Allis, 2001). Ces protéines meCP2 se lient spécifiquement aux cytosines méthylées, ce qui sollicite les déacétylases qui hypo-acétylent les histones (Jones et al., 1998). Il a aussi été démontré que les ARN interférants (siRNA) peuvent supprimer l'activité de gènes spécifiques (Hamilton et al., 2002 ; Vandegehuchte & Janssen, 2011). Ces mécanismes, en plus de la méthylation, ne seraient pas exclusifs et pourraient interagir de façons nombreuses et différentes (Mills et al., 2008). Il est aussi possible que ces gènes ne voient pas leur expression changer après une exposition à la BMAA. Dans ce cas, d'autres gènes pourraient être intéressants à étudier, le gène *Gria2* (ionotropic glutamate receptor 2), un récepteur de neurotransmetteurs excitateurs AMPA activé par le glutamate (Sun et al., 1992). Ou encore, les  $\alpha$ -*PCDH* (protocadhérines) qui ont un rôle crucial pour le développement et les connexions synaptiques (El Hajj et al., 2017) et dont l'expression serait régulée en partie par l'hyper ou l'hypo-méthylation du promoteur (Hirabayashi & Yagi, 2014).

De manière générale, il est approuvé que la méthylation du promoteur réprime la transcription du gène. En effet, les îlots de 5-methylcytosines encombrant ou inhibent l'accès à des facteurs de transcription, ce qui entraîne souvent une sous-expression de ces gènes (Hofmann, 2017). Des études suggèrent que la méthylation sur la partie transcriptionnelle du gène, par opposition à la zone promotrice, corrèle souvent avec une augmentation de l'expression génique (Vandegheuchte & Janssen, 2011). Cependant, Brenet et al. avancent l'hypothèse que la méthylation des premiers exons d'un gène induit également une diminution de l'expression d'un gène (Brenet et al., 2011). En outre, les changements de méthylation spécifique aux tissus apparaîtraient généralement dans les régions riches en CpG, mais pas forcément sur les îlots CpG (Brenet et al., 2011). Ces tentatives de caractérisation des mécanismes de méthylation des gènes reflètent la complexité, la spécificité et la dynamique de l'épigénétique.

Comme mentionné en introduction de ce point, les stress environnementaux durant la période précoce du développement sont susceptibles d'avoir un effet à long terme, via des processus tels que la méthylation de l'ADN (Mill et al., 2008). Les influences épigénétiques durant l'embryogenèse et la période post-natale sont particulièrement importantes. Ce sont des périodes durant lesquelles les taux de synthèse d'ADN sont élevés et où l'épigénétique pourrait établir des marques. Toutefois, les reprogrammations de méthylation durant l'embryogenèse et la période post-natale pourraient aider à surmonter des stress environnementaux et permettre des réponses diverses malgré une très faible variabilité génétique (James et al., 2018). Ce mécanisme est connu chez les mammifères, mais aussi chez les plantes et les poissons (Fellous et al., 2018 ; Feng et al., 2010 ; James et al., 2018 ; Lie, 2002 ; Potok et al., 2013). Ce processus est essentiel pour le développement neuronal des animaux puisqu'il régule l'expression des gènes neuronaux spécifiques à cette période de développement, mais il peut aussi représenter une période de vulnérabilité en cas de stress environnemental. En conséquence, une exposition embryonnaire à des neurotoxines pourrait mener à un établissement d'une plasticité développementale via des marques épigénétiques irréversibles. En 2018, Fellous et al. ont étudié la méthylation globale des sites CpG du génotype du *K. marmoratus* par la méthode Luminometric (LUMA), et ont analysé l'expression des ARNm d'enzymes associées à la méthylation durant le développement dans différents tissus (Fellous et al., 2018). Ils ont démontré une nette diminution de la méthylation juste après la fécondation (15.8% au stade gastrula), suivie d'un rétablissement de la méthylation stable d'environ 70%, après 100 heures jusqu'à 20 dph. Ce phénomène semble plus long, plus profond et plus tardif comparé à celle du *zebrafish*, où la méthylation globale descend à 55% pour atteindre une méthylation de 90% après seulement 3 heures (Fellous et al., 2018). Cette hypothèse prend du sens lorsqu'on replace le rivulus dans son contexte d'habitat naturel. En effet, les mangroves sont des habitats soumis à des conditions naturelles très variables. Ce modèle est alors susceptible d'avoir une haute capacité à résister naturellement au stress environnemental durant le développement embryonnaire. Une hypothèse basée sur le « *general purpose genotype* » avance que les lignées isogéniques permettraient de sélectionner des individus généralistes et plus flexibles dans leurs réponses phénotypiques (Massicotte & Angers, 2012 ; Fellous et al., 2018).

La stabilisation de la méthylation globale jusqu'à 20 jours post-éclosion chez le *K. marmoratus* pourrait permettre l'instauration de marques épigénétiques sur l'épigénome après l'éclosion. Cette stabilisation pourrait contribuer à l'effet d'une plasticité développementale maintenue sur l'épigénome du rivulus lors d'une exposition à un stress post-natal. Ces marques épigénétiques pourraient impliquer des effets à long terme sur le comportement et l'expression de gènes chez le *K. marmoratus*. Cela refléterait une grande plasticité phénotypique au sein des individus d'une même lignée. Mieux cerner la relation entre la variabilité des gènes et les marques épigénétiques est nécessaire si l'on veut mieux comprendre l'implication des mécanismes moléculaires modulant les adaptations phénotypiques du modèle *K. marmoratus*.

## Partie V : Conclusion et perspectives

Les résultats des traits de croissance indiquent que la BMAA induit une baisse de poids et de taille des individus exposés jusqu'à l'âge de 70 jours (70 dph) aux conditions A (20 µg/L) et B (15 mg/L), ce qui n'a pas été observé chez des individus adultes (170 dph) dans une étude précédente au sein de l'URBE. Si les individus sont capables de compenser cette perte de croissance durant le stade adulte, cela signifie que l'énergie dépensée pour la compensation n'est pas allouée à la reproduction, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur le *fitness* de l'individu. Une perte de croissance peut également influencer la morphologie du poisson et donc impacter sa survie en milieu naturel durant le stade juvénile. La plasticité développementale par méthylation induite par la BMAA sur le *Kryptolebias marmoratus* n'a pas été démontrée dans le cadre de cette étude. La BMAA a néanmoins eu un impact négatif sur les traits d'histoire de vie avec des effets immédiats et postposés jusqu'au stade juvénile.

Au niveau comportemental, les données présentent une grande variabilité au sein des conditions. Les tests comportementaux n'ont pas révélé d'effet immédiat de la BMAA. En revanche, les individus juvéniles exposés à la BMAA ont tendance à parcourir plus de distance et se déplacent plus rapidement que les larves. Cette augmentation d'activité peut être mise en relation avec le comportement d'hyperactivité induit par la neurotoxine BMAA. La capacité d'accumulation de la BMAA dans les neurones pourrait en partie expliquer l'effet retardé sur le comportement, car cette accumulation permettrait à la molécule de rester présente et active dans l'organisme à long terme. Cet effet retardé pourrait aussi être lié à un *imprinting* épigénétique durant le développement, qui n'a pas été prouvé via la méthylation de gènes spécifiques dans le cadre de ce mémoire. La détermination de la concentration en BMAA dans les cerveaux des juvéniles et d'adultes pourrait apporter une indication de sa présence et son activité sur le système nerveux des individus à long terme.

Concernant les résultats de méthylation, aucune différence entre les traitements ni entre les stades de vie n'a été observée. Cependant, la grande variabilité de méthylation de certains sites CpG pourrait refléter une diversité de taux de méthylation entre les individus. Cela pourrait induire une plus grande flexibilité de réponse phénotypique au sein de cette lignée de *K. marmoratus*. Il est possible que d'autres mécanismes épigénétiques soient impliqués dans la variabilité phénotypique en plus de la méthylation de gènes, comme le *silencing* par ARN interférants (siRNA) et la modification de la structure des histones par ajout ou retrait de groupements méthyles et acétyles. D'autres gènes pourraient être impliqués dans les mécanismes moléculaires sous-jacents de la BMAA, comme les récepteurs activés par le glutamate tel que *Gria2*, et les  $\alpha$ -PCDH (protocadhérines) qui ont un rôle crucial pour le développement et les connexions synaptiques. Une visualisation globale du méthylome pourrait mettre en évidence les gènes affectés par des changements de méthylation induits par un stress environnemental précoce. Pour cela, un *Whole genome Bisulfite sequencing* (WGNS) peut être réalisé sur le génome de la lignée DC4 de *K. marmoratus*. L'ADN est isolé et les bibliothèques générées à l'aide d'un kit *Accel-NGS Bisulfite DNA library kit* (Swift Biosciences). Les paramètres considérés dans l'analyse seraient la

distribution des méthylations sur le génome, les taux de méthylation globaux ainsi qu'au niveau des CGI, et les gènes affectés. Dans le cas où le séquençage du génome entier s'avère trop conséquent pour l'expérience, la technique RRBS (*Reduced representation bisulphite sequencing*) ou la technique LUMA (*Luminometric Methylation Assay*) (Karimi et al., 2006) sont à considérer.

Bien que la caractéristique neurotoxique de la BMAA ait été démontré de nombreuses fois, son implication dans les maladies neurodégénératives restent très débattue. Si la molécule est capable de se bioaccumuler dans l'organisme, et ce durant une longue période, les risques potentiels pour la santé humaine sont à considérer. Suite aux résultats de ce mémoire, il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur les actions moléculaires afin de clarifier les altérations possibles au long terme chez les animaux adultes aquatiques, mais également terrestres.

## Bibliographie

- Abdelraheem, N., Ahmed, M.M.M., Hou, F. (2019). Effect of Feed Restriction on Broiler Chicks Prior to Slaughter. *Open Journal of Animal Sciences*. 09(01), 12–22.
- Abe, Y. (2016). A Possibility that a Deficiency in Dietary Fiber Causes Depression. *International Journal of Health Sciences (IJHS)*. 4(2), 2372–5079.
- Abel, D.C., Koenig, C.C., Davis, W.P. (1987). Emersion in the mangrove forest fish *Rivulus marmoratus*: a unique response to hydrogen sulphide. *Environmental Biology of Fishes*. 18, 67–72.
- Agrawal, A.A. (2001). Ecology: Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Sciences*. 294(5541), 321–326.
- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*. 4(2), 147–190.
- Allis, C.D. & Jenuwein T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*. 17, 487–500.
- Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D. D. (2014). Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins*. 6(2), 488–508.
- Alsayyah, A., ElMazoudy, R., Al-Namshan, M., Al-Jafary, M., Alaqeel, N. (2019). Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 182.
- Altmann, J. (1974). *Observational Study of Behavior: Sampling Methods*. Behaviour. 49(3), 39.
- Ando, M., Saito, Y., Xu, G., Bui, N. Q., Medetgul-Ernar, K., Pu, M., Fisch, K., Ren, S., Sakai, A., Fukusumi, T., Liu, C., Haft, S., Pang, J., Mark, A., Gaykalova, D. A., Guo, T., Favorov, A.V., Yegnasubramanian, S., Fertig, E. J., Ha, P., Tamayo, P., Yamasoba, T., Ideker, T., Messer, K., Califano, J. A. (2019). Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nature Communications*. 10(1).
- Atchison, G.J., Henry, M.G., Sandhereinrich, M.B. (1987). Effects of metals on fish behaviour: a review. *Environmental Biology of Fishes*. 18, 11–25.
- Banack, S.A. & Cox, P.A. (2003). Biomagnification of Cycad Neurotoxins in Flying Foxes. *Neurology*. 61(3), 387–89.
- Banack, S.A. & Murch., S.J. (2018). Methods for the Chemical Analysis of  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine: What Is Known and What Remains to Be Determined. *Neurotoxicity Research*. 33(1), 184–91.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 21(3), 381–395.

- Bayen, S., Wurl, O., Karuppiyah, S., Sivasothi, N., Lee, H. K., Obbard, J.P. (2005). Persistent organic pollutants in mangrove food webs in Singapore. *Chemosphere*. 61, 303–313.
- Beaver, K.M., Wright, J.P., Boutwell, B.B., Barnes, J.C., DeLisi, M., & Vaughn, M.G. (2013). Exploring the association between the 2-repeat allele of the MAOA gene promoter polymorphism and psychopathic personality traits, arrests, incarceration, and lifetime antisocial behavior. *Personality and Individual Differences*. 54(2), 164–168.
- Bell, A.M. (2001). Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*. 62, 775-780.
- Belzung, C. & Philippot, P. (2007). Anxiety from a phylogenetic perspective: is there a qualitative difference between human and animal anxiety? *Neural Plasticity*. 59676, 18.
- Berbel-Filho, W. M., Rodríguez-Barreto, D., Berry, N., Garcia De Leaniz, C., Consuegra, S. (2019). Contrasting DNA methylation responses of inbred fish lines to different rearing environments. *Epigenetics*. 14(10), 939–948.
- Bernard C., PhD. (2002). MTH 2301- Méthodes statistiques - Maîtrise statistique des processus : SPC.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 16, 6-21.
- Bishop, S. L., Kerkovius, J.K., Menard, F., Murch, S.J. (2018). N-β-Methylamino-L-Alanine and Its Naturally Occurring Isomers in Cyanobacterial Blooms in Lake Winnipeg, Neurotoxicity Research. 33(1), 133-142.
- Blanchard, T. S., Whitehead A., Yunwei, W. Dong, Patricia, A. Wright. (2018). Phenotypic Flexibility in Respiratory Traits Is Associated with Improved Aerial Respiration in an Amphibious Fish out of Water. *The Journal of Experimental Biology*. 222(2), 11.
- Blaser, R.E., Chadwick, L., McGinnis, G.C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behaviour Brain Research*. 208, 56–62.
- Bogdanović, O. & Veenstra, G.J.C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 118(5), 549–565.
- Bossdorf, O., Richards, C.L., Pigliucci, M. (2008). Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*. 11(2), 106–115.
- Botana, L.M. & Alfonso A. (2015). *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Second Edition. 227-228.
- Bouwmeester, M.C., Ruiter, S., Lommelaars, T., Sippel, J., Hodemaekers, H.M., Van den Brandhof, E-J., Pennings, J.L.A., Kamstra, J.H., Jelinek, J., Issa, J-PJ., Legler, J., Van der Ven, L.T.M. (2016). Zebrafish embryos as a screen for DNA methylation modifications after compound exposure. *Toxicology Application Pharmacology*. 291, 84–96.
- Bradley, W.G. & Mash, D.C. (2009). Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 10(Suppl 2), 7–20.

