



HAL
open science

Effets multi et transgénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants : de l'épigénome au phénomène

Rémi Guédon

► **To cite this version:**

Rémi Guédon. Effets multi et transgénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants : de l'épigénome au phénomène. Sciences de l'environnement. Aix-Marseille Université, 2022. Français. NNT : 2022AIXM0062 . tel-04336104

HAL Id: tel-04336104

<https://irsn.hal.science/tel-04336104v1>

Submitted on 11 Dec 2023

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 31 mars 2022 par

Rémi Guédon

**Effets multi- et transgénérationnels d'une
exposition chronique aux rayonnements ionisants :
de l'épigénome au phénomène**

Discipline

Science de l'environnement

Spécialité

Environnement et santé

École doctorale

ED 251 – Sciences de l'environnement

Laboratoire/Partenaires de recherche

IRSN/PSE-ENV/SRTE - Laboratoire de
recherche sur les effets des
radionucléides sur les écosystèmes
(LECO)



Composition du jury

Florence SOLARI	Rapportrice
INSERM, Lyon	
Dimitris XIRODIMAS	Rapporteur
CNRS, Montpellier	
Jean-Christophe POGGIALE	Examineur
Aix-Marseille Université, Marseille	
Myriam RICHAUD	Examinatrice
Université de Montpellier, Montpellier	
André GILLES	Membre invité
Aix-Marseille Université, Marseille	
Simon GALAS	Co-directeur de thèse
Université de Montpellier, Montpellier	
Catherine LECOMTE-PRADINES	Directrice de thèse
IRSN, Cadarache	

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse sont financés par l'Institut de Radioprotection et de sûreté Nucléaire (IRSN) et soutenus par le Programme Environnement-Santé-Travail de l'Anses avec le soutien de l'ITMO cancer dans le cadre du plan cancer 2014-2019 (2015/1/212). Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Dans un premier temps, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Catherine Lecomte-Pradines, de m'avoir offert ce défi et cette belle opportunité. Je ne peux que t'exprimer toute ma gratitude pour la gentillesse et le soutien de chaque instant dont tu as fait preuve à mon égard tout au long de cette thèse. Merci pour ta disponibilité, ta pédagogie, tes idées brillantes, tes conseils pratiques ainsi que pour nos passionnantes discussions. Je mesure la chance que j'ai d'avoir été encadré par toi. Tu m'as fait grandir, réfléchir, changé d'avis et inspiré, malgré mon caractère légèrement obstiné (à de rares occasions :D). Je te souhaite le meilleur dans tes nouvelles fonctions et pour la suite.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, Simon Galas, de m'avoir soutenu et conseillé depuis le Master jusqu'à la soutenance de thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet de recherche, pour la bienveillance de chaque instant ainsi que pour tous les précieux conseils sur *C. elegans*.

Merci également à François Paquet, responsable du SRTE, de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son service. Merci pour votre écoute, votre bienveillance et votre engagement à fournir les meilleures conditions aux doctorants. Je salue également vos actions et votre engagement au sein de l'ICRP.

Dag, Erica ... Vous avez largement contribué à la réussite de cette thèse, merci pour votre accueil en Norvège, pour les précieux conseils, les échanges scientifiques de grandes qualités ainsi que pour votre gentillesse. Au-delà de la recherche, c'est une magnifique rencontre humaine. Je vous souhaite le meilleur pour le futur.

Je remercie chaleureusement Fabien Milliat pour ses précieux conseils sur les miRNAs, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à Fontenay-aux-Roses, ainsi que pour sa gentillesse et sa fine intelligence. Merci à Maâmar Souidi pour son aide sur l'épigénétique, sa bonne humeur, son soutien et sa disponibilité tout au long de ce doctorat. Merci également à Georges Tarlet pour les précieux conseils que tu m'as dispensés sur la biologie moléculaire et l'analyse des TLDA.

Merci à Claire Della Vedova pour ses précieux conseils en statistique, Olivier Armand pour son aide en bio-informatique, Nicolas Dubourg pour la dosimétrie et le fonctionnement de MICADO Lab ainsi que les membres du laboratoire du LECO.

Je tiens également à remercier tous les doctorants que j'ai pu côtoyer, sans qui cette expérience de vie n'aurait pas été la même. Merci à Cécile pour tous ces fous rires, qui continue encore aujourd'hui, merci à Sophia pour ta gentillesse, ta sincérité et ton amitié,

merci à Audrey pour ta douceur, tous ces bons moments et nos discussions, merci à Alexandre pour tes valeurs, ta personnalité et ta présence, merci à Caroline pour ton soutien et les références à Dikkenek avec Cécile, merci à Marine pour ta bonne humeur permanente, merci à Hamza pour ta touchante sincérité, tes valeurs et ta gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes amis et mes proches de m'avoir entouré et soutenu tout au long de ma thèse.

Je dédie cette thèse à mon père, qui nous a quittés avant d'en voir l'aboutissement. Chercheur en biostatistique, tu m'as transmis ta passion pour la science et la recherche. J'espère que tu es fier du travail que j'ai réalisé. Même si je sais que tu me dirais que l'important n'est pas là, tant que je suis heureux et épanoui, tu l'ai aussi <3.

Résumé

Les organismes vivants peuvent être exposés à une irradiation chronique, pouvant entraîner des conséquences néfastes sur les populations exposées et impacter les générations suivantes. L'étude des conséquences multi- et transgénérationnelles de l'exposition chronique à un polluant environnemental est un domaine d'intérêt croissant dans le cadre de la protection de l'homme et de l'environnement. Alors que la plupart des recherches se sont focalisées sur les conséquences d'irradiation à des doses élevées en exposition aiguë, les effets de l'irradiation chronique restent sous-évalués.

Les travaux de cette thèse se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du phénotype reproductif induit par une irradiation chronique aux rayonnements ionisants, ainsi que leur régulation au fil des générations. La contribution des mécanismes épigénétiques, et plus particulièrement des miRNAs, dans la transmission d'informations entre les générations a été évaluée. Pour répondre à ces questions scientifiques, *C. elegans*, a été soumis à une irradiation chronique, du stade embryon au stade L4 jeune adulte, à un débit de dose de 50mGy.h⁻¹. Une cohorte « Exposée » a été suivie pendant quatre générations continuellement exposées et une cohorte « Recovery » a été placée en environnement sans irradiation pendant 3 générations après irradiation parentale (F0) pour évaluer les effets transgénérationnels. L'utilisation d'une approche intégrative de biologie des systèmes a permis d'évaluer les impacts de l'irradiation à plusieurs échelles biologiques, des effets moléculaires aux effets phénotypiques.

La première partie de ce travail a permis de démontrer que les événements initiateurs que sont l'augmentation des dommages à l'ADN et du stress oxydatif entraînent une diminution du nombre de spermatozoïdes, mais également de la spermiogenèse. Une diminution du nombre de cellules mitotiques et une augmentation de l'apoptose dans la lignée germinale sont également mesurées. L'analyse transcriptomique révèle une modification de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et les voies de réponse au stress, avec une augmentation drastique du nombre de gènes impliqués dans ces processus entre les générations F0, F1 et F2, F3. L'un des principaux facteurs de transcription impliqué dans la régulation de la réponse transcriptomique est DAF-16/FOXO (Guédon et al., 2021).

Dans la seconde partie de ce projet de recherche, il a été démontré que les miRNAs étaient impliqués dans la régulation multigénérationnelle des effets sur la lignée germinale, la réponse au stress et le métabolisme lipidique. De plus, certains miRNAs sont transmis jusqu'à 3 générations après irradiation parentale, indiquant un effet transgénérationnel de l'irradiation chronique médié par ces ARN non codants. *Mir-71*, impliqué dans la signalisation du soma avec la lignée germinale et l'expression de DAF-16 est l'un des principaux miRNAs de la réponse multi- et transgénérationnelle, au même titre que la famille mir-35, impliquée dans le fonctionnement de la lignée germinale, la régulation de l'apoptose et la préservation de l'intégrité génomique.

Les résultats des travaux de cette thèse ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes subcellulaires de toxicité induits par une exposition chronique aux rayonnements ionisants ainsi que leur impact sur les générations exposées et non exposées. De plus, même chez des espèces considérées comme radiorésistantes, certains processus subcellulaires sont vulnérables, démontrant l'importance de caractériser les effets des expositions chroniques à de faibles doses de radiations ionisantes. Enfin,

l'implication d'un mécanisme épigénétique dans la réponse à l'irradiation suggère que certaines informations biologiques sont transmises et maintenues aux générations suivantes, pouvant modifier la capacité de l'organisme à répondre à un stress radioinduit.

Mots clés : Rayonnements ionisants gamma, effets multigénérationnels et transgénérationnels, *C. elegans*, reproduction, spermatogenèse et spermiogenèse, DAF-16/FOXO, miRNAs.

Abstract

Living organisms can be exposed to chronic irradiation, which can have harmful consequences on exposed populations and impact subsequent generations. The study of the multi- and transgenerational consequences of chronic exposure to an environmental pollutant is a growing area of interest for the protection of humans and the environment. While most research has focused on high doses and acute exposure, the effects of chronic irradiation remain underestimated.

The work of the present thesis focused on understanding the molecular and cellular mechanisms behind the reprotoxic phenotype induced by chronic irradiation, as well as their regulation over generations. The contribution of epigenetic mechanisms, and in particular of miRNAs, in the transmission of information between generations was evaluated. To answer these scientific questions, *C. elegans*, was subjected to chronic irradiation for 65h, from the embryo stage to the young adult L4 stage, at a dose rate of 50mGy.h⁻¹. An “Exposed” cohort was followed for four continuously exposed generations to address multigenerational effects, while a “Recovery” cohort was placed in a non-irradiation environment for 3 generations after parental irradiation (F0) to assess transgenerational effects. The use of an integrative systems biology approach has made it possible to assess the impacts of irradiation at several biological levels of organization, from molecular effects to phenotypic effects.

The first part of this work made it possible to demonstrate that the decrease in reproduction was due to several deleterious effects on the germ line, following irradiation between the L1 and L4 stages. DNA damage and oxidative stress were identified as molecular initiating events leading to impaired spermatogenesis and consequent decreased number of sperm. A decrease in the number of mitotic cells was also observed in the gonads, following increased apoptosis in the germ line. Transcriptomic analysis revealed a change in the expression of genes involved in lipid metabolism and stress response pathways, with a drastic increase in the number of genes involved in these processes between the F0, F1 and F2, F3 generations. DAF-16 / FOXO was identified as one of the main transcription factors involved in the regulation of the transcriptomic response, which was further validated by the use of a DAF-16::GFP reporter strain (Guédon et al., 2021).

In the second part of this research project, it was shown that miRNAs were involved in the multigenerational regulation of effects on the germ line, stress response and lipid metabolism. In addition, some miRNAs showed to be transmitted for up to 3 generations after parental irradiation, indicating a transgenerational effect of chronic irradiation mediated by these non-coding RNAs. Mir-71, involved in soma to germline signalling and DAF-16 expression, was one of the main miRNAs identified in the multi- and transgenerational response, along with the mir-35 family involved in functions related to germ line progression, the regulation of apoptosis and the preservation of genomic integrity (Guédon et al., 2022, in prep).

The results obtained from the present PhD project have improved our understanding of the subcellular mechanisms of toxicity induced by chronic exposure to ionizing radiation as well as their impact on the exposed and unexposed generations. Moreover, it shows that even in species considered to be radioresistant, certain subcellular processes can be vulnerable, demonstrating the importance of characterizing the effects of chronic exposures to low doses of ionizing radiation. Finally, the involvement of epigenetic

mechanisms in response to irradiation highlights that important biological information is transmitted and maintained in subsequent generations, which may lead to an "adaptive" advantage or, on the contrary, reduce the organism's ability to respond to radiation and radiation-induced stress.

Keywords : Ionizing radiation, multigenerational and transgenerational effects, *C. elegans*, reproductive toxicity, spermatogenesis and spermiogenesis, DAF-16/FOXO, miRNAs.

Valorisation scientifique

Publications scientifiques

Maremonti, E., Eide, D. M., Oughton, D. H., Salbu, B., Grammes, F., Kassaye, Y. A., Guédon, R., Lecomte-Pradines, C., & Brede, D. A. (2019). Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* via impairment of spermatogenesis. *Science of The Total Environment*, 695, 133835. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133835>

Guédon, R., Maremonti, E., Armant, O., Galas, S., Brede, D. A., & Lecomte-Pradines, C. (2021). A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in *C. elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112793. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112793>

Guédon R., Tarlet G, Maremonti E, Galas S, Anders Brede D, Souidi M, Milliat F, Lecomte-Pradines C. MiRNAs involvement in the transgenerational inheritance of ionizing radiation effects in *C. elegans*. (in prep, 2022)

Maremonti E , Oughton D, Dufourcq-Sekatcheff E, Frelon S, Guédon R., Lecomte-Pradines C , Magdalena Roszbach L, Brede D.A . Deposition of ionizing energy leads to population decline via impaired meiosis. (in prep, 2022)

Communications orales

International Congress for Radiation Research (ICRR), 2019, Manchester, Angleterre.
Journées des thèses de l'IRSN, 2019, La Grande Motte, France.
ALLIANCE Workshop on Epigenetic factors and long-term effects of ionizing radiation on organisms, 2018, Fontenay-aux-Roses, France.
Journées des thèses de l'IRSN, 2018, Annecy, France.
Congrès de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement, 2018, Marseille France.
Journées du Groupe de Recherche (GDR) en Écotoxicologie aquatique ; IRSTEA, 2017, Lyon, France.

Communications affichées

Conference of Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER), 2017, Berlin, Allemagne.
Congrès de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement (ED 251), 2017, Aix-en-Provence, France.
Journées des thèses de l'IRSN, 2017, Carry-le-Rouet, France.

Financements et récompenses

ICRR Young Investigator Award from the European Radiation Research Society

Environment-Health-Work program of the ANSES with the support of ITMO cancer as part of the 2014-2019 Cancer Plan (2015/1/2012)

PHC AURORA Scholarship: Hubert Curien Partnership (PHC) between Norway through the Innovation Section of Norges Forskingsraad (NFR) - Norwegian Research Council, and in France, the Ministries of Europe and Foreign Affairs (MEAE) and the Higher Education, Research and Innovation (MESRI)

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé	6
Abstract.....	9
Valorisation scientifique	11
Table des matières.....	13
Liste des tableaux.....	17
Liste des figures	19
Introduction générale.....	21
I. État de l'art	25
I.1 Généralités sur les rayonnements ionisants.....	27
I.1.1 Physique et type de rayonnements ionisants.....	27
I.1.2 Grandeurs, sources et voies d'expositions aux rayonnements ionisants.....	29
I.2 Effets des rayonnements ionisants sur les organismes vivants.....	31
I.2.1 Vers la compréhension des effets des faibles doses.....	31
I.2.2 Mécanismes d'actions	32
I.2.2.1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparations.	32
I.2.2.2 Effets directs, indirects via la radiolyse de l'eau ou non ciblés des radiations ionisantes	36
I.2.3 Conséquences des effets des rayonnements sur les traits d'histoire de vie.	38
I.3 Un élégant modèle, le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
I.3.1 Découverte et utilisation	39
I.3.2 Caractéristiques, culture et cycle de vie.....	40
I.3.3 Le système reproducteur de <i>C. elegans</i>	43
I.3.3.1 Anatomie et lignée germinale.....	43
I.3.3.2 Développement et fécondation.....	44
I.3.3.3 Spermatogenèse et spermiogenèse.....	46
I.3.3.4 Apoptose, dommage à l'ADN et arrêt du cycle cellulaire dans la lignée germinale	47
I.3.4 La voie du récepteur DAF-2 (Insuline/ IGF-1) /DAF-16 FOXO.....	49
I.3.4.1 Signalisation et régulation de la prolifération germinale	49
I.3.4.2 DAF-16/FOXO et résistance au stress.....	52
I.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> et radiobiologie	53
I.4.1 Décryptage des mécanismes moléculaires	53
I.4.2 Exposition aiguë vs chronique.....	53

I.4.3 Événements initiateurs des effets délétères d'une exposition chronique aux rayonnements gamma chez <i>C. elegans</i>	54
I.4.3.1 Sensibilité des stades de vie et dommage à l'ADN.....	55
I.4.3.2 Stress oxydatif.....	58
I.5 Effets générationnels, radiosensibilité et épigénétique	60
I.5.1 Contexte et définition.....	60
I.5.2 Radiosensibilité générationnelle.....	61
I.5.3 Épigénétique.....	62
I.5.3.1 Mécanismes moléculaires	63
I.5.3.2 Méthylation de l'ADN.....	64
I.5.3.3 Modifications post-traductionnelles des histones	65
I.5.3.4 Contribution des ARN non codants	67
Les longs ARNs non codants	68
Les courts ARNs non codants : microRNAs, siRNAs et PiwiRNAs	70
I.5.4 Effets transgénérationnels chez <i>C. elegans</i>	72
II. Objectifs et stratégies de recherches	78
II.1 Objectifs	80
II.1.1 Évaluation des effets toxiques multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez le nématode <i>C. elegans</i>	81
II.1.2 Contribution des miRNAs dans l'héritage transgénérationnel des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez <i>C. elegans</i>	82
II.2 Stratégie de recherche	83
II.2.1 Modèle biologique.....	83
II.2.2 Protocole d'irradiation.....	84
II.2.3 Exposition aux rayonnements ionisants	85
II.2.3.1 Dispositifs d'irradiation.....	85
II.2.3.2 Choix et calcul du débit de doses	86
II.2.4 Toxicogénomique et choix des paramètres biologiques mesurés	87
II.2.4.1 Toxicogénomique	87
II.2.4.2 Paramètres biologiques mesurés, techniques et méthodes d'analyse..	89
III. Analyse des effets reprotoxiques induits par une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants chez <i>C. elegans</i>	93
III.1 Objectifs de l'article	95
III.2 A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in <i>C. elegans</i>	96
III.3 Principales conclusions	120
IV. Implication des microARNs dans l'héritage transgénérationnel des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez <i>C. elegans</i>	122

IV.1 Objectifs de l'article	124
IV.2 MiRNAs involvement in the transgenerational inheritance of ionizing radiation effects in <i>C. elegans</i>	125
IV.3 Principales conclusions.....	158
V. Discussion générale et perspectives	160
Les fonctions biologiques impactées par l'irradiation chronique chez <i>C. elegans</i> par une approche de biologie des systèmes.....	162
Modification des phénotypes et des mécanismes de régulation suite à une irradiation chronique multigénérationnelle.	166
Rôle des miRNAs à la réponse multi- et transgénérationnelle suite à une exposition chronique aux rayonnements ionisants.....	167
Conclusion générale.....	170
Perspectives	173
Annexes.....	175
Annexe 1 : Synthèse des principaux résultats aux différentes échelles biologiques	175
Annexe 2 : <i>C. elegans</i> ChIP-Seq protocole.....	176
Annexe 3 : Extraction mécanique des noyaux pour ATAC-Seq	182
Références bibliographiques	184

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des paramètres biologiques analysés lors de cette thèse	89
---	----

Liste des figures

Figure 1 - Rayonnement gamma.....	28
Figure 2 - Pouvoir pénétrant et ionisant des différents types de rayonnements ionisants.....	28
Figure 3 - Unités de mesure de la radioactivité.....	30
Figure 4 - Effets stochastiques et déterministes des RI à l'échelle cellulaire.....	31
Figure 5 - (a) Principaux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN chez l'homme. (b) Principales voies de transduction du signal impliquées dans le maintien de l'homéostasie nucléaire.....	35
Figure 6 - (a) Effets directs et indirects des rayonnements ionisants. (b) Production de radicaux libres par radiolyse de l'eau.....	36
Figure 7 - Effets cellulaires principaux des RI.....	37
Figure 8 - (a) Observation de <i>C. elegans</i> au microscope optique (b) et au microscope à fluorescence sur une souche reportrice sto-6:GFP.....	40
Figure 9 - Cycle de vie de <i>C. elegans</i> à 20°C.....	42
Figure 10 - Schéma de la lignée germinale de <i>C. elegans</i> hermaphrodite. (a) Pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. (b) Schéma de la lignée germinale avec la gonade (rouge et bleu), la spermathèque (jaune) et les embryons (gris). (c) Polarisation et segmentation de la gonade. (d) La signalisation GLP-1/Notch régule le niveau de GLD-1 et la transition entre mitose et méiose.....	44
Figure 11 - (a) Développement de la lignée germinale d'un hermaphrodite. (b) Stimulation par la MSP de la fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes.....	45
Figure 12 - Spermatogenèse et spermiogenèse chez <i>C. elegans</i>	47
Figure 13 - Régulation de l'apoptose chez <i>C. elegans</i>	49
Figure 14 - (a) Principaux composants de la voie DAF-2/DAF-16 et intégration de différents signaux cellulaires par DAF-16 (b) Contrôle de la prolifération de la lignée germinale en réponse à GLP-1/Notch et DAF-2/DAF-16.....	51
Figure 15 - Design expérimental utilisé pour identifier les stades de développement sensibles à l'exposition chronique aux RI.....	55
Figure 16 - (a) Dommages à l'ADN (moyenne de l'intensité des queues de comètes) mesurés chez les embryons provenant de parents irradiés. (b) Photos au microscope Olympus BX51. De haut en bas : contrôle, 40 et 100mGy/h.....	57
Figure 17 - Statut oxydatif de <i>C. elegans</i> après 48 et 72h d'exposition à 50mG/h de rayonnements gamma. (a) Évaluation <i>in vivo</i> de sod-1. (b) Évaluation <i>in vivo</i> de l'expression du radical H ₂ O ₂ . (c) Mesure <i>in vivo</i> du statut redox par un biosenseur radiométrique. Les tendances linéaires ont été estimées à l'aide d'une analyse de régression linéaire simple (SLR).....	59
Figure 18 - Schéma de l'action transgénérationnelle d'un stressor à travers la lignée germinale d'un <i>C. elegans</i> hermaphrodite.....	61

Figure 19 - Les mécanismes fondamentaux de l'épigénétique. (a) La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout de groupe méthyle sur l'ADN. (b) La modification des queues des histones influe sur la structure de la chromatine. (c) Les ARN non codants agissent sur la régulation de l'expression génique et sur la structure de la chromatine.....	64
Figure 20 - Interconnexion des mécanismes épigénétiques. (a) L'absence de méthylation et la présence de PTMs activatrice permettent la transcription. (b) La méthylation de l'ADN et l'absence de PTMs entraînent une structure compacte de la chromatine, empêchant la transcription.....	66
Figure 21 - Conservation et localisation des PTMs : visualisation de 16 états de la chromatine issue de l'enrichissement de 8 PTMs	67
Figure 22 - Rôle et mécanismes d'actions des longs ARN non codants dans la régulation de la transcription.....	69
Figure 23 - Circuit de régulation miRNAs-épigénétique	71
Figure 24 - (a) Transmission d'information génétique ou épigénétique au fil des divisions cellulaires. (b). Méthylation des histones sur plusieurs générations chez <i>C. elegans</i> . (c) Interconnexion des modifications de l'histone H3	73
Figure 25 - (a) Enzymes responsables de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN en position 6mA chez <i>C. elegans</i> . (b) Corrélation entre processus méthylation de l'ADN en 6mA, méthylation des histones et fertilité	75
Figure 26 - (a) Modèle de la réinitialisation induite par le stress des courts ARN héréditaires. (b) Schéma de l'interaction entre les réponses RNAi héréditaires et le rétrocontrôle déterminant la durée de la répression transgénérationnelle.....	76
Figure 27 - Protocole d'exposition utilisé dans le cadre des axes de recherche de ce travail de thèse	84
Figure 28 - Dispositifs d'irradiation de l'IRSN sur le site de Cadarache. (a) Irradiateur MIRE (b) Source et chape de plomb au centre de la chambre climatique. (c) Hall d'irradiation MICADO'Lab.....	85
Figure 29 - La pyramide de la toxicogénomique vers la prise de décision réglementaire, présentant certaines questions et solutions pour promouvoir la prise de décision au regard des données de toxicogénomiques.....	88
Figure 30 Schéma de synthèse des principaux résultats	170
Figure 31 - AOP 396 : L'exposition aux rayonnements ionisants entraîne un déclin de la population via l'altération de la méiose	171

Introduction générale

Les activités humaines, agricoles, industrielles, militaires ainsi que les transports engendrent l'émission de nombreux polluants dans l'environnement. Ces polluants vont contaminer les différents compartiments de la biosphère tels que l'eau, les sols ou l'air et impacter les espèces vivantes. En 2016, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 13 millions de personnes meurent chaque année à cause d'un environnement pollué (Prüss-Ustün et al., 2017). De plus, les polluants peuvent persister dans l'environnement pendant des dizaines voire des centaines d'années, entraînant des effets nocifs à de très faibles doses dont il est difficile d'évaluer les risques.

Bien que les conséquences d'expositions aiguës à des polluants soient relativement bien caractérisées, les effets d'expositions chroniques, à des doses relativement faibles et sur de longues durées, le sont beaucoup moins. De plus, la présence de nombreux polluants dans l'environnement augmente la probabilité d'effets cocktails et des conséquences sanitaires associées. Pour améliorer l'évaluation du risque, la caractérisation des mécanismes d'action toxique engendrés par l'exposition chronique à un polluant est un prérequis indispensable à la compréhension des effets biologiques induits par ces contaminants anthropiques (UNSCEAR., 2012).

Aujourd'hui, les données scientifiques sur les effets toxiques de polluants, intégrant des analyses de l'échelle moléculaire à l'échelle phénotypique et prenant en compte les modes d'action, sont encore rares, mais représentent un enjeu prioritaire pour une protection efficace de la biosphère. C'est dans ce contexte qu'est apparue la toxicogénomique, regroupant les approches toxicologiques dites classiques et intégrant l'utilisation des technologies dites « Omiques » (transcriptomique, protéomique, métabolomique...). La toxicogénomique permet de décrypter les modes d'action, les interactions gènes-environnement et les répercussions sur les voies biologiques d'un polluant, ainsi que les conséquences de l'échelle moléculaire au phénotype. Elle permet d'obtenir des informations plus sensibles, discriminantes, mécanistiques et prédictives que les techniques de toxicologie historiquement utilisées. Ces considérations ont conduit l'Organisation de coopération et développement économiques (OCDE) à soutenir des programmes dans le but de développer l'approche des « Adverse Outcome Pathway » (AOP). L'AOP est un processus permettant de décrire une réponse toxicologique, en utilisant des informations mécanistiques pour faire le lien entre un événement moléculaire déclencheur et un effet indésirable à un niveau d'organisation biologique pertinent pour l'évaluation des risques.

En outre, des études épidémiologiques, écotoxicologiques et de laboratoire ont démontrées que l'exposition parentale à un polluant peut engendrer des conséquences délétères sur la descendance et les générations suivantes (Adam-Guillermin et al., 2018; Kioumourtzoglou et al., 2018). Ces observations posent de nombreuses questions sur la protection de l'homme, de l'environnement et démontrent la nécessité de conduire des études multi- et transgénérationnelles.

Parmi les polluants environnementaux, les radiations ionisantes (RI), provenant de sources naturelles et artificielles, sont des particules subatomiques ou des protons capables d'ioniser la matière qu'elles traversent. Jusqu'à la fin du XIXe siècle, l'exposition aux RI provenait de sources naturelles, mais au cours du dernier siècle, l'utilisation de sources artificielles s'est répandue, multipliant les risques d'exposition. Face à l'augmentation des doses reçues et des risques encourus par les organismes vivants, il convient d'établir les effets de faibles et moyennes doses de radiations à différentes échelles biologiques ainsi qu'à différentes échelles de temps (UNSCEAR., 2012). En effet, il a été observé que les phénotypes induits par une exposition aux RI peuvent évoluer et

s'aggraver au fil des générations, justifiant la nécessité de réaliser des études sur plusieurs générations pour contribuer à améliorer l'évaluation des risques (Buisset-Goussen et al., 2014; Parisot et al., 2015).

Cette thèse est en partie financée par le Programme Environnement-Santé-Travail de l'ANSES avec le soutien de l'ITMO cancer dans le cadre du plan cancer 2014-2019 (2015/1/212) ainsi que par le Partenariat Hubert Curien (PHC Aurora) franco-norvégien. Notre projet a pour but de caractériser les mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires sous-jacents aux effets toxiques d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants sur plusieurs générations. Principalement connues pour ses effets cancérigènes et mutagènes, les radiations ionisantes peuvent entraîner des dommages sur plusieurs types de biomolécules tels que les lipides, les protéines, l'ADN et impacter certaines fonctions de l'organisme telles que le développement ou la reproduction. Nous avons adopté une approche sans a priori pour analyser l'ensemble des processus biologiques impactés par l'irradiation chronique au fil des générations.

Ce manuscrit est divisé en cinq chapitres. Le premier regroupe les données de la littérature pertinentes pour la compréhension de ce projet de recherche. Nous y abordons la physique des RI, leurs mécanismes d'action sur la matière vivante ainsi que les conséquences sur les organismes. Nous décrivons également les caractéristiques du modèle expérimental *C. elegans* et son utilisation en radiobiologie. Par la suite, nous développons les effets générationnels induits par une exposition aux RI ainsi que la contribution des processus épigénétiques.

La deuxième partie décrit les objectifs et la stratégie de recherche mise en œuvre. Pour aborder nos questions de recherche, nous avons mis en place un protocole d'exposition sur plusieurs générations de l'organisme *C. elegans*. Son cycle de vie court, l'homologie de nombreux gènes et voies de signalisation cellulaires avec l'Homme, ainsi que les nombreux outils de biologie moléculaire en font un modèle de choix pour travailler sur des expositions multi et transgénérationnelles à plusieurs échelles moléculaires. La conduite de ce projet de recherche, en collaboration avec une équipe de l'université de Montpellier/CNRS, l'université norvégienne pour les sciences de la vie (NMBU) et un laboratoire de recherche en toxicologie humaine de l'IRSN, s'est articulée en 3 phases décrites ci-dessous.

Premièrement, nous avons travaillé sur la caractérisation des effets initiaux, directs et indirects, d'une exposition chronique sur *C. elegans* (Maremonti et al., 2019, 2020b). Une attention particulière a été portée sur l'analyse des dommages à l'ADN, la mesure du stress oxydatif ainsi que la sensibilité des différents stades de vie. Les résultats de cette étude sont traités dans le paragraphe I.4.3 de l'état de l'art.

Le deuxième volet fait l'objet d'un article présenté dans le 3^{ème} chapitre de ce manuscrit, traitant des effets moléculaires, cellulaires et omiques d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants sur 4 générations (Guédon et al., 2021). Nous avons analysé les effets reprotoxiques d'une exposition chronique multigénérationnelle aux rayonnements gamma chez *C. elegans*, du phénotype aux mécanismes subcellulaires. Les conséquences sur le transcriptome et les facteurs de transcription sont également décrites, avec la validation de la contribution du facteur de transcription DAF-16/FOXO, impliqué dans la réponse au stress et la longévité, grâce à l'utilisation d'une souche reproductrice DAF-16 :GFP.

La dernière partie de notre projet de recherche, faisant l'objet du 4^{ème} chapitre et d'un article en cours de soumission, traite de la contribution des microRNAs dans la réponse au stress radiobiologique sur les générations continuellement exposées ainsi qu'entre les générations non exposées après exposition parentale. Entité régulatrice d'une grande

partie du transcriptome, ce type d'ARN non codant est fortement impliqué dans la réponse au stress et peut être impacté au fil des générations, exposées et non exposées.

Pour terminer, le 5^{ème} chapitre regroupe la conclusion, la discussion des résultats de notre projet de recherche ainsi que les perspectives.

Première partie

I. État de l'art

Table des matières

I.1 Généralités sur les rayonnements ionisants	27
I.2 Effets des rayonnements ionisants sur les organismes vivants.....	31
I.3. Un élégant modèle, le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
I.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> et radiobiologie.....	53
I.5 Effets générationnels, radiosensibilité et épigénétique	60

I.1 Généralités sur les rayonnements ionisants

I.1.1 Physique et type de rayonnements ionisants

La découverte des rayons X par W. Roentgen en 1895 puis de la radioactivité par H. Becquerel en 1896, a permis de développer l'utilisation militaire, énergétique et médicale des matériaux radioactifs à partir du début du XX^{ème} siècle. Rapidement confrontés à une balance bénéfice/risque pour l'Homme et l'Environnement, les cliniciens et les physiciens se sont attelés à comprendre la nature des RI, à cibler leur action à différentes échelles biologiques et à mesurer les différents types de rayonnements. S'appuyant sur les données scientifiques, les autorités ont mis en place des mesures de radioprotection. Néanmoins, l'évolution des techniques et des concepts en biologie entraîne une amélioration continue du système de radioprotection, à la lumière des nouvelles découvertes dans le domaine. Pour aborder ce sujet, la compréhension de la physique des atomes radioactifs est un prérequis pour appréhender les effets des RI sur le vivant.

L'atome est l'élément fondamental de la matière, constitué de deux types d'entités : le noyau et les électrons. Le numéro atomique dépend du nombre de protons dans le noyau, mais la différence du nombre de neutrons peut créer des isotopes d'un même élément. La prise en compte de différents états d'énergie des isotopes permet de définir des nucléides. L'un des principes de base de la radioactivité est la stabilité des isotopes et des nucléides. En effet, lorsqu'il y a un déséquilibre entre le nombre de neutrons et de protons dans le noyau d'un isotope, l'atome se transforme vers un état plus stable en relâchant de l'énergie sous forme de rayonnements et/ou d'une particule. Les rayonnements sont qualifiés d'ionisants s'ils peuvent ioniser la matière, c'est-à-dire arracher un ou plusieurs électrons.

Lors de la désintégration, l'atome va émettre des particules ou de l'énergie permettant de classer les émissions selon quatre types, ayant des cinétiques et des effets différents sur la matière (Nakashima & Duong, 2021).

L'émission particulaire α : les particules α sont composées de deux protons et de deux neutrons, c'est-à-dire un noyau d'hélium. Ce type de rayonnement fortement ionisant est généralement émis par des noyaux lourds tels que l'uranium. Néanmoins, en raison de la densité et de la charge de ce type de particules, elles perdent rapidement de l'énergie (3 à 5 cm dans l'air).

L'émission particulaire β : engendrée par une différence entre le nombre de protons et de neutrons, le noyau va émettre un électron (particule β^-) ou un positron (particule β^+) pour retrouver sa stabilité. À l'inverse des particules α , les particules β ont un rayon d'action important et peuvent pénétrer l'eau et les tissus avec une énergie élevée.

L'émission des rayonnements électromagnétiques (X et γ) : lors d'une désintégration radioactive, l'énergie résiduelle contenue dans le noyau est libérée sous forme de photons énergétiques pour permettre à l'atome de retrouver un état de stabilité énergétique (Figure 1). Le rayonnement émis est principalement sous forme de rayons gamma. Si le rayon gamma interagit avec un électron de l'atome, un rayon X est émis. Les rayonnements gamma peuvent voyager à de grandes distances (plusieurs centaines de mètres) et traverser différentes structures telles que le fer ou le béton (Figure 2). Ce type

de rayonnement est la principale cause d'effets radiotoxiques lors d'une explosion atomique.

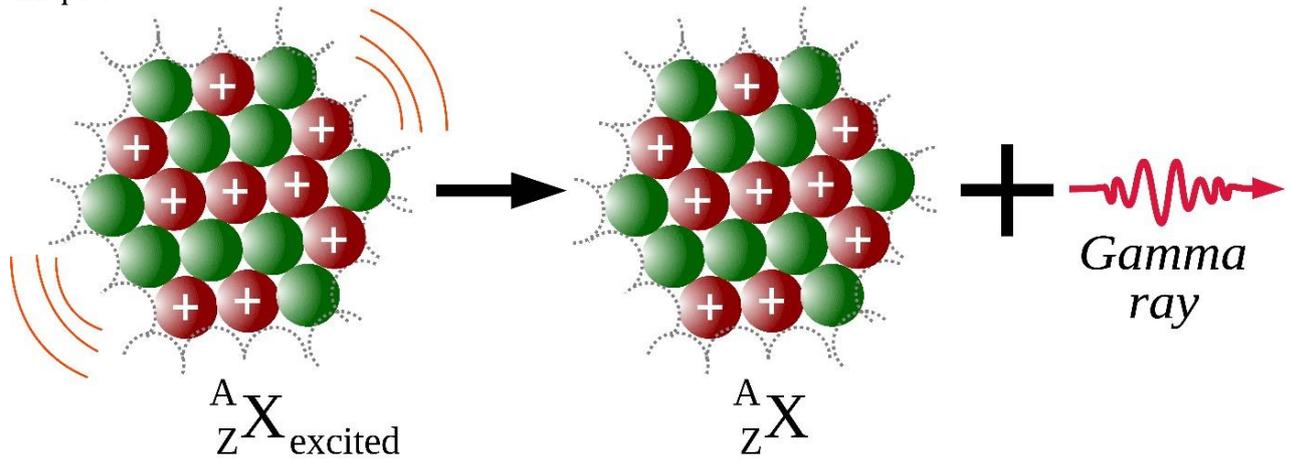


Figure 1 - Rayonnement gamma. *Source : stock.adobe.com*

L'émission neutronique : lors d'une réaction de fusion ou de fission nucléaire, un atome peut perdre un neutron. Cette particule n'est pas chargée et n'ionise pas directement la matière. Néanmoins, le rayonnement neutronique peut entraîner des réactions d'activations neutroniques, aboutissant à la formation de radioisotopes de la matière pénétrée. Ce type de rayonnement possède un pouvoir pénétrant pouvant être supérieur au rayonnement gamma.

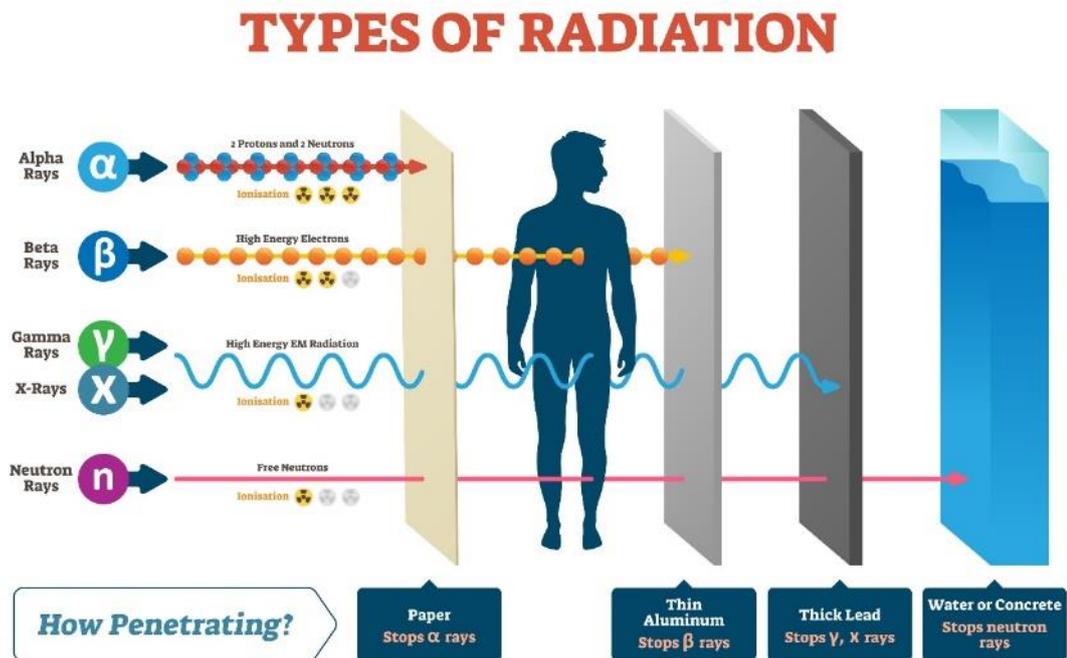


Figure 2 - Pouvoir pénétrant et ionisant des différents types de rayonnements ionisants. *Source : stock.adobe.com*

Le mode d'interaction avec la matière et le pouvoir pénétrant, caractérisés par leur transfert d'énergie linéique (TEL), diffèrent en fonction du type de rayonnement. Le TEL est l'énergie moyenne déposée par unité de longueur d'une particule ionisante (en keV/μm). Plus le TEL est important, plus la perte d'énergie est importante et donc plus

fort sera le pouvoir ionisant, mais la distance parcourue sera courte. À titre d'exemple, les particules alpha ont un TEL important, caractéristique d'un fort pouvoir ionisant, mais faiblement pénétrant de par la taille et la cinétique de ces particules, entraînant une perte d'énergie rapide. Une feuille de papier suffit à bloquer les rayons alpha (Figure 2). A contrario, les rayons gamma sont faiblement ionisants, mais ont un pouvoir pénétrant beaucoup plus important. Durant la suite de ce manuscrit, nous développerons plus particulièrement les rayonnements gamma, utilisés pour les irradiations dans le cadre de ce projet de recherche.