- Bradley, W.G. (2015). The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre in the University of Newcastle and the BMAA theory of motor neuron disease. *Neuromuscular Disorders*. 2(s2), S77–S81.
- Bradley, W.G., Borenstein, A.R., Nelson, L.M., Codd G. A., Rosen B.H., Stommel E.W., Cox A. P. (2013). Is exposure to cyanobacteria an environmental risk factor for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases? *Amyotrophic Lateral Sclerosis Frontotemporal Degeneration*. 14(5-6), 325-33.
- Brand, L. E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D. C. (2010). Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. *Harmful Algae*. 9(6), 620–635.
- Brand, L.E. & Compton, A. (2007). Long-term increase in *Karenia brevis* abundance along the Southwest Florida Coast. *Harmful Algae*. 6, 232–252.
- Brander, S. M., Biales, A. D., Connon, R. E. (2017). The Role of Epigenomics in Aquatic Toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(10), 2565–2573.
- Brown, A. E., & de Bivort, B. (2017). The study of animal behaviour as a physical science. *BioRxiv*. 220855.
- Buske, C. & Gerlai, R. (2012). Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. *Developmental Psychobiology*. 54(1), 28–35.
- Caller T.A., Doolin, J.W., Haney, J.F., Murby, A.J., West, K.G., Farrar, H.E., Ball, A., Harris, B.T., Stommel, E.W. (2009) A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: a possible role for toxic cyanobacteria blooms. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 10(Suppl.2), 101-8.
- Caller, T., Henegan, P., Stommel, E. (2018). The Potential Role of BMAA in Neurodegeneration. *Neurotoxicity Research*. 33(1), 222–26.
- Capellan, E., Nicieza, A. (2007) Non-equivalence of growth arrest induced by predation risk or food limitation: context-dependent compensatory growth in anuran tadpoles. *Animals Ecology*. 76, 1026–1035.
- Carion, A., Hétru J., Markey A., Suarez-Ulloa V., Silvestre F. 2018. Behavioral Effects of the Neurotoxin -N-Methylamino- L-Alanine on the Mangrove Rivulus (*Kryptolebias Marmoratus*) Larvae. *Journal of Xenobiotics*. 8(1), 7820.
- Carmichael, W.W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: The CyanoHABs. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 7(5), 1393–1407.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C., de Kloet, R.E., Richardson, M.K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behaviour Brain Research*. 214, 332–42.
- Charlesworth, D. & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*. 10(11), 783–796.

- Chatterjee, N., Choi, S., Kwon, O. K., Lee, S., Choi, J. (2019). Multi-generational impacts of organic contaminated stream water on *Daphnia magna*: A combined proteomics, epigenetics and ecotoxicity approach. *Environmental Pollution*. 249, 217–224.
- ChemIDplus. (2019). N-Methylamino-L-Alanine - Similar Structures Search, Synonyms, Formulas, Resource Links, and Other Chemical Information. Retrieved April 4, 2019 (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0015920931>).
- Chernoff, N., Hill, D.J., Diggs, D.L., Faison, B.D., Francis, B.M., Lang, J.R., Larue, M.M., Le, T.T., Loftin, K.A., Lugo, J.N., Schmid, J.E., Winnik, W.M. (2017). A critical review of the postulated role of the non-essential amino acid, beta-N-methylamino-l-alanine, in neurodegenerative disease in humans. *Toxicology Environmental Health: Part B Critical Review*. 20(4),1–47.
- Chiu, A. S., Gehringer, M. M., Welch, J. H., Neilan, B. A. (2011). Does  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(9), 3728–3746.
- Chivers, D.P., Smith, R.J.F. (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator–prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience*. 5, 338–352.
- Chollett, D., Perez, K.E., King-Heiden, T.C., 2014. Embryonic exposure to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs prey capture by zebrafish larvae. *Environment Toxicology Chemistry*. 33, 784e790.
- Cianca, R.C., Baptista M.S., Lopes, V.R., Vasconcelos, V.M. (2012). The non-protein amino acid beta-N-methylamino-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates *Amino Acids*. 42, 2473-2479.
- Cohen, S.A. (2012). Analytical techniques for the detection of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid. *Analyst*. 137(9), 1991–2005.
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology*. 307, 35–41.
- Conrad, J.L., Weinersmith, K.L., Brodin, T., Saltz, J.B., Sih, A. (2011). Behavioural syndromes in fishes: A review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology*. 78(2), 395–435.
- Correia, D., Almeida, A. R., Santos, J., Machado, A. L., Koba Uzun, O., Žlábek, V., Oliveira, M., Domingues, I. (2019). Behavioral effects in adult zebrafish after developmental exposure to carbaryl. *Chemosphere*. 235, 1022–1029.
- Costa, W.J.E.M. (2011). Identity of *Rivulus ocellatus* and new name for a hermaphroditic species of Kryptolebia from south-eastern Brazil (Cyprinodontiformes: *Rivulidae*). *Ichthyological Exploration Freshwaters*. 22, 185-192.
- Cox, P.A. & Sacks, O.W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology*. 58, 956-959.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 5074-5078, 23.

- Cucchiaroni, M.L., Viscomi, M.T., Bernardi, G., Molinari, M., Guatteo, E., Mercuri, N.B. (2010). Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative {beta}-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *Neurosciences*. 30, 5176-5188.
- Cuénot L. & Tétry A. (1951). *L'Evolution Biologique : Les Faits, Les Incertitudes*. Paris: Masson et Cie. 114(2960), 592.
- D. M. Orcutt & Erik T. Nilsen (2000). *The Physiology of Plants Under Stress: Soil and biotic factors*. John Wiley and Sons. 277–278.
- Dadds, M. R., Schollar-Root, O., Lenroot, R., Moul, C., Hawes, D. J. (2016). Epigenetic regulation of the DRD4 gene and dimensions of attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 25(10), 1081–1089.
- Davis, W.P., Taylor, D.S., Turner, B.J. (1990). Field observations on the ecology and habits of the mangrove rivulus (*Rivulus marmoratus*) in Belize and Florida. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 1, 123– 134.
- de Abreu, M. S., Genario, R., Giacomini, A. C. V. V., Demin, K. A., Lakstygai, A. M., Amstislavskaya, T. G., Fontana, B.D., Parker, M.O., Kalueff, A. V. (2019). Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience*.
- De Almeida, R. M. M., Ferrari, P. F., Parmigiani, S., & Miczek, K. A. (2005). Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*. 526(1–3), 51–64.
- De Munck E., Munoz-Saez E., Miguel B.G., Solas M.T., Martinez A., Arahuetes. R.M. (2015) Morphometric and neurochemical alterations found in L-BMAA treated rats. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 39(3), 1232-45.
- De Munck E., Muñoz-Sáez E., Miguel B.G., Solas, M.T., Ojeda, I., Martinez, A., Carmen, G., Arahuetes, R.M. (2013).  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 36(2), 243-255.
- Deans, C. & Maggert, K.A. (2015). What do you mean, “Epigenetic”? *Genetic*. 199(4), 775-792.
- Decourten, B. M., & Brander, S. M. (2017). Combined effects of increased temperature and endocrine disrupting pollutants on sex determination, survival, and development across generations. *Scientific Reports*, 7(1).
- Diekmann, H., Klinger, M., Oertle, T., Heinz, D., Pogoda, H. M., Schwab, M. E., Stuermer, C. A. O. (2005). Analysis of the reticulon gene family demonstrates the absence of the neurite growth inhibitor Nogo-A in fish. *Molecular Biology and Evolution*. 22(8), 1635–1648.
- Domingues, I., Oliveira, R., Soares, A.M.V.M., Amorim, M.J.B. (2016). Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. *Ecotoxicology* 25, 49-499.

- Donato, J.D., Kauffman, J.B., Murdiarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., Kanninen, M. (2011). Mangroves among the Most Carbon-Rich Forests in the Tropics. *Nature Geoscience*. Vol. 4, 293-297.
- Dong, X. X., Wang, Y., Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 30(4), 379–387.
- Downing, S., Banack, S.A., Metcalf, J.S., Cox, P.A., Downing, T.G. (2011). Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon*. 58(2), 187–194.
- Dunlop, R.A., Brunk, U.T., Rodgers, K.J. (2011). Proteins containing oxidized amino acids induce apoptosis in human monocytes. *Biochemistry*. 435(1), 207-16.
- Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J. (2013). The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One*. 8(9), e75376.
- Earley, R.L., Hanninen, A.F., Fuller, A., Garcia, M.J., Lee, E.A. (2012). Phenotypic plasticity and integration in the mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*): a prospectus. *Integrative and Comparative Biology*. 52(6), 814–827.
- Eisenberg, E. & Levanon, E.Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*. 29, 569–574.
- El Hajj, N., Dittrich, M., Haaf, T. (2017). Epigenetic dysregulation of protocadherins in human disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. 89, 172-182.
- Ellison, A., Rodríguez López, C. M., Moran, P., Breen, J., Swain, M., Megias, M., Hegarty, M., Wilkinson, M., Pawluk, R., Consuegra, S. (2015). Epigenetic regulation of sex ratios may explain natural variation in self-fertilization rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282(1819), 20151900.
- Esterhuizen, M. & Downing, T.G. (2008). Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 71, 309-313.
- Faassen, E. J. (2016). The neurotoxin BMAA in aquatic systems. The Netherlands Research School for the Socio-Economic and Natural Sciences of the Environment (SENSE).
- Fagiolini, M., Jensen, C.L., Champagne, F.A. (2009). Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 19(2), 207–212.
- Failler, P., Pètre, E., Maréchal, J-P. (2011). Valeur Économique Totale Des Récifs Coralliens, Mangroves et Herbiers de La Martinique - Total Economic Value of Coral Reefs, Mangroves and Seagrass of Martinique. *Études Caraïbéennes*. (15).
- Faraone, S.V., Doyle, A.E., Mick, E., Biederman, J. (2001). Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Psychiatry*. 158(7), 1052–1057.

- Farmer, J.L. & Orlando, E.F. (2012). Creating females? Developmental effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the mangrove rivulus' ovotestis. *Integrative and Comparative Biology*. 52, 769–780.
- Fellous, A., Labeled-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A.S., Earley, R.L., Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecology and Evolution*. 8(12), 6016–6033.
- Feng, S., Jacobsen, S.E., Reik, W. (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*. 330, 622–627, 58.
- Ferrari, M.C., Wisenden, B.D., Chivers, D.P. (2010) Chemical ecology of predator–prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*. 88, 698–724.
- Fidler, A. E., Van Oers, K., Drent, P. J., Kuhn, S., Mueller, J. C., Kempenaers B. (2007). *Drd4* gene polymorphisms are associated with personality variation in a passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274, 1685–1691.
- Field, N. C., Metcalf, J.S., Caller, T.A., Banack, S.A., Cox, P.A, Elijah, W. S. (2013). Linking  $\beta$ -Methylamino-l-Alanine Exposure to Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis in Annapolis, MD. *Toxicol*. 70,179–83.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.-H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 447(7141), 178–182.
- Foret, S., Kucharski, R., Pittelkow, Y., Lockett, G., Maleszka, R. (2009) Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics*. 10(1), 472.
- Frommen, J.G., Herder, F., Engqvist, L., Mehlis, M., Bakker, T.C.M., Schwarzer, J., Thünken, T. (2011) Costly plastic morphological responses to predator specific odour cues in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolution Ecology*. 25, 641–656.
- Frøyset, A.K., Khan, E.A., Fladmark, K.E. (2016). Quantitative proteomics analysis of zebrafish exposed to sub-lethal dosages of  $\beta$ -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Scientific Reports*. 6(29631).
- Fusco, G. & Mineli, A. (2010). Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Philosophical Transactions of The Royal Society*. 365, 547–556.
- Garcia, M. J. (2015). From genotypes to populations: examining phenotypic variation in the mangrove rivulus fish (*Kryptolebias marmoratus*) across multiple scales. PhD Proposal.
- Gavery, M.R. & Roberts, S.B. (2017). Epigenetic considerations in aquaculture. *PeerJ*. 5, e4147.
- Gerrard, D. E. & Grant, A. L. (2002). *Principles of Animal Growth and Development*. Kendall Hunt. 204–208.
- Ghazali, I., Saqrane, S., Carvalho, A., Ouahid, Y., Oudra, B., Fernandez Del Campo, F., Vasconcelos, V. (2009). Compensatory Growth Induced in Zebrafish Larvae after Pre-Exposure to a *Microcystis aeruginosa* Natural Bloom Extract Containing Microcystins. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(1), 133–146.