I.1.2 Grandeurs, sources et voies d'expositions aux rayonnements ionisants

La radioactivité possède plusieurs unités et grandeurs permettant de la mesurer :

Le becquerel (Bq), du nom de l'un des éminents chercheurs à l'origine de la découverte de la radioactivité, permet de caractériser l'activité d'une source radioactive. 1 becquerel correspond à 1 désintégration par seconde. Néanmoins, cette unité ne tient pas compte des effets biologiques d'un rayonnement ionisant.

Le gray (Gy) est l'unité permettant de définir la dose absorbée par la matière. Comme expliqué précédemment, les rayonnements ionisants cèdent de l'énergie à la matière qu'ils traversent. 1 gray représente la dose absorbée par 1 kilo de matière soumis à un joule d'énergie. La mesure du débit de dose se fait en calculant la dose absorbée par unité de temps. Dans le cadre de ce projet de recherche, l'unité de débit de dose est le Gy/h.

Le sievert est l'unité pour évaluer les risques biologiques d'une exposition aux rayonnements ionisants chez l'homme. En effet, la dose absorbée (Gy) ne tient pas compte de la sensibilité des différents tissus, du type de rayonnement et de la durée d'exposition. Le sievert est une pondération de la dose absorbée (Gy) par un facteur permettant de prendre en compte les différents paramètres cités précédemment. C'est l'unité privilégiée pour le calcul de la dose efficace (corps entier) et de la dose équivalente (tissu et organe).

La représentation communément utilisée est l'image de pommes chutant d'un pommier (Figure 3). Le nombre de pommes tombant par unité de temps est mesuré en Becquerel. Le nombre de pommes touchant la matière se mesure en Gray alors que les dégâts occasionnés se mesurent en Sievert et dépendent de la localisation, de la taille et de la cinétique des fruits.

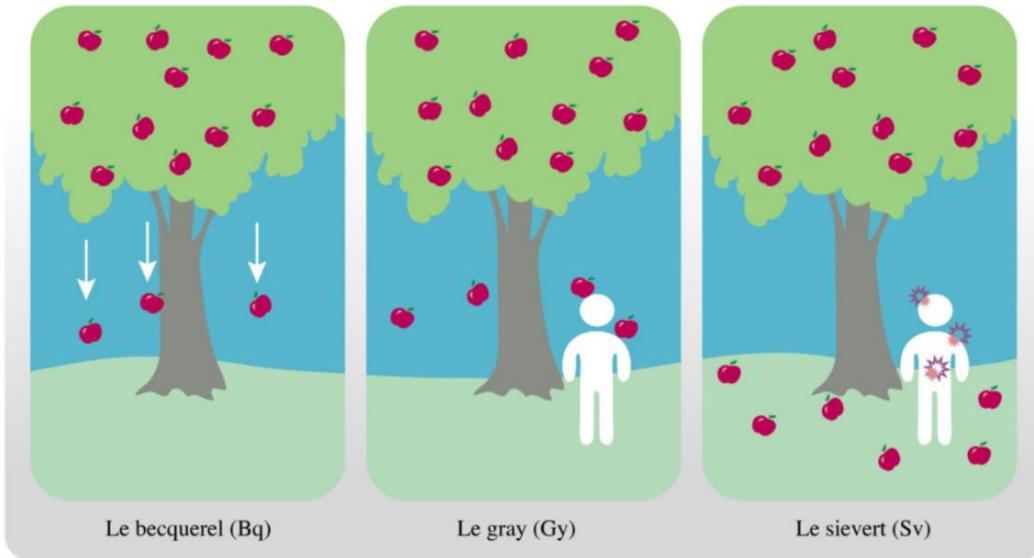


Figure 3 - Unités de mesure de la radioactivité. *Source : monde.ccdmd.qc.ca*

L'exposition aux RI de l'Homme et de l'Environnement provient de sources naturelles et, depuis le début du XXème siècle, de sources anthropiques. Les sources naturelles proviennent des rayonnements terrestres et telluriques, des rayonnements cosmiques, du radon 222 (^{222}Rn) ainsi que de la radioactivité naturelle du corps humain, de l'ordre de 125Bq/kg. Les sources artificielles de rayonnements ionisants proviennent de divers secteurs dont le médical, l'industrie nucléaire, l'armement, certains laboratoires de recherche ainsi qu'un certain nombre d'acteurs industriels (stérilisation, contrôle d'étanchéité par radiographie, détection de métaux ...).

L'exposition aux rayonnements ionisants peut se faire suivant deux voies : interne ou externe. Une exposition interne correspond à la pénétration de radionucléides dans l'organisme par inhalation, ingestion, passage transcutané ou placentaire. L'exposition externe correspond à la mise en contact de radionucléides avec la peau ou les phanères. Le rayonnement gamma est la principale source d'exposition externe, car les autres types de rayons ont un rayon d'action assez court et peuvent être arrêtés par les vêtements avant d'atteindre la peau. Lors des accidents nucléaires de Tchernobyl et de Fukushima-Daiichi, des rejets de Césium 137 (émetteur alpha) dépassant les 600.000 Bq/m² ont été mesurés sur respectivement plus de 13.000km² et 600km².

I.2 Effets des rayonnements ionisants sur les organismes vivants

I.2.1 Vers la compréhension des effets des faibles doses

Si les cellules n'arrivent pas à se réparer correctement, les effets néfastes sur la santé induits par les radiations ionisantes sont divisibles en deux catégories : les effets stochastiques et les effets déterministes (Figure 4).

Les effets déterministes (ou réactions tissulaires) sont directement liés à la dose de rayonnements et ont un seuil de déclenchement (Choudhary, 2018). Les effets déterministes sont caractérisés par un taux de mort cellulaire important, engendrant des dysfonctionnements d'organes, des malformations, des hémorragies, des brûlures, la stérilité ou la cataracte.

Les effets stochastiques n'ont pas de seuil de déclenchement, mais la probabilité d'apparition, et non la gravité, augmente avec la dose reçue. Les plus répandus sont l'apparition de cancers ou d'effets héréditaires, pouvant survenir plusieurs dizaines d'années après l'exposition. Les effets stochastiques sont plus importants pour les expositions à de faibles doses (mGy) ou à long terme (chronique), voire sur plusieurs générations, alors que les effets déterministes dominent les expositions à de fortes doses de rayonnements ionisants (Gy).

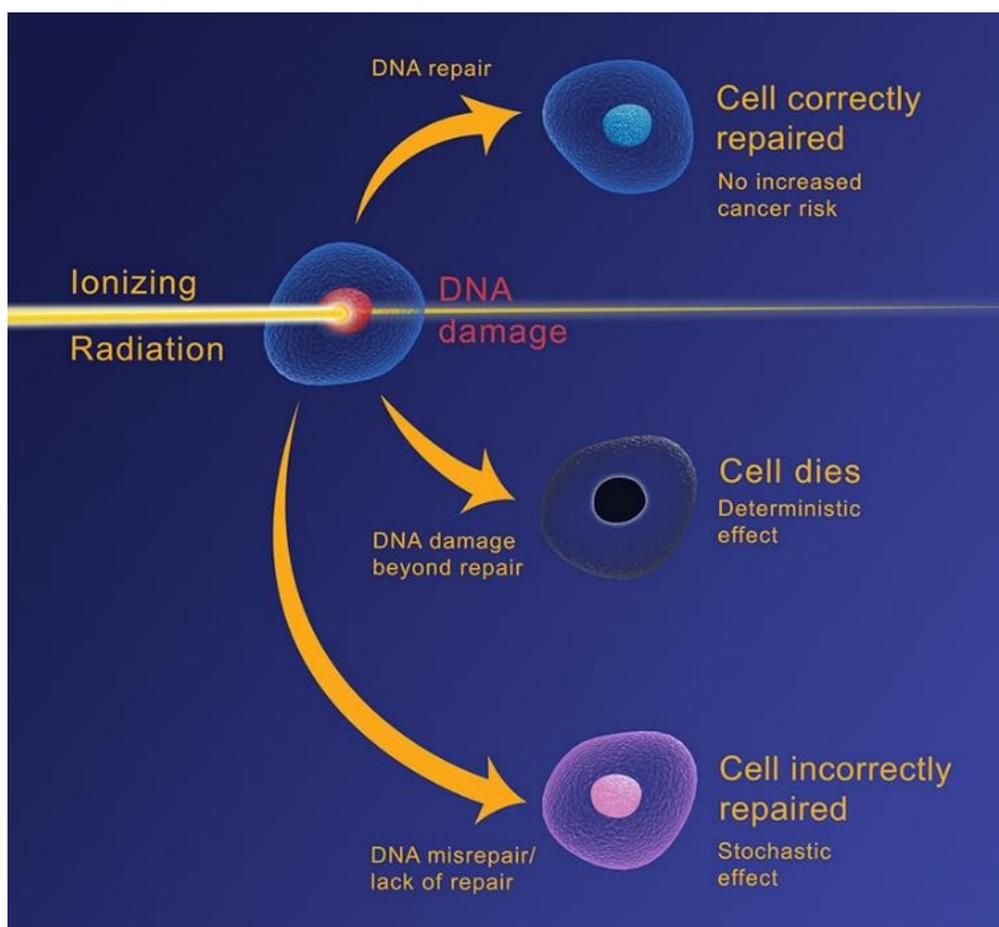


Figure 4 - Effets stochastiques et déterministes des RI à l'échelle cellulaire.

Source : nuclearsafety.gc.ca

Le modèle linéaire sans seuil, basé sur le principe que n'importe quelle dose puisse entraîner un effet néfaste proportionnellement à la dose reçue, comme un cancer ou une modification génétique, a été largement adopté par les instances internationales de radioprotection et la mise en place de recommandations, mais est largement remis en cause dans le domaine des faibles doses (Tubiana et al., 2006). En effet, la relation directe entre dose et cassures double brin de l'ADN ne fonctionne pas pour des doses faibles (MotherSill & Seymour, 2012). De plus, ce modèle ne tient pas compte des différences importantes entre exposition chronique et exposition aiguë, ni des effets non ciblés. Ces deux composantes ont largement démontré qu'elles avaient un impact important sur la mécanistique et l'apparition d'effets stochastiques. **Dans le domaine des faibles doses, les études mécanistiques sont nécessaires pour améliorer la compréhension entre événement déclencheur et lien causal à l'apparition d'effets néfastes.**

Même si la radioprotection de l'homme a prévalu sur la radioprotection de l'environnement jusqu'au début du XXI^e siècle, plusieurs programmes de recherche ont par la suite mis en lumière des différences de sensibilité importante entre les espèces non humaines exposées à des doses chroniques de RI. Une méta-analyse des données issues de FREDERICA (base de données permettant de rendre disponibles les études de radiotoxicité sur les espèces non humaines ; (Copplestone et al., 2008)) montrent que la radiosensibilité des espèces varie de plus de 6 ordres de grandeur et que des effets délétères sont mesurés à des débits de doses faibles (à partir de 5 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) (Garnier-Laplace et al., 2013). La base de données FREDERICA illustre également un nombre beaucoup plus important de données sur l'irradiation aiguë alors que l'irradiation chronique semble plus dommageable à une même dose (Dhakal et al., 2021). **Ces données justifient les efforts engagés pour améliorer la compréhension des effets des faibles doses et de l'exposition chronique, dans le cadre de la radioprotection de l'homme et de l'environnement.**

I.2.2 Mécanismes d'actions

I.2.2.1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparations.

Les radiations ionisantes sont énergétiques et pénétrantes, leur permettant d'affecter la matière biologique pour conduire à l'excitation ou à l'ionisation des atomes des biomolécules (Desouky et al., 2015). Les dommages à l'ADN sont les plus étudiés et comprennent les altérations de bases et de sucres, les pontages avec l'ADN, les cassures simples et doubles brins (Thompson, 2012). Les lésions de l'ADN les plus étudiées sont :

- Les cassures simples et doubles brins de la double hélice : la fréquence des cassures simples brins est de 500 à 1000 / cellule / Gy, en fonction du transfert d'énergie linéique TEL. Des simples liaisons opposées se forment dans un ou deux spires de la double hélice d'ADN engendrent des cassures doubles brins. Pour les cassures doubles brins, on estime les cassures à 40 / cellule / Gy. Les cassures doubles brins induisent les effets les plus délétères pour la cellule, car elles sont plus difficilement réparables et peuvent conduire à une mort cellulaire. De plus, ces lésions peuvent induire carcinogenèse et mutagenèse, aberration chromosomique, et perte d'information génétique. Depuis quelques années, les efforts de recherche se concentrent également sur les autres types de lésions de l'ADN ainsi que sur des sites spécifiques d'accumulation des lésions ("DNA

clustered damaged sites"), étant définis comme des sites ayant au minimum deux types de lésions sur moins de deux tours de la double hélice d'ADN. Ces sites sont considérés comme une signature spécifique des RI (Shikazono et al., 2009).

- Les pontages : ils résultent de la création de liaisons covalentes non physiologiques entre l'ADN et l'ADN ou entre l'ADN et d'autres protéines comme les histones ou certains récepteurs (Barker et al., 2005). Ces protéines piégées, où les liaisons ADN-ADN, constituent des obstacles importants pour la réplication et l'accès de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle, pouvant être potentiellement létales pour la cellule. Fait intéressant, les liaisons ADN-protéine issues des RI sont promues en l'absence d'oxygène alors que les cassures doubles brins sont retardées (Frankenberg-Schwager, 1990). Cette dernière information est pertinente dans le cadre de la radioprotection et de la radiothérapie pour limiter les dommages liés à une exposition aux rayonnements ionisants (Lomax et al., 2013).
- Les altérations de bases : la principale cause des altérations est l'ajout d'un radical libre OH sur une double liaison des bases. Ces altérations conduisent à une déstabilisation de la structure de l'ADN qui ne présente plus une topologie fonctionnelle sur les sites touchés. Un grand nombre de bases modifiées sont générées, qu'elles soient stables ou instables. Les bases instables vont se dégrader, libérant des espèces réactives dans le milieu pour tendre vers un état plus stable, mais entraînent une potentielle perte de fonctionnalité. On estime qu'une trentaine de bases ont une capacité mutagène ou cytotoxique (Cadet et al., 1999). De plus, les altérations des bases peuvent conduire à la présence de site abasique, produit par hydrolyse spontanée ou par l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Les espèces dotées d'une plus grande quantité d'ADN sont plus radiosensibles, car la densité linéaire de cassures double brin par Gy est similaire entre les organismes (Adam-Guillermin et al., 2018). Néanmoins, la sensibilité de l'ADN peut varier en fonction du degré de compaction de l'ADN, ainsi que de barrières autour de la cellule (paroi, cuticule). À titre d'exemple, il a été observé chez *Deinococcus radiodurans* qu'un nucléoïde hautement condensé pouvait limiter la dispersion des fragments d'ADN induits par l'irradiation et donc faciliter la réparation de l'ADN (Cox & Battista, 2005). Les conséquences des RI sur l'ADN vont dépendre de l'efficacité des points de contrôle et des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Les points de contrôle en G1, avant d'entrer en phase S ainsi qu'en G2, avant la mitose, ont la capacité de bloquer l'avancée de la cellule dans son cycle cellulaire pour lui laisser le temps de se réparer. Les voies de réparation régissent l'efficacité d'un organisme à résister aux dommages à l'ADN et donc sa radorésistance. Elles forment un réseau complexe de circuits moléculaires qui détectent et réparent des formes spécifiques de dommages à l'ADN (Figure 5a.b) (I. Vitale et al., 2017). Leur action aboutit à la réparation de la cellule, à la tolérance ou à l'inactivation permanente via la sénescence ou la mort cellulaire. Les principaux mécanismes de réparation de l'ADN sont :

- La réparation par excision de base (BER) permet la réparation des sites abasiques, des lésions légèrement déformantes, des cassures simples brins.

- La réparation par excision de nucléotides (NER) agit sur un grand nombre de lésions déformantes telles que les pontages, ou adduits, ou les dimères de thymine (T-T).
- La réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) agit sur les petites insertions et délétions ainsi que les mésappariements base-base. C'est également une ligne de défense contre les erreurs de réplication.
- La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) est le principal mécanisme de réparation des cassures doubles brins. Ce mécanisme ne restaure pas la séquence initiale, car il n'a pas de brin matrice, mais permet la continuité de l'ADN endommagé. Il génère des modifications de la séquence d'ADN, principalement des délétions, aboutissant à la création de mutations.
- La recombinaison homologue (HR) est un système de réparation des cassures doubles brins, sans erreur grâce à l'utilisation d'ADN homologue comme la chromatide sœur, fonctionnant dans les phases S et G2 du cycle cellulaire. Ce processus aboutit également à l'échange d'information entre les chromosomes parentaux lors de la méiose.
- La synthèse des translésions (TLS) contourne les lésions de l'ADN qui bloquent la machinerie de réplication lorsque la fourche arrive à leur niveau. Ce processus permet d'augmenter la tolérance aux dommages à l'ADN.

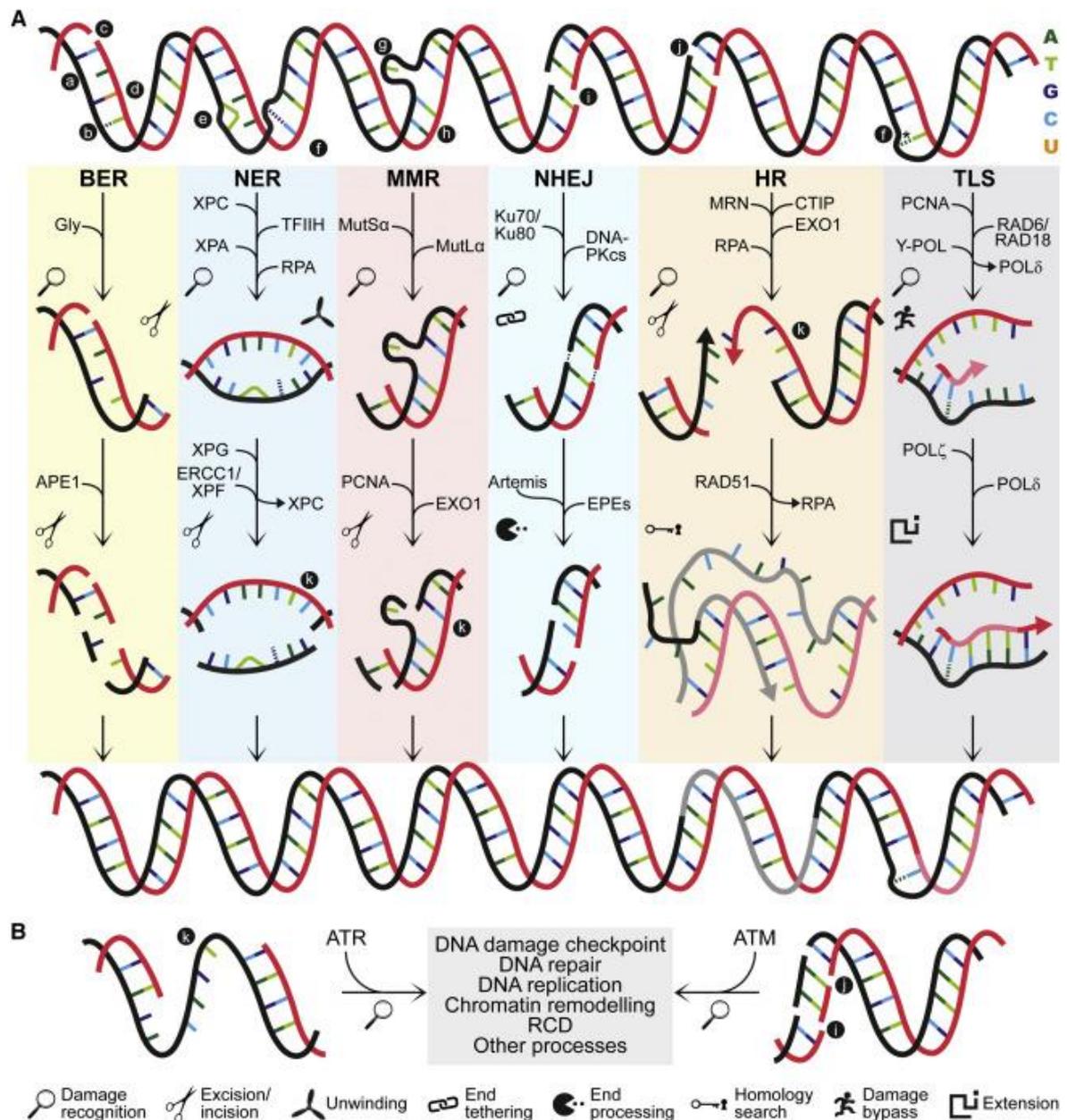


Figure 5 - (a) Principaux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN chez l'homme. (b) Principales voies de transduction du signal impliquées dans le maintien de l'homéostasie nucléaire. *Source : Vitale et al., 2017. (RCD : regulated cell death ; EPE, end-processing enzyme ; Gly, glycosylase ; MRN, MRE11-RAD50-NBS1 ; POLd, polymerase d ; POLz, polymerase z ; Y-POL, Y-family polymerase.)*

Chez *C. elegans*, les mécanismes de réparation les plus utilisés, en cas de stress génotoxique, regroupent la réparation par excision de base, la réparation des mésappariements, la jonction d'extrémité non homologue et la recombinaison homologue (O'Neil, 2006). L'augmentation des dommages à l'ADN conduit à une augmentation de la probabilité d'erreur de réparation et donc de mutations chez les organismes soumis à un stress génotoxique.

1.2.2.2 Effets directs, indirects via la radiolyse de l'eau ou non ciblés des radiations ionisantes

L'action des rayonnements ionisants peut se faire de façon directe ou indirecte (Figure 6a). L'action directe correspond à un dépôt d'énergie sur les biomolécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides, perturbant la structure moléculaire et induisant des dommages pouvant aboutir à la mort cellulaire. Les cellules endommagées peuvent également survivre, se réparer et/ou entraîner des mutations aboutissant à des pathologies telles que le cancer. C'est le principal processus mis en cause lors d'effets délétères causés par des radionucléides à haut TEL (Lomax et al., 2013). Pendant des années, le dogme central de la radiobiologie considère que les effets directs sur l'ADN étaient la cause principale des effets génotoxiques des rayonnements ionisants. Aujourd'hui, il est largement démontré que la contribution de l'effet indirect est importante dans le cadre d'expositions à de faibles doses de rayonnements ionisants. De plus, pour les rayonnements à faibles TEL, tels que le rayonnement gamma, l'action indirecte est prépondérante et représente 80% des effets biologiques (Sutherland et al., 2000).

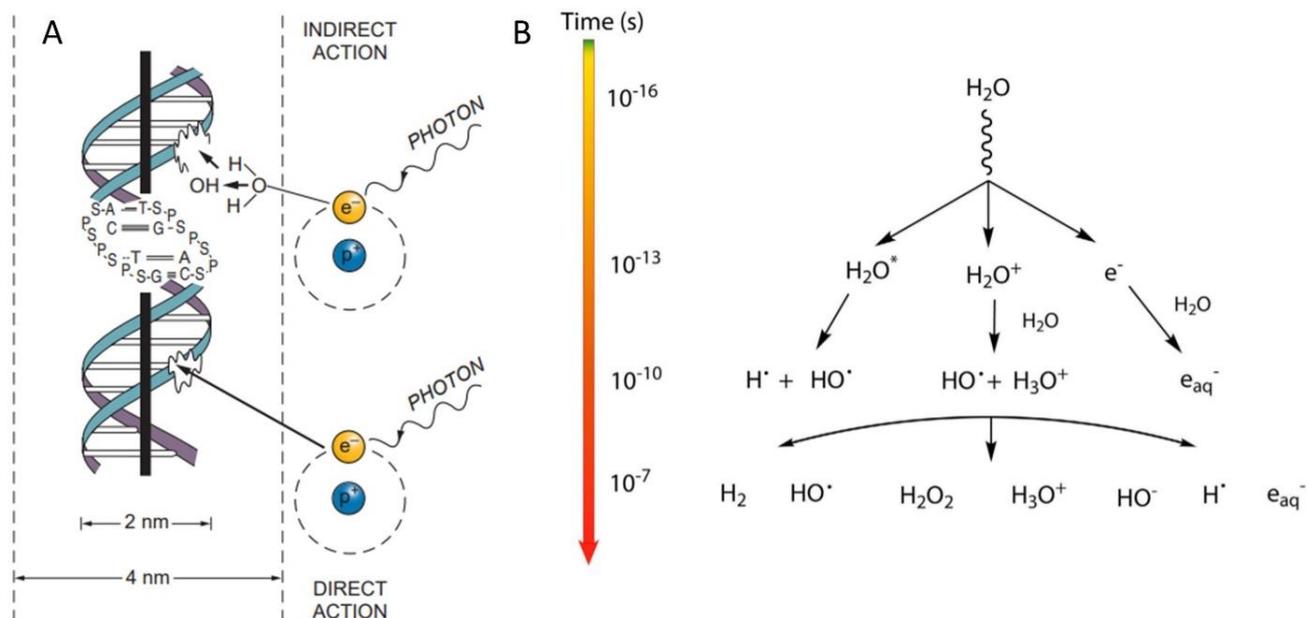


Figure 6 - (a) Effets directs et indirects des rayonnements ionisants. (b) Production de radicaux libres par radiolyse de l'eau. *Source : Lousada et al., 2016*

Les RI peuvent endommager les macromolécules par une action indirecte qui correspond à la radiolyse de molécules d'eau, le principal constituant des cellules, entraînant la production de radicaux libres (ROS) (Figure 6b). Les radicaux libres sont caractérisés par un électron non apparié dans leur structure, rendant le composé très réactif vis-à-vis des biomolécules pour leur arracher un électron et se stabiliser. L'exposition aux RI entraîne la génération de radicaux libres en quelques millisecondes,

mais va pouvoir perdurer pendant des heures ou des jours à cause de la perturbation du métabolisme endogène des ROS (Spitz et al., 2004; Choi et al., 2007)(Figure 7). L'augmentation des radicaux libres et du stress oxydatif va augmenter la charge oxydative de la cellule, affecter la signalisation cellulaire et entraîner des dommages aux biomolécules (Sarsour et al., 2009). Si la charge oxydative n'est pas contrôlée, l'altération de l'ADN peut entraîner la mort cellulaire ou des lésions biologiques jusqu'à plusieurs décennies après l'irradiation. De plus, des modifications génétiques et épigénétiques peuvent être impliquées dans l'évolution de ces lésions (Koturbash et al., 2008).

La majorité des dommages aux acides nucléiques proviennent du radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$, générant notamment des 8-hydroxypurines, un des signes caractéristiques de l'effet génotoxique d'une irradiation (Svoboda & Harms-Ringdahl, 2005). De plus, d'autres radicaux libres endogènes sont formés, comme les radicaux peroxydes, entraînant la peroxydation des lipides aboutissant à une perméabilité membranaire et à la perturbation des gradients ioniques, pouvant entraîner la mort de la cellule ainsi que la propagation des effets aux cellules adjacentes (Corre et al., 2010). En plus de l'oxydation des lipides, les RI peuvent également modifier l'expression des protéines, via la modification de l'expression génique ou l'oxydation des protéines (Dubois et al., 2019).

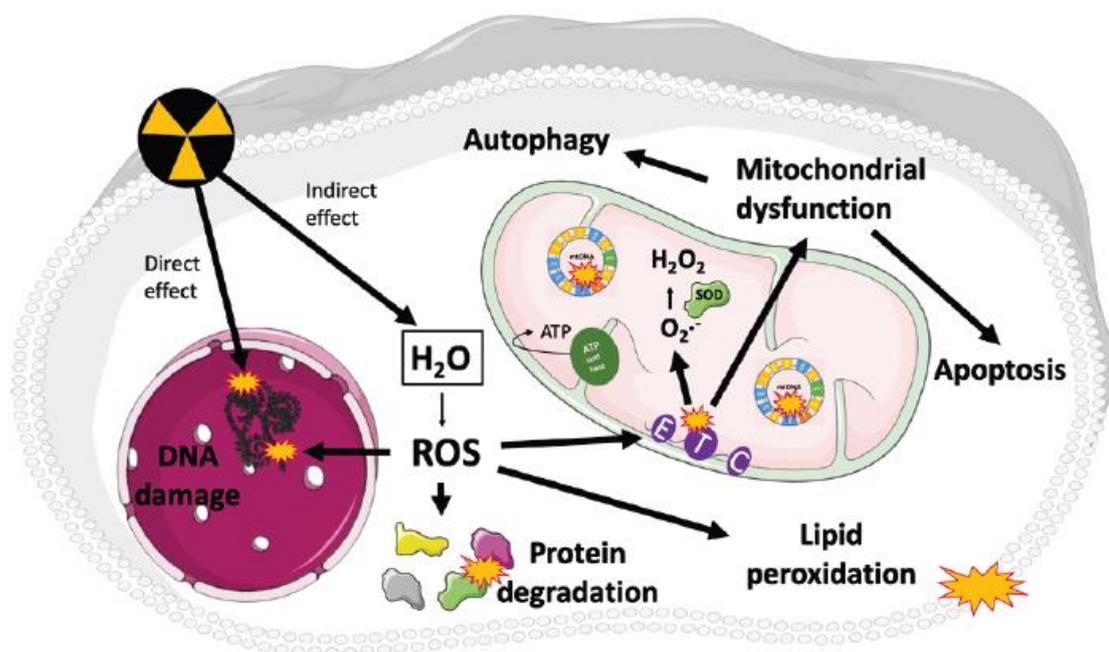


Figure 7 - Effets cellulaires principaux des RI. Source : adapté de Maremonti et al 2020

Les effets de l'irradiation ont longtemps été expliqués en partant du postulat que les effets délétères des radiations ionisantes, comme les mutations, étaient dus à des dommages sur des cibles cellulaires. Néanmoins, cette théorie est remise en cause par le fait que les radiations peuvent induire des mutations dans le noyau de cellules adjacentes, non soumises à l'irradiation, et donc des effets non ciblés (Kadhim et al., 2013). La première catégorie d'effets non ciblés regroupe les effets de proximité (ou bystander) qui sont induits pas des signaux de dommages des cellules adjacentes irradiées aux cellules non irradiées. La deuxième catégorie est l'instabilité génomique induite par les

rayonnements qui peut apparaître dans les cellules descendantes de cellules irradiées, après de nombreuses divisions et présentent une augmentation du taux de mutation, mais également une modification de l'expression génique, ou des aberrations sur la structure des chromosomes (Maxwell et al., 2008). De plus, l'instabilité génomique est également liée à des différences dans le processus d'apoptose, ou les cellules présentant des dommages à l'ADN peuvent continuer à se diviser.

Pour conclure sur cette partie, il est important de prendre en considération que les effets des RI sur le vivant vont dépendre de plusieurs paramètres : le type de radionucléides, la dose et la durée de l'exposition à une source de RI, l'espèce et le stade de vie ainsi que le type d'exposition (aiguë ou chronique). La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires, induisant des modifications phénotypiques, est importante pour comprendre et donc prédire les effets néfastes des radiations ionisantes aux échelles de l'individu et des populations ainsi que pour définir des biomarqueurs sensibles associés aux effets des RI.

1.2.3 Conséquences des effets des rayonnements sur les traits d'histoire de vie.

Les principaux paramètres phénotypiques mesurés en écotoxicologie pour analyser les conséquences d'une exposition aux rayonnements ionisants sont la croissance, la morbidité, la reproduction et la mortalité. Les données de la littérature scientifique sur ces paramètres sont disponibles dans la base de données FREDERICA (Framework for ASSESSment of Environmental impact) (Woodhead, 2002). La mortalité, bien que pertinente dans le cadre d'irradiation aiguë, ne l'est pas toujours dans le cadre d'irradiation chronique à de faibles doses. Ce paramètre est notamment dépendant de la durée, du débit de dose ainsi que des stades de vie exposés. Par exemple, les organismes aquatiques de l'espèce *Artemia* sont connus pour être des espèces radiorésistantes. Néanmoins, de nombreuses études réalisées avant 2002 pour définir une dose létale à 50% étaient réalisées en exposant les stades œufs, métaboliquement inactifs et très résistants (Dallas et al., 2012). À l'inverse, d'autres espèces sont plus sensibles pendant les stades de développement ou les cellules se divisent rapidement. La morbidité regroupe l'ensemble des impacts négatifs qui peuvent diminuer l'état de santé et l'aptitude d'un organisme, sur le court ou le long terme. Ce terme regroupe notamment la respiration, la masse corporelle ou le comportement. La reproduction est un point essentiel du continuum entre les générations et représente donc l'un des effets les plus dommageables d'un contaminant, car impactant la dynamique des populations. Elle regroupe la fertilité, relative à la qualité des descendants (malformation, mutation, ...) et la fécondité, relative à la capacité de produire des gamètes sains (Coutellec & Barata, 2011). La reproduction est considérée comme le paramètre le plus radiosensible, car elle peut être altérée à des doses correspondant à moins de 10% de celles causant la mortalité (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), 1996). L'impact des RI sur la reproduction a été démontré sur les végétaux supérieurs, les poissons et les invertébrés ainsi que sur les mammifères (Real et al., 2004). Cela s'explique en partie par le fait que les cellules en division rapide, lors de la production des gamètes et du développement, sont généralement plus sensibles à l'irradiation et que l'altération du matériel génétique peut entraîner des conséquences et des anomalies sur la descendance.

Comprendre les mécanismes subcellulaires des impacts phénotypiques est une composante importante pour protéger efficacement l'homme, l'environnement et la descendance des espèces des effets néfastes des RI.

I.3 Un élégant modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*

Cette section a pour but de présenter l'organisme modèle utilisé lors de ce projet de recherche, le nématode *Caenorhabditis elegans* ainsi que ses caractéristiques biologiques utiles pour la compréhension de nos études. Nous traiterons également le développement de la lignée germinale, la spermatogenèse, la fécondation, ainsi que la voie régulant l'apoptose et la voie DAF-2/DAF-16, essentielle à la reproduction, au métabolisme et à la réponse au stress.

I.3.1 Découverte et utilisation

La grande famille des nématodes regroupe 440 milliards de milliards d'individus (4.4×10^{20}), soit 4/5 des animaux de notre planète. Cette biomasse pèse plus de 0.3 Gigatonne soit 80% du poids de l'humanité (van den Hoogen et al., 2019). En 1897, un zoologiste et botaniste français, Emile Maupas, découvre un bactériophage non parasitaire, le nématode *Caenorhabditis elegans*, dans un sol riche en humus, à l'abord d'Alger (Algérie). Bien que souvent considéré comme un nématode du sol, on le retrouve majoritairement dans de la matière végétale en décomposition, riche en bactéries. Emile Maupas réalise des croquis étonnamment précis de cet organisme. Il révèle que les cellules somatiques sont divisées et organisées en fonctions biologiques, qu'il existe des hermaphrodites contenant des oocytes, du sperme et une vulve ainsi que des mâles contenant uniquement du sperme. Plus d'un demi-siècle plus tard, ce nématode acquiert ces lettres de noblesse grâce à l'intérêt d'un des pionniers de la biologie moléculaire, Sydney Brenner. Ce biologiste vient de valider l'hypothèse que les ARNm sont lus comme des triplets et qu'une délétion ou addition d'un ou deux nucléotides crée un décalage du cadre de lecture (Brenner et al., 1965). En 1965, ce biologiste choisit d'utiliser ce modèle pour développer ses travaux d'analyse génétique. Il voit rapidement les possibilités qu'offrent *C. elegans* avec son cycle de vie court (3 jours à 20°C), permettant de propager rapidement les cultures et de réaliser des études génétiques et biochimiques. De plus, cet organisme est transparent, ce qui permet de réaliser des études *in situ* et d'observer le devenir et les interactions des cellules. En tant qu'organisme hermaphrodite majoritaire, il permet de maintenir facilement des lignées comportant des mutations homozygotes, et de les recombinaison avec d'autres génotypes par croisement avec des mâles. Sydney Brenner a également annoncé qu'il serait possible de caractériser l'ensemble du système nerveux (302 cellules) par microscopie électronique, une vision réalisée 20 ans plus tard (White et al., 1986).

La méthode de culture, d'isolation de mutants ainsi que les premiers phénotypes et informations génétiques furent publiés lors d'une publication princeps, aujourd'hui citée plus de 15 000 fois (Brenner, 1974). Son travail sur *C. elegans* lui permit d'obtenir le prix Nobel de médecine en 2002, pour ses avancées dans le domaine de la régulation génétique du développement et de la mort cellulaire programmée, ou apoptose (Verma, 2002). Aujourd'hui, les biologistes voient en ce modèle bien plus qu'un nématode croisé dans les environs d'Alger, mais bien une fenêtre transparente sur la biologie, faisant l'objet de plus de 1200 articles scientifiques par an (Corsi et al., 2015). En 1997, *Caenorhabditis elegans* fut le premier organisme métazoaire à avoir son génome

totalemment séquencé, lequel s'est révélé être composé de 97 millions de paires de bases codant pour plus de 19 000 gènes. Plus d'un tiers des gènes ont des homologues chez l'homme, démocratisant l'utilisation de ce ver en biologie médicale et en toxicologie (Khabib et al., 2022; McKay et al., 2003).

***C. elegans* est aujourd'hui un modèle répandu dans le cadre de l'étude du développement et de la polarité cellulaire, du vieillissement, des maladies métaboliques, de l'épigénétique, et du système nerveux.**

I.3.2 Caractéristiques, culture et cycle de vie

C. elegans est un nématode dont les larves mesurent 0,25 millimètre à l'éclosion pour atteindre 1mm à l'âge adulte. Il est observable grâce à un stéréo microscope optique, également appelé microscope à dissection ou loupe binoculaire, pouvant grossir jusqu'à X100 (Figure 8a). L'utilisation d'un microscope confocal ou de la microscopie électronique permet de réaliser des observations beaucoup plus fines sur ce nématode transparent, permettant de répondre à des questions sur le développement et le rôle d'une cellule. De plus, l'utilisation de protéines fluorescentes pour suivre les protéines, l'expression d'un gène ou visualiser les compartiments cellulaires est aisément réalisable (Figure 8b). La microscopie à contraste interférentiel (Nomarski *Differential interference-contrast microscopy*) est également utilisable pour observer les cellules de ce nématode transparent. Ces différentes techniques ont été utilisées dans le cadre de ce projet de recherche pour cultiver, observer et mesurer différents paramètres comme l'activation des spermatozoïdes (binoculaire puis confocal), le nombre de spermatozoïdes (marquage puis apotome), ou l'activation de facteurs de transcription (confocal).