- Ghosh, S., Yates, A.J., Frühwald, M.C., Miecznikowski, J.C., Plass, C., Smiraglia, D. (2010). Tissue specific DNA methylation of CpG islands in normal human adult somatic tissues distinguishes neural from non-neural tissues. *Epigenetics*. 5(6), 527–538.
- Gibb, A., Ferry-Graham, L.A., L. Hernandez P., Romansco R., Blanton, J. (2008). Functional Significance of Intramandibular Bending in *Poeciliid* Fishes. *Environmental Biology of Fishes*. 83(4), 473–85.
- Gillis, M. K. & Walsh, M. R. (2019). Individual variation in plasticity dulls transgenerational responses to stress. *Functional Ecology*. 33(10), 1993–2002.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N. (2011). Status and Distribution of Mangrove Forests of the World Using Earth Observation Satellite Data. *Global Ecology and Biogeography*. 20(1), 154–59.
- Greenberg, M. V. C., & Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. 20(10), 590-607.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C., Shih, J.C. (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(9), 3637–41.
- Grova, N., Schroeder, H., Olivier, J. L., Turner, J. D. (2019). Epigenetic and neurological impairments associated with early life exposure to persistent organic pollutants. *International Journal of Genomics*. 2085496, 19.
- Guo, G., Ou, X.M., Roettger, M., Shih, J.C. (2008). The VNTR 2 repeat in *MAOA* and delinquent behavior in adolescence and young adulthood: associations and *MAOA* promoter activity. *European Journal of Human Genetics*. 16(5), 626–34.
- Guo, G., Roettger, M., Shih, J.C. (2008b). The integration of genetic propensities into social-control models of delinquency and violence among male youths. *American Sociological Review*. 73(4): 543–568.
- Gupta, V., Khan, A.A., Sasi, B.K., Mahapatra, N.R. (2015). Molecular mechanism of monoamine oxidase A gene regulation under inflammation and ischemia-like conditions: key roles of the transcription factors *GATA2*, *Sp1* and *TBP*. *Journal of Neurochemistry*. 134(1), 21–38.
- Haining, R.L., Achat-Mendes, C., 2017. Neuromelanin, one of the most overlooked Molecules in modern medicine, is not a spectator. *Neural Regeneration Research*. 12, 372–375.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*. 21, 4671–4679.
- Hamza, M., Halayem, S., Bourgou, S., Daoud, M., Charfi, F., & Belhadj, A. (2019). Epigenetics and ADHD: Toward an Integrative Approach of the Disorder Pathogenesis. *Attention Disorders*. 23(7), 655–664.

- Handa, K., Kiyohara, S., Yamakawa, T., Ishikawa, K., Hosonuma, M., Sakai, N., Negishi-Koga, T. (2019). Bone loss caused by dopaminergic degeneration and levodopa treatment in Parkinson's disease model mice. *Scientific Reports*. 9(1), 13768.
- Hansen, J.A., Woodward, D.F., Little, E.E, DeLonay, A.J., Bergam, H.L. (1999). Behavioural avoidance: possible mechanism for explaining abundance and distribution of trout species in a metal-impacted river. *Environmental Toxicology Chemistry*. 18, 313-317.
- Hara, T.J. (2006). Feeding behaviour in some teleost is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *The Journal of Fish Biology*. 68, 810-825.
- Harrington, R.W., Jr. (1961). Oviparous hermaphroditic fish with internal self-fertilization. *Science*. 134, 1749–1750.
- Harrington, R.W., Jr. (1971). How Ecological and Genetic Factors Interact to Determine When Self-Fertilizing Hermaphrodites of *Rivulus marmoratus* Change into Functional Secondary Males, with a Reappraisal of the Modes of Intersexuality among Fishes. *Copeia*. (3), 389.
- Harrington, R.W., Jr. (1975). Sex determination and differentiation among uniparental homozygotes of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontidae, Atheriniformes). In *Intersexuality in the Animal Kingdom*. 249– 262
- Head, J.A. (2014). Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective. In: *Integrative and Comparative Biology*. Oxford University Press. 77-86.
- Head, J.A., Dolinoy, D.C., Basu, N. (2012). Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(2), 221–227.
- Hebebrand J, & Klug, B. (1995). Specification of the phenotype required for men with monoamine oxidase type A deficiency. *Human Genetics*. 96(3), 372–6.
- Hergeth, S.P. & Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Reports*. 16(11), 1439–1453.
- Hirabayashi, T. & Yagi, T. (2014). Protocadherins in neurological diseases. *Advances in Neurobiology*. 8, 293-314.
- Hoagland P. & Scatista S. (2006). The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In: *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg. 391-402.
- Hofmann G.E. (2017). Ecological epigenetics in marine metazoans. *Frontiers in Marine Science*. 4, 10.
- Hollert, H., Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*. 29(7), 1321–1330.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*. 1, 76-80.
- Hong, J., Wang, X., Mei, C., Zan, L. (2019). Competitive regulation by transcription factors and DNA methylation in the bovine *SIRT5* promoter: Roles of E2F4 and KLF6. *Gene*. 684, 39–46.

- Horzmann, K., & Freeman, J. (2016). Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics*, 4(3), 19.
- Hotamisligil, G.S. & Breakefield, X.O. (1991). Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *American Journal of Human Genetics*. 49(2), 383–92.
- Huber, J.H. 1992. Review of Rivulus: Ecobiogeography–Relationships. The most widespread Neotropical cyprinodont genus. Paris, Société Française d'Ichtyologie. 1–572.
- Huehner, M.K., Schramm, M.E., Hens, M.D. (1985). Notes on the behavior and ecology of the killifish *Rivulus marmoratus* Poey (*Cyprinodontidae*). *Florida Scientist*. 48, 1–6.
- Jaffee, S.R. & Price, T.S. (2007). Gene–environment correlations: A review of the evidence and implications for prevention of mental illness. *Molecular Psychiatry*. 12, 432–442.
- James S. D. (2004). *Biology and Ecology of Fishes*, 2nd edition. Biological Sciences Press. 79(4), 443.
- James, W. R., Styga, J. M., White, S., Marson, K. M., Earley, R. L. (2018). Phenotypically plastic responses to predation threat in the mangrove rivulus fish (*Kryptolebias marmoratus*): behavior and morphology. *Evolutionary Ecology*. 32(5), 453–468.
- Jang, H.S., Shin, W. J., Lee, J.E., Do, J.T. (2017). CpG and Non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes*. 8(6).
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*. 293, 1074–1080.
- Ji, H., Wang, Y., Jiang, D., Liu, G., Xu, X., Dai, D., Wang, Q. (2016). Elevated *DRD4* promoter methylation increases the risk of Alzheimer's disease in males. *Molecular Medicine Reports*. 14(3), 2732–2738.
- Jiao, Y., Chen, Q., Chen, X., Wang, X., Liao, X., Jiang, L., Wu, J., Yang, L. (2014). Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -methylamino-l-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk. *Science of the Total Environment*. 468–469, 457–463.
- Johnsson, M., Williams, M. J., Jensen, P., & Wright, D. (2016). Genetical genomics of behavior: A novel chicken genomic model for anxiety behavior. *Genetics*. 202(1), 327–340.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L. (2010). Transfer of a Cyanobacterial Neurotoxin within a Temperate Aquatic Ecosystem Suggests Pathways for Human Exposure. *PNAS*. 107(20), 9252-9257.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*. 19(2), 187–191.
- Juan, A. M., & Bartolomei, M. S. (2019). Evolving imprinting control regions: KRAB zinc fingers hold the key. *Genes and Development*. 33(1–2), 1–3.
- Kallai, J., Makany, T., Csatho, A., Karadi, K., Horvath, D., Kovacs-Labadi, B. (2007). Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans. *Behaviour Neuroscience*. 121, 21–30.

- Kallai, J., Makany, T., Karadi, K., Jacobs, W.J. (2005). Spatial orientation strategies in Morris- type virtual water task for humans. *Behaviour Brain Research*. 159, 187–96.
- Kamstra, J.H., Aleström, P., Kooter, J.M., Legler, J. (2015). Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research (ESPR)*. 22, 16262–16276.
- Kappeler, P. (2010). Levels and mechanisms of behavioural variability. *Animal Behaviour: Evolution and mechanisms*. 655-685.
- Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., Ekström, T. J. (2006). LUMA (LUminometric Methylation Assay)-A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research*. 312(11), 1989–1995.
- Karlsson O., Lindquist N.G., Brittebo E.B., Roman E. (2009). Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylaminol-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicology Science*. 109, 286–95.
- Karlsson, O., Berg, A-L, Hanrieder, J., Arnerup, G., Lindström, A-K., Brittebo, E.B. (2015). Intracellular Fibril Formation, Calcification, and Enrichment of Chaperones, Cytoskeletal, and Intermediate Filament Proteins in the Adult Hippocampus CA1 Following Neonatal Exposure to the Nonprotein Amino Acid BMAA. *Archives of Toxicology*. 89(3), 423–36.
- Karlsson, O., Roman, E., Berg, A. L., Brittebo, E. B. (2011). Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA ( $\beta$ -N-methylamino-l-alanine) during the neonatal period. *Behavioural Brain Research*. 219(2), 310–320.
- Kelley, J.L., Yee, M-C., Brown, A.P., Richardson, R.R., Tatarenkov, A., Lee, C.C., Harkins, T.T., Bustamante, C.D., Earley, R.L. (2016). The genome of the self-fertilizing mangrove rivulus fish, *Kryptolebias marmoratus*: a model for studying phenotypic plasticity and adaptations to extreme environments. *Genome Biology and Evolution*. 8(7), 2145-2154.
- Kim, J., Lee, S., Kang, S., Kim, S. H., Kim, J. C., Yang, M., & Moon, C. (2017). Brain-derived neurotropic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration. *Neural Regeneration Research*. 12(10), 1733-1741.
- Kisby, G. E. & Spencer, P. S. (2011). Is neurodegenerative disease a long-latency response to early-life genotoxin exposure? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(10), 3889–3921.
- Kouakou, C. R. C. & Poder, T. G. (2019). Economic impact of harmful algal blooms on human health: A systematic review. *Journal of Water and Health*. 17(4), 499–516.
- Kreitmann, L. (1932). La vitesse de nage des poissons. *Bulletin Français de Pisciculture*. (53), 145–150.
- Kristensen, I. (1970). Competition in three cyprinodont fish species in the Netherlands Antilles. Study on the fauna of Curaçao and other Caribbean Islands. 199, 82-101.

- Kurtuncu, M., Luca, L. J., Dimitrijevic, N., Uz, T., Manev, H. (2005). Reliability assessment of an automated forced swim test device using two mouse strains. *Journal of neuroscience methods*. 149 (1), 26-30.
- Kuschmitz, D. & Hess, B. (1982). Trans-cis isomerisation of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin during the photocycle. *FEBS Letters*. 138(1), 137-140.
- Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S. (2015). Biotransfer of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in a eutrophic freshwater lake. *Marine Drugs*. 13(3), 1185–120.
- LaHoste, G.J., Swanson, J.M., Wigal, S.B., Glabe, C., Wigal, T., King, N., Kennedy, J.L. (1996). Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*. 1 (2), 121–4.
- Lakstygal, A.M., de Abreu, M.S., Kalueff, A. V. (2018). Zebrafish models of epigenetic regulation of CNS functions. *The Brain Research Bulletin (BRB)*. 142, 344–353.
- Lampl, M. (2019). *General Biology of the Developmental Origins of Health* (pp. 23–34).
- Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R. (2018). Occurrence of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. *Toxins*. 10(2), 83.
- Lawrence, T. L. J. & Fowler, V. R. (2002). *Growth of farm animals*. CABI. 229–254.
- Lee, J.-S., Raisuddin, S., Schlenk, D. (2008). *Kryptolebias marmoratus* (Poey, 1880): a potential model species for molecular carcinogenesis and ecotoxicogenomics. *Journal of Fish Biology*. 72(8), 1871–1889.
- Lee, K.K. & Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: One size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 284–295.
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Dingemans, M. M.L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M. L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B. I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S. H., Pollet, D., Waldmann, P., Kienle, C., Werner, I., Haigis, A. C., Knapen, D., Vergauwen, L., Spehr, M., Schulz, W., Busch, W., Leuthold, D., Scholz, S., vom Berg, C. M., Basu, N., Murphy, C. A., Lampert, A., Kuckelkorn, J., Grummt, T., Hollert, H. (2018). An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environmental Sciences Europe*. 30 (46).
- Lewis, M., Pryor, R., Wilking, L., (2011). Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. *Environmental Pollution*. 159, 2328–2346.
- Li, A., Song J., Hu, Y., Deng, L., Ding, L., Li, M. (2016). New Typical Vector of Neurotoxin  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) in the Marine Benthic Ecosystem. *Marine Drugs*. 14(11).
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*. 3, 662–673.