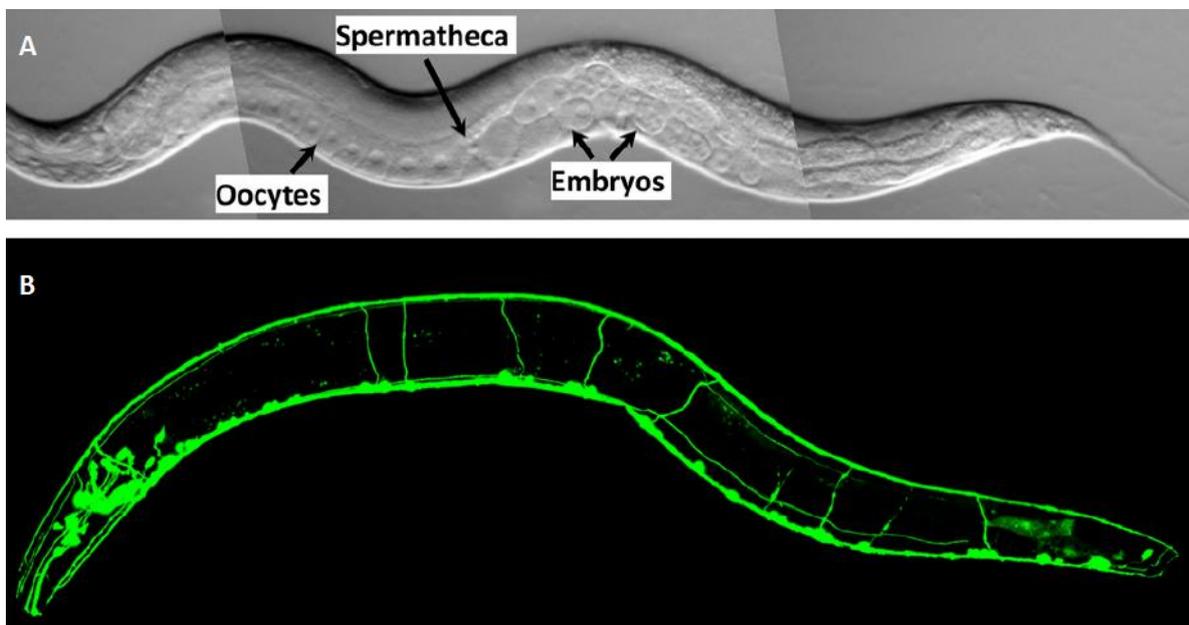


Figure 8 - (a) Observation de *C. elegans* au microscope optique (b) et au microscope à fluorescence sur une souche reportrice *sto-6:GFP*. Source : Corsi et al., 2015

Sa culture est réalisée sur des boîtes de pétriensemencées de *E. coli* ou en culture liquide dans des conditions de température contrôlées (Stiernagle, 2006). Dans le cadre de ce projet, la culture sur boîte de pétri a été très majoritairement utilisée. *C. elegans* est un organisme majoritairement hermaphrodite en condition de culture normale, même si

des mâles peuvent apparaître spontanément dans les cultures à une fréquence de 0,2%. En condition de stress, la proportion de mâles peut augmenter dans le but de préserver la diversité génétique de la population. Un organisme hermaphrodite auto fertile présente l'avantage de produire des spermatozoïdes et des oocytes. Un *C. elegans* hermaphrodite produit environ 300 descendants, le facteur limitant étant le nombre de spermatozoïdes. Cette caractéristique permet de maintenir les mutations homozygotes, mais également d'obtenir des populations isogéniques et de réaliser des études multi et transgénérationnelles en limitant drastiquement la dérive génétique (Baugh & Day, 2020).

Le cycle de vie de *C. elegans* hermaphrodite se caractérise par 4 stades larvaires (L1 à L4) avant d'atteindre la maturité sexuelle (Byerly et al., 1976). À 20 degrés, le cycle de vie est réalisé en 3 jours, permettant de travailler relativement rapidement sur des études multigénérationnelles (Figure 9). L'embryogenèse dure de 10 à 12h à 20°C puis les embryons sont pondus avec 558 cellules, avant de devenir une larve de premier stade larvaire (L1). Entre chaque stade larvaire durant entre 8 et 12h, une étape d'inactivité et d'arrêt de la division cellulaire est dédiée à la mue ainsi qu'à la formation de la nouvelle cuticule. Un des avantages de *C. elegans* et qu'après traitement des hermaphrodites avec une solution hypochlorique alcaline, il est possible d'isoler les embryons, ce qui représente un avantage indéniable pour synchroniser les populations et réaliser de nouvelles cultures. En cas de jeûne ou de stress intense, les larves de stade L1, peuvent entrer dans une phase de vie au ralenti, appelé diapause, et stopper leur croissance normale. Les larves peuvent rester dans ce stade de résistance pendant plus de 4 mois. Ce stade est dénommé Dauer, ce qui signifie dormance ou durée en allemand. *C. elegans* a également un stade de diapause reproductive au stade adulte, lui permettant, en cas de manque de nourriture, de retarder leur période de reproduction et d'étendre leur durée de vie. Durant cette période, l'ensemble de la lignée germinale entre en apoptose et ne conserve qu'une petite population de cellules souches germinales, capables de régénérer l'ensemble de la gonade germinale quand les conditions redeviennent favorables (Angelo & Van Gilst, 2009). L'étude des stades de résistance a permis d'élucider de nombreux mécanismes influençant le vieillissement.

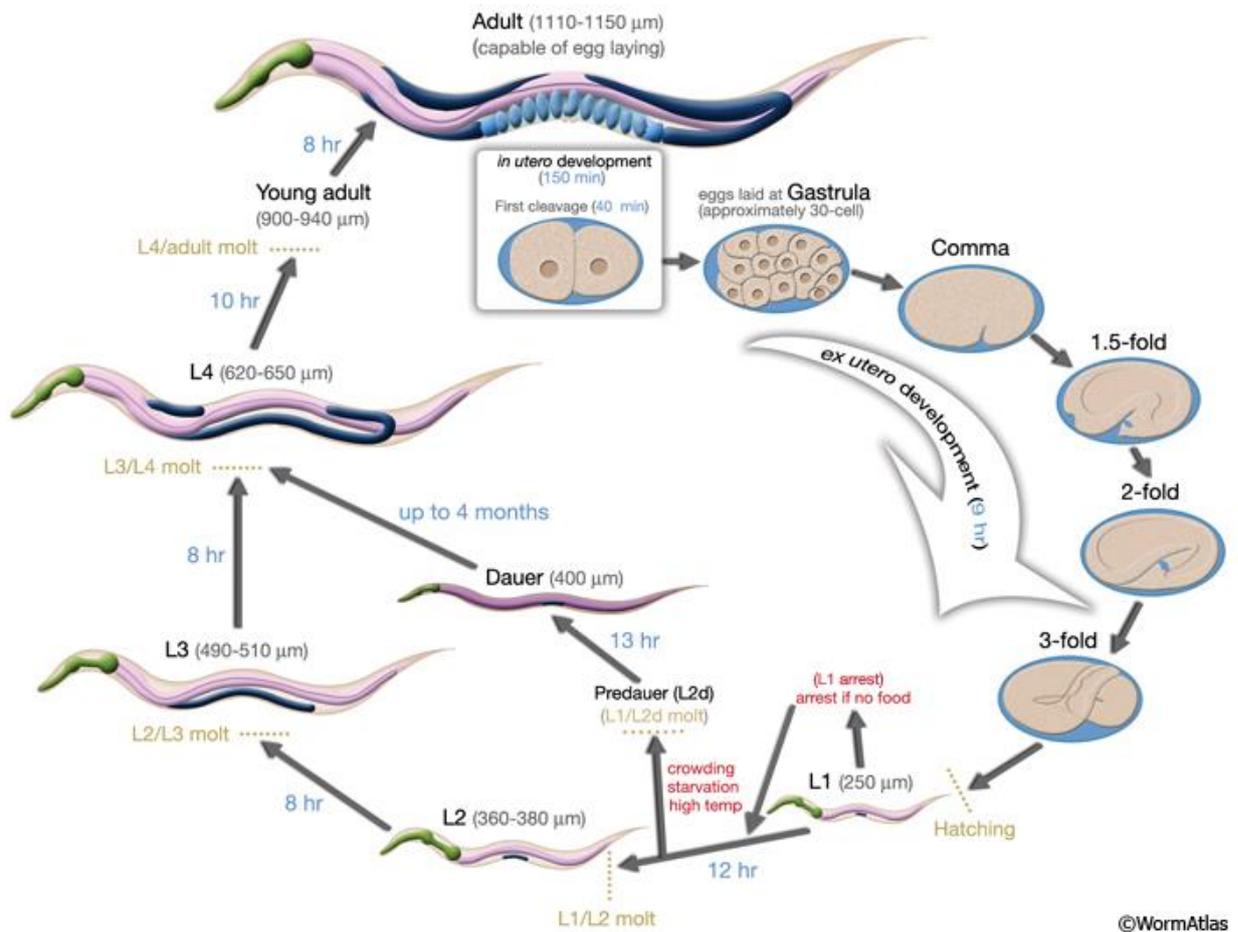


Figure 9 - Cycle de vie de *C. elegans* à 20°C. Source : www.wormatlas.org

Un des nombreux avantages de *C. elegans* est que son développement cellulaire est parfaitement défini, du zygote au stade larvaire. En effet, au cours de l'embryogenèse, 671 cellules sont générées puis 113 subissent une mort cellulaire programmée (111 chez le mâle). La lignée embryonnaire est invariante et va donner naissance aux différentes cellules et tissus composant le nématode à l'âge adulte. Au fil des années, les chercheurs ont pu suivre le devenir de chaque cellulaire et établir une cartographie précise du devenir de chaque cellule (Sulston et al., 1983). Un adulte hermaphrodite est composé de 959 cellules somatiques ainsi que de 1000 à 2000 cellules germinales. Ce nombre quasi invariant de cellules le qualifie d'organisme quasi eutelique. Dans le cadre de notre projet, l'impact de la lignée germinale est un point central des dommages des RI. Nous allons donc préciser le fonctionnement de la gonade de *C. elegans* ainsi que son développement. En effet, les périodes de prolifération cellulaire rapide sont connues pour être sensibles aux rayonnements ionisants, un principe largement utilisé en radiothérapie (Baskar et al., 2014).

I.3.3 Le système reproducteur de *C. elegans*

Lors de l'étude d'effets générationnels, il est essentiel d'analyser le fonctionnement et l'impact d'un stress sur la gonade et la reproduction. En effet, la transmission d'informations transgénérationnelles passe par les gamètes issus de la lignée germinale.

I.3.3.1 Anatomie et lignée germinale

Un point central au continuum de la vie des métazoaires à reproduction sexuée est le cycle de la lignée germinale. Tout au long du développement et du fonctionnement de la lignée germinale, le contrôle transcriptomique et épigénétique permet de finement réguler la reproduction ou de la modifier dans des conditions de stress. Depuis les années 1980, *C. elegans* est un modèle d'étude plébiscité pour les études sur la reproduction. Comme précédemment énoncé, *C. elegans* présente un dimorphisme sexuel, avec des hermaphrodites autoféconds et des mâles. Les hermaphrodites adultes possèdent deux bras de gonades en forme de U, se rejoignant au niveau de l'utérus (Figure 10b). Ils produisent environ 300 spermatides durant le dernier stade larvaire (L4) avant de passer à la production exclusive d'ovocytes (Ellis & Stanfield, 2014). Les spermatides sont stockés dans les deux spermathèques, chacune présente dans un des deux bras de gonades. La gonade est polarisée, c'est-à-dire que les cellules germinales se développent séquentiellement à partir des cellules souches de la lignée germinale, située à l'extrémité distale de la gonade. Les bras de gonade sont coiffés d'une cellule distale somatique (DTC), la cellule de niche somatique, qui va orienter le devenir des cellules de la lignée germinale vers la mitose ou la méiose. Deux voies de régulation principales permettent de contrôler le devenir cellulaire de la lignée germinale. Les cellules germinales prolifératives, proches de la DTC, ont des niveaux de signalisation GLP-1/NOTCH importants tandis que les cellules les plus éloignées ont des niveaux de régulation élevés des voies de régulation GLD-1 et GLD-2 (Figure 10d)(D. Hansen et al., 2004). La voie GLP-1/NOTCH est indispensable au maintien d'une population de cellules souches germinales et inhibe les signaux de GLD-1 dans la zone proche des DTC. Les cellules mitotiques les plus éloignées de la DTC peuvent passer en méiose et suivre les 5 étapes de réarrangement de la chromatine de la prophase I, du leptotène jusqu'à la diacinèse pour produire des ovocytes (Figure 10c)(Kimble, 2005).

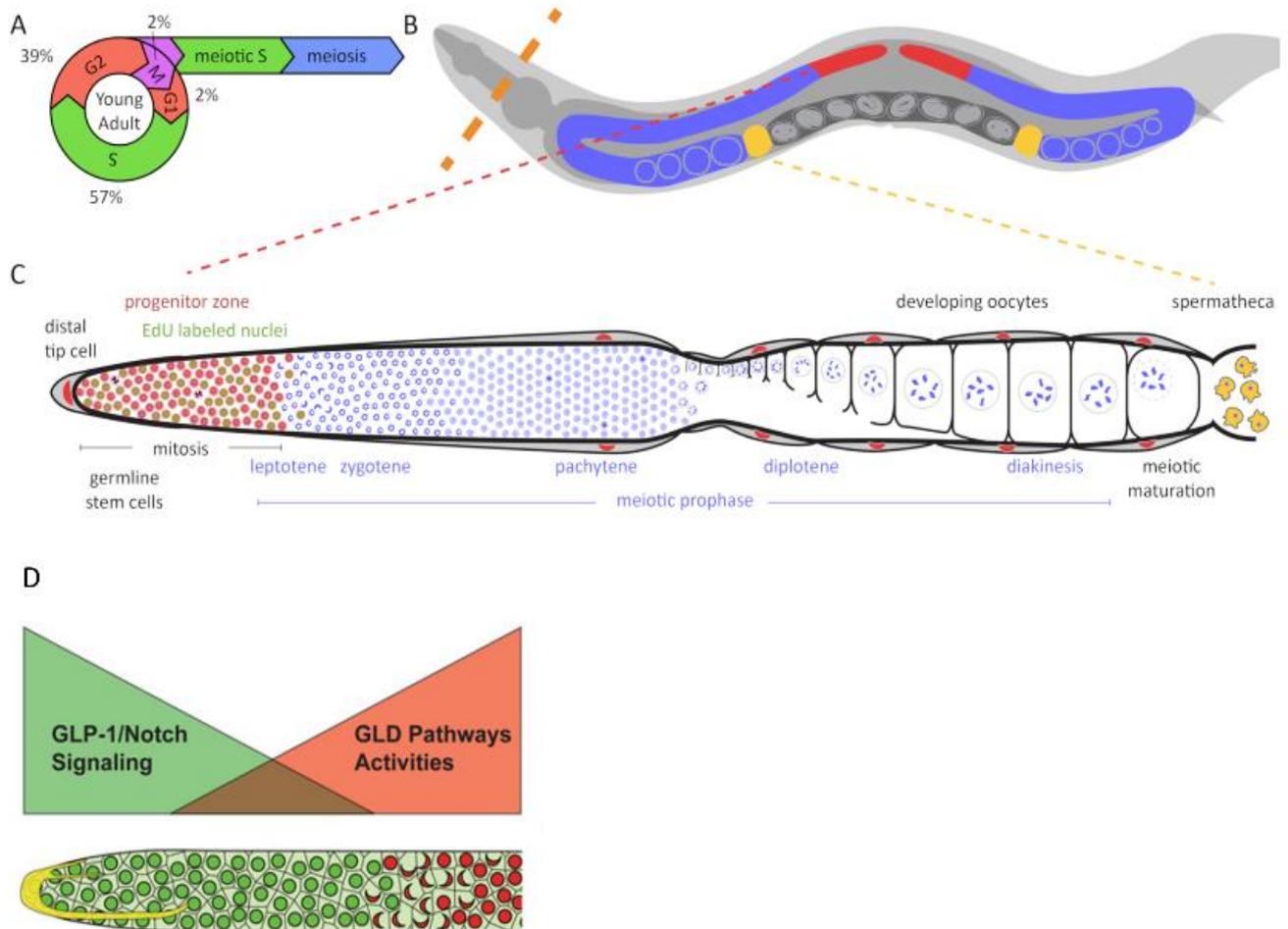


Figure 10 - Schéma de la lignée germinale de *C. elegans* hermaphrodite. (a) Pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. (b) Schéma de la lignée germinale avec la gonade (rouge et bleu), la spermathèque (jaune) et les embryons (gris). (c) Polarisation et segmentation de la gonade. (d) La signalisation GLP-1/Notch régule le niveau de GLD-1 et la transition entre mitose et méiose. *Source : Kocsisova et al., 2018.*

1.3.3.2 Développement et fécondation

Le développement de la gonade de *C. elegans* dérive d'une seule cellule : le blastomère germinatif P4, qui va initier le programme de développement de la lignée germinale, aboutissant à la production de plus de 2000 cellules germinales à l'âge adulte (Pazdernik & Schedl, 2013). Il va produire les cellules germinales primordiales Z2 et Z3, qui vont s'associer avec les précurseurs de la gonade somatique (Z1 et Z4) lors du stade larvaire L1 (Figure 11a). Ces cellules vont se diviser pour former les cellules distales (DTC) et les cellules de la gonade somatique. Avant le stade L3, toutes les cellules sont en mitoses. À partir du début du stade L3, les cellules les plus éloignées des DTC arrêtent de proliférer pour entrer en méiose et progresser au sein de la prophase méiotique (Figure 10c). Environ 37 cellules par bras de gonade passent en méiose durant ce stade pour former des spermatoocytes primaires, qui vont se détacher du rachis pour aboutir à la formation de 300 spermatoïdes haploïdes durant le stade L3/L4. Par la suite, lors du stade

L4 puis durant l'âge adulte, les cellules germinales passant en méiose deviendront des oocytes (Kuwabara & Perry, 2001). Lors de la fécondation, l'ovocyte le plus proche de la spermathèque est stimulé pour maturer par des protéines issues des spermatozoïdes, les « major sperm proteins » (MSP) (Figure 11b). La maturation de l'ovocyte entraîne la dilatation de la spermathèque. Les MSP et la maturation des ovocytes favorisent l'ovulation et les contractions pour faire passer l'ovocyte mature dans la spermathèque. Immédiatement fécondé, l'embryon nouvellement formé passe ensuite dans l'utérus, avant d'être pondu via la vulve. La spermathèque de chaque bras de gonade contenant 150 spermatides, la progéniture d'un hermaphrodite est composée d'approximativement 300 larves. En revanche, si un mâle féconde un hermaphrodite, la progéniture est de l'ordre de 1000 individus.

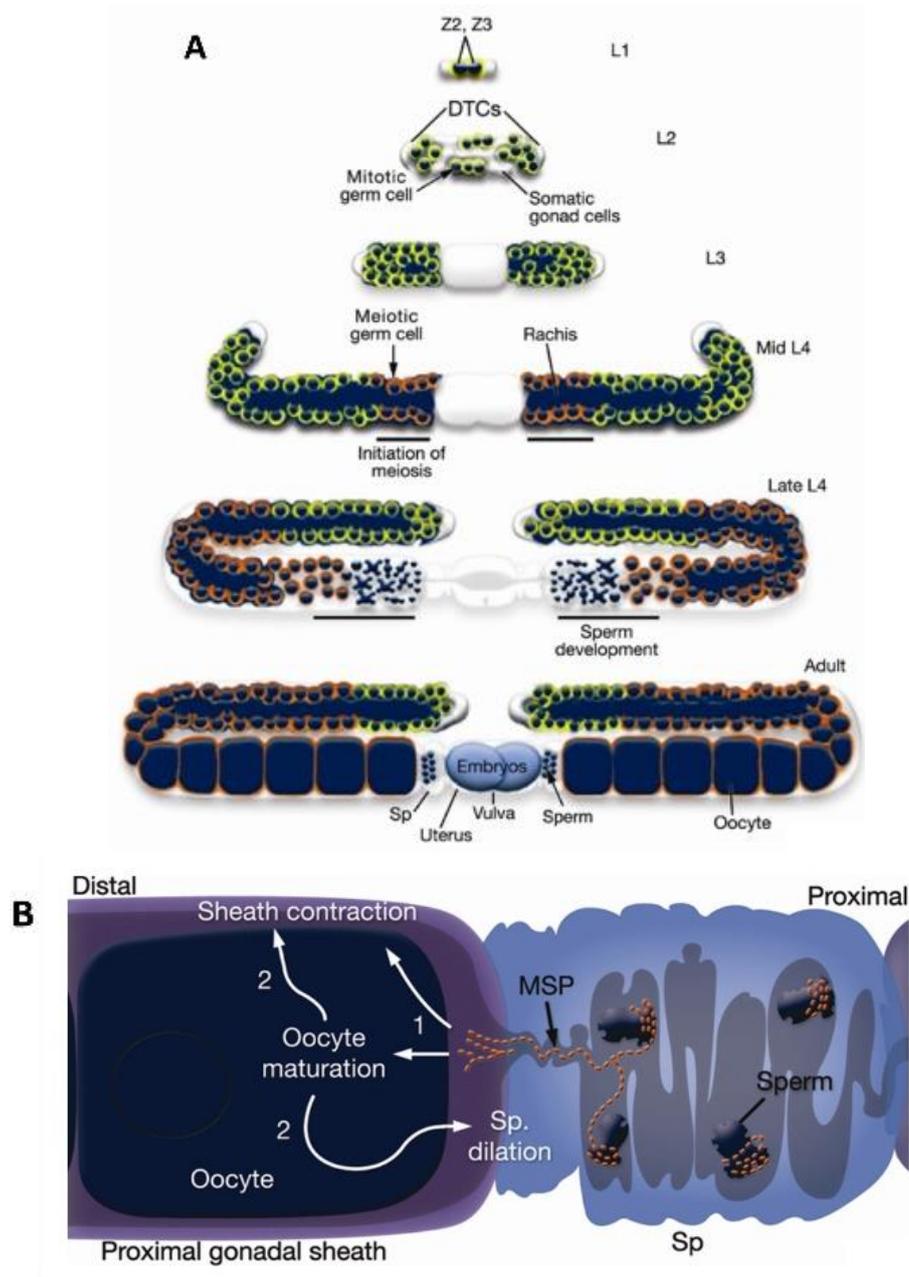


Figure 11 - (a) Développement de la lignée germinale d'un hermaphrodite. (b) Stimulation par la MSP de la fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes. *Source : www.wormatlas.org*

1.3.3 Spermatogenèse et spermiogenèse

Chez *C. elegans*, la spermatogenèse est un processus finement régulé par de nombreux gènes, dont le facteur de transcription (TF) SPE-44 et les gènes de la famille *spe* (Kulkarni et al., 2012). D'autres facteurs de transcription pléiotropiques, tels que ELT-1, essentiel au devenir des cellules de l'épiderme et de l'intestin, sont également primordiaux pour assurer la fonction de spermatozoïdes et de la spermatogenèse (del Castillo-Olivares et al., 2009). Lors de la spermatogenèse, les cellules souches spermatogoniales donnent naissance à des spermatocytes primaires, avec un noyau cytoplasmique appelé rachis (Figure 12) (L'Hernault, 2006). Les spermatocytes primaires entrent en méiose I pour donner deux spermatocytes secondaires, qui entrent à leur tour en méiose II. Une étape de division méiotique suivie d'une deuxième méiose permet la production de quatre spermatides haploïdes. Ces spermatides ronds et immobiles sont fixés au corps résiduel, nécessaire au développement et aux fonctions des futurs spermatozoïdes. Lors du bourgeonnement et de la libération des spermatides, plusieurs organites se retrouvent dans le spermatide, comme le noyau, les mitochondries, les lysosomes, ainsi que des corps fibreux et des organites membranaires (FB-MO), essentiels à l'assemblage et l'enveloppe des protéines majeures du sperme (MSP).

Lors de la spermiogenèse, un signal extracellulaire induit le processus d'activation des spermatides en spermatozoïdes, caractérisé par un réarrangement de la structure et la création d'un pseudopode (Figure 12). En effet, la membrane entourant les corps fibreux se rétracte dans les organites membranaires et les protéines majeures du sperme (MSP) se localisent près de la membrane cytoplasmique. Les MSP, dont le rôle est proche du cytosquelette d'actine chez les mammifères, polymérisent pour former un pseudopode, essentiel à la mobilité et la structure du spermatozoïde. Le noyau, les mitochondries et les autres organites membranaires sont localisés au sein du corps cellulaire.

Chez les hermaphrodites, les spermatides restent sous forme quiescentes jusqu'à l'ovulation ou ils s'activent pour devenir des spermatozoïdes. Alors que pour les ovocytes, les dommages à l'ADN et les erreurs de recombinaison conduisent à la mort cellulaire programmée, aucune apoptose ne se produit chez les gamètes mâles (Gartner et al., 2000). En effet, même si les premiers effecteurs de la voie de l'apoptose sont activés chez les spermatides, la caspase CED-3 ne s'active pas. Bien que l'apoptose ne soit pas effective, l'activation de la voie de signalisation a pour conséquence une viabilité réduite de la descendance provenant de spermatozoïdes dont la voie de l'apoptose s'est activée (Jaramillo-Lambert et al., 2010). Néanmoins, lors de la spermatogenèse, la chromatine est compactée autour de protéines spécifiques de la chromatine du sperme (SPCH) et d'un variant d'histone 2 A (HTAS-1) dans le but d'assurer une protection optimale du matériel génétique.

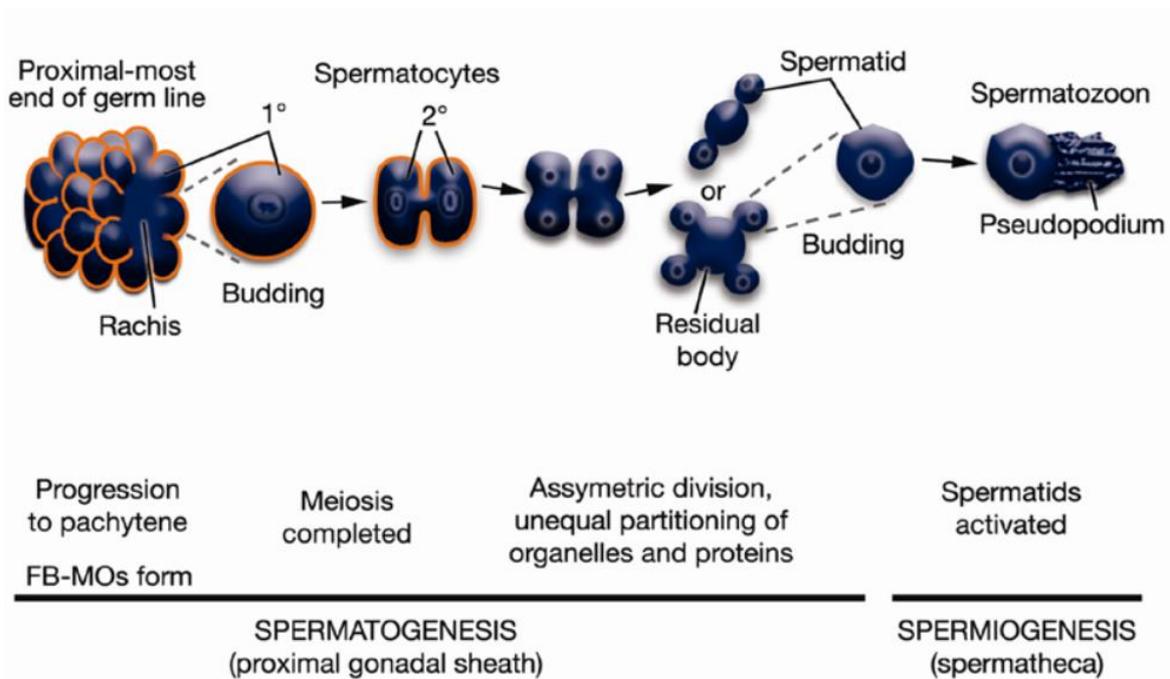


Figure 12 - Spermatogenèse et spermiogenèse chez *C. elegans*.

Source : www.wormatlas.org

1.3.3.4 Apoptose, dommage à l'ADN et arrêt du cycle cellulaire dans la lignée germinale

Les cellules germinales des gonades sont composées de cellules pluripotentes et « immortelles », pouvant se différencier en tous types de cellules de la génération suivante. Chez *C. elegans*, la lignée germinale est le seul tissu contenant des cellules souches, pouvant renouveler et reconstituer la population cellulaire de la gonade germinale (Kimble, 2005). Pour assurer une continuité multigénérationnelle des populations, les gonades assurent une régulation fine de l'intégrité des cellules germinales et des gamètes via les points de contrôle du cycle cellulaire et le mécanisme de l'apoptose. *C. elegans* est un précieux modèle pour étudier la mort cellulaire programmée, car de nombreux effecteurs sont conservés entre les espèces. Chez *C. elegans*, elle fait intervenir la machinerie apoptotique, impliquant CED-9/Bcl2, CED-4/Apaf-1 et CED-3/Caspase (Figure 13). Un des régulateurs majeurs de l'apoptose physiologique est la voie MAPK/Ras, car l'apoptose est bloquée si cette voie est inhibée (Leacock & Reinke, 2006). La compréhension des mécanismes de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* a abouti à un prix Nobel de médecine en 2002. Alors que l'apoptose somatique est programmée au cours du développement, l'apoptose germinale est active durant l'ovogenèse et est localisée au niveau de l'anse des bras de gonade, entre le pachytène et le diplotène. En effet, grâce à ce processus, plus de la moitié des ovocytes créés sont éliminés pour assurer une population cellulaire saine et une descendance fonctionnelle. Pour expliquer ce taux important de mort cellulaire, le modèle des cellules « infirmières » est largement plébiscité par la communauté scientifique (Gumienny et al., 1999). En effet, il semble qu'un nombre de cellules germinales meurt par apoptose pour fournir des composants cytoplasmiques aux ovocytes en formation, ayant besoin de composés pour grandir. À contrario, les spermatides ne subissent pas d'apoptose, tous les noyaux peuvent former des gamètes sans être limités par le cytoplasme (Gartner et al.,

2000). L'étude de l'apoptose germinale chez *C. elegans* permet également de décrypter certains mécanismes conservés chez les mammifères. En effet, l'échange de composant cytoplasmique entre les ovocytes, l'interconnexion cellulaire durant les premiers stades de développement ainsi que la mort cellulaire pendant la transition du pachytène au diplotène font partie des processus conservés lors de la maturation de la lignée germinale de l'homme et de *C. elegans*.

La deuxième catégorie d'apoptose dans la lignée germinale n'est pas physiologique, mais s'active en réponse à un stress environnemental, une infection ou à des dommages à l'ADN. En réponse à un stress génotoxique, les cellules vont faire intervenir différents processus de réparation, d'arrêt transitoire ou définitif ainsi que de mort cellulaire pour assurer l'intégrité cellulaire. L'apoptose induite par un stress, dépendante de CEP-1/p53 et localisée dans le pachytène, est déclenchée par certains senseurs protéiques tels que MRT-2, HUS-1, CLK-2 et EGL-1. La protéine EGL-1 est un marqueur robuste de l'apoptose induite par un stress génotoxique, car elle est activée directement par CEP-1/egl-1 et est nécessaire pour induire la mort cellulaire. De plus, l'apoptose est un processus primordial dans le contrôle de la qualité des cellules de la lignée germinale (Bailly & Gartner, 2013). Une étude a montré que l'irradiation à de fortes doses de radiation ionisante (>60Gy) entraîne une augmentation de l'apoptose dans la lignée germinale d'un facteur 10 ainsi que l'arrêt de la division cellulaire (Gartner et al., 2000). Concernant l'arrêt du cycle cellulaire, Bailly et Gartner ont démontré que l'arrêt du cycle cellulaire, en réponse à un stress radiologique, se faisait principalement en phase G2 (Figure 10a). Cet arrêt est médié par l'activation de la protéine CDK-1, nécessaire à la transition de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire. **Bien que le mécanisme d'apoptose radio-induite soit démontré en réponse à de fortes doses d'irradiation, l'activation de l'apoptose, dépendante de CEP-1/p53, dans le cadre d'irradiation chronique reste à déterminer (Gartner et al., 2008).**

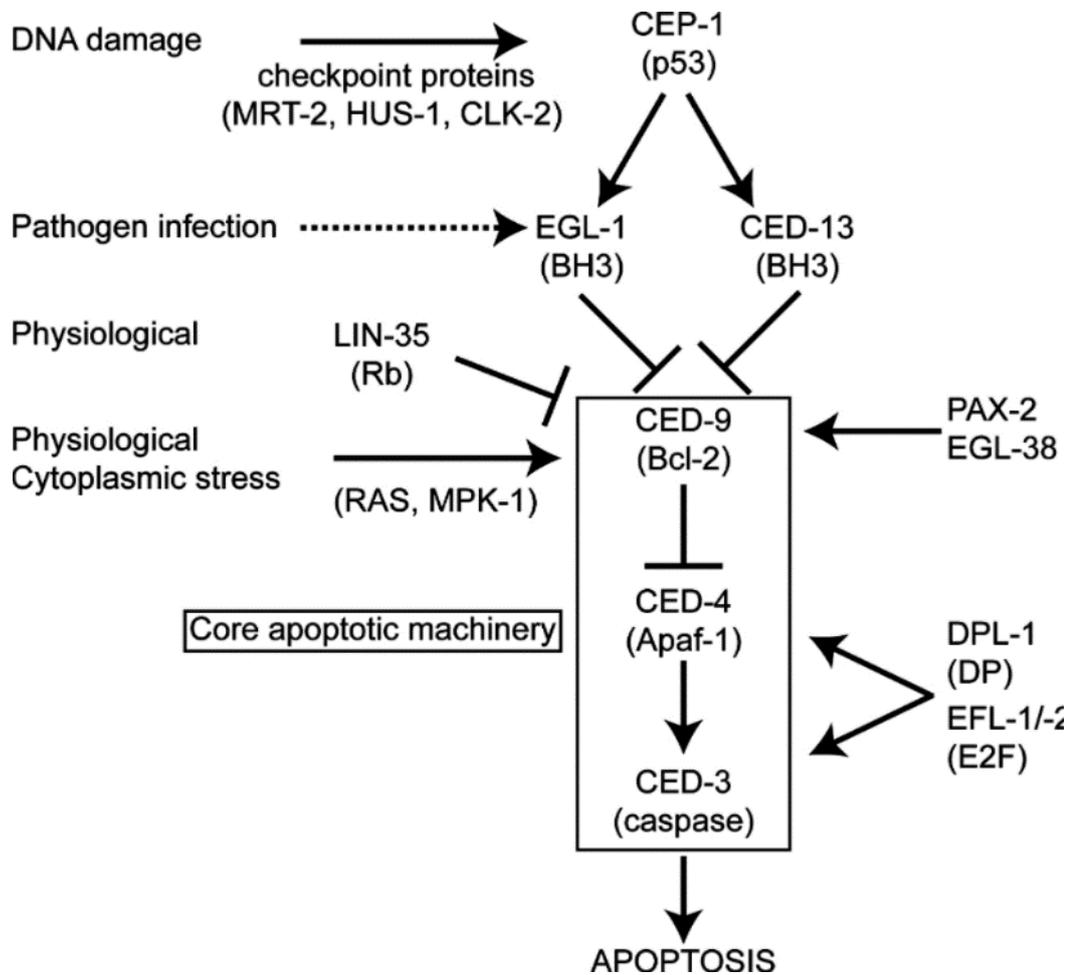


Figure 13 - Régulation de l'apoptose chez *C. elegans*. Source : Gartner et al., 2008

I.3.4 La voie du récepteur DAF-2 (Insuline/ IGF-1) /DAF-16 FOXO

I.3.4.1 Signalisation et régulation de la prolifération germinale

La voie de signalisation insuline/IGF-1 (insulin-like growth factor) est une voie centrale du métabolisme des métazoaires, dont *C. elegans* et l'Homme (G. Vitale et al., 2019). Elle contrôle la croissance, le métabolisme et la reproduction en réponse à la présence de nourriture chez les eucaryotes. Cette voie est régulée par la liaison de peptides ILPs (insulin-like peptide) sur le récepteur transmembranaire DAF-2/IGFR, induisant une cascade de régulation, dont l'activation de la kinase AGE-1/PI3K, aboutissant à l'inactivation du facteur de transcription DAF-16/FoxO (Murphy, 2013). DAF-16/FoxO est un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress, l'immunité, le développement, le métabolisme et la longévité. La signalisation DAF-2/DAF-16 interagit également avec d'autres facteurs de transcription comme HSF-1 (heat shock factor) ou SKN-1/Nrf ainsi que des « master regulateurs » comme AMPK et mTOR (Figure 14a).

Les mécanismes primordiaux de la voie DAF-2/DAF-16 ont été élucidés dans les années 90 lors de l'étude de mutants constitutifs Dauer ainsi que des mutants à longue durée de vie (Kenyon et al., 1993).

En effet, le nématode *C. elegans* a la possibilité de rentrer dans un stade de résistance, appelé stade Dauer, durant le deuxième stade larvaire si les conditions sont défavorables (température, manque de nutriments, surpopulation,). Les larves Dauer se caractérisent par une modification de leur physiologie et de leur comportement, notamment avec un épaississement de la cuticule, un stockage des acides gras ainsi qu'une immobilité. Le passage au stade Dauer nécessite l'accumulation du facteur DAF-16 dans le noyau cellulaire. L'activation de DAF-2, entraînant la localisation cytoplasmique de DAF-16, permet aux larves de réaliser un développement larvaire sans entrer en stade Dauer (Vowels & Thomas, 1992). Les mutants *daf-2* ont un passage facilité en stade Dauer alors que les mutants *daf-16* ne présentent pas de stade de résistance, même en condition défavorable (Riddle et al., 1997). En outre, les mutants *daf-2* et *age-1* présentent un phénotype d'augmentation de la longévité, là où la mutation *daf-16* induit une diminution de ce paramètre.

De plus, la signalisation DAF-2/Daf-16 est essentielle pour assurer une prolifération robuste de la lignée germinale (Michaelson et al., 2010). La prolifération et la spécification cellulaire doivent être finement régulées au cours du développement pour établir les populations de cellules souches de la lignée germinale, aboutissant à la formation de gamètes fonctionnels. La voie DAF-2/DAF-16 permet un contrôle de la prolifération germinale en régulant la transition G2/M du cycle cellulaire (Figure 10a, Figure 14b). En effet, dans des mutants *GLD-1*, enclin à développer des tumeurs germinales, où les cellules méiotiques retournent en mitose et prolifèrent considérablement, la diminution de DAF-2 et l'augmentation de DAF-16 diminuent la formation de tumeurs (Pinkston-Gosse & Kenyon, 2007). De plus, les mutants DAF-2 ont un nombre de cellules germinales prolifératives inférieures à la lignée sauvage N2. **Ces données démontrent l'importance de la régulation de DAF-2/DAF-16 dans le contrôle de la prolifération de la lignée germinale.**

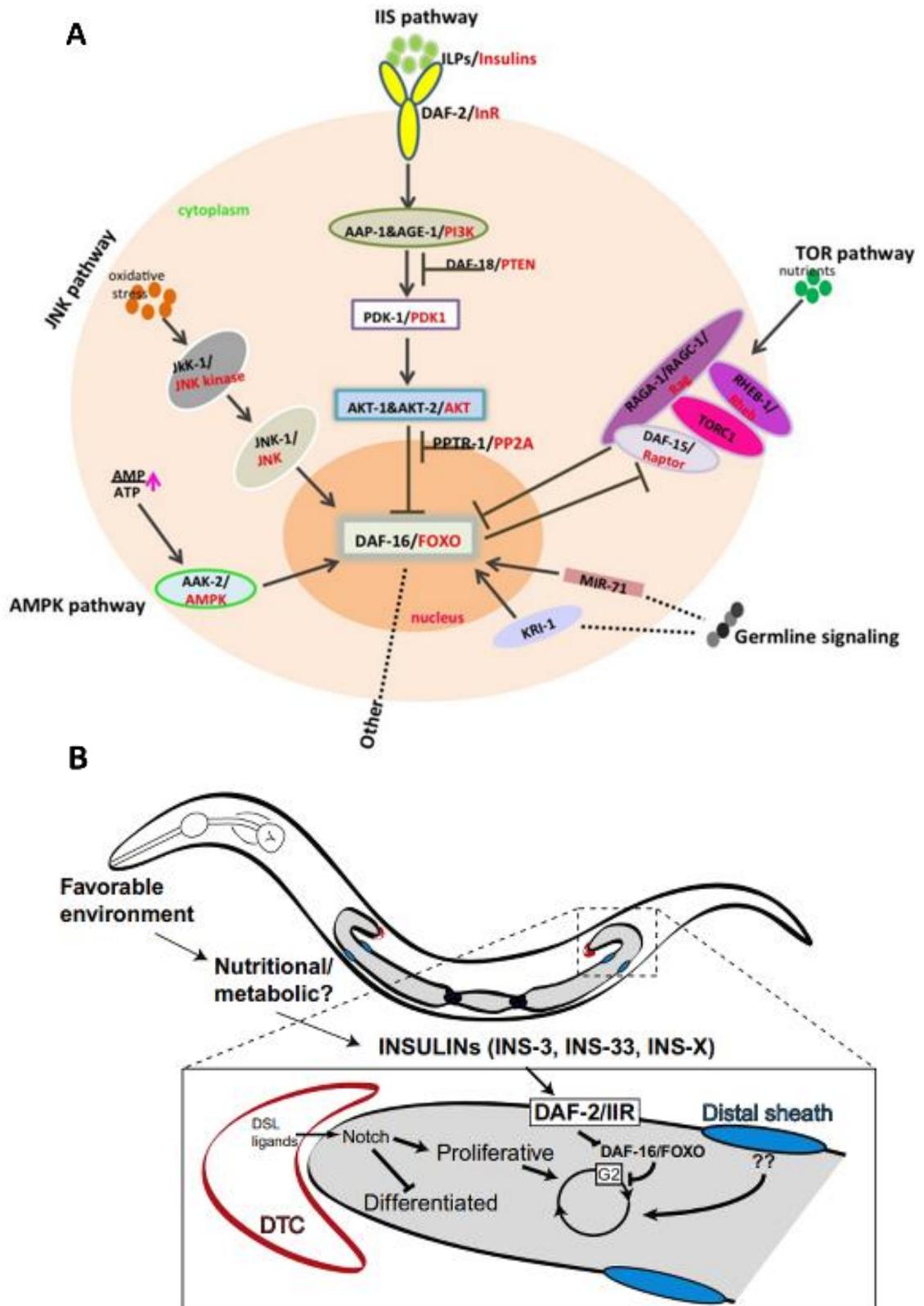


Figure 14 - (a) Principaux composants de la voie DAF-2/DAF-16 et intégration de différents signaux cellulaires par DAF-16. *Source : Sun et al., 2017.* (b) Contrôle de la prolifération de la lignée germinale en réponse à GLP-1/Notch et DAF-2/DAF-16. *Source Hubbart et al., 2011*

1.3.4.2 DAF-16/FOXO et résistance au stress

La baisse de la signalisation DAF-2/IGF-1 ou la réponse à des signaux de stress cellulaire conduit à la translocation du facteur de transcription DAF-16 dans le noyau cellulaire. Les signaux de stress cellulaire conduisent à l'induction spécifique de kinases, telles que JUN(JNK), impliqué dans la réponse au stress oxydatif, AMP (AMPK), en réponse à des ratios AMP/ATP élevés, ou des MAPK influant sur l'immunité (Hesp et al., 2015). Suite à l'activation de DAF-16/FOXO, son accumulation nucléaire entraîne la transcription d'ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme, la réponse au stress oxydatif et thermique, l'immunité, la longévité et l'autophagie. De par sa localisation cytoplasmique ou nucléaire, le facteur de transcription PQM-1 agit comme un antagoniste de DAF-16 ainsi que dans la régulation de gènes impliqués dans le développement et le métabolisme (Tepper et al., 2013). La dualité de ces TF permet de maintenir l'équilibre entre survie et développement cellulaire en agissant sur des gènes impliqués dans le développement, la reproduction, le métabolisme et la longévité (Zečić & Braeckman, 2020). Une étude récente démontre que l'exposition chronique de *C. elegans* aux rayonnements gamma, à des doses comprises entre 0,5 et 24 Gy, induit une modification du métabolisme, et notamment du catabolisme des lipides (Kuzmic et al., 2019).