- Li, T., Zhou, C., & Jiang, M. (1991). Polymer Bulletin UV absorption spectra of polystyrene. *Polymer Bulletin*. 25, 211–216.
- Lim, D.A.H. & Maher, E. (2010). SAC review DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *SAC Review*. 1212, 37–4237.
- Lins, L.S.F., Trojahn, S., Sockell, A., Yee, M., Tatarenkov, A., Bustamante, C.D., Earley, R. L., Kelley, J.L. (2017). Whole-genome sequencing reveals the extent of heterozygosity in a preferentially self-fertilizing hermaphroditic vertebrate. *Genome*. 61(4), 241–247.
- Liu, X., Rush, T., Ciske, J., Lobner, D. (2010). Selective Death of Cholinergic Neurons Induced by Beta-Methylamino-L-Alanine. *NeuroReport*. 21(1), 55–58.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D. (2009). [beta]-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc<sup>-</sup>. *Experimental Neurology*. 217, 429–433.
- Livingston, M.D., Bhargav, V.V., Turko, A.J., Wilson, J.M., Wright, P.A. (2018). Widespread use of emersion and cutaneous ammonia excretion in Aplocheiloid killifishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 285(1884), 1-7.
- Lo, W.-S., M. Harano, M. Gawlik, Z. Yu, J. Chen et al., 2007 GABRB2 association with schizophrenia: commonalities and differences between ethnic groups and clinical subtypes. *Biology Psychiatry*. 61, 653–660.
- Lobner, D., Piana P.M., Salous A.K., Peoples R.W. (2007). Beta-N-methylamino-l-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease*. 25(2), 360–366.
- Lopez-Patino, M.A., Yu, L., Cabral, H., Zhdanova, I.V. (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology Behaviour*. 93, 160–71.
- Lopičić, S., Bratić-Stanojević, M., Dhruha, P., Pavlović D., Prostran, M., Vladimir, N. (2011). Excitatory Amino Acid  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine Is a Putative Environmental Neurotoxin. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 76(4), 479–90.
- Lopicic, S., Nedeljkov, V., Cemerikic, D. (2009). Augmentation and ionic mechanism of effect of [beta]-N-methylamino-L-alanine in presence of bicarbonate on membrane potential of Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Comparative Biochemistry & Physiology (CBP)*. Part A. 153, 284-292.
- Luger, K., Armin W.M., Richmond R.K., Sargent D.F, Richmond T.J. (1997). Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature*. 389(6648), 251–60.
- Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*. Washington, DC: American Chemical Society. 8-12.
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Perry, A., Martin, J.R., Elder, J. F., Bechler, D.L., Avise, J. C. (2006). Microsatellite Documentation of Male-Mediated Outcrossing between Inbred Laboratory Strains

- of the Self-Fertilizing Mangrove Killifish (*Kryptolebias Marmoratus*). *Journal of Heredity*. 97(5), 508–513.
- Maiti, S.K. & Chowdhury, A. (2013). Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. *Journal of Environmental Protection*. 4(12), 1428–1434.
- Markey, A. (2018). Etude de l'effet retardé de l'exposition à la neurotoxine  $\beta$  -N-Méthylamino-L-Alanine (BMAA) durant le développement précoce du *Kryptolebias Marmoratus* sur les traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez l'adulte. Université de Namur. 123.
- Martin, P. & Bateson P. (1993). *Measuring behavior: An introductory guide*. Cambridge University Press, Cambridge, England, Second Edition. 222.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*. 214 (2), 157-171.
- Mehmood, R., Aslam, S., Dangour, A. D, Allen, E. (2019). Factors associated with catch-up growth in early infancy in rural Pakistan: A longitudinal analysis of the women's work and nutrition study. *Maternal & Child Nutrition*. 15(2).
- Metzger, D. C. H., & Schulte, P. M. (2016). Epigenomics in marine fishes. *Marine Genomics*, 30, 43–54.
- Meyer, J.H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., Young, T., Praschak-Rieder, N., Wilson, A.A., Houle, S. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *The Archives of General Psychiatry*. 63,1209-1216.
- Millot, S., Begout, M.L., Chatain, B. (2009). Exploration behaviour and flight response toward a stimulus in three sea bass strains (*Dicentrarchus labrax L.*). *Animal Behaviour*. 119, 108–14.
- Mirbahai, L. & Chipman, J.K. (2014). Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat. Res. – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 764-765, 10-17.
- Mitchell, D.S. (1978). The Potential for Wastewater Treatment by Aquatic Plants in Australia. *Water Australia*. 5 (3), 15-17.
- Moore, G.L., Sucar, S., Newsome, J.M., Ard, M.E., Bernhardt, L., Bland, M.J., Ring, B.C. (2012). Establishing Developmental Genetics in a Self-fertilizing Fish (*Kryptolebias marmoratus*). *Integrative and Comparative Biology*. 52(6), 781–791.
- Moran, P., Ellison, A., Rodrı, C.M., Breen, J., Swain, M., Megias, M., Lopez, C.M.R., Hegarty, M., Wilkinson, M., Pawluk, R., Consuegra, S. (2015). Epigenetic regulation of sex ratios may explain natural variation in self-fertilization rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282(1819).

- Mourabit, S., Edenbrow, M., Croft, D.P., Kudoh, T. (2011). Embryonic development of the self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Developmental Dynamics*. 240(7), 1694–1704.
- Munafò, M.R., Yalcin, B., Willis-Owen, S.A., Flint, J. (2008). Association of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data. *Biological Psychiatry*. 63(2).
- Murch, S. J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W. (2004). Occurrence of Beta-Methylamino-l-Alanine (BMAA) in ALS/PDC Patients from Guam. *Acta Neurologica Scandinavica*. 110(4), 267–69.
- Murch, S.J., Cox P.A., Banack S.A. (2004). A Mechanism for Slow Release of Biomagnified Cyanobacterial Neurotoxins and Neurodegenerative Disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(33), 12228–31.
- Nawata, C.M., Hirose, S., Nakada, T., Wood, C.M. & Kato, A. (2010). Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure. *Journal of Experimental Biology*. 213, 3150–3160.
- Nebraska Department of Environmental Quality. (2012) Water Quality Division. Nebraska Water Monitoring Program Report, Lincoln, NE, USA. Available online: <http://www.deq.state.ne.us/> (accessed on 21 April 2019).
- Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*. 24 (3), 165–205.
- Nilsson, E. E., Sadler-Riggelman, I., & Skinner, M. K. (2018). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental Epigenetics*. 4(2).
- Northon, W.H.J., (2012). Measuring Larval Zebrafish Behavior: Locomotion, Thigmotaxis, and Startle. *Zebrafish Protocols for Neurabehavioral Research*. 66, 3-20.
- Nunn, P.B. & Ponnusamy, M. (2009). [beta]-N-Methylaminoalanine (BMAA): Metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. *Toxicol*. 54, 85-94.
- Nunn, P.B. (2017). 50 years of research on  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid ( $\beta$ -methylaminoalanine). *Phytochemistry*. 144, 271–281.
- O’Neal, R.M., Chen, C.H., Reynolds, C.S., Meghal, S.K., Koeppe, R.E. (1968). The ‘neurotoxicity’ of l-2,4-diaminobutyric acid. *Biochemistry Journal*. 106(3), 699–706.
- Oh, S. Y. & Park, J. (2019). Effect of feed deprivation on compensatory growth in juvenile rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Fisheries Science*. 85(5), 813–819.
- Ong, K.J., Stevens, E.D. Wright, P.A. (2007). Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure. *Journal of Experimental Biology*. 210, 1109-1115.

- Painter, M.M., Buerkley, M.A., Julies, M.L., Vadja, A.M., Norris, D.O., Barber, L.B., Furlong, E.T., Schultz, M.M., Schoenfuss, H.L. (2009). Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology Chemistry*. 28, 2677-2684.
- Pandey, B.D., Hagiwara, A., Sakakura, Y. (2008). Feeding Behaviour, Feed Selectivity and Growth Studies of Mangrove Killifish, *Kryptolebias Marmoratus*, Larvae Using Various Live and Formulated Feeds. *Environmental Biology of Fishes*. 82(4), 365–75.
- Patton, P., Windsor, S., Coombs, S. (2010). Active wall following by Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *Journal of comparative physiology. Part A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*. 196, 853–67.
- Philibert, R.A., Gunter, T.D., Beach, S.R., Brody, G.H., Madan, A. (2008). *MAOA* methylation is associated with nicotine and alcohol dependence in women. *American Journal of Medical Genetics Part B*. 147B(5), 565–70.
- Philibert, R.A., Wernett, P., Plume, J., Packer, H., Brody, G.H., Beach, S.R. (2011). Gene environment interactions with a novel variable Monoamine Oxidase A transcriptional enhancer are associated with antisocial personality disorder. *Biological Psychology*. 87 (3), 366–71.
- Pierce, B. A. (2012). *Genetics : A Conceptual Approach*. W.H. Freeman.
- Pinay, G., Gascuel, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Le Moal, M., Levain, A-L., Etrillard, C., Moatar-Bertrand, F., Pannard, A., Souchu, P. (2018). L’eutrophisation : Manifestations, Causes, Conséquences et Prédicibilité. *Quae (France)*. 25-35.
- Pinsonneault, J. K., Papp, A. C., Sadée, W. (2006). Allelic mRNA expression of X-linked monoamine oxidase a (*MAOA*) in human brain: dissection of epigenetic and genetic factors. *Human Molecular Genetics*. 15(17).
- Polacik, M. & Podrabsky, J.E. (2015). Temporary environments. In *Extremophile Fishes Ecology, Evolution, and Physiology of Teleosts in Extreme Environments*. Eds. R. Riesch, M. Tobler and M. Plath. 217– 245.
- Potok, M.E., Nix, D.A., Parnell, T.J., Cairns, B.R. (2013) Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*. 153, 759–772
- Prabhakaran, R.; Misra, M.; Miller, K. K.; Kruczek, K., Sundaralingam, S., Herzog, D. B., Katzman, D. K., Klibanski, A. (2008). Determinants of Height in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *Pediatrics*. 121(6).
- Pradeilles, R., Norris, T., Ferguson, E., Gazdar, H., Mazhar, S., Bux Mallah, H., Budhani, A., Mehmood, R., Aslam, S., Dangour, A. D., Allen, E. (2019). Factors associated with catch-up growth in early infancy in rural Pakistan: A longitudinal analysis of the women’s work and nutrition study. *Maternal and Child Nutrition*. 15(2).
- Provençal, N., Arloth, J., Cattaneo, A., Anacker, C., Cattane, N., Wiechmann, T., Röh, S., Ködel, M., Klengel, T., Czamara, D., Müller, N. S., Lahti, J., Räikkönen, K., Pariante, C. M., Binder, E. B. (2019). Glucocorticoid exposure during hippocampal neurogenesis primes future stress response

- by inducing changes in DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(1), 54-73.
- Prut, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *The European Journal of Pharmacology*. 463, 3–33.
- Ptáček, R., Kuželová, H., Stefano, G.B., Raboch, J., Kream, R.M. (2013). Targeted D4 dopamine receptors: implications for drug discovery and therapeutic development. *Current Drug Targets*. 14 (4), 507–12.
- Pudell, C., Vicente, B. A., Delattre, A. M., Carabelli, B., Mori, M. A., Suchecki, D., Machado, R. B., Zanata, S. M., Visentainer, J. V., de Oliveira Santos, O., Lima, M. M.S., Ferraz, A. C. (2014). Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. *European Journal of Neuroscience*. 39(2), 266-274.
- Pun, F. W., C. Zhao, W. S. Lo, S. K. Ng, S. Y. Tsang, Nimgaonkar, V., Chung, W.S., Ungvari, G.S., Xue, H. (2011). Imprinting in the schizophrenia candidate gene *GABRB2* encoding GABAA receptor [beta]2 subunit. *Molecular Psychiatry*. 16, 557–568.
- Pun, F. W., Zhao, C., Lo, W. S., Ng, S. K, Tsang, S. Y., Nimgaonkar, V., Chung, W.S., Ungvari, G.S., Xue, H. (2011). Imprinting in the schizophrenia candidate gene *GABRB2* encoding GABAA receptor [beta]2 subunit. *Molecular Psychiatry*. 16, 557–568.
- Purdie, E.L., Samsudin, S., Eddy, F.B., Codd, G.A. (2009). Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-l-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 95(4), 279–284.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P. T., Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*. 82(2). 291-318.
- Reed, D., Plato, C., Elizan, T., Kurland, L. T. (1966). The amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism/dementia complex: A ten-year follow-up on guam: Part I. Epidemiologic studies. *American Journal of Epidemiology*. 83(1), 54–73.
- Règlement (UE) 830/2015 DE LA COMMISSION du 28 mai 2015 modifiant le règlement (CE) n o 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil. (2015). Retrieved from [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=OJ:JOL\\_2015\\_132\\_R\\_0004](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=OJ:JOL_2015_132_R_0004).
- Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., Amzil, Z. (2015).  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*. 110, 8–18.
- Richa, R. & Sinha, R.P. (2014). Hydroxymethylation of DNA : an epigenetic marker. *EXCLI Journal*. 13, 592–610.
- Riggs, A.D., Xiong, Z., Wang, L., LeBon, J.M. (1998). Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. *Novartis Found Symposium*. 214, 214–225.