De plus, DAF-16 va interagir avec d'autres facteurs de transcription dans le noyau pour amorcer l'expression de gènes spécifiques aux signaux environnementaux. Par exemple, en cas de dommages à l'ADN persistant, et contrairement au rôle de DAF-16 dans l'arrêt du développement en cas de manque de nutriments, la liaison DAF-16 avec EGL-27 permet de maintenir le développement (Mueller et al., 2014). En effet, ces deux facteurs de transcription vont coréguler des gènes de réparation de l'ADN pour favoriser la croissance et la résistance somatique. Ces données impliquent que lors d'un stress génotoxique prolongé, DAF-16 contribue à améliorer la résistance de l'organisme via la maintenance des tissus et la résistance somatique. Une autre étude fait écho à une modification des fonctions physiologiques de *C. elegans* lors d'une exposition chronique à un stress génotoxique (Edifizi et al., 2017). La présence de dommages à l'ADN non réparé, à partir d'un certain seuil, entraîne une modification du métabolisme, du maintien tissulaire, et induit un changement de l'activité du protéasome et des protéines chaperonnes vers l'augmentation de l'autophagie. Ces modifications sont gouvernées par l'interconnexion des voies AMPK, DAF-2/DAF-15 et EGF. DAF-16 interagit également avec HLH-30, un facteur de transcription impliqué dans l'autophagie et la formation des lysosomes en condition de stress, pour promouvoir des ensembles de gènes impliqués la longévité et la résistance au stress oxydatif (Lapierre et al., 2013; Lin et al., 2018). En effet, en condition normale, les deux TF sont cytoplasmiques et ne peuvent activer la transcription de leurs gènes cibles. Différents signaux de stress peuvent faire transloquer l'un des deux ou les deux facteurs dans le noyau. DAF-16 seul peut promouvoir le stade Dauer, la modification du métabolisme ou la résistance au stress thermique. HLH-30 peut lui aussi promouvoir la réponse au stress thermique en induisant la transcription de gènes indépendants de DAF-16, mais également altérer la formation de larves Dauer. Néanmoins, dans le cadre de la réponse au stress oxydatif, l'internalisation puis la liaison conjointe de ces deux TF aux régions promotrices de nombreux gènes importants pour la résistance au stress oxydatif et la longévité va permettre d'améliorer la résistance de l'organisme.

La voie de l'insuline DAF-2/DAF-16 est une voie centrale permettant de gouverner le développement, la reproduction, le métabolisme, la résistance au stress et la longévité de *C. elegans*. Dans le cadre de la résistance au stress, bien que les effecteurs des différents types de stress soient identifiés, la notion de seuil

d'activation dans le cadre d'exposition chronique ou à de faibles doses est encore mal comprise.

I.4 *Caenorhabditis elegans* et radiobiologie

I.4.1 Décryptage des mécanismes moléculaires

Les premières utilisations de *C. elegans* dans le domaine de la radiobiologie datent des années 1980. En effet, la première étude sur le sujet décrit le réarrangement chromosomique suite à une exposition aux rayons X (Herman et al., 1976). Une autre étude est réalisée 4 ans plus tard et identifie des mutants sensibles à de fortes doses de rayonnements, mettant en lumière le rôle des gènes *rad-1* et *rad-2* (RADiation sensitivity abnormal ; Hartman & Herman, 1982). Par la suite, les recherches se sont concentrées sur les effets cellulaires des radiations ionisantes et notamment l'induction et la réparation des dommages à l'ADN. Dans les années 2000, les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la voie de signalisation de l'apoptose ont été décryptés suite à l'exposition aiguë de *C. elegans* à des doses de 120Gy. Le décryptage des mécanismes moléculaires, grâce à l'utilisation de technique de biologie moléculaire comme l'ARN interférence, a permis d'identifier une cinquantaine de gènes conservés avec l'homme, dont *rad-51*, ayant un impact sur la sensibilité aux radiations ionisantes, mais aussi dans le développement et la reproduction (Rinaldo et al., 2002; van Haaften et al., 2006). L'étude des mécanismes moléculaires a également permis de montrer les interconnexions entre la génération de radicaux libres lors du vieillissement ou après exposition aux rayonnements ionisants, ainsi que les modifications de comportements associées (Sakashita et al., 2010). Néanmoins, l'ensemble de ces études ont été réalisées dans des conditions d'exposition aiguë, à des doses comprises entre 20 et 1000Gy, peu réalistes sur le plan environnemental. De plus, l'exposition aiguë est généralement réalisée sur les stades adultes ou jeunes adultes, alors que les stades de développement précoces sont généralement plus sensibles au stress et peuvent entraîner des conséquences délétères à l'âge adulte (van der Lee et al., 2020).

I.4.2 Exposition aiguë vs chronique

L'exposition aiguë correspond à une irradiation courte, généralement à de fortes doses, alors que l'exposition chronique correspond à une irradiation réalisée sur plus de 10% du cycle de vie, généralement à des doses plus faibles. Des études récentes ont mis en évidence d'importantes différences de mécanismes et d'effets délétères entre exposition aiguë et chronique (Dubois et al., 2018). Par exemple, des effets reprotoxiques apparaissent en exposition chronique à des rayonnements gamma, du stade œuf au stade jeune adulte, à partir de 3,3 Gy (50mGy.h⁻¹) alors qu'ils n'apparaissent qu'à partir de 50 Gy en exposition aiguë au stade L4 (Pereira et al., 2011 ; Dubois et al., 2018 ; Dhakal et al., 2021). **Ces données montrent que le type d'irradiation ainsi que le stade d'exposition influent fortement sur l'apparition d'effets phénotypiques délétères.** Par la suite, une étude a comparé les effets sur le protéome des deux types d'expositions, à des doses cumulées de 0.5, 1 et 3 Gy. L'exposition chronique module des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, le développement de la lignée germinale, le métabolisme des lipides, le cycle de mue et la cuticule (Dubois et al., 2019). A contrario,

l'exposition aiguë impacte les protéines liées au vieillissement, au développement des embryons et des larves et au métabolisme des composés organo-azotés. Cette analyse montre que pour une même dose cumulée, l'exposition chronique n'implique pas les mêmes mécanismes subcellulaires que l'exposition aiguë. **Ces données confirment que l'irradiation chronique induit des mécanismes subcellulaires de réponse au stress différents de ceux induits par l'irradiation aiguë.**

Des études récentes, réalisées au sein de notre laboratoire, ont décrypté certains effets et mécanismes subcellulaires induits par une irradiation chronique aux rayonnements ionisants. Outre la modulation du protéome, l'irradiation chronique entraîne une augmentation de l'activité du protéasome, nécessaire à la dégradation des protéines mal repliées ou dénaturées. (Dubois et al., 2018 ;2019). De plus, l'irradiation chronique engendre une augmentation du catabolisme des lipides, corrélée à une diminution de la longévité sur les mutants *glp-1*, dépourvue de lignée germinale (Kuzmic et al., 2019). En outre, l'exposition chronique de *C. elegans* sur 3 générations montre une diminution de la reproduction sur la 3^{ème} génération exposée, à un débit de dose de 42.7 mGy.h⁻¹ (Buisset-Goussen et al., 2014).

Malgré le manque de connaissance actuelle sur les effets moléculaires, subcellulaires et phénotypes d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants, ainsi que le lien causal reliant les effets délétères à différentes échelles, plusieurs études démontrent que la reproduction est l'un des systèmes physiologiques les plus radiosensibles (Adam-Guillermin et al., 2018). Chez les mammifères, tels que le rat et le cochon, une irradiation gamma externe de 4 mois, à des débits de doses de 0,1 et 1mGy.h⁻¹ entraîne une diminution des ovocytes, des spermatozoïdes, du poids de la gonade et du nombre de cellules de la lignée germinale (Erickson et Martin., 1976). Chez les poissons, et notamment *Danio rerio*, les effets reprotoxiques sont accompagnés d'une instabilité génomique, d'une augmentation du stress oxydatif et des dommages à l'ADN sur la génération issue de l'irradiation parentale (Hurem et al., 2017).

I.4.3 Événements initiateurs des effets délétères d'une exposition chronique aux rayonnements gamma chez *C. elegans*

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'objectif était de caractériser les effets phénotypiques et subcellulaires d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants gamma ainsi que la transmission d'effets au fil des générations. Comme précédemment développée, l'extrapolation des données issues d'études de toxicologie en expositions aiguës montre des limites pour prédire et protéger l'homme et son environnement des effets de l'exposition chronique. La collaboration avec une équipe norvégienne de la Norwegian University of Life Sciences (NMBU) nous a permis de décrypter les événements initiateurs des effets subcellulaires et multi-transgénérationnels à travers la mutualisation de nos plateformes et compétences. Les réflexions autour de ce projet se sont appuyées, entre autres, sur un article publié par notre laboratoire, montrant les effets reprotoxiques d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants (3,3 Gy) sur 3 générations (Buisset-Goussen et al., 2014). Cette étude confirme que, même si *C. elegans* est tolérant à de fortes doses de RI en exposition aiguë, en exposition chronique des effets délétères peuvent apparaître à des doses cumulées beaucoup plus faibles. L'accueil de l'équipe norvégienne au sein de notre laboratoire ainsi que la réalisation d'irradiation chronique et la mise au point de différents protocoles ont été les points de départ de deux articles (Maremonti et al., 2019, 2020b), synthétisés dans les 2 paragraphes suivants, et traitants des événements initiateurs de l'irradiation chronique sur l'ADN et le stress

oxydant. En effet, même si les effets initiateurs sont connus pour de fortes doses de RI, les mécanismes impliqués en condition chronique (63h à un débit de 50mGy.h⁻¹) sont moins bien décrits. De plus, l'exposition chronique à différents stades de vie a également permis de démontrer quels stades de développement sont les plus sensibles.

1.4.3.1 Sensibilité des stades de vie et dommage à l'ADN

La différence entre les effets reprotoxiques observés entre exposition aiguë et chronique peut être liée à la différence de sensibilité entre les différents stades de vie d'un organisme ainsi qu'à la radiosensibilité de certains tissus ou cellules (Harrison & Anderson, 1996; Maremonti et al., 2019). Les stades de développement précoces sont généralement des périodes de vie où les cellules se divisent rapidement. En outre, les cellules en prolifération rapide sont sensibles aux effets des RI, un mécanisme largement utilisé en radiothérapie dans le traitement des cellules cancéreuses (Azzam et al., 2012). De plus, l'impact des premiers stades de développement peut entraîner des conséquences fonctionnelles sur l'organisme à l'âge adulte. Pour répondre à cette question, un protocole d'exposition chronique aux rayons gamma avec plusieurs scénarios a été mis en place (Figure 15).

- 1: Exposition du stade embryons jusqu'au début de la ponte au stade L4 jeune adulte (62h), utilisé au sein de notre laboratoire (Buisset-Goussen et al., 2014)
- 2 : SC1 Exposition du stade L1 jusqu'à la fin de la période de ponte (192h)
- 3 : SC2 Exposition du stade L1 au stade L4 jeune adulte (43h)
- 4 : SC3 Exposition du stade L4 jeune adulte jusqu'à la fin de la période ponte (149h)
- 5 : SC4 Exposition des stades L3 et L4 (13h)

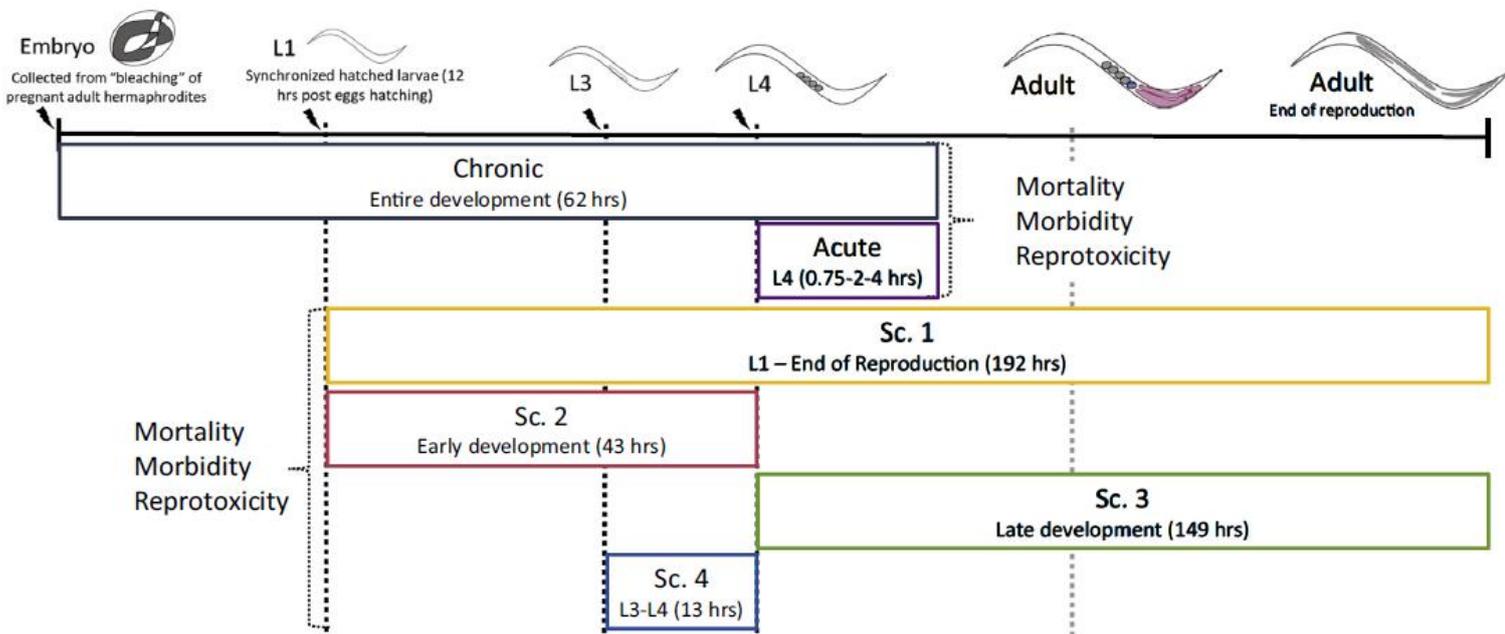


Figure 15 - Design expérimental utilisé pour identifier les stades de développement sensibles à l'exposition chronique aux RI. *Source : Maremonti et al., 2019*

La première expérience compare les effets de l'exposition chronique, du stade embryon au stade L4 jeune adulte (à une dose cumulée de 6,7 Gy), à une exposition aiguë,

au stade L4 jeune adulte à une dose cumulée de 6 Gy. Il a été démontré que l'exposition aiguë n'entraîne pas d'effets reprotoxiques contrairement à l'exposition chronique qui induit une baisse de 43% du nombre de larves, sans effet sur la mortalité et la morbidité. Néanmoins, il n'était pas évident qu'un stade particulier, ou un tissu spécifique était impliqué dans les effets reprotoxiques. Par la suite, il a été démontré que le scénario SC3, impliquant une exposition du stade L4 à la fin de la ponte n'entraîne pas d'effets reprotoxiques. Ces données suggèrent que les effets reprotoxiques d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants sont liés à l'exposition entre les stades embryons et les stades L4 jeune adulte. Les stades post-mitotiques pourraient donc être plus résistants. L'irradiation du scénario 4, des stades L3 et L4, n'a pas d'impact sur la reproduction. Nous montrons également que l'irradiation du stade embryon au stade L4 jeune adulte et l'irradiation du stade L1 au stade L4 jeune adulte (SC2), engendrent les mêmes effets sur la reproduction. Ces données suggèrent que l'effet reprotoxique est dû à l'irradiation des stades L1 à L4. Ces données sont en accord avec le fait que chez *C. elegans*, la réparation des dommages à l'ADN est robuste lors de l'embryogenèse grâce à un mécanisme de recombinaison homologue efficace (Clejan et al., 2006). De plus, les cellules somatiques sont plus résistantes que les cellules germinales, car elles ont la capacité de réparer leur ADN sans activer la cascade de signalisation de réponse aux dommages à l'ADN, pouvant aboutir à la mort cellulaire par apoptose (Vermezovic et al., 2012). **Cette expérience a permis de mettre en évidence que les stades post-embryonnaires sont les stades les plus critiques pour engendrer des effets reprotoxiques.** Durant ces stades, la prolifération cellulaire est importante et entraîne la mise en place de l'appareil reproducteur à partir des cellules Z1-Z4, précurseur de la gonade somatique et des cellules Z2-Z3, précurseur de la lignée germinale (Figure 12). De plus, les stades de développement succédant au stade L4 jeune adulte semblent pouvoir résister à des doses supérieures à 15 Gy et sont donc capables d'améliorer efficacement leurs défenses contre les effets génotoxiques.

Le test des comètes a été utilisé pour mesurer le nombre de cassures de l'ADN induit par l'exposition aux rayonnements ionisants sur la génération exposée et les embryons issus de parents irradiés (Figure 16 a.b). Il a été démontré une augmentation des dommages à l'ADN des embryons dont les parents ont été soumis à des débits de doses de 40 mGy.h⁻¹(fold change =3.9) et 100 mGy.h⁻¹(fold change = 4.4). **Ces données laissent entrevoir que les générations suivantes peuvent être plus impactées que la génération parentale.**

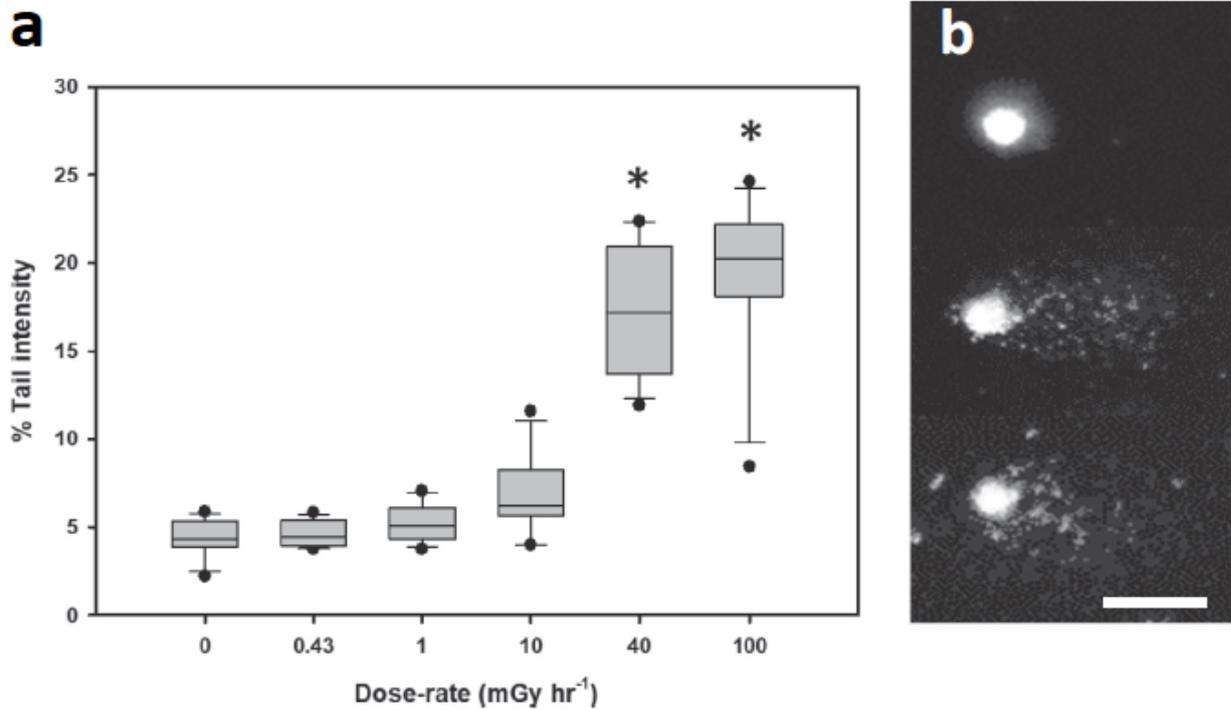


Figure 16 - (a) Dommages à l'ADN (moyenne de l'intensité des queues de comètes) mesurés chez les embryons provenant de parents irradiés. (b) Photos au microscope Olympus BX51. De haut en bas : contrôle, 40 et 100mGy/h. *Source : Maremonti et al., 2019*

1.4.3.2 Stress oxydatif

L'action indirecte des RI correspond à la radiolyse de l'eau, générant des radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le radical hydrogène ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 6b). Une surproduction de radicaux libres peut entraîner une augmentation du stress oxydant, aboutissant à l'oxydation des macromolécules biologiques comme les lipides, les protéines ou l'ADN. Dans le cadre de ce projet et des débits de dose utilisée, il semblait primordial d'identifier si les événements initiaux, aboutissant à des phénotypes de diminution de la reproduction, étaient dus à des dommages à l'ADN, ou également à une surproduction de radicaux libres. Pour ce faire, l'équipe du NMBU a utilisé un protocole s'appuyant sur 3 souches pour mesurer la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes. La souche reportrice *sod-1:gfp* permet de mesurer l'activité de la superoxyde dismutase 1, une enzyme transformant l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme permet également une évaluation indirecte de la génération de l'anion superoxyde. Le biosenseur *Grx1-roGFP2* est utilisé pour suivre le ratio du couple disulphide-glutathion GSSG/GSH (Cannon & James Remington, 2008), un acteur central de l'homéostasie redox. L'utilisation du biosenseur *HyPer* permet d'analyser la production du radical H_2O_2 . L'objectif était de déterminer si les défenses antioxydantes (Grx : GSH/GSSG et SOD) pouvaient empêcher la génération de radicaux libres (H_2O_2) ou si des niveaux élevés de ROS pouvaient déborder les défenses antioxydantes et induire des dommages oxydatifs. Pour ce faire, les différentes souches ont été irradiées à une gamme de doses de : 0, 0.4, 1, 10, 40 et 100 mGy.h⁻¹ pendant 48 et 72 h.

L'expression de SOD-1 augmente significativement après 48h d'exposition d'une façon dose dépendante (p-value <0,0001) (Figure 17a). Cette enzyme de défense endogène montre également une cinétique d'augmentation, car l'exposition de 72h montre une expression significativement plus importante que celle de 48h. Dans les conditions d'expositions, un seuil est observé entre la dose de 0,4 et 1 mGy.h⁻¹ et suggère une production de l'anion superoxyde. La production du radical H_2O_2 est également augmentée après 48h de façon dose dépendante. Les données à 72h montrent une importante variabilité, ne permettant pas d'avoir une analyse statistique significative, même si l'augmentation du radical H_2O_2 est clairement visible (Figure 17b). L'augmentation dose dépendante est également clairement identifiable. Les deux conditions montrent également un seuil à partir d'un débit de dose de 1 mGy.h⁻¹. Le couple GSSH/GSH montre une augmentation significative, à 100 mGy.h⁻¹ dans le pharynx postérieur, l'intestin postérieur (données non montrées), ainsi que dans la gonade (Figure 17c). **Cette donnée démontre qu'à partir de cette dose, le statut redox de *C. elegans* est déstabilisé dans certains tissus et que les défenses antioxydantes n'arrivent plus à contrecarrer la surproduction de radicaux libres.** L'ensemble de ces données montrent que la surproduction de radicaux libres, à partir de 48h à un débit de dose de 40mGy.h⁻¹, peut jouer un rôle important dans l'initiation de dommages moléculaires, cellulaires et phénotypiques. De plus, la surproduction de ROS, à des débits de doses faibles, peut également entraîner des conséquences sur la régulation des processus cellulaires médiés par les radicaux libres.

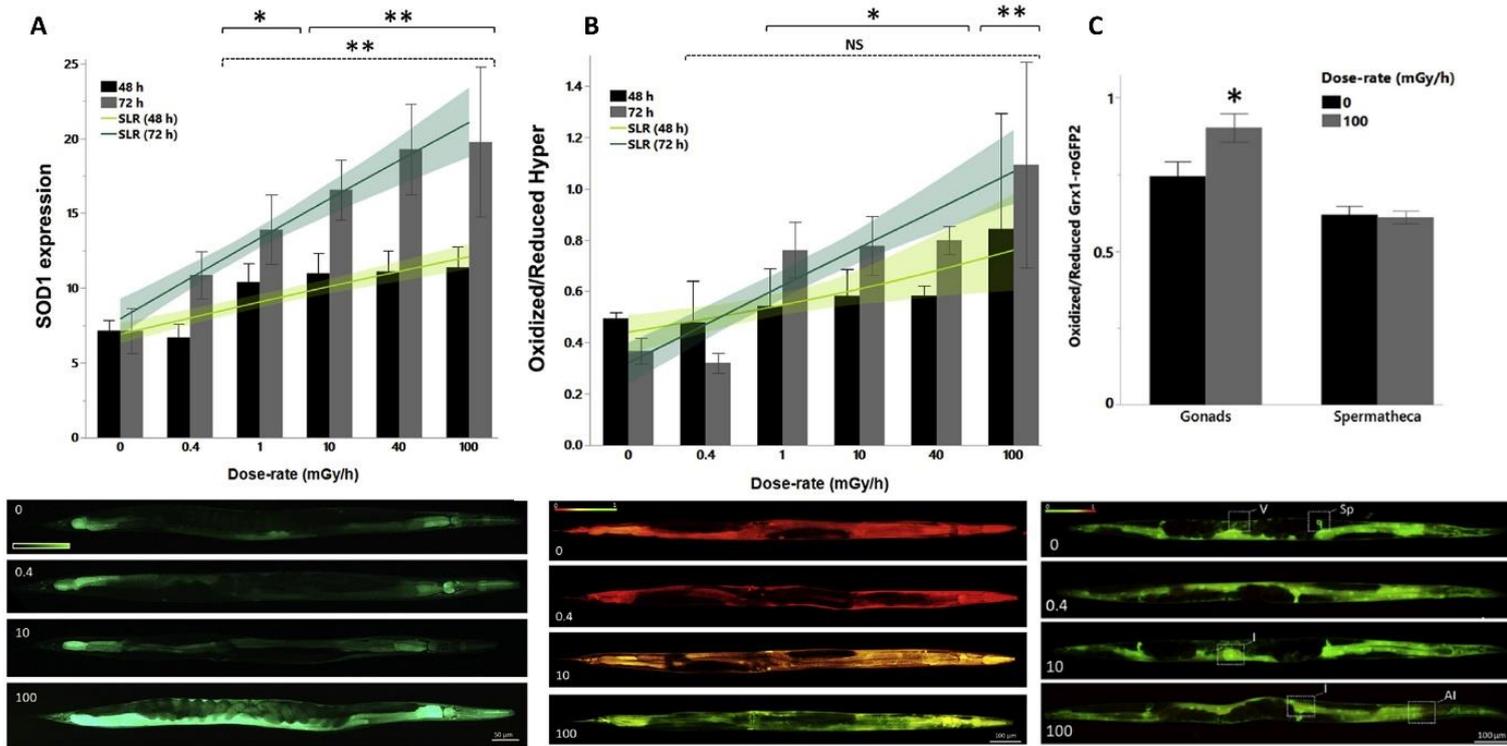


Figure 17 - Statut oxydatif de *C. elegans* après 48 et 72h d'exposition à 50mG/h de rayonnements gamma. (a) Évaluation *in vivo* de sod-1. (b) Évaluation *in vivo* de l'expression du radical H_2O_2 . (c) Mesure *in vivo* du statut redox par un biosenseur radiométrique. Les tendances linéaires ont été estimées à l'aide d'une analyse de régression linéaire simple (SLR). Source : Maremonti et al., 2020

Ces données démontrent qu'à une dose proche de 50mGy.h-1, l'augmentation du stress oxydatif et des dommages à l'ADN sont les événements initiateurs des conséquences phénotypiques. De plus, les effets reprotoxiques précédemment mesurés sur 4 générations au sein de notre laboratoire, ainsi que la présence de dommages à l'ADN sur la génération non irradiée issue de parents irradiés, laissent entrevoir la possibilité d'effets néfastes sur les générations non exposées (Buisset-Goussen et al., 2014; Maremonti et al., 2019).

I.5 Effets générationnels, radiosensibilité et épigénétique

I.5.1 Contexte et définition

L'exposition d'un organisme à un polluant ou à un agent stresser peut entraîner des conséquences ou aboutir à une transmission d'effet ou d'information aux générations suivantes. Une des études, ayant eu un fort impact sociétal sur ce sujet, concerne les conséquences à l'exposition de particules fines ($\leq 2,5 \mu\text{m}$) de femmes enceintes durant la grossesse. Cette étude démontre qu'à des doses environnementales, l'inhalation de particules fines augmente l'inflammation intra-utérine, associée à des durées de grossesses et des poids à la naissance réduits (Nachman et al., 2016). Aujourd'hui, les enfants sont plus souvent diagnostiqués avec des troubles neurologiques ou comportementaux que les générations précédentes. La communauté scientifique évoque la possibilité que les polluants environnementaux et le mode de vie des parents puissent entraîner des problèmes d'infertilité, de développement, de croissance ou de pathologies pédiatriques. L'étude de l'interaction entre l'environnement et l'expression des gènes peut permettre de mettre en lumière de nouvelles tendances en matière de santé. Néanmoins, peu d'études sur plusieurs générations sont aujourd'hui disponibles chez l'homme. La compréhension des mécanismes subcellulaires ainsi que l'identification des stades de vie sensibles doivent passer par l'utilisation d'organismes « modèles expérimentaux ». Pour étudier les conséquences générationnelles d'une molécule ou d'un polluant, on distingue deux types d'expériences :

- Les expositions multigénérationnelles ou les organismes sont continuellement exposés sur plusieurs générations. Le but principal est de mesurer si les effets du stresser s'accroissent au fil des générations, ou au contraire si un phénomène d'acclimatation ou d'adaptation se met en place.

- Les expositions transgénérationnelles, ou les organismes sont exposés sur la première génération parentale, puis placés en condition contrôle. Ce type d'étude a pour objectif principal d'analyser si des effets se propagent au fil des générations non exposées. On peut définir un effet transgénérationnel à partir de la 3^{ème} ou de la 4^{ème} génération non exposée, en fonction de l'exposition, ou non, des embryons (Skinner, 2009). En effet, lors de l'exposition d'un organisme (F0) contenant des embryons (F1'), les cellules souches de l'embryon aboutissant à la production de la lignée germinale de la génération suivante (F2') sont également exposées. À partir de la génération F3', les organismes n'ont eu aucun contact avec le polluant et on peut parler d'effet transgénérationnel (Figure 18). Si les embryons ne sont pas présents au moment de l'exposition, ou pour les mâles exposés, l'effet est transgénérationnel à partir de la F2'.

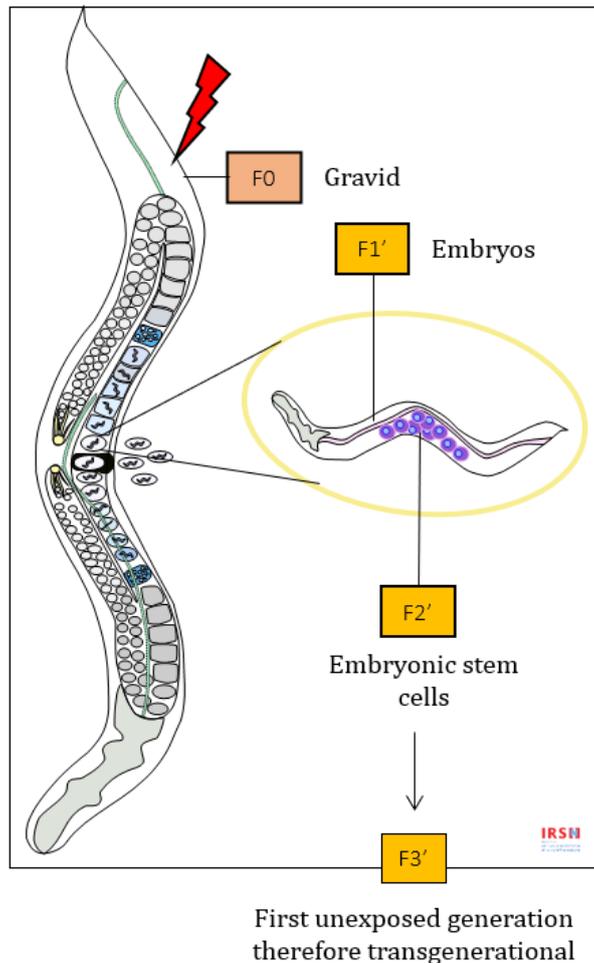


Figure 18 - Schéma de l'action transgénérationnelle d'un stressor à travers la lignée germinale d'un *C. elegans* hermaphrodite

I.5.2 Radiosensibilité générationnelle

Depuis le milieu des années 2000, les instances internationales ont mis en exergue le manque de données sur les effets à long terme et sur plusieurs générations (Nuclear Energy Agency, 2007). Les études disponibles sur l'exposition multigénérationnelle à des radiations ionisantes se concentrent principalement sur des effets phénotypiques. Néanmoins, ces études relatent en majorité de protocoles d'exposition chronique, réalistes au niveau environnemental. Ces études montrent principalement une aggravation des effets au fil des générations. L'exposition à des rayonnements gamma du polychète *Ophryotrocha diadema* sur 7 générations, à des doses comprises entre 1,7 et 13,7 mGy/h, montre des effets sur la croissance et la reproduction sur les générations 1, 2, 3 et 7 (Knowles & Greenwood, 1994). L'effet sur la reproduction est plus marqué sur les générations 1, 2 et 3 alors qu'à la génération 7, bien qu'une diminution significative soit observée, la tendance est à la récupération ou à l'acclimatation. Une étude a montré une augmentation de la radiosensibilité de *Daphnia magna* continuellement exposés à des sources de rayonnements gamma sur 3 générations, à des doses comprises entre 0,007 et 35,4 mGy.h⁻¹ (Parisot et al., 2015). L'augmentation des effets délétères sur la croissance, la survie et la reproduction est associée à une augmentation des dommages à l'ADN pour le plus fort débit de doses. Une expérience, réalisée au sein de notre laboratoire, a

également montré une diminution de la reproduction chez *C. elegans*, à partir de la 3^{ème} génération continuellement exposée, pour un débit de dose de 42,7 mGy.h⁻¹ (Buisset-Goussen et al., 2014).

Néanmoins, ces études fournissent peu d'explications mécanistiques sur les phénotypes observés alors qu'il est reconnu que les phénotypes sont induits par des effets précoces au niveau cellulaire. À titre d'exemple, l'impact sur la reproduction chez *C. elegans* apparaît sur la première génération exposée à un débit de 50mGy.h⁻¹, suite à une exposition chronique englobant les stades larvaires jusqu'à la maturité sexuelle (Dubois et al., 2018). A contrario, une étude récente réalisée sur des nématodes soumis à un débit de dose de 70 nGy.h⁻¹, proche du bruit de fond dans l'environnement, et à un débit de dose inférieure de l'ordre de 15,7 nGy.h⁻¹, démontre que la diminution du débit de dose permet de modifier le transcriptome et notamment les gènes impliqués dans la spermatogenèse (*msp*) ainsi que la vitesse de croissance et de pontes (Van Voorhies et al., 2020). Ces données suggèrent que de faibles niveaux et variations de débit de dose peuvent avoir des conséquences moléculaires et phénotypiques sur les organismes.

Outre les modifications de la radiosensibilité des organismes continuellement exposés, les impacts de l'exposition à un stress sur les générations non exposées sont aujourd'hui une question au cœur des études en toxicologie. Dans ce cadre, les données montrant un impact phénotypique transgénérationnel des RI sont rares et les études se focalisent principalement sur la transmission de marques moléculaires et cellulaires (Adam-Guillermin et al., 2018). Néanmoins, l'impact de la lignée germinale ainsi que des gamètes mâles et femelles par les radiations ionisantes entraîne des conséquences sur les générations suivantes. De plus, l'instabilité génomique de cellules germinales peut entraîner des taux de mutations élevés, des aberrations chromosomiques, la formation de micronoyaux ou à une augmentation de l'incidence de cancers chez les générations suivantes (Merrifield & Kovalchuk, 2013). L'instabilité génomique a été reliée aux effets non ciblés et aux effets transgénérationnels, même si le mécanisme moléculaire n'est pas clairement élucidé. **Néanmoins, la persistance de l'instabilité génomique et le mode de transmission non mendélien des effets transgénérationnels suggèrent le rôle de mécanismes épigénétiques (Koturbash et al., 2006).**

I.5.3 Épigenétique

Le concept d'épigénétique est né dans les années 40, par un généticien s'intéressant à la biologie des systèmes et la biologie du développement évolutif, Conrad Hal Waddington. En 1942, il utilise le mot épigénétique pour décrire la relation entre le génotype et les phénotypes d'un organisme, établissant le lien entre le génome et l'acquisition de caractéristiques biologiques en réponse à l'environnement cellulaire (stress oxydatif, métabolisme, vieillissement, système endocrinien...) et extérieur (stress environnemental, pollution, température ...) (Waddington, 2012). L'épigénétique peut être définie comme l'étude de l'influence de l'environnement sur la modulation de l'expression génique et l'adaptation d'un certain nombre de paramètres physiologiques, conférant une plasticité au génome et l'expression de différents phénotypes.

Cette discipline regroupe l'ensemble des mécanismes, héréditaires et réversibles, responsables de la modulation de l'expression génique qui ne peuvent être expliqués par des modifications de la séquence d'ADN. Cette théorie est étendue au processus de développement, au cours duquel, des cellules souches se différencient pour donner naissance à différents types cellulaires et tissus. Bien que chaque cellule ait le même génome, il existe plusieurs épigénomes au sein d'un organisme, permettant d'activer des ensembles de gènes en fonction de besoins physiologiques et du type cellulaire. Ces

mécanismes sont impliqués dans presque tous les processus biologiques de la reproduction (reprogrammation du génome, inactivation du chromosome X chez les femelles, embryogenèse et différenciation cellulaire), à la modulation du transcriptome, jusqu'à la mort (apoptose, sénescence et atteinte pathologique). La découverte de gènes répondant à des stimuli (intrinsèques ou extrinsèques) par des régulations de l'état de leur méthylation, mais également la possibilité de transmission de cellule mère à cellule fille (mitose et méiose) ont permis d'étayer cette théorie et de la faire accepter par la communauté scientifique (Holliday & Pugh, 1975). Ce concept a été approfondi lors de l'étude de cellules souches pluripotentes induites, où les différents états cellulaires (totipotent, pluripotent, multipotent ou unipotent) sont associés à un état épigénétique différent (Hochedlinger & Plath, 2009). Ce concept permet de mettre un nom sur de nombreux concepts du vivant comme le changement de couleur de pelage de certains animaux au fil des saisons ou encore les différences entre une abeille ouvrière et une reine alors qu'elles partagent le même génome.

1.5.3.1 Mécanismes moléculaires

D'un point de vue scientifique, l'épigénétique peut se définir comme l'ensemble des modifications (ou marques chimiques) méiotiques héréditaires et mitotiquement stables de l'expression des gènes, sans modification de la séquence d'ADN. À la différence des mutations, les marques épigénétiques sont réversibles. Les trois principaux mécanismes épigénétiques sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) et la contribution des ARN non codants (Figure 19a.b.c ; Yan et al., 2010). Les autres mécanismes que sont les prions (AINC : agents infectieux non conventionnels), les protéines polycomb ou les structures d'organisation supérieures de la chromatine ne seront pas abordés dans le cadre de ce manuscrit (Handbook of Epigenetics - 2nd Edition). La méthylation de l'ADN et les PTMs des histones modifient la transcription des gènes en interagissant avec la structure de la chromatine pour moduler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. Cette dernière peut passer d'un état décomprimé (euchromatine) permettant l'accès aux protéines initiateuses de la transcription, à un état comprimé (hétérochromatine), inactif vis-à-vis de la transcription. Les ARNnc regroupent plusieurs familles d'ARNs non codant agissant comme des régulateurs négatifs de l'expression post-transcriptionnelle des gènes. Notons également que ces trois processus sont interconnectés et agissent de manière coordonnée pour se renforcer et maintenir leur action (Iorio et al, 2010).

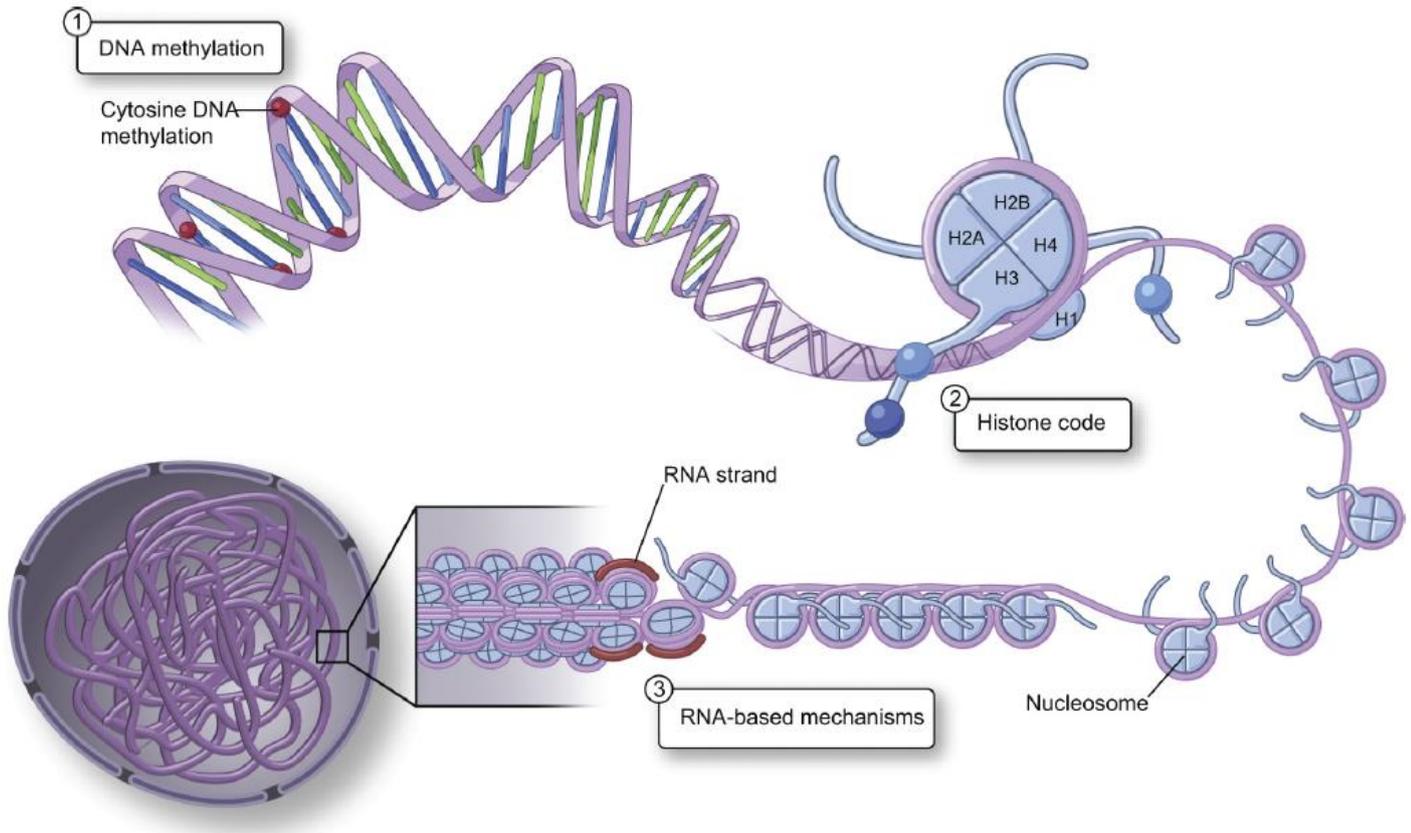


Figure 19 - Les mécanismes fondamentaux de l'épigénétique. (a) La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout de groupe méthyle sur l'ADN. (b) La modification des queues des histones influence sur la structure de la chromatine. (c) Les ARN non codants agissent sur la régulation de l'expression génique, mais également sur la structure de la chromatine. *Source : Yan et al., 2010*

1.5.3.2 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la première modification épigénétique découverte et la mieux caractérisée. Chez les mammifères, la méthylation a lieu sur les résidus Cytosine (C) précédant un résidu Guanine (G) en position 5, pour former des îlots CpG. La méthylation de l'ADN est réalisée selon deux processus : la méthylation de novo au niveau des séquences ne possédant pas de cytosine méthylée et la méthylation permettant la maintenance des profils de méthylation au fil des divisions cellulaires, à partir du brin parental hémiméthylé. Les îlots CpG sont présents dans 60% des promoteurs des gènes des mammifères, ainsi que sur les exons, pouvant ainsi impacter directement la transcription. La méthylation de ces îlots par les méthyltransférases de l'ADN (DNMTs) entraîne, en règle générale, une compaction de l'ADN en modifiant l'équilibre biochimique de surface et en recrutant des protéines bloquant les facteurs de transcription (Wade, 2001). Ce processus aboutit à l'inhibition de l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN intervient également dans la structure de la chromatine, l'inactivation des transposons ou des séquences d'ADN viraux (Robertson & A.Jones, 2000). Notons que l'absence des enzymes responsables de la méthylation (ou ADN méthyltransférases) peut être létale lors du développement embryonnaire, soulignant l'importance de ce processus

lors des étapes de développement et de différenciation (E. Li et al., 1992). Certaines études démontrent une modulation de la méthylation de l'ADN, en réponse aux stress environnementaux, pouvant être transmise aux générations suivantes (Gudsnuk & Champagne, 2012). À titre d'illustration, l'exposition de rates gestantes à des perturbateurs endocriniens induit un phénotype de diminution du nombre de spermatozoïdes viables et augmente l'infertilité masculine sur la génération suivante. Ce phénotype est transmis sur les générations suivantes étudiées (F1 à F4) et corrélées avec une modification de la méthylation de l'ADN dans les cellules de la lignée germinale (Anway et al., 2005). La méthylation de l'ADN est également très étudiée en cancérologie, où de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont hyperméthylés dans les cellules prolifératives, aboutissant à une répression transcriptomique favorable à l'expression de proto-oncogène, comme dans le cas du cancer du côlon (Kerachian et al., 2020).

Chez *C. elegans*, il n'y a pas de méthylation en position 5' des cytosines. Une étude récente a démontré une méthylation de l'ADN en position 6', précédant un résidu Adénine (6mA) (Greer et al., 2015). La méthylation en 6mA est présente chez les eucaryotes ainsi que les procaryotes. Elle joue un rôle dans la déstabilisation de la double hélice d'ADN et au niveau des sites de liaison de protéines effectrices de la transcription. Cette méthylation en 6mA agit notamment sur la biogenèse ainsi que l'adressage et la stabilité des ARNm. Son rôle est également associé à de grands processus biologiques tels que la méiose, la différenciation des cellules souches embryonnaires, la régulation des microARNs ou les dommages à l'ADN. Néanmoins, son implication directe comme processus épigénétique n'a été mise en évidence que récemment (Greer et al., 2015). Des enzymes responsables de la méthylation (DAMT-1) et de la déméthylation (NMAD-1) ont également été identifiées ainsi que leurs rôles dans une probable transmission d'informations au travers des générations (Luo et al., 2015).

1.5.3.3 Modifications post-traductionnelles des histones

La chromatine des eucaryotes est une structure hautement condensée qui est fondamentale pour les processus nucléaires tels que la transcription, la réplication ou la réparation des dommages. Dans le noyau, l'ADN est compacté dans la chromatine, elle-même organisée en unité répétée appelée nucléosome, s'organisant ensuite en structure supérieure. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composé de 8 protéines d'histones (2x H2A, H2B, H3 et H4, chargées positivement), en interaction avec 147pb d'ADN (chargé négativement). La chromatine existe sous deux différentes formes, une forme condensée, appelée hétérochromatine, qui est généralement inactive au niveau transcriptionnel et une forme décompactée permettant les processus de régulation de l'ADN, appelée euchromatine (Handbook of Epigenetics - 2nd Edition). La régulation fine de la structure de la chromatine est essentielle pour orchestrer les fonctions cellulaires en modulant la transcription des gènes. Pour ce faire, les histones contiennent un domaine globulaire et des queues d'histones qui dépassent du cœur du nucléosome. Les résidus situés aux extrémités N-terminales des histones peuvent être modifiés post-traductionnellement (PTMs) (Yan et al., 2010). Aujourd'hui, plus de 80 modifications post-traductionnelles d'histones ont été décrites, mais les avancées en protéomique, biologie moléculaire et bio-informatique concourront à la découverte de nouvelles modifications. Parmi ces modifications, les plus étudiées sont l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et la sumoylation.

Les PTMs affectent les interactions entre le nucléosome et l'ADN de deux façons. Premièrement, l'ajout d'entités physiques entraîne une modification de la charge des histones. Deuxièmement, les modifications peuvent servir de « point d'amarrage » ou de répulsion pour certaines protéines.

Par exemple, la phosphorylation de l'histone H2AX sur le résidu 139 entraîne une réponse de dommage à l'ADN. La méthylation et la diméthylation de l'histone H3 sur le résidu K9 sont associées à une activation de la transcription et à un état euchromatine alors que la triméthylation est associée à une répression de la transcription (Zeller et al., 2016). De nombreuses recherches ont également soulevé l'hypothèse que la combinaison de différentes marques et leurs interactions constituent « le code histone », déterminant l'état transcriptionnel d'un locus (Prakash & Fournier, 2017). Un nombre grandissant de protéines interagissant avec un motif spécifique de PTMs, ou un code histone spécifique, ont été découvertes. En outre, les modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) et la méthylation de l'ADN agissent de concert pour permettre une réponse transcriptionnelle adaptée, notamment lors du développement, de la reprogrammation des cellules somatiques et en cas de pathologies cancéreuses (Figure 20) (Cedar & Bergman, 2009).

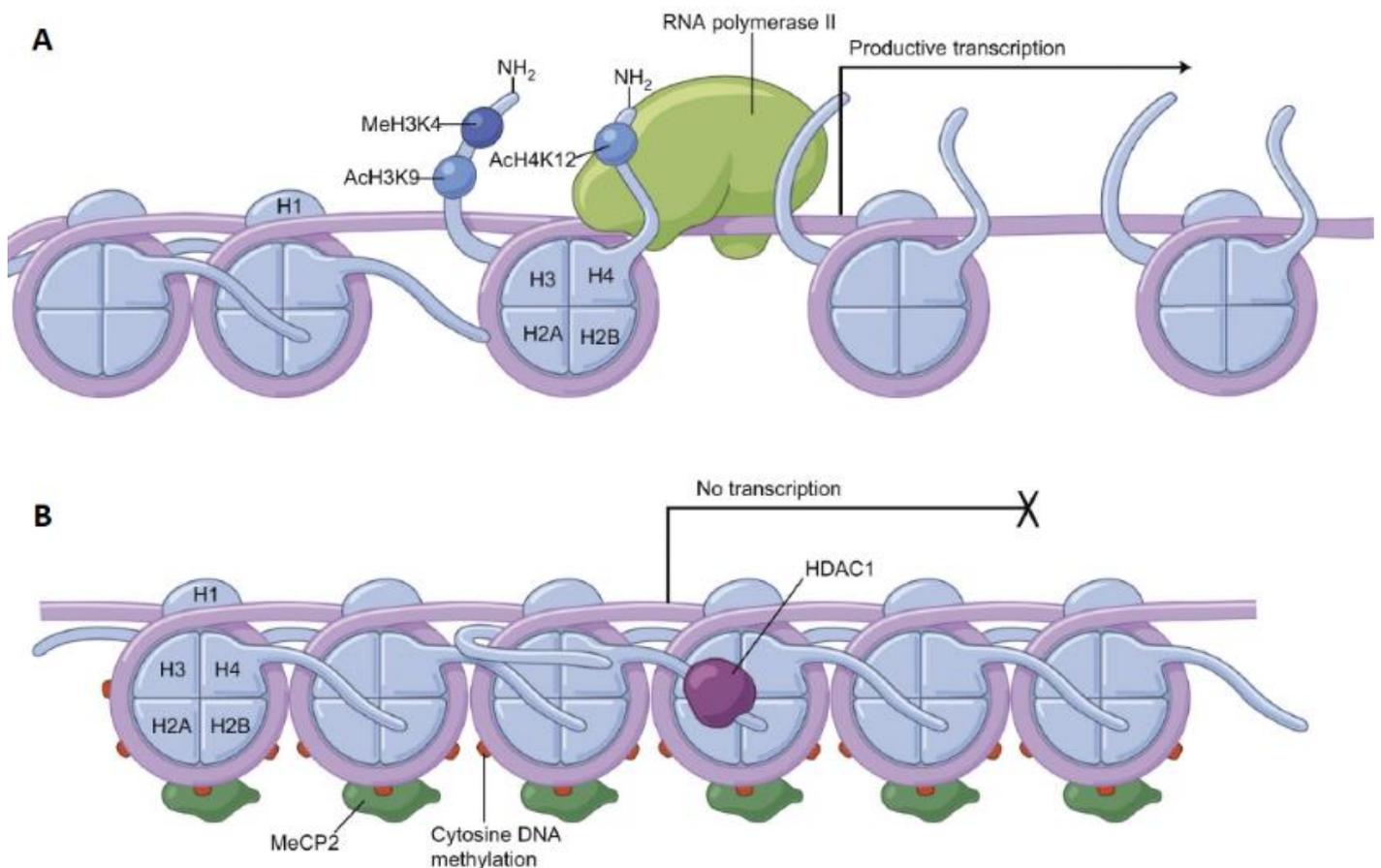


Figure 20 - Interconnexion des mécanismes épigénétiques. (a) L'absence de méthylation et la présence de PTMs activatrice permettent la transcription. (b) La méthylation de l'ADN et l'absence de PTMs entraînent une structure compacte de la chromatine, empêchant la transcription. *Source : Shu-Ching Yan et al., 2010*

L'étude des mécanismes de régulation de la chromatine chez *C. elegans* et *D. melanogaster* a permis de contribuer de manière significative à la compréhension des mécanismes de régulation du génome chez l'homme. Le projet de recherche ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) a permis de fournir à la communauté scientifique plus de 800 nouveaux jeux de données relatives à l'organisation de la chromatine et la transcription associée chez les 3 espèces précédemment citées (Figure 21) (The ENCODE Project Consortium, 2012; Ho et al., 2014). L'étude des PTMs, des domaines topologiques, des promoteurs et amplificateurs et des modèles de réplication de l'ADN montre de nombreuses caractéristiques conservées au sein de ces 3 espèces. Bien que les profils de PTMs soient largement conservés, il existe certaines différences. Par exemple, H3K3ac est enrichi au niveau des promoteurs chez le ver, alors qu'il est enrichi dans le corps des gènes, exprimé ou silencieux chez la mouche. De plus, les 3 espèces montrent des profils différents de méthylation d'H3K9. H3K9m2 est plus fortement corrélé avec H3K9m3 chez *D. melanogaster* que chez *C. elegans*, alors qu'H3K9m2 est corrélé à H3K9me et H3K9me3 à H3K27me3 chez le ver. Ces données démontrent des différences spécifiques sur la régulation de la chromatine silencieuse, ou hétérochromatine. Néanmoins, l'étude globale des PTMs chez les organismes modèles permet d'ouvrir des pistes de recherche ainsi que des explications mécanistiques sur l'Homme.

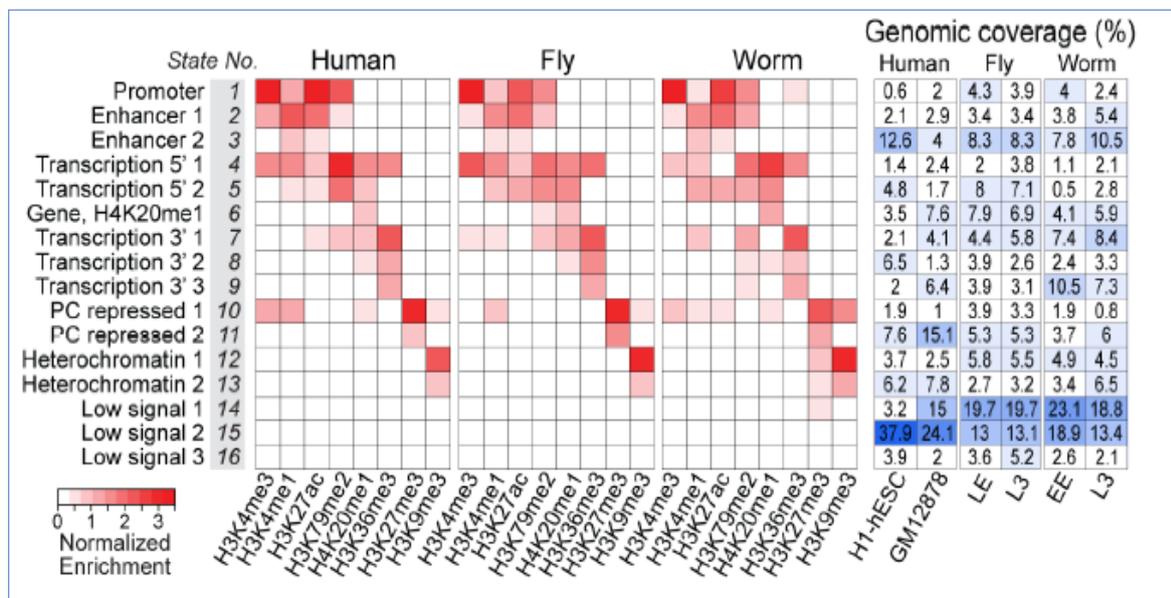


Figure 21 - Conservation et localisation des PTMs : visualisation de 16 états de la chromatine issue de l'enrichissement de 8 PTMs. Source : Ho et al, 2014

1.5.3.4 Contribution des ARN non codants

Moins de 3% du génome humain code pour des protéines, et ce taux est semblable dans de nombreuses espèces phénotypiquement très éloignées. Cette observation permet de proposer que la diversité biologique s'appuie sur une autre composante du génome. Le projet ENCODE a démontré que 80-90% du génome non codant (auparavant appelé « génome poubelle ») était biochimiquement actif, laissant suggérer une activité biologique (The ENCODE Project Consortium, 2012). Une des avancées majeures dans le domaine de l'épigénétique a été la découverte que le génome « non codant », codait en réalité pour des ARN non codants (ARNnc), ayant un rôle primordial dans la régulation : épigénétique, en interagissant avec la méthylation de l'ADN et les histones,

transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et traductionnelle du génome (Z. Liu et al., 2019). L'essor de l'étude des ARNnc a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes régissant l'expression génique en réponse à des changements environnementaux et à l'adaptation physiopathologique tissulaire. De plus, les ARNnc apparaissent comme d'importants régulateurs épigénétiques du remodelage de la chromatine, de l'apoptose, de la différenciation cellulaire ainsi que de l'adaptation à certains stress. Les ARNnc appartiennent à plusieurs familles, regroupés en 2 catégories : les longs ARNnc (> 200 nucléotides) (lncARNs) et les courts ARNnc (<200 nucléotides) regroupant notamment les microRNAs (miRNAs), les piwiRNA (piRNAs) et les short interfering RNAs (siRNAs).

Les longs ARNs non codants

Les lncARNs sont des transcrits de 200 nucléotides à plusieurs dizaines de kilobases. Les gènes des lncARNs sont plus faiblement exprimés que les gènes codants, avec une expression différentielle en fonction des tissus. Certaines séquences initiatrices de la transcription des lncARNs sont marquées par des modifications d'histones (notamment H3K27Ac et H3K4me3) suggérant l'existence d'un rétrocontrôle épigénétique.

Certains lncARNs comme HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) et ANRIL (antisens non-coding RNA in the INK4 locus) ont été associés au remodelage de la chromatine, en guidant des complexes enzymatiques impliqués dans les PTMs, comme PRC2, et en agissant comme initiateurs de l'inhibition des marques répressives de la chromatine (ex : H3K27me3) (Davidovich & Cech, 2015) (Figure 22 a). Ce mode d'action est notamment retrouvé dans l'inactivation du chromosome X. Ils peuvent également réguler l'expression génique en interagissant avec des acteurs de la transcription comme la polymérase II ou des facteurs de transcription, en les déplaçant des séquences régulatrices de l'ADN. Les lncARN peuvent également mimer structurellement certains sites de liaisons de récepteurs et ainsi inhiber l'action de certaines hormones (Figure 22 b). D'autres interagissent avec certains ARNm avant l'épissage alternatif pour favoriser certains variants (Figure 22 d). Les lncRNAs semblent également en mesure d'agir comme des leurres pour permettre aux ARNm ciblés par des miRNAs d'échapper à la dégradation. Le trio ARNm, microARN et lncARN forme un réseau en interaction (competitive endogenous network) (Pedrazzini, 2015) (Figure 22 c). Enfin, ils permettent l'association de séquences amplificatrices et promotrices pour initier la transcription (Figure 22 e). La dérégulation des lncRNAs dans différentes pathologies ouvre un nouveau champ de recherche médicale, illustré par HOTAIR, parfois nommé « onco-lncRNA » (Rinn et al., 2007). Les recherches sur ce sujet sont en plein essor, autant pour comprendre les mécanismes d'actions que pour l'utilisation en diagnostic des lncARNs circulants dans les fluides corporels.

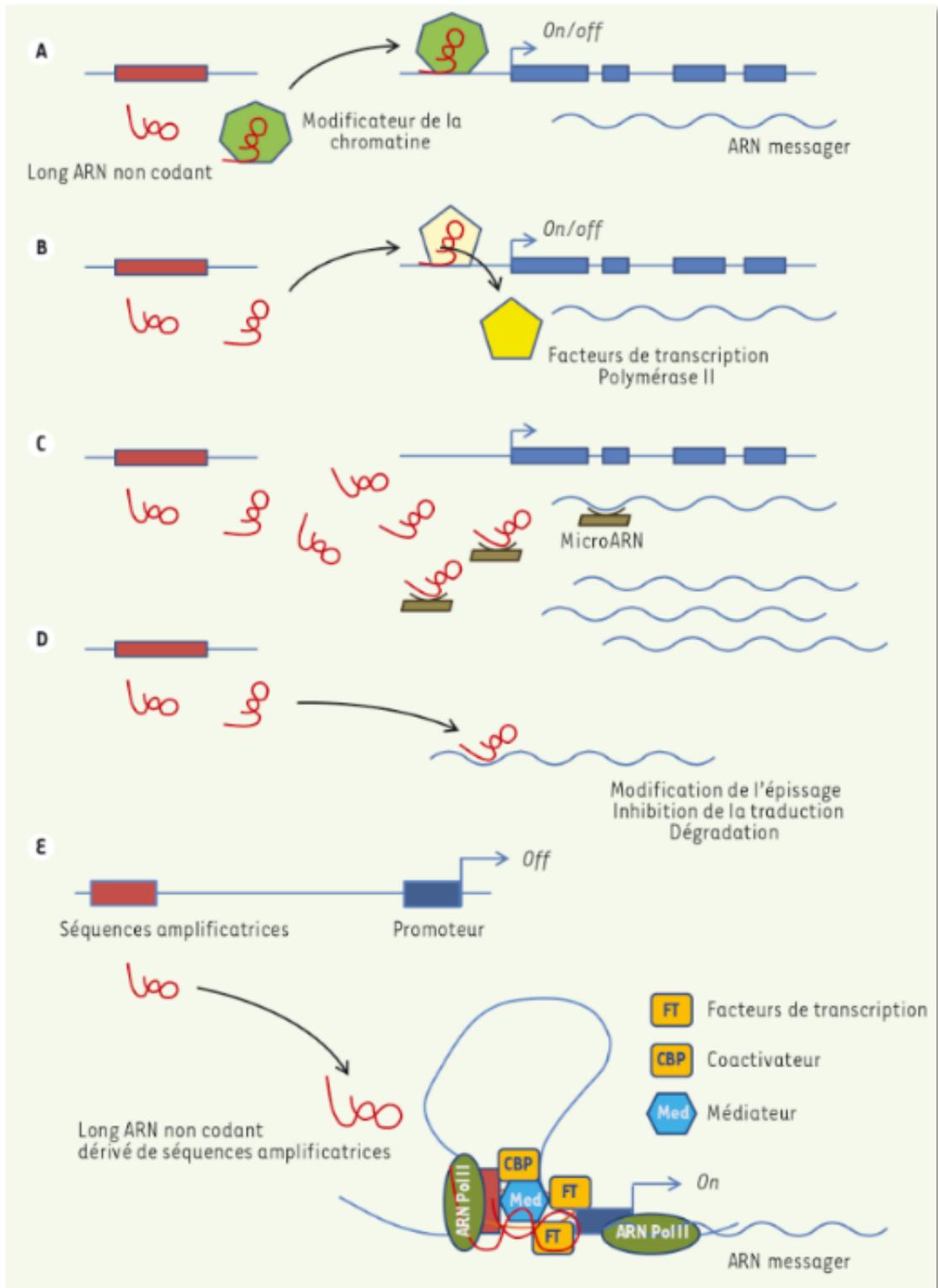


Figure 22 - Rôle et mécanismes d'actions des longs ARN non codants dans la régulation de la transcription. *Source Pedrazzini et al, 2015*

Les miRNAs et siRNAs (short interfering RNA) sont les effecteurs de l'interférence ARN (ou RNAi), une voie de régulation de l'expression post-transcriptionnelle des gènes. L'explication mécanistique de ce phénomène sur *C. elegans* a conduit au Prix Nobel de médecine en 2006 d'A. Fire et C. Mello (Fire et al., 1998). Ce processus permet l'inactivation spécifique d'ARNm. Le mécanisme d'ARNi a probablement été sélectionné au cours de l'évolution pour protéger les cellules contre la transcription de certains gènes (en particulier de virus ou transposon), afin de permettre une dégradation des ARNm non fonctionnels et moduler l'expression génique, mais également comme un mécanisme de régulation majeur de l'expression du génome. Deux autres classes de courts ARNs non codants, les piRNAs (ou piwi interacting RNAs) ainsi que les snoRNA (small nucleolar RNA) sont également impliqués dans les processus épigénétiques.

Les miRNAs (21 à 24 nucléotides), codés par le génome de la cellule, peuvent induire une inhibition de la traduction ou un clivage de l'ARNm cible en fonction de la complémentarité de séquence. On estime que 60% des gènes sont régulés par des miRNAs chez l'homme (Zhang & Wang, 2017). La biogenèse des miRNAs a été largement décrite dans la littérature scientifique (Vella, 2005). Les gènes des miRNAs sont transcrits, certains par l'ARN polymérase II, pour produire des transcrits primaires de plusieurs milliers de nucléotides, appelés pri-miRNAs. Les pri-miRNAs sont clivés par le complexe Drosha/DGCR8 pour former des précurseurs de quelques centaines de nucléotides, appelés pre-miRNAs. Les pre-miRNAs sont transportés hors du noyau par les complexes Ran-GTP/Exportin-5 avant d'être clivés par le complexe Dicer/TRBP pour produire des miRNAs matures d'une longueur de 19 à 24 nucléotides. L'interaction du miRNAs mature double brins avec une protéine de la famille des argonautes permet la formation du complexe RISC, également miRISC. Ce complexe va faire passer le miRNAs double brin en simple brin. L'ARNm cible est ensuite chargé par le complexe miRISC, en fonction de la complémentarité de séquences avec le miRNAs, avant d'être soit clivé soit réprimé. Notons que les miRNAs sont des effecteurs primordiaux très dynamiques de la réponse au stress. De nombreuses études relatent des modifications dans l'expression de miRNAs suite à une exposition à différents stress environnementaux chez *C. elegans*: stress oxydatif (Kato et al., 2016), oxyde de graphène (Yang et al., 2016), nanoparticules de carbone (Zhao et al., 2016), Benzo α pyrène, hypoxie, restriction calorique, etc.

Les miRNAs sont impliqués dans la régulation de l'expression génique, de manière physiologique ou en réponse à l'environnement. Il existe un rétrocontrôle des miRNAs sur la machinerie épigénétique et un contrôle de l'expression des miRNAs par des mécanismes épigénétiques, dont les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins, certains gènes du complexe Polycomb, d'histones désacétylases et de DNA méthyltransférases sont sous contrôle de miRNAs. A contrario, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones régulent l'expression de certains miRNAs (Sato et al., 2011). Chez l'homme, les gènes des miRNAs sont associés à 50% à des îlots CpG. De plus, la délétion du gène *DICER-LIKE1b* (clivage des pre-miRNAs) entraîne une réduction du nombre d'ARNm en hyperméthylant les gènes cibles, permettant de maintenir les taux d'ARNm et suggérant un mécanisme de rétrocontrôle entre miRNAs et méthylation de l'ADN. La Figure 23 présente une partie du mécanisme de rétrocontrôle entre épigénétiques et microRNAs. La perturbation de ce circuit est notamment impliquée dans la physiopathologie de maladies cardiovasculaires ou de cancers.

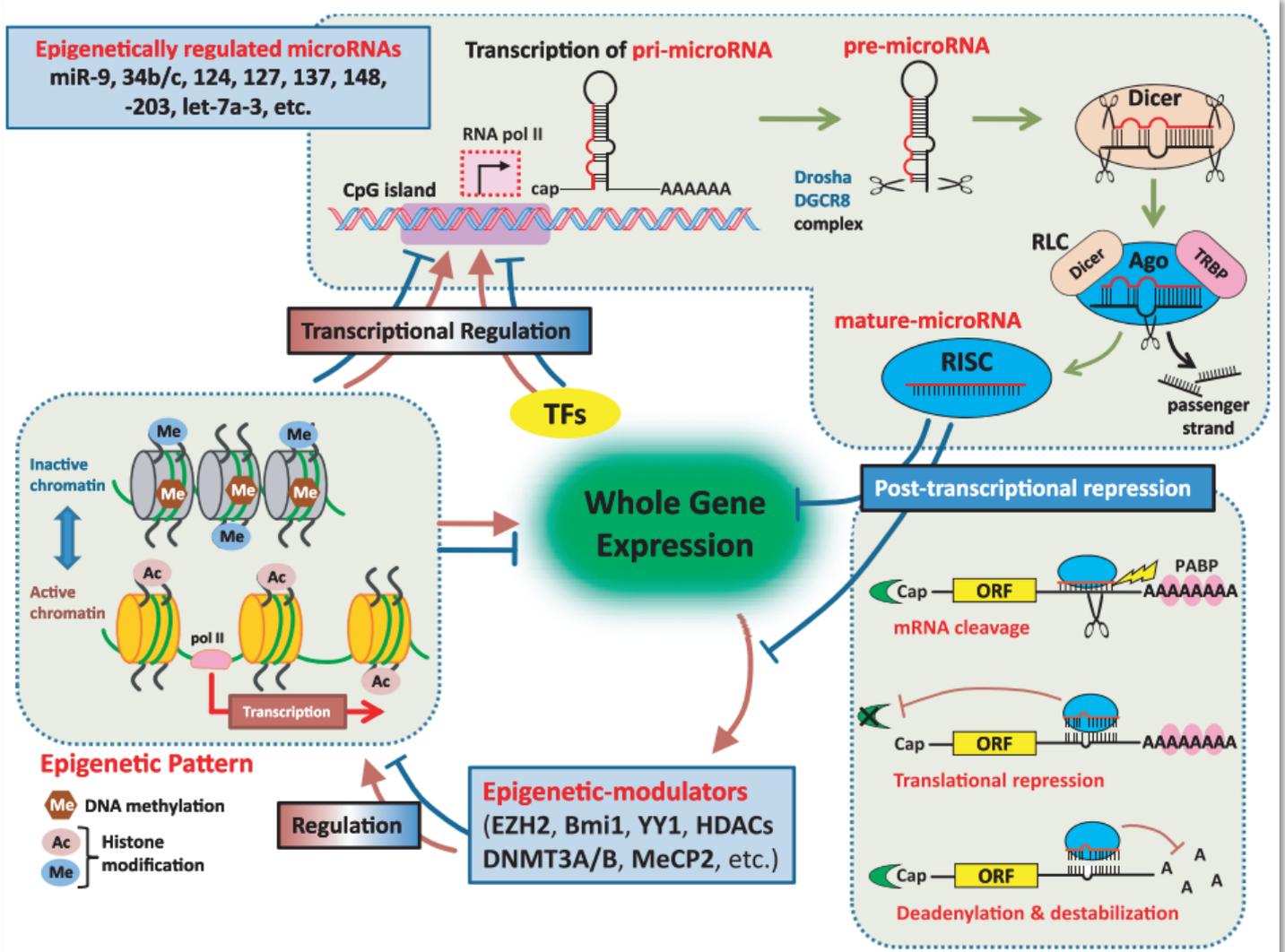


Figure 23 - Circuit de régulation miRNAs-épigénétique. L'épigénétique et les miRNAs régulent l'expression des gènes de manière transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et se régulent mutuellement. *Source : Sato et al, 2011*

Les siRNAs peuvent être d'origine exogène (ARN double brin de virus) ou endogène (ARN double brin propre à la cellule). Les précurseurs des siRNAs sont des longs dsRNA qui sont clivés puis dissociés, dans un processus similaire à celui des miRNAs, pour aboutir aux siRNAs. Notons que les siRNAs, au même titre que les piwiRNAs, sont impliqués dans le contrôle de la mobilité des transposons. Les siRNAs ont une complémentarité de séquence parfaite avec l'ARNm cible, induisant un clivage ou une répression de la transcription par remodelage de la chromatine (dans un mécanisme encore imparfaitement décrypté impliquant la méthylation de l'ADN et de l'histone H3)(Youngman & Claycomb, 2014).

Les piRNAs sont des petits ARNs, exprimés dans les stades précoces de développement (cellules germinales et embryons), agissant dans le blocage d'éléments mobiles de type transposons ou rétroéléments. Leur action évite un remaniement génomique (maintien de l'intégrité du génome) pouvant avoir des conséquences létales lors des premiers stades de différenciation cellulaire. Les piRNAs se lient avec leur cible

et les hydrolysent via une interaction avec les protéines PIWI, laissant supposer un mode d'action analogue avec le mécanisme d'ARNi. Ils agissent également sur la structure de la chromatine, et plus précisément sur l'initiation de la forme hétérochromatine. De plus, ils peuvent être transmis à la descendance, permettant d'influencer la régulation d'éléments transposables (Weiser & Kim, 2019).

I.5.4 Effets transgénérationnels chez *C. elegans*

Certaines marques épigénétiques sont transmissibles au sein des mitoses et des méioses, pouvant conférer un avantage adaptatif aux descendants vis-à-vis des stress auxquels a été soumise la génération parentale. Chez *C. elegans*, certaines études montrent un effet hormétique chez la descendance d'organismes exposés à certains stress. Cette observation suggère la mise en place d'une mémoire épigénétique (Kishimoto et al., 2017). La lignée germinale est le support des informations génétiques et épigénétiques transmises entre les générations. Lors de la fertilisation, la réunion de deux génomes possédant des marques épigénétiques différentes aboutit à un effacement et une reprogrammation de ces dernières. Néanmoins, un grand nombre de patterns semble être transmis, ce qui laisse à penser que la reprogrammation peut être influencée par les marques épigénétiques parentales.

De plus, certains épiallèles (expression allélique gouvernée par l'état épigénétique de l'ADN) de la souris sont résistants à l'effacement de la méthylation de l'ADN lors des événements de reprogrammation dans les stades précoces. Chez l'homme, il existe également certaines loci, impliquées dans des maladies métaboliques et neurologiques, résistants à la reprogrammation (Tang et al., 2015). La preuve de ce concept semble faite, mais la mécanistique sous-jacente à la mémoire transgénérationnelle est un axe majeur de recherche dans le domaine de l'épigénétique. La Figure 24a présente une modification épigénétique (ou génétique), touchant (i) les cellules germinales, transmises aux tissus somatiques et germinaux de la descendance et une modification épigénétique touchant (ii) la lignée somatique, transmise au sein des divisions cellulaires, mais non au fil des générations (Kelly, 2014).

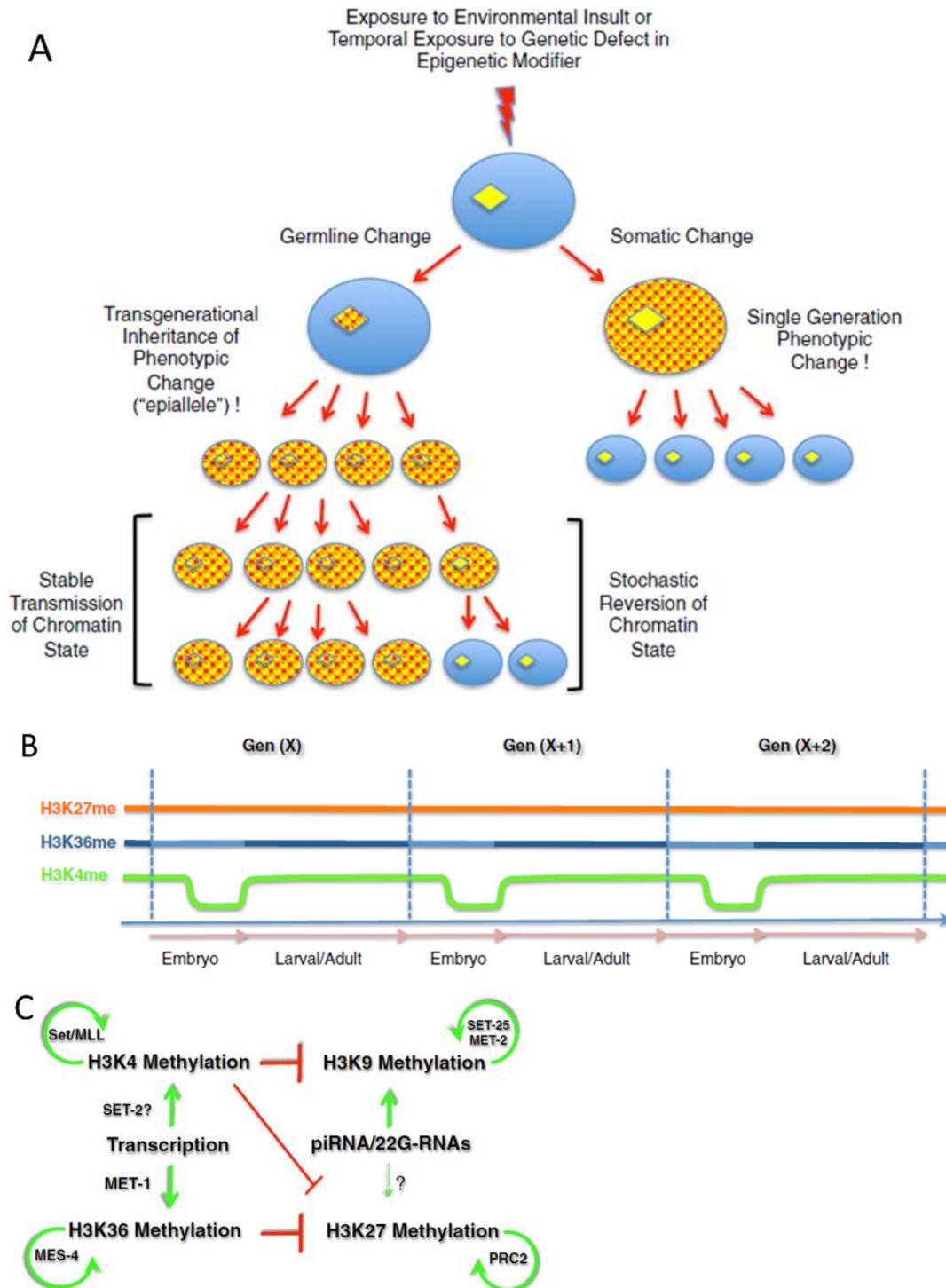


Figure 24 - (a) Transmission d'information génétique ou épigénétique au fil des divisions cellulaires. (b). Méthylation des histones sur plusieurs générations chez *C. elegans*. (c) Interconnexion des modifications de l'histone H3. *Source : Kelly., 2014*

Chez *C. elegans*, certaines PTMs semblent échapper à la reprogrammation suivant la fécondation, et sont transmises via les gamètes mâles au fil des générations (Samson et al., 2014) (Figure 24b). La modification la plus étudiée est le degré de méthylation (méthyl, di-, tri-méthyl) de l'histone H3 sur les résidus K4, K9, K27 et K36 (Figure 24c). Les modifications de l'histone H3 semblent être de bonnes candidates pour la transmission d'une mémoire épigénétique et d'une modulation stable de la transcription.