- Riyahi, S., Sánchez-Delgado, M., Calafell, F., Monk, D., Senar, J. C. (2015). Combined epigenetic and intraspecific variation of the *DRD4* and *SERT* genes influence novelty seeking behavior in great tit *Parus major*. *Epigenetics*. 10(6), 516–525.
- Rodgers, A.B., Morgan, C.P., Leu, N.A., Bale, T.L. (2015). Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112, 13699–13704.
- Rossini, G. P. & Hess P. (2010). Phycotoxins: Chemistry, Mechanisms of Action and Shellfish Poisoning. *EXS*. 100, 65–122.
- Rowan, K., Srikandakumar, A., Englebright, R., and Josey, M. (1996). Compensatory growth in rats feed intake and growth patterns. *Proceeding-Australian Society of Animal Production*. 215-218.
- Russek, S.J., Farb, D.H. (1994). Mapping of the beta 2 subunit gene (*GABRB2*) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant GABAA receptor isoform. *Genomics*. 23(3), 528–533.
- Sabol, S.Z., Hu, S., Hamer, D. (Sep 1998). A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics*. 103 (3), 273–93.
- Sacharowski, S. P., & Sarnowski, T. J. (2019). Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. *Postepy Biochemii. NLM (Medline)*. 65(1), 9-20.
- Sakakura, Y. & Noakes, D.L.G. (2000). Age, Growth, and Sexual Development in the Self-fertilizing Hermaphroditic Fish *Rivulus marmoratus*. *Environmental Biology of Fishes*. 59(3), 309–317.
- Sakakura, Y., Soyano, K., Noakes, D.L.G., Hagiwara, A. (2006). Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Ichthyological Research*. 53(4), 427–430.
- Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behaviour Brain Research*. 228, 367-374.
- Segev, O., Pezaro, N., Rovelli, V., Rybak, O., Templeton, A. R., Blaustein, L. (2019). Phenotypic plasticity and local adaptations to dissolved oxygen in larvae fire salamander (*Salamandra atra*). *Oecologia*. 190(4), 737–746.
- Serretti, A., Lilli, R., Lorenzi, C., Lattuada, E., Smeraldi, E. (2001). *DRD4* exon 3 variants associated with delusional symptomatology in major psychoses: a study on 2,011 affected subjects. *American Journal of Medical Genetics*. 105, 283-290.
- Shaldubina, A., Nemets, B., Bersudsky, Y. (2002). Lack of effect of eicosapentaenoic acid in the Porsolt forced swimming test model of depression. *Acta Neuropsychiatrica*. 14(5), 203–206.
- Sharma, S., Coombs, S., Patton, P., Burt de Perera T. (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *Journal of comparative physiology. Part A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*. 195, 225–40.

- Smalley, S.L., Bailey, J.N., Palmer, C.G., Cantwell, D.P., McGough, J.J., Del'Homme, M.A., Asarnow, J.R., Woodward, J.A., Ramsey, C., Nelson, S.F. (1998). Evidence that the dopamine D4 receptor is a susceptibility gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*. 3 (5), 427–30.
- Smith, P.F., de Waele, C., Vidal, P.P., Darlington, C.L. (1991). Excitatory amino acid receptors in normal and abnormal vestibular function. *Molecular Neurobiology*. 5, 369-387.
- Smith, Q. R., Nagura, H., Takada, Y., Duncan, M. W. (1992). Facilitated Transport of the Neurotoxin, Beta-N-Methylamino-l-Alanine, Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, 58(4), 1330–1337.
- Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environmental Science and Pollution Research International*, 10(2), 126–139.
- Smith, Z. D., Jiantao, S., Hongcang, G., Donaghey, J., Clement K., Cacchiarelli, D., Gnirke, A., Michor, F., Meissner, A. (2017). Epigenetic Restriction of Extraembryonic Lineages Mirrors the Somatic Transition to Cancer. *Nature*. 549 (7673), 543-47.
- Song, C., Kanthasamy, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G. (2011). Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology*. 32(5), 586–595.
- Sozmen, E. G., Rosenzweig, S., Llorente, I. L., DiTullio, D. J., Machnicki, M., Vinters, H. V., Havton, Li.A., Giger, R.J., Hinman, J.D. Carmichael, S. T. (2016). Nogo receptor blockade overcomes remyelination failure after white matter stroke and stimulates functional recovery in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(52), E8453–E8462.
- Spencer, P.S., Nunn, P. B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C. (1987). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*. 237(4814), 517–522.
- Srivastava, S., Cohen, J., Pevsner, J., Aradhya, S., Mcknight, D., Butler, E., Johnston, M., Fatemi, A. (2014). A novel variant in *GABRB2* associated with intellectual disability and epilepsy. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 164(11), 2914–2921.
- Sun, W., Ferrer-Montiel, A.V., Schinder, A.F., McPherson, J.P., Evans, G.A., Montal, M. (1992). Molecular cloning, chromosomal mapping, and functional expression of human brain glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)*. 89 (4), 1443–7.
- Sun, Y-X., Zhang, Z.W., Xu, X.R., Hu, Y.X., Luo, X.J., Cai, M.G., Mai, B.X. (2015). Bioaccumulation and Biomagnification of Halogenated Organic Pollutants in Mangrove Biota from the Pearl River Estuary, South China. *Marine Pollution Bulletin*. 99(1–2), 150–56.
- Suzuki, M.M., Bird, A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. 9(6), 465–476.

- Tampe, B., Tampe, D., Muller, C. A., Sugimoto, H., LeBleu, V., Xu, X., Muller, G.A. Zeisberg, E.M., Kalluri, R., Zeisberg, M. (2014). Tet3-Mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic Protein 7-Induced reversal of kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 25(5), 905–912.
- Tatarenkov, A., Gao, H., Mackiewicz, M., Taylor, D. S., Turner, B. J., Avise, J. (2007). Strong population structure despite evidence of recent migration in a selfing hermaphroditic vertebrate, the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*). *Molecular Ecology*. 16, 2701–2711.
- Tatarenkov, A., Ring, B.C., Elder, J.F., Bechler, D.L., Avise, J.C. (2010). Genetic composition of laboratory stocks of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*: a valuable resource for experimental research. *Plos One* 5(9). e12863.
- Taylor, D.S. (2000). Biology & ecology of *Rivulus marmoratus*: New insights and a review. *Florida Scientist*. 63, 242–255.
- Taylor, D.S. (2012). Twenty-four years in the mud: What have we learned about the natural history and ecology of the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*? *Integrative and Comparative Biology*. 52, 724–736.
- Taylor, D.S. (1988). Observations on the ecology of the killifish *Rivulus marmoratus* (Poey, Cyprinodontidae) in an infrequently flooded mangrove swamp. *Northeast Gulf Science*. 10, 63–68.
- Taylor, D.S. (1990). Adaptive specializations of the cyprinodont fish *Rivulus marmoratus*. *Florida Scientist*. 53, 239–248.
- Taylor, D.S., Turner, B. J., Davis, W.P., Chapman, B. B. (2008). A novel terrestrial fish habitat inside emergent logs. *American Naturalist*. 171, 263–266.
- Thapar, A., Langley, K., Owen, M.J., O'Donovan, M.C. (2007). Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychological Medicine*. 37 (12), 1681–92.
- Thom, B. G., Snedaker, S., Snedaker, J. (1984). The mangrove ecosystem: research methods. *The mangrove ecosystem: research methods. Monographs on oceanographic methodology*. 3-15.
- Thompson, A. W., Hayes, A., Podrabsky, J. E., Ortí, G. (2017). Gene expression during delayed hatching in fish-out-of-water. *Ecological Genetics and Genomics*. 3–5, 52–59.
- Timm, K., Tilgar, V., Saag, P. (2015). DRD4 gene polymorphism in great tits: gender-specific association with behavioural variation in the wild. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69(5), 729–735.
- Türkmen, S., Eroldoğan, O. T., Yılmaz, H. A., Ölçülü, A., Inan, G. A. K., Erçen, Z., & Tekelioğlu, N. (2012). Compensatory growth response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under cycled starvation and restricted feeding rate. *Aquaculture Research*. 43(11), 1643–1650.
- Turko, A. J., Tatarenkov, A., Currie, S., Earley, R. L., Platek, A., Taylor, D. S., & Wright, P. A. (2018). Emersion behaviour underlies variation in gill morphology and aquatic respiratory function in the

- amphibious fish *Kryptolebias marmoratus*. *The Journal of Experimental Biology*. 221(8), jeb168039.
- Turko, A.J., Wright, P.A. (2015). Evolution, ecology and physiology of amphibious killifishes (Cyprinodontiformes). *Journal of Fish Biology*. 87, 815-835.
- Turner, B.M. (1998). Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 21–31.
- Ushijima, T., Watanabe, N., Okochi, E., Kaneda, A., Sugimura, T., & Miyamoto, K. (2003). Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Research*, 13, 868–874.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., & Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1762(11–12), 1068–1082.
- Van Dolah, F.M. (2000). Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*. 108, 133–141.
- Van Ijzendoorn, M. H., Bakermans-Kranenburg, M. J., Ebstein, R. P. (2011). Methylation matters in child development: Toward developmental behavioral epigenetics. *Child Development Perspectives*. 5(4), 305–310.
- Van Onselen, R., Venables, L., Van de Venter, M., Downing, T.G. (2018).  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine Toxicity in PC12: Excitotoxicity vs. Misincorporation. *Neurotoxicology Research*. 33(1),15-23.
- Van Speybroeck, L., 2002. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Academic Science*. 981, 61–81.
- Vandegheuchte, M.B. & Janssen, C.R. (2011). Epigenetics and its implication for ecotoxicology. *Ecotoxicology*. 20, 607-624.
- Vandegheuchte, M.B. & Janssen, C.R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research Genetics Toxicology Environmental Mutagenesis*. 764-765, 36-45.
- Vega, A., & Bell, E. A. (1967).  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*. 6(5), 759–762.
- Verhulst, E.C., Mateman, A.C., Zwier, M. V., Caro, S.P., Verhoeven, K.J.F., Van Oers, K., (2016). Evidence from pyrosequencing indicates that natural variation in animal personality is associated with DRD4 DNA methylation. *Molecular Ecology*. 25, 1801–1811.
- Violi, J., Simon, P., Mitrovic, M., Colville, A., Main, B.J., Rodgers, K.J. (2019). Prevalence of  $\beta$ -Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Its Isomers in Freshwater Cyanobacteria Isolated from Eastern Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 172, 72–81.
- Voisin, A. S., Kültz, D., Silvestre, F. (2019). Early-life exposure to the endocrine disruptor 17- $\alpha$ -ethinylestradiol induces delayed effects in adult brain, liver and ovotestis proteomes of a self-fertilizing fish. *Journal of Proteomics*. 194, 112–124.

- Voisin, A-S., Fellous, A., Earley, R.L., Silvestre, F. (2016). Delayed impacts of developmental exposure to 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. *Aquatic Toxicology*. 180, 247–257.
- Waddington, C.H. (1940). *Organisers and Genes*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wagner, J. & Podrabsky J. (2015). Gene Expression Patterns That Support Novel Developmental Stress Buffering in Embryos of the Annual Killifish *Austrofundulus Limnaeus*. *EvoDevo*. 6(1), 2.
- Waidyanatha, S., Ryan K., Sanders J.M., McDonald J.D, Wegerski, C.J., Doyle-Eisle, M., Garner, C.E. (2018). Disposition of  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine (L-BMAA), a Neurotoxin, in Rodents Following a Single or Repeated Oral Exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 339, 151–60.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R. M., Peakall, D.B. (2001). *Principles of ecotoxicology*. Second Edition. Taylor & Francis. Fourth Edition. 20-100.
- Wang, J. (2015). Acute Toxicity of  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) to Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*) and Zebrafish (*Danio Rerio*). M.S. Thesis, University of Nebraska. 1-103.
- Wang, L., Jiang, W., Lin, Q., Zhang, Y., Zhao, C. (2016). DNA methylation regulates *gabbr2* mRNA expression: developmental variations and disruptions in l-methionine-induced zebrafish with schizophrenia-like symptoms. *Genes Brain Behaviour*. 15, 702-710.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*. 39(4), 457–466.
- Weeks, S.C., Benvenuto, C., Reed, S. K. (2006). When males and hermaphrodites coexist: A review of androdioecy in animals. *Integrative and Comparative Biology*. 46(4), 449–464.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P. (2003). Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants, Lar. *Environmental. Research*. 55, 27-38.
- Weiss, J.H., Koh, J., Choi. D. (1989). Neurotoxicity of  $\beta$  -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and  $\beta$ -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Behaviour Brain Research*. 497 (1), 64–71.
- Weon, J.L. & Potts, P.R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends. 37, 1-8.
- Wilson, P. & Osbourn, D. (1960). Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 35, 324–363.
- Wourms, J.P. (1972). The developmental biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes, *J. Experimental Zoology*. 182, 389–414.
- Wright, P.A. & Turko, A.J. (2016). Amphibious fishes: evolution and phenotypic plasticity. *The Journal of Experimental Biology*. 219(15), 2245–2259.

- Wu J, Xiao H, Sun H, Zou L, Zhu LQ (2012). Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis. *Molecular Neurobiology*. 45(3), 605–20.
- Wu, Q., Odwin-Dacosta, S., Cao, S., Yager, J. D., Tang, W. (2019). Estrogen down regulates COMT transcription via promoter DNA methylation in human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 367, 12–22.
- Xu, X., Li, G., Li, C., Zhang, J., Wang, Q., Simmons, D. K., Liu, J. (2019). Evolutionary transition between invertebrates and vertebrates via methylation reprogramming in embryogenesis. *National Science Review*. 6(5), 993–1003.
- Yunger, L.M., Cramer, R.D. (1981). Measurement and correlation of partition coefficients of polar amino acids. *Molecular Pharmaceutics*. 20, 602–608.
- Yutaka M., Zoltan, R., Ezio, G., Dean, N. (1993). L- $\beta$ -methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 44(3), 727–734.
- Zaiwang, Z., Pei, N., Sun, Y., Li, J., Li, S., Yu, S., Xu, S., Hu, Y., Mai, B. (2019). Halogenated Organic Pollutants in Sediments and Organisms from Mangrove Wetlands of the Jiulong River Estuary, South China. *Environmental Research*. 171, 145–52.
- Zakhari, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Research : Current Reviews*. 35(1), 6–16.
- Zhao, C., Wang, F., Pun, F. W., Mei, L., Ren, L., Yu, Z., Ng S.K., Chen, J., Tsang, S.Y., Xue, H. (2012). Epigenetic regulation on GABRB2 isoforms expression: Developmental variations and disruptions in psychotic disorders. *Schizophrenia Research*, 134(2–3), 260–266.
- Ziegler, C., Richter, J., Mahr, M., Gajewska, A., Schiele, M.A., Gehrman, A., Schmidt, B., Lesch, K.P.P., Lang, T., HelbigPLang, S., Pauli, P., Kircher, T., Reif, A., Rief, W., Vossbeck, P., Elsebusch, A.N., Arolt, V., Wittchen, H.P.U., Hamm, A.O., Deckert, J., Domschke, K.. (2016). MAOA gene hypomethylation in panic disorder-reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy. *Translational Psychiatry*. 6, e773.
- Zong, L., Zhou, L., Hou, Y., Zhang, L., Jiang, W., Zhang, W., Wang, L., Luo, X., Wang, S., Deng, C., Peng, Z., Li, S., Hu, J., Zhao, H., Zhao, C. (2017). Genetic and epigenetic regulation on the transcription of GABRB2: Genotype-dependent hydroxymethylation and methylation alterations in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 88, 9–17.
- Zucca, F.A., Basso, E., Cupaioli, F.A., Ferrari, E., Sulzer, D., Casella, L., Zecca, L., 2014. Neuromelanin of the human substantianigra : anupdate. *Neurotoxicology Research*. 25, 13–23.

## Annexes I

### I a. Protocole de préparation de la BMAA - Valentine Chapelle

Matériels	Localisation
BMAA HCl lyophilisée (50mg)	Stocké à - 20°C (évite la dégradation)
Berlin de 100 ml	Labo biochimie
Ballon jaugé de 100 ml	Labo biochimie
Ballon jaugé de 50 ml (2)	Labo biochimie
Eau salée (25 ppt ±1)	Salle killifish
pHmètre	Labo biochimie
Pipette pasteur	Labo biochimie
Incubateur	
Plaques 6 puits peintes	

Mesures de sécurité :

- Gants en nitrile (toujours), masque et lunettes (poudre)
- Poubelle liquide spéciale BMAA

### PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE

1. Mettre de l'eau salée (25 ppt et 27°C) dans un berlin.
  2. Mesurer pH.
  3. Sous hotte : Remplir entièrement le tube contenant la BMAA en poudre avec l'eau salée via une pipette pasteur (sans toucher parois).
  4. Prélever le mélange BMAA + eau salée et verser dans un berlin.
  5. Si nécessaire, fermer et agiter le tube pour récupérer l'entièreté de la poudre BMAA
  6. Mettre le berlin à niveau de 80 ml.  
**A partir de cette étape, plus besoin de travailler sous hotte car BMAA en solution.**
  7. Mesurer le pH.
  8. Transférer la solution dans un ballon jaugé de 100 ml et mettre à niveau de 100 ml.
- Après manip : Rincer pHmètre avec de l'eau au-dessus de la poubelle liquide BMAA
  - **50 mg dans 100 ml = 500 mg/l = CONCENTRATION SOLUTION STOCK**

\* Prendre en compte la masse molaire :

Masse molaire de BMAA HCl = 154,6 g/mol

Masse molaire de HCl = 36,46 g/mol

Masse molaire de BMAA = 154,6 – 36,46 = 118,14 g/mol

Proportion de BMAA HCl correspondant à de la BMAA uniquement :  $154,6 / 118,14 = 1,3086169$

Si on reçoit un tube de 50 mg de BMAA HCl, on a  $50 / 1,3086169 = 38,208$  g de BMAA pure

## PRÉPARATION DES CONDITIONS

- **Mises au point 18 larves, 6 par condition**

### Calculs

<b>50 g de BMAA HCl = 38,208 mg de BMAA*</b>
Ci = 382,08 mg/l Vi = ? ml Cf = 20 µg/l ou 15 mg/l Vf = 0,006 l x 6 puits = 0,036 l -> Arrondir à 40 ml
<b>20 µg/l (ou 0,020 mg/l)</b>  382,08 mg/l . Vi = 0,020 mg/l . 0,050 l  Vi = (0,020 x 0,050) / 382,08 = 0,000 002 09 l = <b>2,09 µl</b> à prendre de la solution stock
<b>15 mg/l :</b>  382,08 mg/l . Vi = 15 mg/l . 0,040 l  Vi = (15 x 0,040) / 382,08 = 0,001 57 l = <b>1,57 ml</b> à prendre de la solution stock

1. Prélever les volumes calculés et mettre dans des ballons jaugés de 50 ml
2. Rajouter de l'eau salée pour atteindre 50 ml

- **Exposition 270 larves, 90 par condition**

Quantité nécessaire

- J0 : 6mL x 90 larves = 540mL
  - J 8 : 6mL x 90 larves = 540mL
  - J 4 et J 12 : 4mL x 2 x 90 larves = 720
- Somme totale = **1800mL**

<b>50 g de BMAA HCl = 38,208 mg de BMAA*</b>
<p>Ci = 382,08 mg/l            Vi = ? ml            Cf 1 = 15mg/L</p> <p>Cf 2= 0,020 mg/L            Vf = 1800 mL -&gt; Arrondir à 2000 mL</p> <p><b>Ci x Vi = Cf x Vf</b></p>
<p><b>Cf 2 = 0,020 mg/l</b></p> <p>382,08 mg/l . Vi = 0,020 mg/l . 2 L</p> <p>Vi = (0,020 x 2) / 382,08            = 0,000104 L            = <b>0,104 mL</b> à prendre de la solution stock</p>
<p><b>Cf 1 = 15 mg/l</b></p> <p>382,08 mg/l . Vi = 15 mg/l x 2 L</p> <p>Vi = (15 x 2) / 382,08            = 0, 078517            = <b>78,517 ml</b> à prendre de la solution stock</p>

## I b. Protocole d'exposition des larves – Valentine Chapelle

1. Récolte des œufs : pour mise au point, besoin de 270 larves, donc récolter 350 œufs.
2. Placer les œufs individuellement dans les plaques transparentes 12 puits dans de l'eau salée à 25ppt  $\pm 1$ , à une température constante de 27°C  $\pm 1$  et une photopériode 12h/12h (deux changements d'eau hebdomadaire est mis en place jusqu'à l'éclosion).
3. Après éclosion, les larves sont placées dans des plaques 6 puits dont les parois sont opaques afin d'éviter tout contact visuel entre les individus.
4. Chaque puits contient un volume total de 6 mL dont la concentration diffère selon le traitement.
5. Prévoir un aliquot « eau salée » comme témoin pour la température.
6. Placer les aliquots contenant les solutions de BMAA qui viennent du frigo (4°C) dans l'incubateur à 27°C.
7. Après une heure, vérifier que la température de l'aliquot témoin « eau salée » est à 27°C avec la sonde.
8. Préparer quatre pipettes pasteur, un bidon pour les solutions de BMAA des puits, un bassin de rinçage pour les larves J14, de l'eau distillée et de l'éthanol.
9. Sortir les plaques et les aliquots de l'incubateur.
10. Réaliser les renouvellements (J4, J8 et J11)§ et sortir les larves J14 des conditions.
11. Jeter les déchets liquide contaminés à la BMAA dans les poubelles jaunes.

Les larves sont nourries quotidiennement avec 50  $\mu$ L d'artémias. Après 14 jours d'exposition, les larves sont placées individuellement dans 1 bassin de rinçage (eau salée 25ppt  $\pm 1$  à 27°C  $\pm 1$ ). Ensuite, les individus sont disposés dans des boîtes étiquetées contenant 400 mL d'eau salée et placés dans l'incubateur. Au 40<sup>ème</sup> jour, les juvéniles sont déplacés dans la pièce thermorégulée avec les poissons stocks jusqu'à 70 dph.

## I c. Protocole test locomotion et thigmotaxie du *Kryptolebias marmoratus* (stade larvae) – Julie Hétru

<b>Matériel</b>	<b>Localisation</b>
Caméra	Salle comportement
2 lampes de chevet	Salle comportement
1 plaque 6 puits peinte en blanc	Dernier tiroir sous l'ordi – salle poissons
Pipette 10 $\mu$ L	Salle épigénétique
Incubateur	Salle poissons

Test locomotion Acclimatation : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 min</li> <li>• Allumer la caméra</li> <li>• 2min d'acquisition</li> </ul> Test : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 min</li> <li>• Arrêter caméra</li> </ul>	Salle comportementale
---	-----------------------

### *I c. 1 Préparation du test locomotion et thigmotaxie*

#### LA VEILLE :

- S'assurer que l'incubateur est à 27°C
- Allumer le chauffage de la salle comportementale
- Peindre les bords des plaques en blanc (afin que les poissons ne se voient pas entre eux -> éviter biais)
- Marquer la plaque (**Test**)

#### LE JOUR MÊME :

- Rénover plaques à l'éthanol
- 6ml d'eau salée 25ppt 27°C /puit
- Préparer la caméra : la placer au-dessus de l'aquarium et ne plus rien bouger par après

### *I c. 2. Déroulement du test locomotion et thigmotaxie*

- Allumer la caméra
- Attendre 5min avant de lancer l'acquisition (= **acclimatation**)
- Lancer la caméra
- 2min d'acquisition (= **temps d'acclimatation supplémentaire** où l'on ne va plus s'approcher des plaques pour éviter un maximum la perturbation des larves)
- 10min de test (= **les 5 dernières minutes de la vidéo**)
- A la fin du test, s'approcher doucement de la plaque contenant les larves
- Remettre la plaque dans l'incubateur le temps de passer les autres plaques
- Analyser les vidéos sur Ethovision

### I d. Protocole test locomotion et thigmotaxie du *Kryptolebias marmoratus* (stade juvénile) – Valentine Chapelle et Emma Wauthier

<b>Matériel</b>	<b>Localisation</b>
Caméra	Salle comportementale
Lampes	Salle comportementale
Réflecteur de lumière (type doux)	Salle comportementale

Boîte(s) contenant l'individu au J70	Chambre de culture - Salle poisson
Epuisette	Salle épigénétique
Sonde	Salle poissons
Tourie contenant eau salée 25 ppt à 27°C +-1	Salle poissons
Berlin de 2L	Salle poissons
Incubateur	Salle poissons
Test locomotion Acclimatation : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 min</li> <li>• Allumer la caméra</li> <li>• 2min d'acquisition</li> </ul> Test : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 min</li> <li>• Arrêter caméra</li> </ul>	Salle comportementale

#### *I d. 1 Préparation du test locomotion et thigmotaxie*

##### LA VEILLE :

- S'assurer que l'incubateur est à 27°C
- Allumer le chauffage de la salle comportementale

##### LE JOUR MÊME :

- Transporter l'(es) individu(s) dans la salle comportementale
- Mesurer la salinité de l'eau de la tourie et de l'individu
- Verser l'eau de la tourie dans le sceau jusqu'au trait de 2cm de hauteur
- Préparer la caméra : la placer au-dessus de l'aquarium et ne plus rien bouger par après

#### *I. d.2. Déroulement test locomotion et thigmotaxie*

- Allumer la caméra
- Attendre 5min avant de lancer l'acquisition (= **acclimatation**)
- Lancer la caméra
- 2min d'acquisition (= **temps d'acclimatation supplémentaire** où l'on ne va plus s'approcher du sceau pour éviter un maximum la perturbation des larves)
- 10min de test (= **les 5 dernières minutes de la vidéo**)
- A la fin du test, s'approcher doucement du sceau contenant l'individu
- Sortir l'individu de l'eau et changer l'eau pour le test comportement suivant
- Analyser les vidéos sur Ethovision

## I e. Protocole euthanasie et dissection du *Kryptolebias marmoratus* – Valentine Chapelle

Materiel	Localisation
Eppendorf Safe Lock (4 par poisson)	Salle épigénétique
Balance de précision	Salle des balances (arriere bioch)
Microscope binoculaire	Salle TP bio animale
Euthanasie : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gants</li> <li>• Plaque de liège</li> <li>• Parafilm</li> <li>• Lame de rasoir</li> <li>• Feuille plastifiée + latte collée</li> <li>• Gsm ou appareil photo</li> <li>• Papier microfibre</li> </ul>	Labo killi, tiroir à côté de l'évier  Labo bioch (papier microfibre)
Dissection : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit de microdissection</li> <li>• Ethanol</li> <li>• Bac en frigolite + azote liquide</li> <li>• Bac en frigolite + glace</li> <li>• Petit bac + eau salée glacée</li> <li>• Boite de pétri + glace dedans</li> <li>• Papier Torik</li> </ul>	Labo killi, tiroir à côté de l'évier

### 1. Préparation

#### LA VEILLE :

- Mettre de l'eau 25 ppt dans la chambre froide
- Marquer les eppendorfs :
- Capuchons : N° du poisson + type d'organe (Bleu = Brain ; vert = Liver, noir = Gonads)
- Côté du tube : N° du poisson + date
- Peser les eppendorfs et noter le poids sur une feuille (transférer par la suite dans fichier Excel)
- Préparer boite de Pétri + glace + parafilm

#### LE JOUR MÊME :

- Nettoyer paillasse, microscope et tous les ustensiles à l'éthanol
- Préparer zone d'euthanasie : Plaque en liège, lame de rasoir, un carré de parafilm, bac d'eau glacée dans bac de frigolite + glace, feuille blanche avec latte collée, marqueur indélébile, éthanol.
- Préparer zone dissection : Microscope, papier Tork glissé dessous, ustensiles sur papier Tork, portoir avec eppendorfs annotés, boite de Petri remplie de glace dans bac frigolite
- Préparer zone balance : Balance de précision, bac avec azote, récipient frigolite pour peser poisson, feuille où noter les poids.