Ces modifications sont établies et maintenues par l'intermédiaire d'un certain nombre d'enzymes et de complexes protéiques. En règle générale, chez *C. elegans*, la méthylation d'H3K4 et H3K36 est associée à une activation de la transcription alors que H3K9 et H3K27 sont associées à une répression de la transcription. La régulation et l'interconnexion des différentes méthylations de l'histone H3 sont nécessaires à la viabilité de *C. elegans*.

En effet, le maintien du profil de méthylation d'H3K36 par l'activité enzymatique MES-4 empêche une activité de transcription aberrante dans les cellules germinales primordiales. Dans les souches mutantes MES-4, l'activité de Pol II (RNA polymérase II) est dérégulée et les cellules primordiales dégénèrent, aboutissant à un phénotype stérile (Furuhashi et al., 2010). La suppression de la déméthylase *spr-5* (orthologue de la déméthylase humaine LSD1) de l'histone H3K4me2 conduit à une accumulation héréditaire de la marque euchromatine H3K4me2 et un déclin progressif de la fertilité. À l'inverse, la suppression de la méthylase d'H3K4me2 *set-30* inverse progressivement ce phénotype sur 20 générations. **Ces données confirment un réseau connecté et finement régulé contrôlant le flux d'informations épigénétiques transgénérationnelles ainsi qu'un équilibre entre H3K4 et H3K9 pouvant moduler les effets transgénérationnels sur la fertilité** (Greer et al., 2014) (Figure 25c). Une étude récente amène une nouvelle preuve de mémoire épigénétique transgénérationnelle médiée par les PTMs chez *C. elegans*. Une modification de la température peut induire une modification de l'expression génique sur 15 générations, se transmettant par les gamètes mâles et femelles, associée à la triméthylation de l'histone H3 sur la Lysine 9, par le biais de la méthyltransférase *set-25* (Klosin et al., 2017).

En outre, il a été démontré une régulation réciproque de la méthylation de l'histone H3K4 et de la méthylation 6mA, ainsi qu'une interconnexion des régulateurs de ces 2 processus. Comme précédemment évoquée, la souche délétée pour *spr-5*, responsable de la déméthylation de l'histone H3K4me2, présente un phénotype de diminution progressive de la fertilité au fil des générations. Ce phénotype est associé à une accumulation de me2 sur l'histone H3K4 ainsi qu'une augmentation de 6mA sur 20 générations (Figure 25b). La délétion de DAMT-1 sur la souche *spr-5* réduit le niveau de me2 d'H3K4 et reverse partiellement la baisse de fertilité (Greer et al., 2015). À l'inverse, la délétion de NMAD-1 accélère le déclin progressif de la fertilité. Les données de cette étude semblent indiquer une transmission d'informations transgénérationnelles liée à l'histone H3K4 et à la 6mA. Deux séquences sont significativement associées à la présence de 6mA. Le motif GAGG est le plus répandu dans les sites fréquemment méthylés (50-100% de niveau de méthylation) ainsi que le site AGAA (10-50% de niveau de méthylation). De plus, le niveau de 6mA au sein de différents réplicas d'une même population de *C. elegans* isogénique varie de 0.013 à 0.39%, soit une variation d'un ratio de plus de 30 entre les individus. Cette donnée suggère que le niveau de 6mA chez *C. elegans* est particulièrement sensible aux stress environnementaux et/ou aux étapes de développement (O'Brown & Greer, 2016).

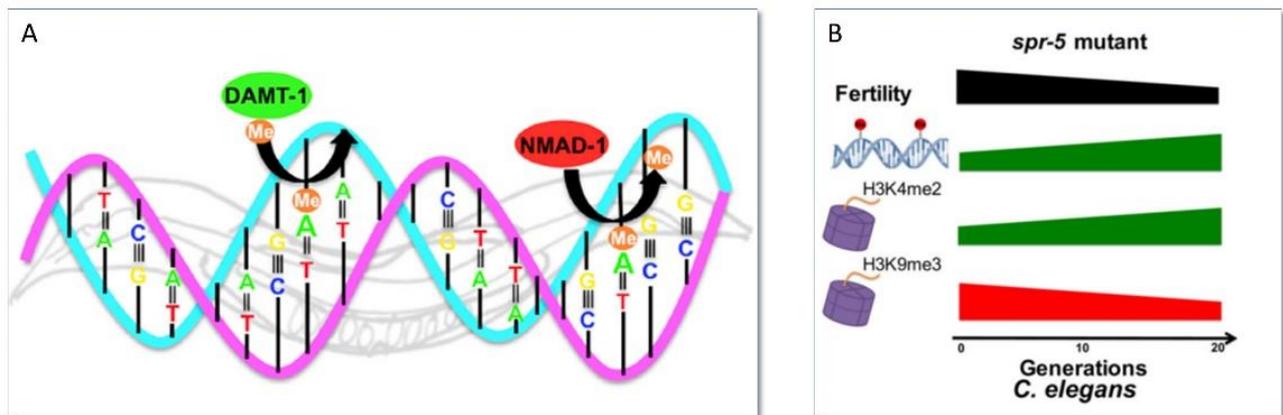


Figure 25 - (a) Enzymes responsables de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN en position 6mA chez *C. elegans*. (b) Corrélation entre processus méthylation de l'ADN en 6mA, méthylation des histones et fertilité. *Source : Greer et al, 2015*

La mémoire transgénérationnelle est également régulée par les ARN non codants. L'amplification de courts non codants héréditaires au fil des générations, peut être induite par des courts ARNs endogènes ou exogènes, comme les siRNAs ou les piRNAs (Figure 26b) (Hourri-Zeevi et al., 2021). Dans certains cas, la réponse de l'ARN interférence peut induire une répression de gènes stable sur de nombreuses générations (Vastenhouw et al., 2006). De plus, certaines PTMs des histones sont initiées par un ARN double brins et peuvent être maintenues en l'absence d'ARNdb pendant au moins 2 générations. Ces résultats étayent l'hypothèse d'une réponse programmable et spécifique, définissant un état chromatinien métastable et transgénérationnel induit par les ARNnc (Gu et al., 2012). Les piRNAs peuvent induire une répression de l'expression de gènes sur une vingtaine de générations, en interagissant avec des histones méthyltransférases *set-25* et *set-32* et en étant transporté du soma à la lignée germinale par des protéines de la famille argonaute (Ashe et al., 2012; Hourri-Zeevi et al., 2021). Par la suite, il a été montré que l'interconnexion des ARN double brins, des siRNAs et du mécanisme d'ARNi permet de moduler la réponse transgénérationnelle répressive de certains gènes, si l'environnement de la descendance et des parents sont différents (Hourri-Zeevi et al., 2020; Hourri-Zeevi et al., 2016; Hourri-Zeevi & Rechavi, 2017). Ce mécanisme actif permet de dicter si l'ARN interférence ancestrale est mémorisé ou omis (Figure 26a). Les miRNAs sont également un effecteur potentiel de la mémoire transgénérationnelle, car ils interagissent et régulent les autres modifications épigénétiques. Une étude a également montré une transmission transgénérationnelle de miRNAs sur 3 générations, après une exposition à la nicotine (Taki et al., 2015). Cette étude suggère que les miRNAs ne sont pas uniquement des régulateurs secondaires de la mémoire épigénétique, mais peuvent également être transmis ou induits par d'autres mécanismes épigénétiques au fil des générations.

Les mécanismes épigénétiques de *C. elegans*, encore imparfaitement décryptés, sont essentiels à son développement, son fonctionnement physiologique ainsi qu'à l'adaptation à son environnement cellulaire et extérieur. Certaines marques épigénétiques peuvent être transmises aux générations suivantes, conférant un avantage adaptatif à la descendance ou une mémoire ancestrale de l'exposition à un stress.

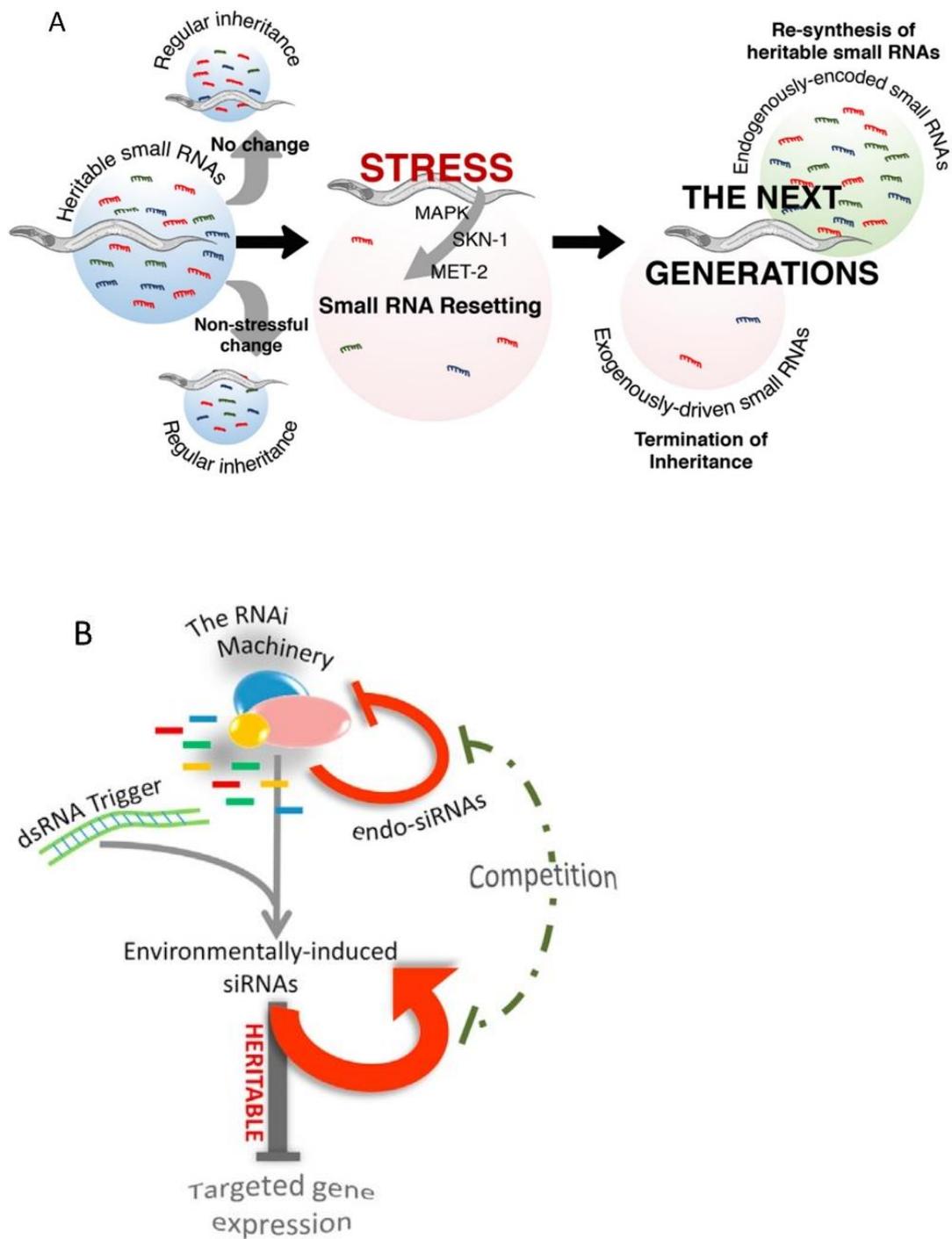


Figure 26 - (a) Modèle de la réinitialisation induite par le stress des courts ARN héréditaires. *Source* : Houry Zeevi et al., 2012. (b) Schéma de l'interaction entre les réponses RNAi héréditaires et le rétrocontrôle déterminant la durée de la répression transgénérationnelle *Source* : Rechavi et al., 2016

Deuxième partie

II. Objectifs et stratégies de recherches

Table des matières

II.1 Objectifs.....	80
II.2 Stratégie de recherche.....	83

II.1 Objectifs

Ce projet de recherche s'intègre dans le cadre du programme national de recherche Environnement-Santé Travail. Cette thèse a pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité (dont les mécanismes génotoxiques) et leur héritabilité lors d'exposition chronique à de faibles doses de RI. Une précédente étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré un impact sur la reproduction à la 3ème génération de *C. elegans* continuellement exposé à un débit de dose de 42.7 mGy.h^{-1} (Buisset-Goussen et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes subcellulaires n'ont pas été identifiés et ne permettent pas d'apporter une explication mécanistique à ce phénotype ainsi qu'un impact sur les processus cellulaires et la transmission d'informations entre les générations. Au regard du faible nombre d'études disponibles sur les mécanismes subcellulaires impliqués dans la réponse multigénérationnelle aux radiations ionisantes, ce projet a pour objectif de faire le lien entre mécanisme moléculaire et conséquences phénotypiques sur plusieurs générations, chez le nématode *C. elegans*. Pour cela, 3 approches complémentaires ont été utilisées.

Premièrement, comme présentés succinctement au paragraphe I.4.3, les événements initiateurs des conséquences phénotypiques ont été identifiés sur une génération exposée, à un débit de dose similaire à celui utilisé dans le cadre des expositions multi- et transgénérationnelles (Maremonti et al., 2019, 2020a). Nous avons démontré que la présence de dommages à l'ADN et l'augmentation de la charge oxydative dans les cellules font partie des éléments initiateurs des conséquences d'une exposition chronique aux rayonnements gamma. Nous montrons également que les stades larvaires sont les plus sensibles. Cette donnée suggère qu'il est pertinent de prendre en compte la sensibilité des stades de vie pour une analyse exhaustive des effets des RI.

Deuxièmement, nous avons mis en place une approche de biologie des systèmes pour analyser les conséquences d'une exposition multigénérationnelle à différentes échelles biologiques : transcriptomique, moléculaire, cellulaire, tissulaire et phénotypique.

Troisièmement, nous avons analysé l'impact des RI sur un mécanisme épigénétique impliquant les microARNs. Nous avons également participé à la mise au point d'un protocole de Chip-Seq qui permet d'analyser les PTMs chez *C. elegans*, avec une quantité de matériel biologique moindre et une rapidité bien plus importante que les protocoles actuellement disponibles.

II.1.1 Évaluation des effets toxiques multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez le nématode *C. elegans*

La première partie de nos recherches a pour but d'identifier les effets néfastes d'une exposition chronique aux rayonnements gamma, l'un des principaux produits de fission de l'uranium, à plusieurs échelles biologiques. Ce type de rayonnements possède un fort pouvoir pénétrant et son parcours dans la matière est long comparativement aux rayons alpha et bêta. Ainsi, les rayonnements gamma contribuent fortement à la dose externe reçue par un organisme.

Pour analyser les effets des rayons gamma, nous avons réalisé des analyses à plusieurs échelles biologiques. En effet, les altérations phénotypiques apparaissent généralement plus tardivement que les effets à l'échelle subcellulaire. Inversement, un impact à l'échelle subcellulaire peut ne pas avoir d'impact sur le phénotype et/ou influencer le phénotype à long terme ou après plusieurs générations. L'analyse et l'intégration de données à plusieurs échelles permettent de fournir des informations importantes pour la compréhension fondamentale des modes d'action toxiques des radiations ionisantes à travers les générations. Pour cette partie, une approche de biologie des systèmes a été utilisée. De plus, une attention particulière est portée à l'aggravation ou à la diminution des effets au fil des générations. En effet, des phénomènes d'acclimatation, d'adaptation, ou à l'inverse, d'aggravation des réponses biologiques en réponse à un stress multigénérationnel ont été démontrés ((Buisset-Goussen et al., 2014; Parisot et al., 2015).

Cette première question se subdivise en deux parties :

- L'évaluation des effets des RI sur la reproduction ainsi que les causes tissulaires, cellulaires et moléculaires. La transmission d'effets ou d'informations entre les générations est directement liée à la lignée germinale. Il convient de décrypter le mécanisme d'action des RI sur la gonade et les gamètes pour appréhender les modes d'action toxiques sur plusieurs générations.
- L'évaluation des effets des RI sur le transcriptome et les facteurs de transcription. En effet, l'organisme en réponse à un stress va mettre en place de nombreux mécanismes de défense, comme la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose ou une modification du métabolisme pour lutter et conserver son intégrité. De plus, les outils associés aux méthodes d'analyses haut débit (GOTERMS, Kegg Pathway, ou phenotypic enrichment) permettent de mettre en lumière des mécanismes aux échelles supérieures qui peuvent ensuite être validés par des méthodes in situ, des lignées mutantes ou des observations microscopiques.

II.1.2 Contribution des miRNAs dans l'héritage transgénérationnel des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez *C. elegans*.

La deuxième partie de nos recherches a pour but d'identifier les fonctions biologiques médiées par les miRNAs, en réponse à une irradiation gamma. Comme précédemment développés dans les paragraphes I.5.3 et I.5.4, les miRNAs sont des effecteurs centraux de la régulation des gènes et interagissent avec les autres mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN, les PTMS, ou les ARN non codants. Chez *C. elegans*, plus de 140 gènes codent pour des miRNAs impliqués dans le développement, la reproduction, le métabolisme ainsi que la réponse physiologique et environnementale à un stress (Ambros & Ruvkun, 2018). Une attention particulière est portée à la transmission des miRNAs entre les générations ainsi qu'aux rôles des familles de miRNAs modulées et à leur contribution dans le fonctionnement de la lignée germinale.

Il s'agit de la première étude générationnelle portant sur l'étude des miRNAs sur plusieurs générations en réponse à un stress radiobiologique chez *C. elegans*. Les miRNAs sont en partie conservés entre les espèces, permettant de transposer certaines informations à des organismes supérieurs. À titre d'illustration, le cel-mir-237 et son homologue humain hsa-miR-125b modulent la sensibilité cellulaire en réponse à de fortes doses d'irradiation aiguë (Metheetraitut et al., 2017).

Cet axe de recherche se subdivise en deux parties :

- L'analyse de la modulation des miRNAs dans un contexte d'exposition multigénérationnelle. Les fonctions biologiques, les enrichissements de phénotypes, ainsi que l'interaction de miRNAs agissant en réseau sont analysés pour identifier les modes d'action impliqués dans la réponse à l'irradiation chronique.
- La contribution des miRNAs dans l'héritage transgénérationnel d'une exposition chronique aux rayonnements gamma. L'analyse de la 3ème génération après arrêt de l'irradiation permet d'étudier la contribution des miRNAs dans la transmission d'informations transgénérationnelles. L'analyse et le rôle des miRNAs transmis permettent d'identifier des potentiels effecteurs de cette réponse. La modulation de ces miRNAs est confrontée aux données de transcriptomique issues de la première partie de nos recherches.

II.2 Stratégie de recherche

II.2.1 Modèle biologique

Les effets d'une exposition chronique aux rayonnements gamma ont été évalués sur l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*. Il s'agit d'un invertébré couramment utilisé en toxicologie, en biologie moléculaire et médicale, ainsi que dans le domaine du vieillissement et de la fertilité. Son cycle de vie court, sa facilité d'élevage ainsi que les nombreux outils de biologie moléculaire et la présence d'une communauté scientifique dynamique l'utilisant font partie des nombreux avantages de ce modèle, développé dans le chapitre I.3. En effet, *C. elegans* est un modèle biologique approprié pour étudier les effets multi- et transgénérationnels de par son cycle de vie permettant de générer plusieurs générations sur un temps relativement court. L'homologie d'un certain nombre de mécanismes moléculaires et cellulaires permet de transposer ou d'ouvrir des champs de recherche sur d'autres organismes. À titre d'exemple, les prix Nobel de médecine de 2002 et de 2006, sur la mort cellulaire programmée et l'ARN interférence respectivement, ont été décernés pour la découverte de ces deux mécanismes conservés chez *C. elegans*. Cet organisme est également le premier animal à avoir eu son génome séquencé. Couplés au fait que *C. elegans* est transparent, de nombreux outils moléculaires et bio-informatiques ont été développés pour décrypter, *in vivo*, les mécanismes subcellulaires régissant son fonctionnement physiologique et en réponse à un stress.

II.2.2 Protocole d'irradiation

Le protocole d'exposition utilisé pour identifier les stades larvaires comme étant les plus sensibles a été détaillé dans le chapitre 1.4.3. En effet, les stades de développement sont sensibles aux perturbations en raison de la multiplication rapide des cellules et de l'établissement des marques épigénétiques. Pour le reste de nos études, le protocole d'irradiation utilisé, englobant les stades larvaires, est détaillé sur la figure 27. Les nématodes sont cultivés par les techniques standard à 19°C, 80 % humidité, sur des boîtes de pétri avec du NGM (Nematode Growth Medium) etensemencées avec un tapis bactérien d'*Escherichia coli* OP50 (Brenner, 1974). Les nématodes sont synchronisés par la technique dite de « bleaching », c'est-à-dire un traitement des adultes contenant des embryons avec une solution alcaline d'hypochlorite de sodium (Stiernagle, 2006). Cette technique permet de dissoudre la cuticule des adultes gravides sans impacter l'intégrité des embryons. Pour le lancement des irradiations, plusieurs amplifications d'une population clonale sont réalisées, par bleaching puis ensemencement de boîte de pétri, pour obtenir une population suffisante au lancement des irradiations.

La population clonale initiale est divisée en 3 cohortes, une cohorte « Contrôle », une cohorte « Exposée » continuellement soumise à une irradiation chronique sur 4 générations et une cohorte « Recovery », placée en environnement contrôle après exposition parentale et suivie sur 3 générations pour étudier les effets transgénérationnels. Pour chaque cohorte, les échantillons sont prélevés à chaque génération, au bout de 65 heures, c'est-à-dire au stade jeune adulte. Des tripliquas sont laissés en condition contrôle ou sous irradiation pendant 24 heures de plus pour réaliser une synchronisation au stade adulte grvide et lancer la prochaine génération. Dans le cadre de cette thèse, 6 irradiations ont été réalisées, composés de 3 cohortes, avec 3 à 10 réplicas de 1000 à 10 000 vers en fonctions des expérimentations. Depuis l'étape de croissance bactérienne et de production des boîtes de pétri jusqu'à la collecte de la 4^{ème} génération (F3), la durée totale de notre protocole d'irradiation est comprise entre 3 semaines et 1 mois. Lors de ce travail de recherche, les nématodes ont été exposés à un débit de dose de 50mGy.h⁻¹, pour une dose cumulée de 3.3 Gy (65 heures d'exposition).

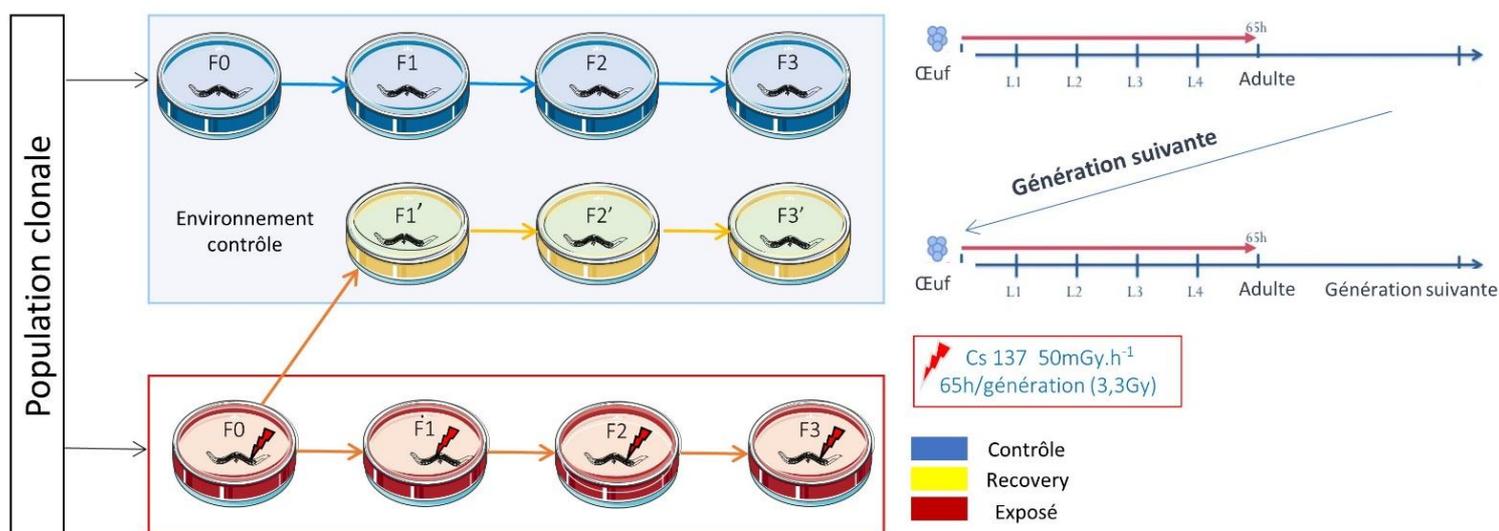


Figure 27 - Protocole d'exposition utilisé dans le cadre des axes de recherche de ce travail de thèse

II.2.3 Exposition aux rayonnements ionisants

Comme développé dans la partie I.1, l'irradiation externe aux rayonnements gamma est caractérisée par l'exposition d'un organisme aux rayonnements provenant d'une source située à distance de l'organisme. Lorsqu'il n'y a pas de contact entre l'organisme et la source, on parle d'irradiation. La dose cumulée (Gy) est calculée à partir du débit de dose et du temps d'exposition. Le débit de dose est calculé en fonction de l'activité de la source et de la distance.

II.2.3.1 Dispositifs d'irradiation

Deux dispositifs d'irradiation, situés sur le centre de recherche de Cadarache, ont été utilisés dans le cadre de cette thèse. Pour la première partie des recherches, la plateforme MIRE (Mini Irradiation for Radio-Ecology) a été utilisée. Pour la seconde partie, nécessitant de générer un nombre plus important d'échantillons, la plateforme MICADO'Lab (Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations Dose effet en Laboratoire) a été privilégiée. MIRE et MICADO'Lab disposent de sources de césium 137 avec des activités de 1,6 GBq et de 4x111GBq respectivement. Dans le cas de MIRE, la source est située au sein de la chambre climatique contenant les nématodes, permettant la régulation de l'humidité et la température (Figure 28b). La source est disposée au centre de l'incubateur et est recouverte par une chape de plomb, déplaçable à l'aide d'un levier pour les périodes d'irradiations. Les chambres climatiques sont entourées par des protections en plomb pour limiter fortement les rayons ionisants dans l'enceinte du dispositif (Figure 28 a). Pour MICADO'Lab, la source est à l'extérieur de la chambre climatique contenant les échantillons (Figure 28 c). La chambre climatique est placée en dessous ou à distance de la source, en fonction du débit de doses souhaitées.

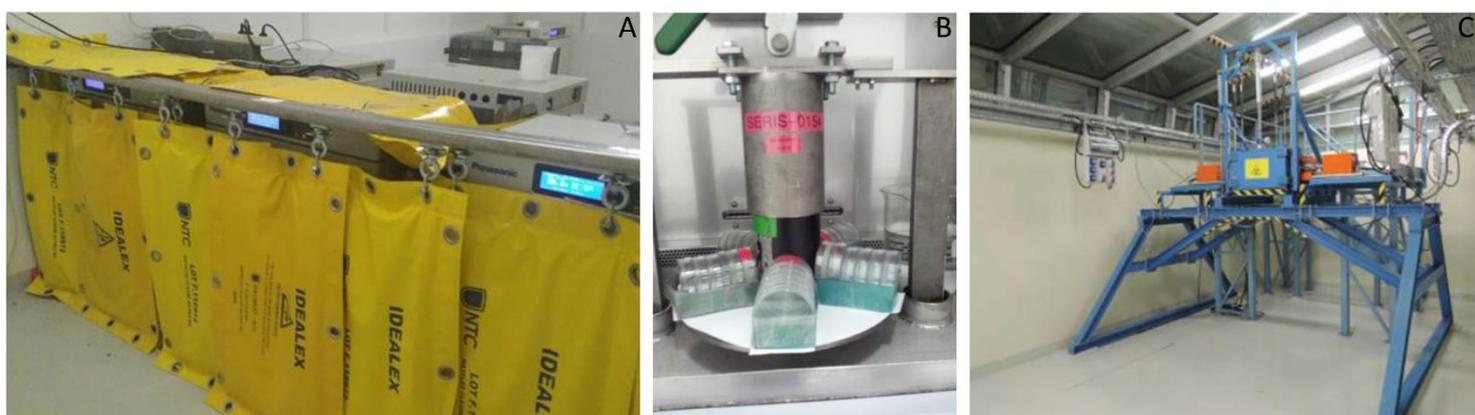


Figure 28 - Dispositifs d'irradiation de l'IRSN sur le site de Cadarache. (a) Irradiateur MIRE protégé par des sacs de plomb (jaune). (b) Source et chape de plomb au centre de la chambre climatique. (c) Hall d'irradiation MICADO'Lab. Les sources sont situées dans les caissons de protection (orange). *Source : IRSN*

II.2.3.2 Choix et calcul du débit de doses

Le choix du débit de dose a été réalisé par rapport aux expérimentations précédemment réalisées au sein de notre laboratoire. En effet, nous souhaitons avoir un débit de dose permettant d'observer un phénotype sur la reproduction, le paramètre observable le plus radiosensible, pour pouvoir appliquer une méthodologie de biologie des systèmes jusqu'à l'échelle phénotypique. Le choix a été fait pour un débit de dose de $50\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, pour une durée d'exposition de 65 heures par génération. De plus, ces paramètres d'irradiation ont été utilisés dans le cadre d'une autre thèse dont l'objectif était d'étudier la réponse du protéasome et des protéines à l'irradiation. L'utilisation de paramètres similaires permet de comparer les différents jeux de données obtenues.

Un calcul théorique permet de placer les échantillons à la bonne distance de la source pour obtenir le débit de dose souhaité. Comme précédemment évoqué dans le paragraphe I.1.1, le débit de dose diminue avec la distance et est spécifique de l'activité de la source et de l'élément radioactif. Le débit de dose se calcule suivant la formule suivante :

$$D0 \times (d0)^2 = A0 * T$$

Avec :

DO = débit de dose proportionnel au carré de la distance ($d0^2$)

A0= Activité de la source (Bq)

T = énergie spécifique de la source radioactive (keV)

Cette formule permet ensuite de calculer la distance entre la source et les organismes exposés grâce à la formule suivante :

$$D2 = D1 / (d2)^2$$

Avec :

D2 = débit de dose souhaité dépendant du débit de dose D1, à un mètre de la source et de la distance d2.

Pour tenir compte de l'atténuation des rayonnements ionisants à travers les dispositifs expérimentaux (boîte de pétri, chambre climatique) et le milieu (gélose, air) des simulations numériques utilisant le code MNCP (Monte-Carlo N-Particle transport code) sont réalisées, à l'aide du schéma expérimental, par N. Dubourg (IRSN/LECO). Le calcul du débit de dose sur le centre d'intérêt, dans notre cas, le centre des boîtes de pétri, permet d'obtenir une distance à la source précise pour placer les organismes au débit de dose souhaité. De plus, ces données théoriques sont confortées à des mesures fournies par des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL) placés sur chaque boîte de pétri (avant l'irradiation, pour calibrer le modèle ainsi que lors de l'irradiation pour valider le débit de dose reçue par les organismes). Les données expérimentales et théoriques sont ensuite comparées pour valider ou ajuster le débit de dose.

II.2.4 Toxicogénomique et choix des paramètres biologiques mesurés

II.2.4.1 Toxicogénomique

Lors de ce travail de thèse, une stratégie de biologie des systèmes issue de la toxicogénomique a été utilisée pour avoir une approche intégrative et faire le lien entre plusieurs échelles biologiques. En effet, les modifications à l'échelle moléculaire sont plus sensibles que la mesure des paramètres observables. Elles sont également plus précoces et peuvent être prédictives d'altérations tardives, avant qu'elles n'affectent l'organisme dans son ensemble (Voelker et al., 2007). Les approches de biologie des systèmes permettent de contribuer à la compréhension mécanistique des effets d'un agent toxique. Une fois le mécanisme élucidé, un test approprié (*in vitro* ou *in vivo*) peut être utilisé pour évaluer les conséquences sur pour analyser la réponse cellulaire, tissulaire ou phénotypique.

La toxicologie « classique » se base sur les modifications biologiques macromoléculaires induites par des agents toxiques. La toxicogénomique est une approche complémentaire combinant l'intégration de méthodes haut débit à large spectre, l'utilisation d'outils bio-informatiques et de mesure aux échelles supérieures, permettant d'obtenir des informations sur les modes d'actions, et non uniquement sur un paramètre traduisant la toxicité d'une substance. La toxicogénomique permet une approche mécanistique de la toxicité, c'est-à-dire d'élucider les mécanismes de toxicité d'un organisme à une substance, avec pour objet de proposer de profil d'expression moléculaire capable de prédire une toxicité et/ou une susceptibilité génétique ou épigénétique. L'utilisation de lignées mutantes, transgéniques ou l'ARN interférence peuvent également augmenter la puissance de ce type d'analyse. La toxicogénomique peut également être prévisionnelle. La comparaison des effets moléculaires d'un ou plusieurs composés appartenant à la même famille ou partageant des modes d'action similaires peut permettre d'extrapoler certaines informations pour des composés de la même famille ou structurellement proches. La transposition d'un mode d'action toxique, d'un organisme à l'autre partageant une certaine homologie, est également facilitée grâce à l'utilisation de ces techniques (Sengupta et al., 2011).

D'après le Conseil National de la Recherche des États-Unis :

« la toxicogénomique est définie comme l'application des technologies de la génomique pour étudier les effets néfastes des produits chimiques environnementaux et pharmaceutiques sur la santé humaine et l'environnement. La toxicogénomique peut donner un aperçu des interactions gènes-environnement et les réponses des voies et de réseaux biologiques à une perturbation. Elle peut conduire à des informations plus discriminantes, prédictives et sensibles que les techniques actuellement utilisées pour évaluer les expositions aux substances toxiques ou pour prédire les effets sur la santé humaine ».

De plus la toxicogénomique facilite le développement d'« Adverse Outcome Pathway » (AOP), ou voie d'issue défavorable. L'AOP est un modèle qui permet d'identifier la séquence des effets d'une substance sur un organisme, d'un événement initiateur à l'échelle moléculaire et cellulaire, jusqu'à la production d'un effet toxique. Une compréhension plus fine des modes d'action toxique et des technologies plus efficaces permettent également de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations, en favorisant les approches *in vitro*. La réduction du nombre d'animaux est recommandée

par de nombreux programmes nationaux et internationaux, comme le « Seven Framework Programme (FP7) » de la Commission européenne ainsi que par le règlement REACH (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals), avec le désormais célèbre « affiner, réduire et remplacer ». Nul doute que l'amélioration constante des techniques de génomique, des approches *in silico* ou *in vitro* ainsi que de la bio-informatique et de l'intelligence artificielle fournira de précieuses données dans l'évolution de la toxicogénomique. La toxicogénomique pourra également contribuer à l'efficacité de la prise de décision réglementaire. La figure 29 résume les défis et les opportunités que peut apporter la toxicogénomique au processus de décision réglementaire. Aujourd'hui, les AOP sont les modèles issus de ce domaine les plus utilisés dans le cadre de ce processus (Z. Liu et al., 2019). Ils permettent d'identifier et d'harmoniser les modes d'action d'un agent toxique.

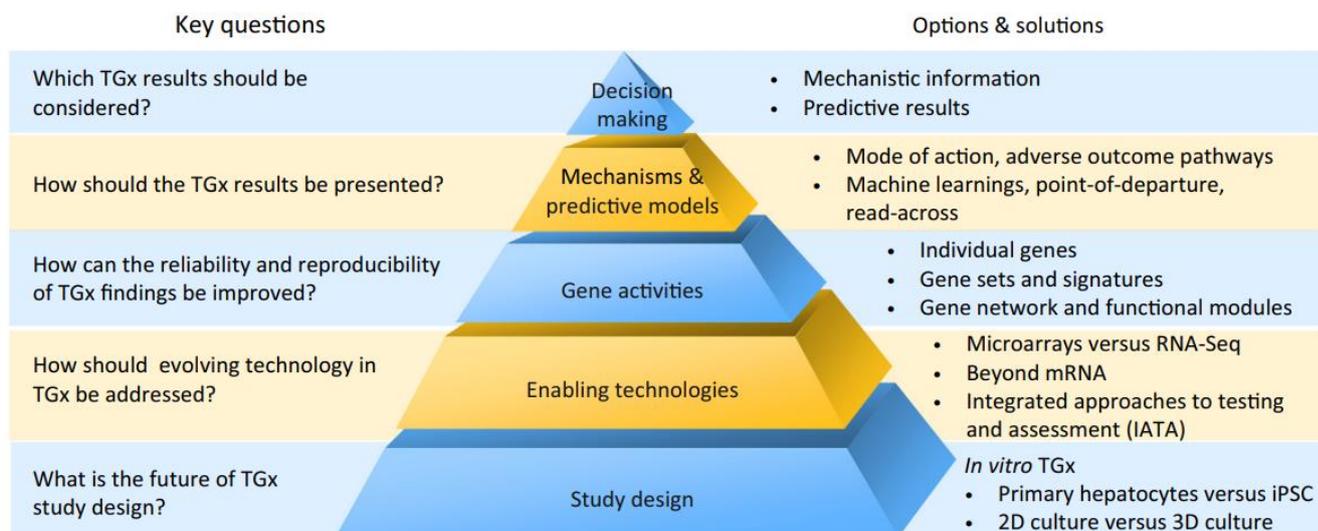


Figure 29 - La pyramide de la toxicogénomique vers la prise de décision réglementaire, présentant certaines questions et solutions pour promouvoir la prise de décision au regard des données de toxicogénomiques. *Source : Liu et al., 2019*

II.2.4.2 Paramètres biologiques mesurés, techniques et méthodes d'analyse

Les différents paramètres analysés lors de ce projet, ainsi que les échelles biologiques (moléculaires, cellulaires, phénotypiques), les conditions et les méthodes d'analyses sont indiquées dans le tableau 1

Echelle	Analyse	Cibles	Débit de dose	Stades exposés	Publications
Moléculaire	RNA-Seq	ARNm et mutations	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021 ; 2022
Moléculaire	qRT-PCR	ARNm et apoptose	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Moléculaire	TLDA	miRNAs	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2022, in prep
Moléculaire	LA-QPCR	Dommmage à l'ADN	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Manque de reproductibilité
Moléculaire	Comet Assay	Dommmage à l'ADN	40 et 100 mGy.h-1	In utero + F1 embryons	Maremonti et al., 2019
Moléculaire	Chip-Seq	PTMs	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Mise au point du protocole
Moléculaire	ATAC-Seq	Chromatine	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Mise au point de l'extraction
Moléculaire	Nile red Oil Red O	Lipide	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Manque de spécificité
Cellulaire	Marquage au DAPI	Nombre de spermatozoïde	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Cellulaire	Marquage au DAPI	Arrêt du cycle cellulaire	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Cellulaire	In vitro activation	Spermiogenèse	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Cellulaire	Souches reprotrices	DAF-16 et miRNAs	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021 ; 2022
Tissulaire	Marquage au DAPI	Cellules mitotiques dans la gonade	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Phénotypique	Reproduction	Nombre de larves	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Phénotypique	Vieillessement	Durée de vie	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Phénotypique	Morbidité et mortalité	Impact sur la descendance	50 mGy.h-1	Embryons --> L4 jeune adulte	Guédon et al., 2021
Phénotypique	Développement	Croissance	0.4 à 100 mGy.h-1	96h post L1	Maremonti et al., 2019

Tableau 1 Liste des paramètres biologiques analysés lors de cette thèse

Transcriptomique : Dans le cadre de ce travail de thèse, une analyse du transcriptome a été réalisée. Le choix du RNA-sequencing a été privilégié par rapport aux puces à ADN. En effet, bien que très robustes, les puces à ADN sont moins sensibles et ne permettent pas d'avoir une vision exhaustive du transcriptome, ou alors avec un coût bien plus important que le RNA-Seq. Le RNA-Seq n'a pas besoin de sondes spécifiques et peut donc détecter de nouveaux transcrits, des indels (insertion ou délétion) ou des fusions de gènes, mais également des variants. De plus, le RNA-Seq a démontré des avantages dans la détection de gènes faiblement exprimés et présente une gamme quantitative plus large, en comparaison avec les microarrays (Rao et al., 2019). Cette technique permet d'identifier les gènes différentiellement exprimés (DEG) en mesurant l'expression globale des gènes, par rapport au groupe témoin. Pour ce faire, nous avons analysé 3 réplicas sur chaque cohorte (contrôle, recovery, exposé) sur les quatre générations. La méthode de génération des bibliothèques à partir des ARN totaux, l'assemblage des reads sur le génome et les analyses statistiques sont développés dans l'article Guédon et al., 2021. Une fois les DEGs identifiés, l'analyse de GOTERMS, des enrichissements de phénotypes, des KEGG pathways et des facteurs de transcription associés aux DEG permettent de décrypter les mécanismes d'actions, les fonctions biologiques, les voies de signalisation impactées par l'irradiation chronique ainsi que son évolution au fil des générations. La modulation de certains DEG est confirmée par l'utilisation de qRT-PCR.

TaqMan Low Density Array (TLDA): La technologie des TLDA, comme son nom l'indique, repose sur la technologie TaqMan. L'avantage de cette technique, en comparaison à une PCR quantitative classique, est la présence d'une sonde TaqMan capable de s'hybrider sur une séquence spécifique, amplifiée par une paire d'amorces

spécifiques. La présence d'un fluorophore et d'un désactivateur (quencher) aux extrémités de la sonde permet de libérer de la fluorescence après clivage de la sonde par une Taq polymérase. La mesure de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN. La sonde présente l'avantage d'améliorer fortement la spécificité de la PCR, car les amplifications non spécifiques des amorces ne sont plus prises en compte. L'association pour la recherche sur le cancer américaine (AACR), lors de son meeting de 2008, recommande d'utiliser les TLDA, par rapport aux puces à ADN, car elles sont plus sensibles, spécifiques, reproductibles, robustes et efficaces que ces dernières. De plus, l'un des principaux avantages au regard de ces caractéristiques est que les TLDA ne nécessitent pas de validation complémentaire par une autre méthode. En effet, la technologie TaqMan est, à ce jour, la plus robuste. La question se pose ensuite d'utiliser un RNA-Seq pour mesurer l'ensemble du transcriptome, codant et non codant, ou des TLDA. L'avantage du RNA-seq est la détection de la majorité des séquences d'un échantillon. Le désavantage, outre la spécificité, la robustesse et la reproductibilité moindre, est qu'un nombre de séquences d'ARN non codant ne sont aujourd'hui pas identifiées. L'objectif de cet axe de recherche est d'évaluer la transmission de microARNs connus dans un cadre multi- transgénérationnel, avec une robustesse importante dans l'analyse. Il ne s'agit pas d'un travail exploratoire sur les ARN non codants. Nous avons donc sélectionné la technologie TLDA pour analyser 360 miRNAs chez *C. elegans*, avec des amorces et des sondes spécifiques pour chacun d'entre eux. Deux irradiations et analyses ont été réalisées. La première, sur 3 réplicats par condition et génération, manquait de puissance statistique. Nous avons donc réalisé une deuxième expérience avec 7 réplicas, qui nous a permis d'explorer avec une puissance statistique importante, les miRNAs modulés, les fonctions biologiques associées ainsi que les interactions et les réseaux de miRNAs.

Domage à l'ADN : Dans un premier temps, la technique de Long Amplicon Quantitative Polymerase Chain Reaction (LA-QPCR) a été privilégiée (Gonzalez-Hunt et al., 2016). Cette technique est basée sur l'amplification de longs et de courts fragments d'ADN nucléaire et mitochondrial. Les lésions comme les adduits ou les cassures ont la capacité d'inhiber l'action de l'ADN polymérase. Plus les fragments sont longs, plus la probabilité de bloquer la polymérase est importante. En comparant l'amplification des longs et des courts fragments, on obtient une proportion relative des dommages à l'ADN qui peut ensuite être normalisée. Malgré la mise au point du protocole et de nombreuses PCR réalisées, nous n'avons pas utilisé les données issues de cette technique, car elles manquaient de reproductibilité, probablement à cause des étapes de dilutions spécifiques pouvant accentuer les variations de volume de pipetage. Par la suite, nous avons utilisé le test des comètes, en collaboration avec l'équipe du NMBU, tel que décrit dans Maremonti et al., 2019. Ce test permet la détection des cassures doubles brins, en faisant migrer l'ADN par électrophorèse. Si l'ADN n'est pas endommagé, il restera sous forme sphérique. En cas de cassure, des fragments migrent, formant un halo d'ADN, pouvant être identifiés à la queue d'une comète (Figure 16).

Chip-Seq et ATAC-Seq : Le Chip-Seq est la méthode de choix pour étudier les modifications post-traductionnelles des histones. L'ATAC-Seq permet de mesurer l'état de condensation de la chromatine, c'est-à-dire l'état euchromatine ou hétérochromatine. Les deux techniques partagent une problématique chez *C. elegans* : extraire de l'ADN natif, sans traitement chimique, par lyse mécanique. La lyse chimique dénature l'ADN, ce qui est incompatible avec l'analyse de la chromatine dans son état physiologique. La cuticule de *C. elegans* rend la lyse mécanique plus difficile que sur la majorité des espèces et

demande de mettre au point des protocoles spécifiques. L'autre problématique liée au Chip-Seq est la quantité de matériel nécessaire ainsi que le temps pour réaliser les protocoles (plusieurs jours). Nous avons donc mis au point un protocole d'extraction de l'ADN par lyse mécanique ainsi qu'un protocole de Chip-Seq rapide et nécessitant moins de matériel (Annexe 1). Faute de temps pour les analyses bio-informatiques, le protocole de Chip-Seq n'a été employé que pour faire des Chip-PCR, permettant de valider le protocole et de fournir des informations sur la méthylation des histones sur la génération F0 et les embryons de la F1. Le protocole d'extraction pour l'ATAC-Seq a été validé par microscopie, mais aucun séquençage n'a été réalisé (Annexe 2). Néanmoins, le protocole classique de l'ATAC-Seq, applicable à *C. elegans*, est relativement simple à réaliser et sera discuté dans la partie perspective de recherche.

Marquages de lipides : Les résultats de l'analyse transcriptomique par RNA-Seq nous ont conduit à nous intéresser au métabolisme et à la mesure des lipides. La quantification et l'évaluation de la distribution des lipides ont été réalisées suivant les protocoles classiques de marquage au Nile Red et au Oil Red O (Escorcia et al., 2018). Bien que les résultats soient intéressants, le manque de spécificité de ces marquages et la remise en cause de leur pertinence nous ont poussés à ne pas utiliser ces données. En effet, le Nile Red marque de façon non spécifique les organites lipidiques ainsi que les membranes cellulaires. La problématique du Oil Red O est liée à sa mauvaise solubilité. Il est nécessaire d'utiliser de l'éthanol ou de l'isopropanol pour réaliser le marquage. Ces solvants peuvent entraîner la dégradation des lipides natifs ou des fusions. Par ailleurs, l'impact des RI sur les lipides fait l'objet d'une thèse au sein du laboratoire, en s'appuyant sur des techniques plus fines et discriminatives (Dufourcq-Sekatcheff et al., 2021).

Marquage au DAPI : Le marquage de l'ADN au DAPI est une technique de marquage connue et robuste pour observer les cellules au microscope à fluorescence. Cette technique a été utilisée pour compter le nombre de spermatides dans la spermathèque, le nombre de cellules mitotiques dans la lignée germinale ainsi que les cellules en arrêt cellulaire dans la partie distale de la gonade.

Activation des spermatides : L'analyse transcriptomique nous a révélé une répression de nombreux gènes impliqués dans la spermatogenèse, mais également dans la spermiogenèse. Ces données nous ont poussés à analyser la capacité des spermatides à s'activer en spermatozoïdes. Les spermatides de *C. elegans* peuvent être extraits puis activés dans un milieu spécifique, contenant de la pronase E comme activateur de la différenciation. En effet, un défaut d'activation traduit une perte de qualité des spermatides, et peut entraîner des conséquences pour les générations futures et la transmission d'informations entre les générations.

Lignées rapportrices et mutantes : La souche mutante *him-5* (High Incidence of Males) a été utilisée pour obtenir un nombre important de mâles, dans le cadre de l'activation des spermatozoïdes. Les lignées rapportrices DAF-16 :GFP, mir-35, mir-71 et mir-788 :GFP ont été utilisées pour valider la contribution de ces facteurs de transcription et des miRNAs suite à l'analyse du RNA-Seq et des TLDA.

Phénotype : Les mesures de phénotypes ont été réalisées suivant les protocoles standards (wormbook.org) et explicités dans les articles découlant de ce projet. Une attention particulière a été portée à l'analyse statistique des résultats, avec l'aide d'une statisticienne reconnue, Claire Della Vedova.

Pour conclure sur cette partie, un protocole d'irradiation a été défini en fonction des données de la littérature et de nos objectifs de recherche. La stratégie de recherche basée sur le concept de la toxicogénomique a permis de coupler des analyses à haut débit, dites -omiques, à des mesures phénotypiques, des approches de biologie moléculaire et cellulaire ainsi que l'utilisation de lignées mutantes et rapportrices.

Troisième partie

III. Analyse des effets reprotoxiques induits par une exposition multigénérationnelle aux rayonnements ionisants chez *C. elegans*

Table des matières

III.1 Objectifs de l'article	95
III.2 A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in <i>C. elegans</i>	96
III.3 Principales conclusions	120

III.1 Objectifs de l'article

L'augmentation de l'utilisation du nucléaire civil, médical et militaire ainsi que les accidents de Tchernobyl et de Fukushima-Daiichi ont entraîné une augmentation de l'exposition à des substances radioactives au cours du XX et du XXIème siècle. Bien que les effets de fortes doses de RI soient bien caractérisés sur l'Homme et l'environnement, les effets de faibles doses d'exposition chronique, les mécanismes subcellulaires et les conséquences sur plusieurs générations restent peu étudiés. Cet article scientifique a pour but d'évaluer les effets délétères d'une exposition chronique aux RI chez le nématode *C. elegans* par une approche de biologie des systèmes. Pour se faire, une analyse transcriptomique, sans à priori sur les gènes d'intérêt est conduite. L'analyse des fonctions biologiques, des facteurs de transcription et de l'enrichissement de phénotype sur les données de transcriptomique ont ensuite permis de réaliser des expérimentations à l'échelle cellulaire, tissulaire et individuelle pour confirmer ou infirmer les résultats moléculaires obtenus. Une attention particulière est portée à la transmission et à la modulation des effets sur les générations continuellement exposées.

III.2 A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in *C. elegans*.

Article soumis le 3 juillet 2021, accepté le 14 septembre 2021 et publié le 17 septembre 2021. Les données supplémentaires sont insérées à la suite de l'article, sauf la table S1, relative aux processus biologiques (GOTerms) impactés sur les 4 générations exposés, en raison de sa taille conséquente. Néanmoins, cette table est disponible en suivant le lien suivant : <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112793>.

Listes des données supplémentaires incluses dans l'article :

Figure S1. Estimation of the biological variability of sample by hierarchical clustering

Figure S2. Cell cycle arrest per gonadal arm

Figure S3. Transcriptomic validation of *egl-1* expression by qRT-PCR

Figure S4. Network analysis of 72 DEGs and transcription factors

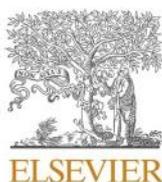
Table S1: List of biological processes GOTerms modulated after chronic exposure to IR in Deseq2/TopGO enrichment analysis

Table S2: List of DEGs playing a role in sperm formation, activation and mobility,

Table S3: List of transcription factors enriched after chronic exposure to ionizing radiation

Table S4 DEG of transcriptomic analysis playing a role in histone synthesis and regulation

Les données de transcriptomique sont disponibles sur le référentiel GEO, sous le numéro GSE175918



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in *C. elegans*

Rémi Guédon^a, Erica Maremonti^b, Olivier Armant^a, Simon Galas^c, Dag Anders Brede^b, Catherine Lecomte-Pradines^{a,*}

^a Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SRTE, Laboratoire d'ECOTOxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

^b Centre for Environmental Radioactivity (CERAD), Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management (MINA), Norwegian University of Life Sciences (NMBU), 1432 Ås, Norway

^c Institut des biomolécules Max Mousseron (IBMM), University of Montpellier, Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), ENSCM, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Edited by Paul Sibley

Keywords:

Ionizing gamma radiation
Multigenerational effects
Caenorhabditis elegans
Reproductive toxicity
Spermatogenesis
Germ cells
DAF-16/FOXO
Transcriptomic stress response

ABSTRACT

Understanding the effects of chronic exposure to pollutants over generations is of primary importance for the protection of humans and the environment; however, to date, knowledge on the molecular mechanisms underlying multigenerational adverse effects is scarce. We employed a systems biology approach to analyze effects of chronic exposure to gamma radiation at molecular, tissue and individual levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Our data show a decrease of 23% in the number of offspring on the first generation F0 and more than 40% in subsequent generations F1, F2 and F3. To unveil the impact on the germline, an in-depth analysis of reproductive processes involved in gametes formation was performed for all four generations. We measured a decrease in the number of mitotic germ cells accompanied by increased cell-cycle arrest in the distal part of the gonad. Further impact on the germline was manifested by decreased sperm quantity and quality. In order to obtain insight in the molecular mechanisms leading to decreased fecundity, gene expression was investigated via whole genome RNA sequencing. The transcriptomic analysis revealed modulation of transcription factors, as well as genes involved in stress response, unfolded protein response, lipid metabolism and reproduction. Furthermore, a drastic increase in the number of differentially expressed genes involved in defense response was measured in the last two generations, suggesting a cumulative stress effect of ionizing radiation exposure. Transcription factor binding site enrichment analysis and the use of transgenic strain identified *daf-16/FOXO* as a master regulator of genes differentially expressed in response to radiation. The presented data provide new knowledge with respect to the molecular mechanisms involved in reproductive toxic effects and accumulated stress resulting from multigenerational exposure to ionizing radiation.

1. Introduction

The study of multigenerational consequences of chronic exposure to environmental stressors is a growing field of interest for human and environmental protection. Both natural and anthropogenic sources of ionizing radiation (e.g medical, industrial or military sources, nuclear power plant accidents) can lead to the presence of radionuclides into the environment and long term/chronic exposure of organisms (UNSCEAR, 2008). Current knowledge on the effects of ionizing radiation mainly concerns short term/acute and single generation exposure, while the multigenerational effects of long-term exposure are still poorly understood. Emerging evidence suggests that the early stages of development

and reproductive mechanisms are particularly sensitive to chronic exposure to gamma radiation, even in tolerant species (Heyer et al., 2000; UNSCEAR, 2006; Honjo and Ichinohe, 2019). Understanding the overall toxic mechanisms induced by chronic low dose as well as generational effects is a major concern for improving prevention of toxicity (UNSCEAR, 2012). Some studies have highlighted that the phenotypical effects of ionizing radiation observed at the first exposed generation are not necessarily representative of the effects on the following generations (Adam-Guillermin et al., 2018; Buisset-Goussen et al., 2014). In order to provide a more holistic assessment of long-term impact of chronic exposure to ionizing radiation, it is necessary to carry out dedicated studies over several generations, including

* Corresponding author.

E-mail address: catherine.lecomte-pradines@irsn.fr (C. Lecomte-Pradines).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112793>

Received 3 July 2021; Received in revised form 12 September 2021; Accepted 14 September 2021

Available online 17 September 2021

0147-6513/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

the investigation of molecular mechanisms to fundamentally understand the mode of toxic action through generations.

Ionizing radiation causes a wide range of effects in macromolecules by disruption of molecular structures, ionization of atoms, or indirectly through radiolysis of water and generation of oxidative stress (Azzam et al., 2012). Under exposure to ionizing radiation, cellular stress response pathways can be activated, including antioxidant defenses, DNA damage, or the unfolded protein response to promote survival (Fulda et al., 2010). If such response cannot counteract the harmful effects, the cell activates downstream pathways that can finally lead to programmed cell death (Greiss et al., 2008). In *C. elegans*, cell death apoptosis is controlled by activation of CEP-1 in the p53 pathway. CEP-1 modulates *egl-1* and *cep-13* transcription, which activates caspase induced germline apoptosis (Hoffman et al., 2014). Accumulation of damages and elimination of cells can lead to functional phenotypic consequences for the organism but can also impact subsequent generations if the gametes are affected. Thus, parental exposure to ionizing radiation can lead to genomic and epigenomic instability in subsequent generations (Kadhim et al., 2013).

In the present study, we investigated the impact of ionizing radiation on nematodes reproduction and the underlying molecular mechanisms induced by chronic exposure to gamma radiation over 4 generations. To address the current lack of knowledge concerning reproductive toxicity effects onto subsequent generations and the underlying molecular mechanisms, *C. elegans* was challenged over the entire lifecycle from the embryonic stage until sexual maturity. We employed a systems biology approach to assess alterations at the molecular, cellular and individual levels.

2. Materials and methods

2.1. *C. elegans* maintenance, strains and synchronization

The following *C. elegans* strains were used in the current study: Wild type Bristol (N2), CB4088 *him 5* (*e1490*), T356 *daf-16::GFP* (*zIs356* (pDAF-16:DAF-16-GFP;rol-6)) provided by CGC (Caenorhabditis Genetic Center). Worms were cultured by standard techniques at 19 °C, 80% humidity, on petri dishes with NGM (Nematode Growth Medium) and seeded *Escherichia coli* OP50 as food source (Brenner, 1974).

2.2. Experimental design and gamma irradiation

Effects of ionizing radiation were evaluated on four generations of nematodes continuously exposed (F0, F1, F2, F3) from synchronized embryos to L4 young adult stage (65 h). Several irradiations were carried out, from 3 to 10 replicates with 1000–5000 worms. Chronic irradiation to 50 mGy h⁻¹ of gamma radiation was performed in incubators under controlled conditions using the platform MIRE (Mini irradiator for Radioecology) and MICADO irradiation facility (IRSN, Cadarache, France). Data loggers were used to measure humidity and temperature during irradiation. Dose rates were calculated based on the Monte-Carlo N-Particle model and validated during irradiation with radio-photo luminescent dosimeters (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation Japan) placed on each incubator to measure the delivered cumulative dose received from the Cesium-137 source. Samples for molecular and phenotypical analysis were collected after 65 h, to cover the entire lifecycle from embryo to L4 young adult stage. A part of the replicates was irradiated for additional 24 h in order to obtain sexually mature hermaphrodites and harvest the next generation.

2.3. Total brood size measurements

Brood size was determined by measuring the cumulative number of larvae produced by five nematodes continuously exposed for 65 h (5 biological replicates, n = 25 per condition), at each generation. Nematodes were transferred daily into new Petri dishes. The number of progenies was determined by counting the number of eggs produced over 8 days. Effects of gamma radiation through generation were assessed using a two-way ANOVA on the mean of each replicate. Residuals normality and homogeneity residuals assumption were checked using Shapiro-Wilk test and Levene test, respectively. Brood size of control and exposed groups were then compared at each generation using Wilcoxon test and Holm adjustment to take into account the multiple comparisons. P-value < 0.05 was considered as significant.

2.4. DIC and fluorescent microscopy

Transgenic strain T356 *daf-16::GFP* from 5 biological replicates was used to classify DAF-16 transcription factor sub-cellular localization on the basis of associated GFP fluorescence by using an inverted microscope (Zeiss Axio observer, Carl Zeiss, France) as previously described (Thabit et al., 2018). Sperm and mitotic cells were counted with a DAPI filter and apotome.2 after capturing images of more than 10 Z-sections. Sperm activation was measured via Nomarski Differential Interference Contrast (DIC) method. For more detailed examination, nematodes were immobilized on an agar pad, with 1 mM levamisole (Sigma) and images were collected with an LSM 780 confocal microscopy (Carl Zeiss, France).

2.5. Quantification of mitotic germ cells and spermatids

To measure the number of mitotic cells and spermatozoa, nematodes were dissected as previously described (Craig et al., 2012). Briefly, after 65 h of irradiation, worms were immersed into 10 µl of 2% PFA buffer on poly-lysine coated slide. A 27-gauge needle was used to cut each worm and allow the extrusion of the gonadal arms. The slide was freeze cracked in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Gonads were stained with 10 µl of DAPI mounting medium (Fluoroshield™ with Dapi, Sigma-Aldrich). Mitotic germ cells assay was performed by counting cells in the 50 µm Distal Tip Cell region, from at least 29 intact germlines and 3 biological replicates per condition. Replicates were analyzed with a (quasi) Poisson generalized linear model with multiple comparisons using Dunnett test approach. P-value < 0.05 was considered significant. For spermatozoa quantification, ten slides with 20 hermaphrodites per treatment were prepared. The number of spermatozoa was counted in 10 intact germlines from 10 biological replicates per condition. A total of ~25 Z-sections of ~6 µm were obtained with an inverted microscope (Zeiss Axio observer, Carl Zeiss, France) in order to assess the number of spermatids. A two-ways ANOVA and multiple comparison approach was used on the mean of each replicate, as described in Section 2.3.

2.6. Spermatozoa activation

In order to assess spermatozoa activation in response to gamma radiation, *him-5* hermaphrodites were exposed for 65 h from embryonic stage. 20 males per replicates were isolated on fresh petri dishes and exposed from 66 h to 90 h to obtain a large number of spermatids. Celibate males were transferred with a pipette from droplet to droplet on slide with 1X sperm medium (50 mM HEPES, 25 mM KCl, 45 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂, 1 mM Dextrose, pH 7.6) in order to remove excess *E. coli*. Males were then transferred to a square traced with

Vaseline on a slide and dissected in 1X sperm medium containing pronase E (200 µg/ml) to release and activate spermatids. A coverslip was gently placed on the surface of the slide and spermatids/spermatozoa were counted after 10 min at 100X magnification with immersion oil. Several counts were made on 5 randomly selected areas per each replicate. To analyze this non-independent binary data, four independent replicates were analyzed with a general linear mixed model (GLMM) based on logistic regression with binomial errors. P-value < 0.05 was considered as significant.

2.7. Transcriptomic analysis

RNA sequencing analysis was performed in order to obtain a multi-generational gene expression profile of nematodes in response to chronic exposure to ionizing radiation. Total RNA was extracted from four generations of L4 young adult irradiated for 65 h from embryonic stage ($n = 1000$ per replicate). Total RNA was extracted using FastPrep with Direct-zol Reagent (Nordic Biosite) and purified with RNeasy Mini Kit (Zymo Research) according to manufacture instructions. RNA quality, integrity and concentration were assessed using Nanodrop (NanoDrop Technology, Wilmington, DE) and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies) with RNA Nano Chip. cDNA synthesis and sequencing library were obtained using Strand-specific TruSeq RNA-seq pair-end libraries with 350 bp fragment size. Libraries were sequenced using Illumina HiSeq 3000 as paired-end 150 base reads with high quality score (Q30 higher than 98% for all samples) at the Norwegian High Throughput Sequencing Centre (Oslo, Norway). Reads were mapped to the *C. elegans* genome (Ensembl 91/WormBase235) using RNA-STAR. Hierarchical clustering of the variance stabilized data with Pearson's correlation and complete-linkage method was generated and showed a good correlation between biological replicates, except for one exposed and one control sample in F3 generation (Fig. S1), which were removed for the subsequent analysis. Deseq2 v1.10.2 and rlog R packages were used for normalization and differential expression analysis. Genes with a log2 fold change (Exp/Ctrl) > 0.5 and adjusted p-value < 0.05 (False Discovery Rate, FDR) were considered as significantly regulated.

2.8. Enrichment of transcriptomic data

In order to analyze biological processes impacted by gamma irradiation, Differentially Expressed Genes (DEGs) obtained from DESeq2 analysis were subjected to enrichment analysis. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of biological functions was performed using the R package topGO and VISEAGO. Enriched functions with p-value from Fisher's exact test < 0.1 were considered significant. Heatmap was generated using the R package ggplot2. Phenotype enrichment analysis was obtained from the DEGs from DESeq2. DEGs were analyzed using WormBase Phenotype Ontology database and modPhEA. Significantly enriched phenotypes were validated by Bonferroni-corrected p-value < 0.05 from Fisher's exact test. Network analysis was performed with a combination of Gene Ontology analysis and GeneMANIA 3.5.1 plug-in within the Cytoscape 3.8.1 software.

2.9. Transcription factor binding motif analysis

Promoter sequences of DEGs from four generations were analyzed in order to identify potential enrichment of transcription factor binding motifs after chronic exposure to gamma radiation. A set of 4500 randomly chosen promoters' sequences was selected as background. Promoter sequences are defined as DNA genomic sequences from 1500 bp upstream to 200 bp downstream of transcriptional start site and were

retrieved via Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) from Ensembl 91 release. Promoter sequences were analyzed with OPOSSUM v3 Single Site Analysis (SSA) and 43 non-redundant transcription factor binding profiles stored as position frequency matrices from JASPAR database. Binding sites with Z-score > 5 and Fisher-score > 2 were considered significantly enriched. The Z-score assessed whether the rate of occurrence of transcription binding site in the DEGs sequence differs significantly from the background sequence based on binomial distribution model. The Fisher-score assessed the probability of a non-random association between DEGs sequence and background.

2.10. qRT-PCR

RNA from four generations of irradiated nematodes was extracted with Qiagen mRNA kit and integrity was assessed with Bioanalyzer® (in conjunction with RNA 6000 Nano LabChip®). cDNAs were synthesized using the superscript affinity cDNA from Qiagen. Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed in order to quantify the expression of *egl-1*. For this purpose, Mx4000 multiplex quantitative PCR system (Stratagene) with 1X MasterMix Agilent and 2 µM of primer set were used. The PCR reactions were amplified for 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C for 45 cycles. Transcript expression was normalized to PMP-3, CDC-42 and ACT-2 housekeeping genes. Primer sequences used are in [Supplementary Data \(Fig. S3\)](#). qRT-PCR were performed three times on three independent biological replicates. Statistical analysis was performed using dataassist software.

3. Results

3.1. Reproduction impairment is associated to effects on gamete production

In order to evaluate the impact of multigenerational exposure to ionizing radiation, phenotypical and molecular analyses were performed over four generations (F0, F1, F2 and F3) of *C. elegans* continuously exposed to 50 mGy h⁻¹ of gamma radiation. Each generation was irradiated for 65 h, from embryo to L4 young adult stage, and received a cumulative dose of 3.3 Gy. The dose rate and duration of exposure were previously defined as inducing significant effect on reproduction from the first generation (Buisset-Goussen et al., 2014; Dubois et al., 2018).

3.1.1. Brood size reduction in *C. elegans* after chronic irradiation over four generations

3.1.1.1. Number of larvae/progeny per individual. The brood size decreased significantly in comparison with control (GLM- Dunnet test p-value < 0.001) when nematode populations were exposed from embryos to adult to 50 mGy h⁻¹ of gamma radiation (Fig. 1b). The first exposed generation (F0) showed a brood size reduction of 23% (170 scored larvae) in comparison with control (221 scored larvae), while subsequent generations (F1 to F3) showed a brood size reduction of up to 40%. The hatching success was not affected, neither the embryonic mortality, the morbidity nor the lifespan of the progeny in any generation (data not shown). In the absence of detectable embryonic developmental failures, the effects on gamete formation were investigated in order to identify the mechanisms of reproductive toxicity. Therefore, a systematic investigation of the different stages of gamete development and performance was conducted. In the reproductive system of *C. elegans*, germ cells proliferate from the distal mitotic zone of the gonadal arm (Fig. 1a). The distal area of the gonad hosts the distal tip stem cells, from which proliferating cells migrate to the proximal part to

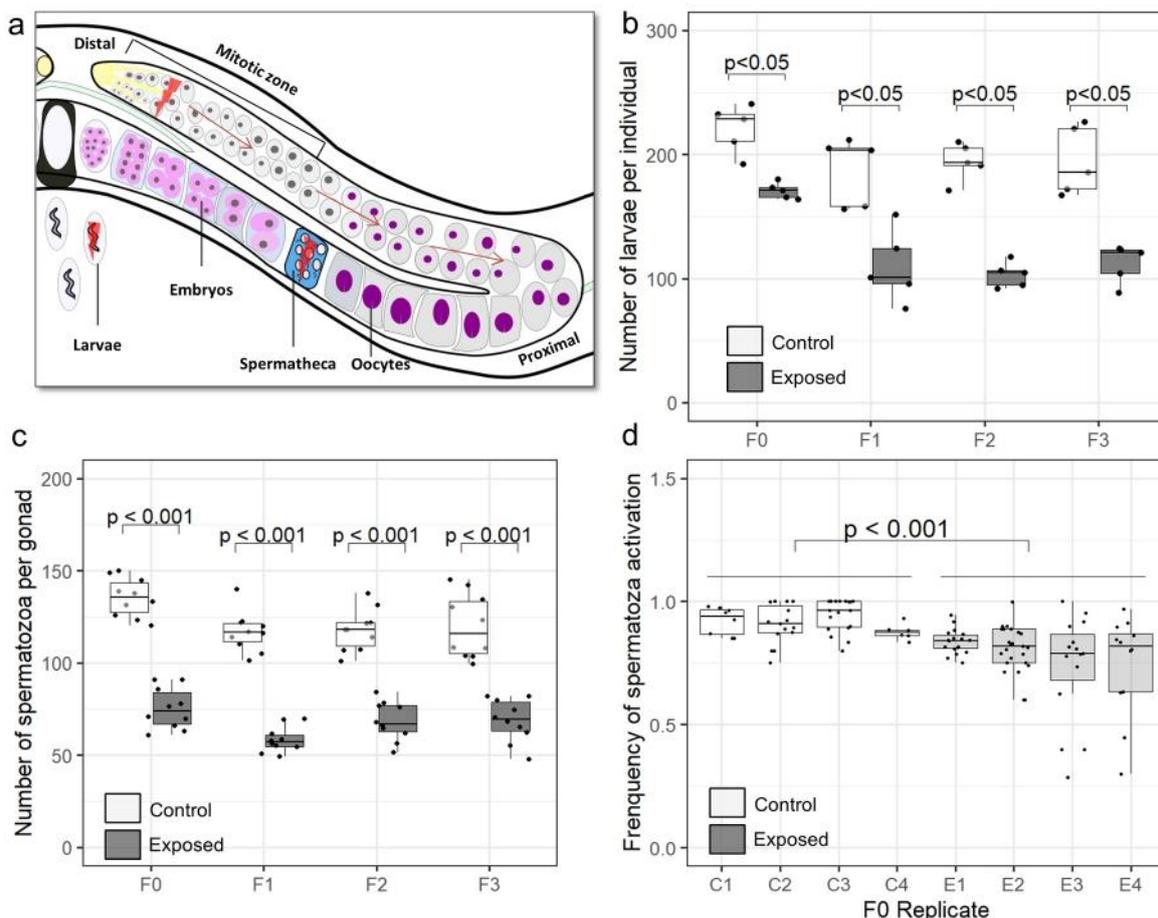


Fig. 1. (a) Diagram of a *C. elegans* gonadal arm. The red symbols indicate the processes investigated in the present study. (b,c) Box-plot of the number of larvae per individual (b) and spermatozoa per gonad arm at L4/YA stage (c) (p -value ≤ 0.5 from two ways ANOVA with multiple comparisons followed by Wilcoxon tests and holm p -values adjustment). (d) Box-plot of impacted spermatozoa activation in the first generation F0 from 4 biological replicates per conditions (p -value from generalized linear mode with logistic regression and binomial error). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the gonad and proceed to meiosis to produce the gametes. In order to specify a possible impact of the irradiation on the gamete production, we then assessed several endpoints including number of spermatozoa (Fig. 1c), spermatid activation (Fig. 1d), number of mitotic cells per gonadal arm and apoptosis (Fig. 2a, Fig. S2a,b, Fig. S3).

3.1.2. Detrimental effect of gamma radiation on spermatids quantity and quality

3.1.2.1. Number of spermatids per gonad. the potential multigenerational effect of gamma radiation on spermatogenesis was assessed by measuring the number of spermatozoa after 65 h of exposure from embryonic stage. The exposed F0 nematodes showed a 44% decrease in the number of spermatids (from 135 to 75 spermatozoa per gonad). The following generations (F1 to F3) presented a similar effect (between 42% and 50%) (Fig. 1c). Thus, all exposed generations showed a significant decrease in the number of spermatids, which followed a similar trend as the reduction in number of offspring compared to non-irradiated nematodes (GLM- Dunnet test p -value < 0.001).

3.1.2.2. Spermatids activation. Because of the observed impact of gamma irradiation on the spermatids number, we then examined

whether the process of spermatids activation, by which fully functional spermatozoa are produced, was similarly affected. We observed a significant decrease (p -value < 0.001) of spermatid activation frequency from controls (0.89) to exposed organisms (0.75) indicating that the chronic exposure to gamma radiation induced a significantly reduced quality by 14% less activation of spermatozoa from the produced spermatids (Fig. 1d). The effect was highly reproducible in all the independent replicates.

3.1.3. Decreased number of mitotic germ cells and enhanced cell cycle arrest induced by chronic gamma irradiation

3.1.3.1. Number of mitotic germ cells. We performed a standard germline proliferation assay on dissociated gonads from F0 and F3 generations (see Section 2.5). The distal part of the gonadal arm in F0 and F3 (Fig. 2a) showed a decrease in the number of mitotic cells by up to 25% (respectively 95.9 ± 3.13 and 95.9 ± 3.82 for control compared to 71.8 ± 3.52 and 71 ± 3.15 for exposed). A significant (p -value < 0.01) increase of cell cycle arrest was also identified by cells size analysis and DNA staining (Fig. 2b, Fig. S2a,b). These results showed that chronic exposure to 50 mGy h^{-1} of gamma radiation impaired the cell cycle, cell division and decreased the germ cell proliferation by $\sim 25\%$.

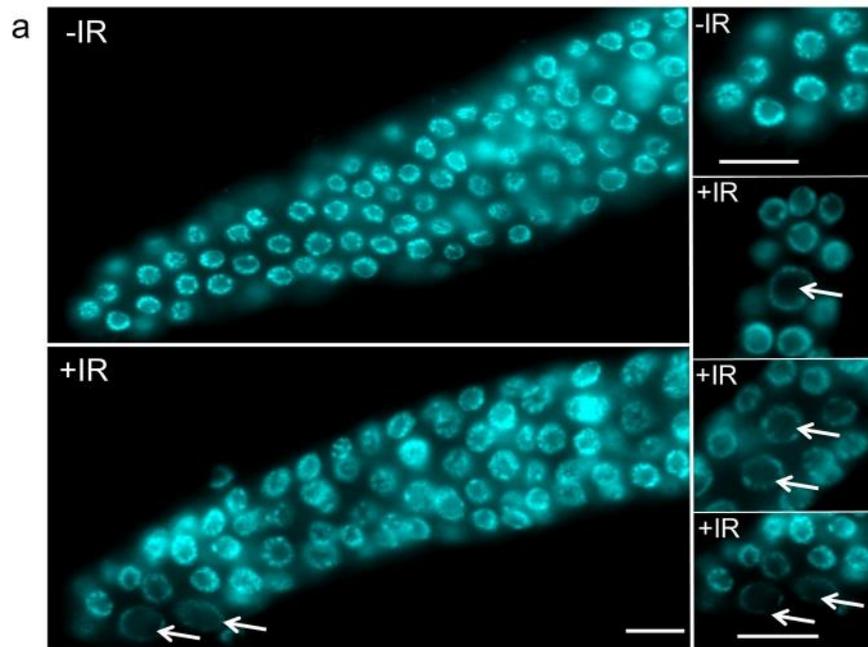


Fig. 2. (a) Distal germ cells from control (-IR) and exposed (+IR) *C. elegans* stained with DAPI. Mitotic germ cells under cell cycle arrest are indicated with white arrows. Scale bar = 10 μ m. (b) Box plot of the number of mitotic germ cells in the first 50 μ m of the gonad. Triple asterisks indicate a p-value < 0.001 from generalized linear model and multiple comparison using Dunnett's test approach (n indicates the number of different gonadal arms measured in the mitotic germ cells assays).

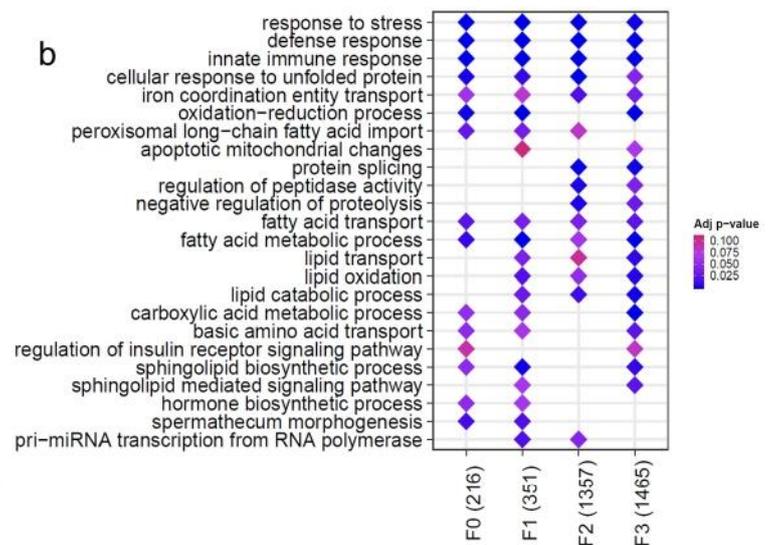
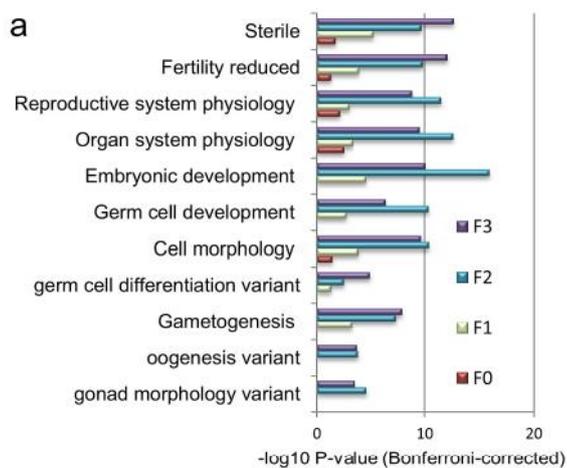
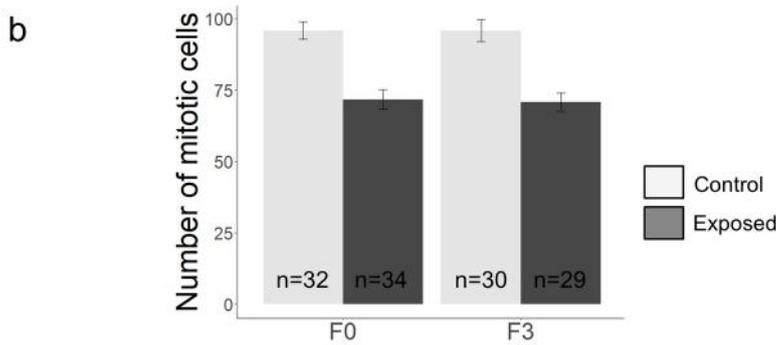


Fig. 3. (a) Bar plot of shared enriched phenotype terms from transcriptome analysis across generations exposed to chronic irradiation (Bonferroni corrected p-value \leq 0.05). (b) Heatmap of shared GO terms modulated in response to chronic irradiation. Colors indicate the enrichment p-values from exact Fisher's test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.1.3.2. Genotoxicity induced germ cell apoptosis. *egl-1* is required for *p53/cep-1* dependent germ cell apoptosis induced by genotoxic stress. The effect of chronic exposure to ionizing radiation was therefore assessed by measuring *egl-1* expression by qRT-PCR analysis in all generations (Fig. S3). A significant increase of *egl-1* expression from 1.5 to 4.2-fold change was observed over all exposed generations compared to control, thus substantiating increased apoptosis in response to chronic irradiation.