### 2. Euthanasie

1. Placer le poisson dans l'eau glacée
2. Vérifier la mort : immobile, branchies relâchées
3. Éponger le poisson sur papier microfibre
4. Prendre photo du poisson sur papier + latte + n° du poisson
5. Peser le poisson
6. Placer le poisson sur le ventre sur plaque en liège + parafilm

7. Couper la tête en biais juste sous les nageoires pectorales (couper vers l'avant de la tête, pas verticalement)
8. Placer la tête sur une boîte de Petri remplie de glace, et le corps sur une autre

### **3. Dissection : cerveau**

1. Épingler la tête au bloc de glace via deux aiguilles plantées juste au-dessus des yeux (pas crever les yeux)
2. Gratter les écailles à l'aide d'une pince courbée
3. Incision médiane et dilacération de la peau et des muscles recouvrant la boîte crânienne.
4. Incision médiane de la boîte crânienne.
5. Soulèvement du cerveau permettant la visualisation des deux nerfs optiques.
6. Section des deux nerfs optiques.
7. Prélèvement du cerveau.

### **4. Dissection : nageoire**

1. Placer le corps du poisson latéralement
2. Couper la nageoire caudale au début des rayons aux ciseaux

### **5. Dissection : foie et gonades**

1. Placer le poisson sur le dos, coté antérieur vers nous
2. Incision médiane de la paroi abdominale jusqu'à l'anus
3. Epingler la peau au bloc de glace,
4. Visualisation du foie orangé et fortement vascularisé dans la partie crâniale de la cavité abdominale.
5. Prélèvement du foie.
6. Visualisation des gonades formées de deux lobes latéraux joints au niveau du conduit génital commun.
7. Prélèvement des gonades avec possible présence d'oeufs en formation.

## **I f. Protocole extraction d'ADN du *Kryptolebias marmoratus* larve et juvéniles**

*SOP Ecological Epigenetics – LEAP Méthylation gène spécifique via pyroséquençage*

*DNeasy\_Blood\_&\_Tissue\_Handbook.pdf*

*Qiaamp\_DNA\_Micro\_Handbook.pdf*

### **1. Matériel**

Eau MQ stérile  
Tubes PCR stériles  
Thermocycleur (à réserver)  
Tubes eppendorfs 1.5 ml stériles  
Ethanol absolu (armoire réserve)

### **2. Pré-lyse**

1. Dans un eppendorf 1.5mL standard qui contient l'échantillon, ajouter Buffer T1 80µL et 8µL protéinase K, avec des billes pour les larves.
2. Mettre en incubation 56° de 2h à 4h.

### **3. Lyse**

1. Ajouter 80µL Buffer B3 dans la solution précédente.
2. Mettre à incubation 70° pendant 5min.
3. Laisser refroidir avant l'étape suivante.

### **4. Binding condition**

Ajouter 80µL d'éthanol dans l'eppendorf.

### **5. Bind DNA**

1. Placer toute la solution sur colonne.

2. Passer en centrifugation 11,000 g (rcf) 1min
3. Garder la colonne et jeter le tube collecteur.

#### **6. Wash membrane**

1. Ajouter 50 µL de wash Buggef B5.
2. Centrifugation 11,000 g, 1min
3. Garder le même tube collecteur et ajouter à nouveau 50µL Buffer B5.
4. Centrifugation 11,000 g, 2min

#### **7. Elution**

1. Sur nouveaux eppendorfs 1.5mL, ajouter 20 µL BE (Buffer Elution)
2. Centrifugation 11,000 g, 1min.
3. Garder le tube collecteur qui contient l'ADN élué.

#### **8. Conservation**

Conserver l'ADN à -20°C à court terme ou -80°C à long terme.

### I g. Protocole de traitement bisulfite de l'ADN du *Kryptolebias marmoratus* larve et juvénile

*SOP Ecological Epigenetics – LEAP Méthylation gène spécifique via pyroséquençage*

*EZ DNA Methylation-Gold™ Kit Catalog Nos. D5005 & D5006*

#### **1. Concentration des échantillons**

1. La quantité d'ADN des échantillons doit être comprise entre 500 pg et 2 µg. Utiliser 400 ng d'ADN (entre 200 et 500 ng) pour faire le traitement bisulfite mettre à volume (20 µl) avec de l'H<sub>2</sub>O MQ dans un tube PCR stérile.

#### **2. Reconstitution des réactifs**

1. Ajouter 900 µl d' H<sub>2</sub>O MQ, 300 µl de M-Dilution Buffer et 500 µl de M-Dissolving Buffer par tube de CT Conversion Reagent
2. Mélanger à RT soit en vortexant plusieurs fois ou en le mettant sur agitateur pendant 10 minutes (il peut rester des particules non dissoutes)
3. Ajouter 24 ml d'éthanol 100 % à 6 ml de M-Wash Buffer concentrés (D5005) ou 96 ml d'éthanol 100 % à 24 ml de M-Wash Buffer concentrés (D5006)

#### **Notes importantes:**

Chaque tube permet de traiter 10 échantillons.

Le CT Conversion Reagent est sensible à la lumière. Il vaut mieux utiliser le CT Conversion Reagent directement après l'avoir reconstitué. Si ce n'est pas le cas, il peut rester overnight à RT ou une semaine à 4°C ou 1 mois à -20°C. Avant chaque utilisation, le CT Conversion Reagent doit être chauffé à 37°C et ensuite vortexé.

#### **3. Ajout des réactifs**

1. Ajouter 130 µl de CT Conversion Reagent au 20 µl d'échantillons d'ADN, dans un tube PCR.
2. Mélanger en tapotant le tube et µspin

#### **4. Thermocycleur**

1. Allumer le thermocycleur à l'arrière. Aller dans « Alessandra » à « Enter » à « program » à « open directory » , sélectionner « bisulfite » et START

98°C ; 10 min 64°C ; 2.5 heures 4°C ; ∞

2. Mettre les échantillons dans le thermocycleur et lancer le programme

## 5. Loading

1. Mettre les colonnes (Zymo-Spin IC Column) dans des tubes collecteurs et ajouter 600 µl de M-Binding Buffer
2. Pipeter les échantillons (150 µl) dans la colonne.
3. Fermer le capuchon et mélanger en inversant plusieurs fois la colonne
4. Centrifugation à > 10000g (full speed) pendant 1 min
5. Jeter l'éluat mais pas le tube collecteur

## 6. Wash

1. Ajouter 100 µl de M-Wash Buffer dans la colonne. Centrifuger à > 10000g pendant 1min. Ne pas jeter l'éluat
2. Ajouter 200 µl de M-Desulphonation Buffer dans la colonne et laisser à RT (20-30°C) pendant 15-20 minutes.
3. Après l'incubation, centrifuger à > 10000g pendant 30 (45) secondes. Ne pas jeter l'éluat
4. Ajouter 200 µl de M-Wash Buffer dans la colonne. Centrifuger à > 10000g pendant 30 (45) secondes.
5. Ajouter une nouvelle fois, 200 µl de M-Wash Buffer et centrifuger à >10000g pendant 30 (45) secondes

## 7. Elution

1. Placer la colonne dans un tube eppendorf de 1.5ml.  
*Attention que la colonne ne touche pas l'éluat.*
2. Ajouter 10 µl de M-Elution Buffer directement sur la membrane de la colonne sans la toucher.
3. Centrifuger pendant 1min à > 10000g pour éluer l'ADN traité

## 8. Conservation

L'ADN peut être utilisé immédiatement ou conservé à -20°C. Pour une conservation de longue durée mettre à -80°C.

## I h. Design des amorces (Pyromark Assay Design 2.0 Qiagen)

### 1. Sélection d'une séquence d'intérêt

Sélectionner la séquence d'intérêt (promoteur, introns, ...). Aller sur le site « Ensembl » (<http://www.ensembl.org/index.html>) et faire une recherche du gène chez l'espèce étudiée. Sélectionner « sequence ».

### 2. Sélection d'une zone riche en CpG

Sélectionner une région riche en CpG. Aller sur le site MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) et coller la séquence. Cocher « Use CpG island prediction for primer selection ». Laisser les paramètres tels quels à Submit

### 3. Création des amorces

Ouvrir le software, et venir coller la séquence définie précédemment.

### 4. Choix d'une région cible

Aller dans le menu « converted sequence » et choisir une région riche en CpG (max 400 pb). Pour avoir plus facile s'aider du schéma en haut à droite qui permet de situer chaque CpG dans la séquence. Il faut éviter d'avoir un CpG en tout début de séquence. Le mieux est qu'ils soient répartis sur toute la région. Maximiser la taille de la séquence « pyro » (>200pb) par rapport au nombre de CpG. Cliquez droit et choisir « target region » et ensuite « set target region ». Appuyez sur « run assay design ».

## 5. Choix des amorces

Score : doit être le plus élevé possible. Lorsque l'on travaille avec de l'ADN traité au bisulfite il est très rare d'avoir un score > 80 à cause de la forte probabilité de structure secondaire et mispriming (dû au contenu GC faible).

Amplicon length : pour le produit PCR, max 500 pb, taille optimale entre 80 et 200 pb (selon Qiagen). Pour l'amplicon du séquenceur < 150-200 pb.

Tm (température de melting) : La Tm de l'amorce F et R doivent être proche, moins d'1° C de différence. Elles doivent être comprises entre 50 et 68°C.

**Recommandations** : les amorces ne doivent pas former de « strong hairpin loops » ou des dimères avec elles-mêmes ou les autres amorces. Vérifier que l'amorce biotinylée (Reverse) ne forme pas de « hairpin loops » et se duplexe pas avec l'amorce de séquençage.

## I i. Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du *Kryptolebias marmoratus* larve et juvénile

*PyroMark PCR Handbook 05/2009 Catalog no. 978703*

### 1. Matériels

Pyromark PCR kit (Qiagen Cat No./ID : 978703)

Filter tips + Micropipettes

Thermocycleur (à réserver)

Tubes PCR autoclavés ou plaque PCR + Film plastique

### 2. Protocole

1. Décongeler à température ambiante ou sur glace les produits:

- PyroMark PCR Master Mix
- CoralLoad Concentrate 10x
- Primer Solutions (100µM) Forward (A) et Reverse (B)
- Eau nucléase free
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> si nécessaire

Ne pas oublier de mélanger les réactifs avant utilisation

2. Préparation des primers

2.5 µM (primer : 5µL de forward (µM), µL de reverse (100µM) porté à 200µL avec de l'eau nucléase free

Note : Utiliser pour optimiser la réaction d'amplification. Les primers ont été testés sans et avec 1µL de MgC<sub>2</sub>cl<sub>2</sub> lors de la mise au point.

3. Préparation du reaction Mix (**Tableau 1**).

N = nombre d'échantillons+1)

Tableau 1 – Composition de la solution utilisée pour la PCR

Composé	Volume/reaction	Concentration finale
PyroMark PCR Master Mix, 2x	n x 12,5 µL	Contient HotStar Taq DNA Polymerase pyroMark PCR Buffer 1x (contient 3mM MgCl <sub>2</sub> et dNTPs)
CoralLoad®(10x)	n x 2,5 µL	1x
Primer mix	n x 2 µL	0.2 µM de A et B
RNA-Free Water	Variable	Porter au volume total
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	1µL/sample	Optional-See Handbook
Volume reaction mix	n x 24 µL	
Template DNA	1µL/sample	~ 10-20 ng bisulfite converted DNA
Total volume	25µL/well	

**Note** : Homogénéiser le mix par aspiration-refoulement

4. Distribuer le volume de réaction mix dans le puits/tubes (24µL)
5. Ajouter le volume d'ADN converti bisulfite (1µL)
6. Sceller et spinner la plaque/tube
7. Placer dans le thermocycleur
8. Lancer le programme (**Tableau 7**)

Tableau 2 – Etapes du cycles optimisées pour la PCR utilisant du PyroMark Master Mix

Etape	Temps	T°C	Commentaires
PCR initiale Etape d'activation	15 min	95°C	HotStar Taq Polymerase est activée par une étape de chauffe
Dénaturation	30s	94°C	
Annealing	30s	(60°C) 56°C	Pour l'ADN converti après traitement bisulfite
Extension	30s	72°C	
Extension finale	10min	72°C	

### 3. Conservation

Les produits PCR peuvent être conservés overnight entre 2 et 8°C. Les congeler à -20°C pour une conservation de longue durée.

## I j. Protocole de pyroséquençage de l'ADN du *Kryptolebias marmoratus* larve et juvénile

### 1. Design assay

- Ouvrir le programme Pyromark Q24 Advanced  
File → New Assay → CpG Assay
- Coller la séquence avant traitement bisulfite et la séquence à analyser (après traitement bisulfite)  
→ Generate Dispensation Order
- Ajouter un contrôle bisulfite au début de la séquence générée en ajoutant un C devant un T qui a été converti
- Onglet "Variable positions" : pour chaque position, ajuster le Methylation Range en fonction du % de méthylation attendu
- Onglet "Analysis Parameters" : si le pourcentage de méthylation est très faible, la hauteur des pics sera trop faible pour valider les seuils de qualité par défaut, on peut donc diminuer :

Required peak height for passed quality : 7

Required peak height for check quality :

- Enregistrer l'assay  
File → New Run
- Sélectionner dans "Instrument Method" le numéro de la méthode correspondant au numéro de série de la cartouche. Si celui-ci n'apparaît pas il faut le télécharger via le site de Qiagen
- Compléter le plate setup (chaque carré correspond à 1 puits de la plaque) : •  
Ligne 1 : click droit → Load assay → sélectionner le fichier voulu  
Ligne 2 : identifier l'échantillon (nom, type de restriction, réplicat,...)  
Ligne 3 : remarques si nécessaire
- Imprimer la feuille "Pre Run Information" pour connaître les volumes des réactifs à utiliser et enregistrer le run sur une clé USB.

### 2. Préparation du run

- Mettre les réactifs pyro à température ambiante au moins 30 minutes avant utilisation (Streptavidine, Denaturation solution, Wash Buffer, Binding buffer, Annealing Buffer, nucléotides)
- Allumer le Pyrosequençeur, la pompe à vide et la plaque chauffante à 80°C
- Remplir la Workstation avec
  - 1. 40 mL d'éthanol 70%
  - 40 mL de Denaturation Buffer
  - 50 mL de Wash Buffer (à diluer 10x)
  - 40 mL d'eau bidistillée stérile
  - 70 mL d'eau bidistillée stérile
- Diluer le(s) primer(s) de sequencing pour arriver à une concentration finale de 0.375 µM dans de l'Annealing Buffer (diluer 8x si la concentration initiale est 3 µM)
- Pipeter 20 µL de primer(s) dilué(s) dans les puits de la plaque 24 puits en suivant la feuille « pré run information »

- Positionner la plaque à l'avant droit de la workstation
- Préparer le mix contenant la streptavidine, le Buffer et l'eau  
Note : Bien homogénéiser avant de pipeter

Tableau 3 – Composition de la solution pour l'immobilisation de l'ADN

Composants	Volume	T°C
Streptavidin Sepharose HP	1µL	95°C
PyroMark binding Buffer	40µL	94°C
Eau purifiée	Variable	(60°C) 56°C
Produits PCR biotinylés	10 µL	72°C
Volume total	80 µL	

- Dispenser dans des eppendorfs PCR en chainettes le volume adéquat de mix en s'assurant qu'il est toujours bien homogène  
**Note** : la streptavidine précipite vite
- Laisser 10 minutes sur la plaque agitante
- Ajouter les produits PCR (10µL) et faire des mouvements de va et vient pour homogénéiser
- Laisser au moins 10min sur le vortex à vitesse maximale  
**Note** : Ne jamais laisser statique
- Remplir la cartouche en suivant la feuille « pre run information », étiquette face à soi en posant le tips sur le coin du compartiment adéquat.  
**Note** : Une fois la cartouche remplie tapoter légèrement afin de faire tomber le liquide dans le fond.
- Placer la cartouche à sa place dans le pyroséquenceur et clipser la tige qui la maintient en place

### 3. Run

- A la fin de l'agitation, placer les tubes sur l'avant gauche de la workstation  
**Note** : suivre le plan de plaque
- Mettre l'aspiration sur **ON** et aspirer le contenu des tubes 15 secondes en faisant un mouvement de *up and down*.
- Vérifier que tout le mix a bien été aspiré avant de passer aux autres étapes
- Transférer l'aspirateur 5 sec dans le 1er bain (éthanol 70%)  
**Note** : Compter à partir du moment où l'on voit du liquide être aspiré)
- Transférer l'aspirateur 5s dans le 2ème bain (Denaturation Solution)
- Transférer l'aspirateur 10s dans le 3ème bain (Wash Buffer)
- Maintenir le dispositif 5s à la verticale afin de vider les tuyaux de tout le liquide

### 4. Arrêt

- Positionner l'aspirateur au-dessus de la plaque, arrêter l'aspiration (**OFF**), descendre les piques dans le(s) primer(s) dilué(s) et mélanger délicatement en bougeant l'aspirateur.
  - Transférer l'aspirateur dans le 4ème bain (toujours en position **OFF**) et agiter 10 sec pour rincer les filtres.
  - Transférer finalement dans le 5ème bain, remettre l'aspiration sur ON et laisser aspirer toute l'eau. Maintenez-le à la verticale 5 secondes, éteignez l'aspiration (**OFF**) et placez le dans le compartiment « parking ».
- Etape finale
- Transférer la plaque 24 puits sur la plaque chauffante, 5 minutes à 80 °C, puis la transférer à sa place dans le pyroséquenceur et rabattre la tige qui la maintient en place.
  - Refermer le couvercle de l'appareil, insérer la clé USB sur l'avant, sélectionner le run avec les flèches directionnelles et lancer l'analyse.
  - Récupérer la Denaturation Solution et le Wash Buffer dans des falcons 50 mL, ils peuvent être utilisés 5 fois ; jeter les autres bains et nettoyer le tout à l'éthanol ; placer les cuvettes à l'envers pour éviter le dépôt de poussière.
- Après le run, jeter la plaque dans une poubelle jaune et rincer 2 fois la cartouche à l'eau stérile puis la remplir complètement et exercer une pression du pouce sur chaque cavité pour faire passer l'eau dans les aiguilles.

## Annexe II

Tableau a – Moyennes ± écarts-types des taux de méthylation pour chaque site CpG des gènes RTN4, Mao, DRD4, à 14 et 70 dph. C : Condition contrôle, A : Condition A (20 µg/L), B : Condition B (15 mg/L).

J14	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6
<b>RTN4 Prom</b>						
C	23,49±8,149	/	0,994±0,7047	4,497±2,054	50,02±4,276	1,304±1,084
A	17,50±2,467	/	2,089±2,512	6,467±8,553	42,02±16,31	1,419±1,307
B	20,37±5,005	/	1,482±0,9588	2,908±1,651	48,96±4,167	1,183±0,7965
<b>MAO Prom</b>						
C	87,21±3,843	95,12±2,510	90,50±0,7656	72,68±2,965	89,13±6,800	/
A	87,03±1,190	94,45±1,353	90,57±1,262	75,09±1,983	88,39±5,138	/
B	86,63±2,425	94,52±2,004	90,69±1,177	73,10±5,384	85,96±1,843	/
<b>DRD4 Exon3</b>						
C	88,77±1,049	90,61±0,7704	58,41±4,830	84,86±1,449	77,79±5,475	/
A	89,53±1,091	91,49±1,870	60,12±4,193	86,89±1,902	81,35±1,776	/
B	89,63±1,506	90,55±0,9311	60,85±3,808	85,56±1,399	81,39±1,093	/
<b>J70</b>						
	<b>CpG 1</b>	<b>CpG 2</b>	<b>CpG 3</b>	<b>CpG 4</b>	<b>CpG 5</b>	<b>CpG 6</b>
<b>RTN4 Prom</b>						
C	14,47±3,578	/	1,169±1,207	4,217±2,558	53,33±3,984	1,096±0,966
A	19,32±3,506	/	1,640±1,495	7,736±13,20	49,38±16,88	1,177±1,038
B	16,85±1,273	/	1,174±0,963	3,709±1,709	47,60±17,56	0,7943±0,601
<b>MAO Prom</b>						
C	87,33±0,512	96,69±2,230	92,08±1,490	74,90±4,070	85,96±4,142	/
A	84,07±6,685	96,22±1,383	91,45±1,291	74,27±9,399	85,36±2,549	/
B	85,56±1,991	98,09±1,752	91,68±0,899	74,63±3,798	81,29±13,51	/
<b>DRD4 Exon3</b>						
C	82,55±1,336	88,19±1,213	55,99±3,882	84,30±2,359	77,46±1,657	/
A	81,66±1,240	87,41±1,838	58,08±8,706	85,70±3,551	77,45±2,137	/
B	82,57±1,540	88,92±1,025	60,77±3,921	88,06±3,402	77,96±2,368	/

Tableau b – Moyennes ± écarts-types des taux de méthylation pour chaque site CpG du gène Gabrb2, à 14 et 70 dph. C : Condition contrôle, A : Condition A (20 µg/L), B : Condition B (15 mg/L).

<b>J14</b>	<b>CpG 1</b>	<b>CpG 2</b>	<b>CpG 3</b>	<b>CpG 4</b>	<b>CpG 5</b>	<b>CpG 6</b>	<b>CpG 7</b>	<b>CpG 8</b>	<b>CpG 9</b>	<b>CpG 10</b>	<b>CpG 11</b>	<b>CpG 12</b>	<b>CpG 13</b>
<b>GABRB 2 Prom</b>													
C	97,97± 1,784	98,20± 2,013	96,33± 2,542	90,38± 5,110	81,52± 5,044	78,08± 4,903	87,28± 5,885	90,65± 3,807	100,0± 0,000	/	/	/	/
A	97,81± 1,841	98,98± 0,920	96,30± 1,793	90,26± 2,421	82,22± 4,076	76,70± 2,298	87,78± 2,993	90,92± 4,117	99,07± 2,803	/	/	/	/
B	98,38± 1,337	99,36± 0,951	95,98± 1,202	89,94± 2,250	82,07± 2,651	76,55± 3,854	86,52± 2,208	88,24± 4,204	92,24± 15,40	/	/	/	/
<b>GABRB 2 Exon 9</b>													
C	94,89± 2,175	90,68±5 ,293	73,16±1 7,17	60,33±2 2,23	85,90±4 ,251	76,64±8 ,953	84,53±7 ,074	97,67±1 ,616	84,32±5 ,221	58,91±1 1,49	57,83±1 2,24	58,78±1 1,07	82,56±8 ,544
A	95,44± 2,025	94,47± 3,189	89,67± 8,845	81,14± 13,46	86,63± 7,219	77,09± 9,341	83,75± 5,958	97,61± 1,941	85,08± 2,774	59,13± 10,51	59,63± 10,00	60,54± 10,25	81,58± 10,71
B	95,71± 1,827	91,93± 3,875	74,76± 15,75	61,81± 21,43	86,22± 4,135	77,21± 8,371	84,31± 6,232	98,20± 1,419	85,08± 3,764	58,55± 10,66	58,19± 10,34	60,24± 10,13	87,23± 2,150
<b>J14</b>	<b>CpG 1</b>	<b>CpG 2</b>	<b>CpG 3</b>	<b>CpG 4</b>	<b>CpG 5</b>	<b>CpG 6</b>	<b>CpG 7</b>	<b>CpG 8</b>	<b>CpG 9</b>	<b>CpG 10</b>	<b>CpG 11</b>	<b>CpG 12</b>	<b>CpG 13</b>
<b>GABRB 2 Prom</b>													
C	95,00± 2,073	97,48± 2,124	94,79± 1,918	88,31± 3,679	79,36± 6,230	76,81± 4,745	87,25± 6,067	86,48± 3,254	100,0± 0,000	/	/	/	/
A	95,72± 2,015	98,31± 1,013	94,92± 0,984	89,49± 1,440	79,17± 8,566	76,15± 2,721	85,72± 11,16	91,24± 4,915	100,0± 0,000	/	/	/	/
B	94,47± 1,645	99,00± 0,950	94,84± 0,624	88,11± 3,251	80,97± 4,272	74,00± 4,975	86,88± 3,583	84,27± 14,52	98,76± 3,733	/	/	/	/
<b>GABRB 2 Exon 9</b>													
C	99,10± 1,268	95,20± 2,373	84,91± 10,30	72,76± 13,84	85,74± 7,360	80,35± 5,316	84,92± 5,217	98,52± 1,501	87,34± 1,525	63,40± 6,790	61,52± 6,122	64,12± 6,663	88,17± 4,819
A	98,53± 1,843	91,07± 8,642	80,16± 18,76	68,68± 24,13	84,92± 6,609	79,54± 8,463	85,17± 5,517	96,84± 3,447	89,59± 7,415	65,70± 10,46	57,91± 16,37	65,65± 9,277	86,27± 3,587
B	98,32± 1,959	96,22± 3,570	87,32± 12,32	77,85± 16,73	85,32± 9,022	77,80± 12,01	84,79± 8,063	99,38± 0,932	85,96± 3,969	59,94± 12,31	58,28± 12,78	62,60± 11,91	85,78± 2,580