3.2. Transcriptomic profiling over four consecutive generations exposed to chronic gamma radiation

3.2.1. Stress response, metabolism and reproduction as the main enriched biological functions over multiple irradiated generations

In order to investigate the toxic mode of action (MoA) and the molecular response to germline damage induced by chronic irradiation, a genome wide transcriptome analysis was performed over four generations (F0 to F3) of *C. elegans* continuously exposed to 50 mGy h⁻¹. Hierarchical clustering of the variance revealed that irradiation modified the transcription profiles in all exposed generations compared to control conditions (Pearson’s correlation and complete-linkage method). High correlation was shown for F1, F2 and F3 “control” populations whereas F0 generation clustered separately (Fig. S1). We therefore identified Differentially Expressed Genes (DEGs) by pairwise comparison between exposed and control populations. DEGs with a q-value < 0.05 and log2 fold change | ≥ 0.5 were considered significant. The analysis identified 272 genes differentially expressed in F0, with 216 (79%) up-regulated and 56 (21%) down-regulated genes respectively. The number of DEGs in F1 was comparable to F0 generation, with 225 (64.1%) up-regulated and 126 down-regulated (35.9%) genes (total of 351 DEGs).

An increase of total DEGs was observed between F1 and F2 generations. The F2 and F3 presented 1357 and 1465 DEGs, respectively, with 136 (10%) and 523 (36%) up-regulated and 1221(90%) and 942 (64%) down-regulated genes, respectively. Phenotype enrichment (Fig. 3a) and Gene Ontology (GO) biological processes (Fig. 3b, Table S1) were examined in order to identify biological functions impacted by the chronic exposure to gamma radiation over multiple generations.

Phenotype enrichment analysis of DEGs highlighted an impact of gamma radiation in all exposed generations on reproductive processes and cell functions (Fig. 3a). In line with the measured reproductive toxicity effects, the phenotypes related to sterility (p-value < 10⁻²), reproductive system physiology (p-value < 10⁻³) and reduced fertility (p-value < 10⁻²) were significantly enriched. Germ cell development (p-value < 10⁻²), embryonic development (p-value < 10⁻⁵) and gametogenesis (p-value < 10⁻⁴) were also significantly enriched phenotypes. Phenotype enrichment analysis was thus consistent with the identified phenotypic effects on the germline.

Next, we identified significantly enriched biological processes by GO terms shared by multiple generations (Fig. 3b). Consistent with the phenotype enrichment analysis the GO term biological process also showed an effect on spermatheca morphogenesis in F0 and F1. We observed a large proportion of differentially expressed genes linked to stress defense mechanisms like oxidation-reduction processes, innate immune response, defense response, apoptotic mitochondrial changes, and cellular response to unfolded protein, (Fig. 3). Effects on lipid metabolism and transport, including fatty acid metabolic process, lipid transport, sphingolipid biosynthetic processes and lipid oxidation were also observed. The GO terms analysis revealed modulation of signaling processes including insulin receptor signaling pathway, sphingolipid mediated signaling pathway which is required for radiation-induced

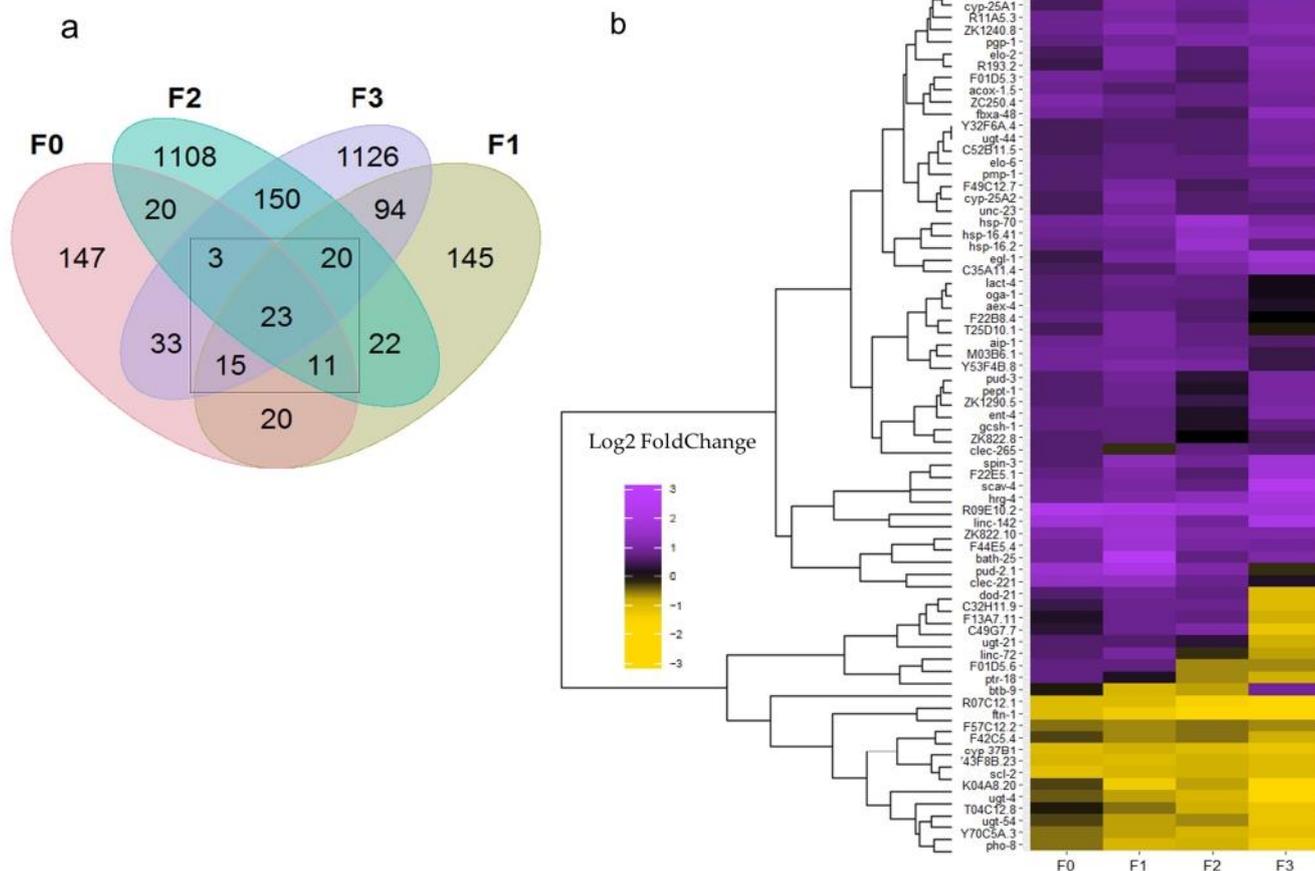


Fig. 4. (a) Venn diagram of differentially expressed genes in response to chronic irradiation over exposed generations (Fold change | ≥ log2(0.5) and adjusted p-value ≤ 0.05. (b) Hierarchical clustering of differentially expressed genes after chronic exposure to 50 mGy h⁻¹ shared by at least three generations.

apoptosis in the germline through *egl-1*, hormone biosynthetic process and pri-miRNA transcription from RNA polymerase. In F2 and F3 generations, a modulation of biological processes related to protein synthesis and turnover was showed with terms related to regulation of peptidase activity, alternative protein splicing and negative regulation of proteolysis.

3.2.2. Consistent modulation of stress response genes across irradiated generations

In order to gain insights into the core transcriptomic response induced by radiation over multiple generations, a detailed analysis of common DEGs was performed. An overlap of 23 genes was found between the 4 exposed generations and a total of 72 genes was shared between 3 generations, suggesting that part of the transcriptomic response to chronic irradiation was stably maintained (Fig. 4a). The majority of the 72 shared DEGs was upregulated (Fig. 4b). Thirteen of the modulated genes were involved in terms related to stress response and to topologically incorrect protein, including *aip-1*, *hsp-16.41*, *hsp-16.2*, *hsp-70*, *pept-1* and *pgp-1*. In addition, seven genes were involved in oxidation-reduction processes: *ftn-1*, *cyp-25A1*, *cyp-25A2*, *acox-1.5*, *cyp-37B1*, *oga-1*, *ZK1290.5*. Seven genes were involved in lipid metabolic process and localization: *pept-1*, *acox-1.5*, *ugt-21*, *Y32F6A.4*, *pmp-1*, *elo-2* and *elo-6*. *elo-2* and *pept-1* are also involved in reproductive processes. In addition, the *egl-1* gene, regulated by CEP-1/P53 transcription factor, which is the hallmark of genotoxic stress induced germline apoptosis, was upregulated in all generations. It thus appeared that the DEGs shared by all generations were predominantly involved in stress response and apoptosis.

3.2.3. Transcription factor enrichment analysis identifies DAF-16 as key regulator of response to chronic ionizing radiation

An increase in the number of DEGs was observed between F0-F1 (respectively 272 and 351) and F2-F3 generations (respectively 1357 and 1465) (Fig. 4a). We hypothesized that this increase could be associated to regulatory pathways activated to counteract persistent stress, or repair needed to maintain fundamental biological functions. In order to identify potential pathways involved in the stress response, a binding motif enrichment test of 43 non-redundant transcription factors (TFBMs) was performed on differentially expressed genes promoter sequences (-1500 +200 bp from TSS). Twenty-three binding motifs were found to be significantly enriched in at least one of the four generations (Table 1, Table S3).

Two TFBMs of ELT family, ELT-2/GATA4-GATA5 and ELT-3, were enriched in all generations. ELT-2 is known to regulate gut

Table 1
Enrichment of transcription factor binding site in differentially expressed genes sequences (-1500 +200 bp from TSS). Binding sites with Z-score > 5 and Fisher-score > 2 were considered significantly enriched and annotated with x.

TF name	F0E	F1E	F2E	F3E	Class
DAF-16/FOXO1, FOXO-4				x	Fork head/winged helix factors
CES-2/DBP and TEF			x	x	Basic leucine zipper factors (bZIP)
HLH-30/MITF			x	x	Basic helix-loop-helix factors (bHLH)
ELT-2/GATA4, GATA5	x	x	x	x	Other C4 zinc finger-type factors
ELT-3	x	x	x	x	Other C4 zinc finger-type factors
PQM-1	x	x		x	C2H2 zinc finger factors
SMA-4/SMAD4		x		x	SMAD/NF-1 DNA-binding domain factors
CEBP-1		x		x	Basic leucine zipper factors (bZIP)
ZIP-8		x		x	Basic leucine zipper factors (bZIP)
CEH-10/VSX2	x				Homeo domain factors

differentiation as well as its maintenance. Another TFBS enriched in F3 is DAF-16/FOXO, the main target of insulin/insulin-like growth factor signaling pathway (IIS) in response to stress (Table 1). DAF-16 interacts with many others TF to coordinate the stress response. Interestingly other TF involved in the regulation of the stress response PQM-1, were enriched in F0, F1 and F3 (Downen et al., 2016). The upstream regulator of the core apoptotic cell death machinery, CES-2 was enriched in the F2 and F3 exposed generations. HLH-30/TFEB is involved in regulation of autophagy and lipolysis in stress response conditions (Lin et al., 2018). Moreover, HLH-30/TFEB forms a transcriptional regulatory module with DAF-16/FOXO to modulate oxidative stress response and protein homeostasis. This was in line with a significant enrichment of TF gene products under direct control of DAF-16 transcripts in all generations.

The simultaneous nuclear localization of the product of the DAF-16 and PQM-1 genes leads to antagonistic effects on the control of class I (DAF-16) and class II (PQM-1) target genes. The action of these two transcription factors allows switching between stress response (class I) and reproduction/growth functions (class II). The list of gene classes I and II comes from a robust consensus of transcriptomic and Chip-sequencing meta-analysis (Tepper et al., 2013). We found that 52% of the 72 shared DEGs were under control of DAF-16/PQM-1, of which 13 and 25 DEGs belonged to class I and to class II, respectively (Table 2). This notion was further corroborated by the significant enrichment of the DAF-16 binding motif in the promoter sequences of the 72 DEGs (Z-score = 8.9 and Fisher score = 3) (data not shown). These data strongly suggest that DAF-16 is a key regulator of the stress response imposed by chronic gamma radiation. Based on experimentally validated interactions, we built a network between the transcription factors and the shared DEGs. This showed the connection between DAF-16, PQM-1, ZTF-2, CES-2 and *egl-1*. A part of this network governs stress, apoptosis response and it was shared by four continuously exposed generations (Fig. S4).

To verify the responsiveness and activation by gamma radiation of DAF-16, the cellular localization was investigated in irradiated L4-young adult hermaphrodites using a *daf-16:gfp* reporter strain. Basal expression of DAF-16 is predominantly localized in the cytoplasm, while activation requires translocation to the nucleus. DAF-16 localization can thus be divided into three categories: cytoplasmic (inactivated state), intermediate or nuclear (activated state) (Fig. 5a). The nuclear localization shifted significantly, from 15% under control conditions to 47% in exposed nematodes, while the intermediate localization remained relatively stable (28.9–34.8%). The increased nuclear localization of DAF-16 in response to chronic irradiation was consistent with the transcriptomic data which demonstrated the activation of genes under the control of DAF-16.

4. Discussion

4.1. Chronic multigenerational exposure to ionizing radiation induces consistent reproductive toxicity

To address the existing knowledge gap in the field of chronic-low dose exposure to ionizing radiation and its impact over multiple generations, the present study investigated the progression of phenotypic and molecular toxic effects induced over four consecutive generations of *C. elegans* subjected to chronic gamma irradiation. The exposure condition used in this study was known to induce reproductive toxicity effects without affecting embryonic survival (Dubois et al., 2018). Moreover, since reproductive impairment has been recently linked to irradiation during the early stages of development (Maremonti et al., 2019), the exposure encompassed both embryonal and larval stages including gonadal development.

Total brood size was employed as the apical endpoint to assess reproductive toxicity, which revealed a persistent decrease in the number of offspring in all generations exposed to 50 mGy h⁻¹ (Fig. 1a). This result is consistent with the phenotypical effects previously

Table 2

Table of percentage of class I and class II genes and proteins regulated by DAF-16/PQM1 in response to chronic exposure to IR. The analysis includes DEGs resulting from four exposed generations as well as genes in common between three or four generations from our study. Other datasets include: Maremonti et al., 2019 (Maremonti et al., 2019), Maremonti et al., 2019 (Maremonti et al., 2020), Dubois et al., 2019 (Dubois et al., 2019).

	This study					Other datasets				
	F0E	F1E	F2E	F3E	Genes shared	F0 (Maremonti et al., 2019)		F0 (Maremonti et al., 2020)		F0 (Dubois et al., 2019)
Type of analysis	Transcriptomic					Proteomic				
Irradiation time (h)	65					48	48	72	72	65
Dose rate (mGy/h)	50					10	100	10	100	50
Class I %	15.1	17.7	6.0	14.0	18.1	18.2	25.9	18.9	11.7	2.8
Class II %	22.8	22.6	6.5	17.3	34.7	10.0	8.3	32.1	5.9	19.4
Total %	37.9	40.3	12.5	31.2	52.8	28.2	34.3	50.9	17.6	22.2

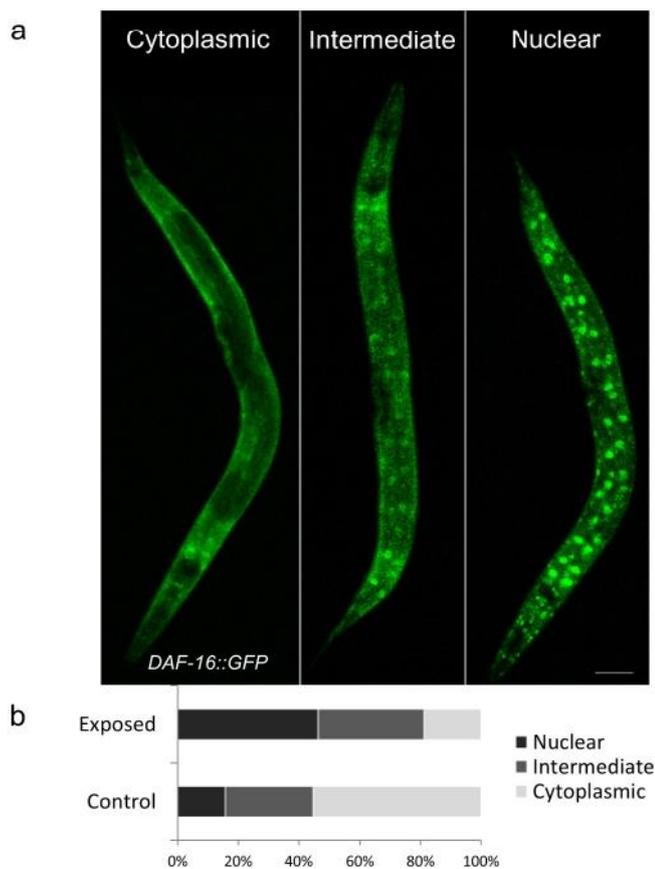


Fig. 5. (a) Representative picture of *DAF-16::GFP* localization in L4 YA hermaphrodites. *DAF-16* localization is classified as cytoplasmic, intermediate or nuclear. Scale bar = 50 μm. (b) The proportion of *DAF-16::GFP* nuclear localization increased from 15% to 47% after chronic exposure to IR in the first generation F0. Standard deviation SD < 0.8 on each proportion.

observed in *C. elegans* upon exposure to chronic irradiation (Buisset-Goussen et al., 2014). A clear difference in terms of reproductive toxicity effect was found between F0 and the subsequent generations (23% to more than 40% decrease in number of offspring). This difference could be attributed to the fact that F0 nematodes were only exposed from the egg stage to young adults, whereas the following generations (F1 to F3) exposure included the gametogenesis event period during parental irradiation. This result showed no further effect of cumulative dose over the generations with respect to reproduction, but rather a steady state type of effect from F1 onward. This is in accordance with parental exposure to similar dose rates of gamma radiation that have recently shown to induce significant DNA damage in F1 embryos (Maremonti et al., 2019). The current study thus confirms that reproduction is a radiosensitive process in *C. elegans* (Buisset-Goussen et al., 2014;

Maremonti et al., 2019; Adam-Guillermin et al., 2012). However, the resulting offspring were viable and displayed no evident developmental defects, which is consistent with the fact that embryos upon exposure to stress display silenced cell checkpoints combined with a robust DNA repair that enables normal embryogenesis in spite of DNA-damage (Holway et al., 2006; Clejan et al., 2006). We therefore conducted a systematic investigation of central processes in germ cell maturation to unveil the cause of the reduced reproduction.

4.2. Gametes and germ cell vulnerability to chronic gamma irradiation causes multigenerational reproductive toxicity effects in *C. elegans*

In a previous study, irradiation during L1-L3 stages was demonstrated to be critical for reproduction (Maremonti et al., 2019). During these developmental stages, the precursors of the germline (Z1/Z4) and the somatic gonad (Z2/Z3) proliferate rapidly to form the gonad (Hubbard and Greenstein, 2005). In the current study, reduced number of mitotic cells in the distal gonad of irradiated nematodes in F0 and F3 generations, demonstrated a consistent impact on gamete production and germ line homeostasis (Fig. 1c,d, Fig. 2a,b). In line with these observations, Gene Ontology Phenotype analysis resulted in enrichment of terms related to "Germ cell development", "Germ cell differentiation variant" and "Gonad morphology variant" (Fig. 3a). The distal part of the gonad, containing germ cells and their niches are used to produce the germline and ensure the integrity of the subsequent generations. To further investigate the essential function of the distal gonad, radiation-induced cell proliferation arrest was assessed, which showed an increase in the frequency of enlarged cell nuclei and less condensed chromosomes (Fig. 2b; Fig. S2), indicating a potentially deleterious effect onto the germ line stem cell niches. When *C. elegans* is subjected to genotoxic stress, cell-cycle arrest and germline apoptosis are spatially separated. Cell-cycle arrest is restricted to the mitotic proliferation zone of the distal part, while apoptosis occurs in the meiotic pachytene zone, near to the bend (Craig et al., 2012). *Egl-1* acts in DNA damage-induced germline apoptosis whereas non-stress related germline apoptosis does not rely on this gene function (Gartner et al., 2018). Upregulation of *egl-1* was measured in all generations by both RNA-Seq and qRT-PCR (Fig. 4b, Fig. S3), in line with a recent study where chronic exposure to ionizing radiation was shown to induce DNA-damage germline apoptosis through *cep-1/p53* pathway (Maremonti et al., 2019). These data, thus, revealed an overall functional impact on the germ line caused by radiation-induced DNA damage consistent with the model where genetically damaged cells are removed to preserve genome integrity and progeny viability (Stergiou and Hengartner, 2004).

Further investigation of the impact on the germ line was performed by assessing the effects of ionizing radiation on spermatogenesis. In many species, the spermatozoa are among the most radiation vulnerable cells including crustaceans, mice and humans (Adam-Guillermin et al., 2018; Fukunaga et al., 2017). In *C. elegans* hermaphrodite, sperm is produced in limited amount and roughly 300 spermatids can be generated during L3-L4 stages of larval development (Chu and Shakes, 2013). Thus, the reproduction in *C. elegans* is limited by the number of sperm

produced and immediately stored in the spermatheca, which are then used to fertilize oocytes upon sexual maturation. The current study highlighted a significant, consistent and similar decrease of spermatids over the four exposed generations (Fig. 1c). The observed decrease was positively associated to the decreased number of offspring, suggesting that sperm toxicity is at the origin of the observed reproductive toxicity effects. Gene ontology term "spermatheca morphogenesis" was found significantly modulated for both F0 and F1 generations, as well as "Gametogenesis" in F1, F2 and F3 assessed by phenotype enrichment analysis (Fig. 3a,b). Consistent with the reduction of spermatids, a group of 68 genes linked to the sperm functions were downregulated, including 2 of the 5 genes required for sperm activation pathway in hermaphrodites (L'Hemault et al., 1988), three protamine sperm chromatin enriched genes, *spch-1*, *spch-2* and *spch-3*, histone genes and associated enzymes (Table S2), which are required for packaging of *C. elegans* sperm DNA in the transition from pachytene to mature sperm, and 46 Major Sperm Protein (MSP), required for sperm cytoskeleton dynamics, oocytes maturation and MAPK activation (Kuwabara, 2003; Yang et al., 2010) (Table S2). This indicated that both activation and sperm viability were affected. In order to test this hypothesis, sperm quality was assessed and showed a significant decrease (p -value < 0.001) in the activation of spermatids to spermatozoa in exposed nematodes (Fig. 1d). The spermatids DNA is compact chromatin transcriptionally silenced under the control of protamine and transmits epigenetic information to the embryos, which is required for proper spermatogenesis and oogenesis (Samson et al., 2014; Tabuchi et al., 2018). Collectively, these results indicate that radiation-induced decrease in sperm quality, *msp* and *spch* gene expression may influence reproduction by modification of the epigenetic information transmitted over the generations (Engert et al., 2018).

4.3. Molecular stress and defense mechanisms induced during multigenerational exposure to ionizing radiation

The data of the current study emphasize the difference between radiosensitive reproductive processes and the inherent robustness of somatic tissues in *C. elegans*. We therefore investigated the transcriptomic data to identify molecular mechanisms involved in defense and repair, and evidence of adaptation to chronic radiation. Response to stress, Innate immune response, Cellular response to unfolded protein and Iron transport were stress related GO terms shared between generations that involved an increasing number of DEGs over the 4 generations (Fig. 3b). A significant proportion of the increase in DEGs, observed between the first two (F0-F1) and the last two generations (F2-F3) (Fig. 4a), was related to stress response, lipid metabolism and signaling pathway.

Within the stress response categories, and consistent with increased ROS level and oxidative stress as molecular initiating events under exposure to ionizing radiation (Maremonti et al., 2020), we identified a significant up-regulation of oxidation-reduction processes in F0, F1 and F3 generations. In this regard, differential regulation of *ftn-1*, *cyp-25A1*, *cyp-25A2*, *acox-1.5*, *cyp-37B1*, *oga-1* and *ZK1290.5.2*, over the four exposed generations, indicated a persistent response to oxidative stress. Induction of oxidative stress by ionizing radiation leads to increased DNA damage and affects proteostasis (Maremonti et al., 2019; Dubois et al., 2019). In line with these findings, the *hsp-70* gene, which is a member of a conserved chaperone gene family that plays a central role in stress response and clearance of protein aggregates (Kirstein et al., 2017) was found differentially regulated in all exposed generations (Fig. 4b). This gene was also found up-regulated in the crustacean model organism *Daphnia magna* after transgenerational chronic irradiation, suggesting a central role of this protein in maintaining proteostasis in response to chronic irradiation (Trijau et al., 2018). Interestingly, a recent study showed a modulation of the activity of the 20S, 26S, 30S subunit of the proteasome, in response to chronic gamma irradiation in *C. elegans* (Dubois et al., 2018).

Previous studies have shown that chronic exposure to ionizing radiation induces a modulation of lipid metabolism, via biosynthesis of unsaturated fatty acid, both in mice and nematode models [85]. Especially, it has also been shown that under persistent DNA damage caused by UV radiation, *C. elegans* adapts its metabolism by modulating fatty acids synthesis, via EGF, DAF-2/DAF-16 and AMPK like pathways (Edifizi et al., 2017). In addition, an increase in lipogenic processes after germline ablation has been shown to restore lipid homeostasis, by shifting from reproduction to longevity through DAF-16 and TCER-1 pathways (Amit et al., 2016). In the present study, transcription factors and transcriptomic analysis showed significant up-regulation of *daf-16* as well as significant differential regulation of genes under control of insulin DAF-2/DAF-16 pathway, such as *pud-2.1*, *pud-3*, *pept-1* and *dod-21*. This was in line with the GO terms showing the influence on multiple signaling processes including regulation of insulin receptor signaling pathway, sphingolipid mediated signaling pathway, hormone biosynthetic process and pri-miRNA transcription from RNA polymerase.

Collectively, the observed modulation of protein and lipid metabolism, innate immune response, proteolysis, peptide activity and protein splicing, implies a cumulative stress that required activation of additional repair and signaling processes in the last two generations (F2-F3) (Fig. 3b).

4.4. Upstream transcription factors modulating gene expression over multiple irradiated generations

Transcription factor enrichment and gene networks analyses were performed to identify the key regulators involved in the radiation-induced transcriptional responses. Compiled DEGs resulting from the four exposed generations, identified transcription factors related to stress response and lipid and protein metabolism (Table 1). Specifically, ELT-2/GATA4-GATA5 and ELT-3 were among the most significantly enriched transcription factors in all exposed generations. Both are regulated during aging, causing the regulation of hundreds of genes (Budovskaya et al., 2008; Mann et al., 2016). ELT-2 is the main regulator of ageing through differentiation, maintenance and function of the intestine (Wiesenfahrt et al., 2016), essential to lipid storage and metabolism in *C. elegans* (Mullaney and Ashrafi, 2009). Overexpression of *elt-2* significantly increases the lifespan, while the rate of gene expression changes that occur during normal aging is slowed (Mann et al., 2016), which implies that ionizing radiation affects *C. elegans* lipid metabolism, intestine, and ageing processes.

CES-2/DBP, TEF and HLH-30/TFEB were enriched in the 2 last generations (F2 and F3). CES-2 is a co-regulator of autophagy and apoptotic cell death pathways, which may indicate intensification of such toxicological responses over generations (Erdélyi et al., 2011). HLH-30 forms a transcriptional regulatory complex that translocates into the nucleus to promote stress resistance and longevity (Lin et al., 2018). Moreover, HLH-30 acts in peroxide stress response via activation of *ftn-1* (Quach et al., 2013), which was found significantly upregulated in all exposed generations (Fig. 4b). HLH-30 is also a regulator of both lipid metabolism and localization, through lipolysis and autophagy (O'Rourke and Ruvkun, 2013; Lapierre et al., 2013). At a certain threshold of persistent DNA damage, there is a switch from proteasome and chaperones expression towards autophagy (Edifizi et al., 2017), which also supports the notion that the last two generations experienced higher stress (Fig. 3b).

Furthermore, PQM-1, a central regulator of stress response, was enriched in 3 exposed generations (F0, F1 and F3). PQM-1 acts under control of DAF-2/DAF-16, mTOR and microRNAs to regulate fat storage through vitellogenin genes (Downen et al., 2016). PQM-1 is also required for proteostasis and systemic chaperone signaling in order to reduce protein aggregates (O'Brien et al., 2018). PQM-1 and DAF-16 act as mutual antagonists on nuclear localization and transcription of Class I and II target genes (Tepper et al., 2013). Regulation of PQM-1 and

DAF-16/FOXO by the Insulin and IGF-1 signaling (IIS) pathways allows a rapid switch between stress response to reproduction, development, and metabolism (Zecic and Braeckman, 2020). In particular, the IIS pathway governs part of the development and extends lifespan by upregulating genes related to stress response and metabolism (class I), and by downregulating genes involved in development and reproduction (class II). DAF-16 regulates class I genes through the DAF-16 binding element (GTAAACA or TGTTTAC), whereas PQM-1 controls class II genes through DAF-16 associated elements (TGATAAG or CTTATCA). In relation to the enhanced transcriptomic stress response observed in the last generation, the well-characterized stress-induced transcription factor DAF-16/FOXO was found significantly enriched as well as the DAF-16 co-regulator PQM-1 and HLH-30 in the other generations (Table 1).

In the present study, consistent with the significant upregulation of class I genes, the translocation of DAF-16 transcription factor to the nucleus and hence its activation was shown in 47% of the exposed nematodes (Fig. 5b). This strongly suggests that, as environmental stressor, chronic exposure to ionizing radiation affects the transcriptional regulation over multiple generations, by inducing metabolic changes to modulate the allocation of resources, and a switch from reproduction and growth to cellular maintenance and repair (Henderson and Johnson, 2001; Mueller et al., 2014). However, the partial or cytoplasmic localization of DAF-16 in 45% of the exposed population as well as the proportion of class II genes indicated that other regulators were involved in radiation-induced stress response.

Thus, we further investigated the implication of DAF-16 by comparing the presence of class I and II genes and proteins under DAF-16/PQM-1 control with previously published omics datasets from chronic irradiation of *C. elegans*. In the current study, between 12.5% and 40.3% of class I and II genes were identified over the 4 exposed generations, where 52.8% were shared by 3 or 4 generations. In recent transcriptomic analysis carried out after 48 and 72 h of irradiation at 10 and 100 mGy h⁻¹ (Maremonti et al., 2019), similar rates from 17.6% to 50.9% were observed (Table 2). Moreover, a proteomic analysis on nematodes exposed to similar doses of chronic gamma radiation showed that 22% of proteins from class I and II genes were overexpressed (Dubois et al., 2019). Thus, these findings indicate that DAF-16 and PQM-1 constitute major regulators in response to single or multigenerational exposure to chronic irradiation.

Collectively, the transcriptomic and transcription factors enrichment analyses indicate that chronic irradiation elicits a cumulative effect manifested as a stronger transcriptional level response to stress in the last two generations (F2 and F3), which underlines the importance of performing multigenerational exposures. Non-targeted effects may also play a significant role in the effect induced by chronic irradiation. Indeed, microbeam irradiation of somatic cells increases DNA damage in the germ line as well as genomic instability in the F1 generation and affects several signaling pathways (Guo et al., 2013).

5. Conclusions

Multigenerational exposure to gamma radiation causes a significant and persistent reproductive toxicity effect in *C. elegans*, due to impact on gametes production. Specifically, radiation-induced cell cycle arrest and increased DNA damage-induced germ cell apoptosis, which caused a consistent reduction in the number of germ cells. The main cause of reproductive toxicity in all generations was decreased quality and quantity of sperm cells. The transcriptomic responses were overall directed towards counteracting stress and damage and increased sharply over the last two generations (F2-F3). This included defenses against oxidative stress and damage to DNA and proteins as well as a metabolic shift, and activation of DAF-16/FOXO stress resistance pathways. The adopted systems biology approach thus facilitated an improved understanding of the ionizing radiation toxic mode of action and linked phenotypic impact with underlying molecular mechanisms over

multiple exposed generations in *C. elegans*. Difference between generations underlines the importance of investigating transgenerational inherited effects from ionizing radiation exposure. This may involve heritable genetic or epigenetic effects of radiation onto subsequent generations which should be further investigated.

Funding

This work was supported by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses with the support of the Cancer TMOI of the French Alliance for Life and Health Sciences (AVIESAN) (2015/1/212). DAB and EM were supported by the Research Council of Norway through its Center of Excellence (CoE) Center for Environmental Radioactivity (CERAD, project No. 223268).

CRedit authorship contribution statement

Rémi Guédon: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Erica Maremonti:** Investigation, Methodology, Software, Writing – original draft, Review. **Olivier Armant:** Methodology, Software, Formal analysis, Review. **Simon Galas:** Conceptualization, Methodology, Resources, Review. **Dag Anders Brede:** Conceptualization, Project administration, Resources, Methodology, Writing – original draft, Review. **Catherines Lecomte-Pradines:** Conceptualization, Data curation, Project administration, Resources, Supervision, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Data availability

All transcriptomics data are accessible in the GEO repository under the accession number GSE175918.

Acknowledgments

Dag Markus Eide is acknowledged for his help during transcriptomic data analysis. We want to thank Claire Della Vedova for her critical inputs on the statistical analysis as well as Nicolas Dubourg for his help with irradiation and dosimetry calculations. We also thank Christelle Adam-Guillermin and François Paquet for their support in setting up and carrying out this project.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112793.

References

- Adam-Guillermin, C., Hertal-Aas, T., Oughton, D., Blanchard, L., Alonzo, F., Armant, O., Horemans, N., 2018. Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. *Ann. ICRP* 47 (3–4), 327–341.
- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., et al., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, pp. 67–103.
- Amrit, F.R., Steenkiste, E.M., Ratnappan, R., Chen, S.W., McClendon, T.B., Kostka, D., Yanowitz, J., Olsen, C.P., Ghazi, A., 2016. DAF-16 and TCR-1 facilitate adaptation to germline loss by restoring lipid homeostasis and repressing reproductive physiology in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 12 (2), 1005788.

- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 327 (1), 48–60.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 (1), 71–94.
- Budovskaya, Y.V., Wu, K., Southworth, L.K., Jiang, M., Tedesco, P., Johnson, T.E., Kim, S.K., 2008. An elt-3/elt-5/elt-6 GATA transcription circuit guides aging in *C. elegans*. *Cell* 134.2, 291–303.
- Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *J. Environ. Radioact.* 137, 190–197.
- Chu, D.S., Shakes, D.C., 2013. Spermatogenesis. *Germ Cell Development in C. elegans*. Springer, pp. 171–203.
- Clejan, I., Boerckel, J., Ahmed, S., 2006. Developmental modulation of nonhomologous end joining in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 173 (3), 1301–1317.
- Craig, A.L., Moser, S.C., et al., 2012. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 321–352.
- Downen, R.H., Breen, P.C., Tullius, T., Conery, A.L., Ruvkun, G., 2016. A microRNA program in the *C. elegans* hypodermis couples to intestinal mTORC2/PQM-1 signaling to modulate fat transport. *Genes Dev.* 30 (13), 1515–1528.
- Dubois, C., Lecomte, C., Ruys, S., Kuzmic, M., Della-Vedova, C., Dubourg, N., Galas, S., Frelon, S., 2018. Precoce and opposite response of proteasome activity after acute or chronic exposure of *C. elegans* to γ -radiation. *Sci. Rep.* 8.1, 1–11.
- Dubois, C., Pophillat, M., Audebert, S., Fourquet, P., Lecomte, C., Dubourg, N., Galas, S., Camoin, L., Frelon, S., 2019. Differential modification of the *C. elegans* proteome in response to acute and chronic gamma radiation: link with reproduction decline. *Sci. Total Environ.* 676, 767–781.
- Edifizi, D., Nolte, H., Babu, V., Castells-Roca, L., Mueller, M.M., Brodesser, S., Krüger, M., Schumacher, B., 2017. Multilayered reprogramming in response to persistent DNA damage in *C. elegans*. *Cell Rep.* 20 (9), 2026–2043.
- Engert, C.G., Droste, R., van Oudenaarden, A., Horvitz, H.R., 2018. A *Caenorhabditis elegans* protein with a PRDM9-like SET domain localizes to chromatin-associated foci and promotes spermatocyte gene expression, sperm production and fertility. *PLoS Genet.* 14 (4), 1007295.
- Erdélyi, P., Borsos, E., Takács-Vellai, K., Kovács, T., Kovács, A.L., Sigmond, T., Hargitai, B., Pásztor, L., Sengupta, T., Dengg, M., Pécsi, I., Tóth, J., Nilsen, H., Vértessy, B.G., Vellai, T., 2011. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* 124 (9), 1510–1518.
- Fukunaga, H., Butterworth, K.T., Yokoya, A., Ogawa, T., Prise, K.M., 2017. Low-dose radiation-induced risk in spermatogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 93 (12), 1291–1298.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., Samali, A., 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 1–23.
- Gartner, A., Boag, P.R., et al., 2018. Germline survival and apoptosis. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet], WormBook.
- Greiss, S., Schumacher, B., et al., 2008. Transcriptional profiling in *C. elegans* suggests DNA damage dependent apoptosis as an ancient function of the p53 family. *BMC Genom.* 9 (1), 334.
- Guo, X., Sun, J., Bian, P., Chen, L., Zhan, F., Wang, J., Xu, A., Wang, Y., Hei, T.K., Wu, L., 2013. Radiation-induced bystander signaling from somatic cells to germ cells in *Caenorhabditis elegans*. *Radiat. Res.* 180.3, 268–275.
- Henderson, S.T., Johnson, T.E., 2001. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11 (24), 1975–1980.
- Heyer, B.S., MacAuley, A., Behrendtsen, O., Werb, Z., 2000. Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development. *Genes Dev.* 14 (16), 2072–2084.
- Hoffman, S., Martin, D., Meléndez, A., Bargonetti, J., 2014. *C. elegans* CEP-1/p53 and BEC-1 are involved in DNA repair. *PLoS One* 9 (2), 88828.
- Holway, A.H., Kim, S.-H., La Volpe, A., Michael, W.M., 2006. Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J. Cell Biol.* 172 (7), 999–1008.
- Honjo, Y., Ichinohe, T., 2019. Cellular responses to ionizing radiation change quickly over time during early development in zebrafish. *Cell Biol. Int.* 43 (5), 516–527.
- Hubbard, E., Greenstein, D., 2005. Introduction to the germ line. In: *WormBook* 1 (4).
- Kadhim, M., Salomaa, S., Wright, E., Hildebrandt, G., Belyakov, O.V., Prise, K.M., Little, M.P., 2013. Non-targeted effects of ionising radiation—implications for low dose risk. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 752.2, 84–98.
- Kirstein, J., Arnsburg, K., Scior, A., Szlachcic, A., Guilbride, D.L., Morimoto, R.I., Bukau, B., Nillegoda, N.B., 2017. In vivo properties of the disaggregate function of J-proteins and Hsc70 in *Caenorhabditis elegans* stress and aging. *Aging Cell* 16 (6), 1414–1424.
- Kuwabara, P.E., 2003. The multifaceted *C. elegans* major sperm protein: an ephrin signaling antagonist in oocyte maturation. *Genes Dev.* 17 (2), 155–161.
- L'Hernault, S.W., Shakes, D.C., Ward, S., 1988. Developmental genetics of chromosome I spermatogenesis-defective mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 120 (2), 435–452.
- Lapierre, L.R., De Magalhães Filho, C.D., McQuary, P.R., Chu, C.C., Visvikis, O., Chang, J. T., Gelino, S., Ong, B., Davis, A.E., Irazoqui, J.E., Dillin, A., Hansen, M., 2013. The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 4 (1), 1–8.
- Lin, X.-X., Sen, I., Janssens, G.E., Zhou, X., Fonslow, B.R., Edgar, D., Stroustrup, N., Swoboda, P., Yates, J.R., Ruvkun, G., Riedel, C.G., 2018. DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nat. Commun.* 9 (1), 1–15.
- Mann, F.G., Van Nostrand, E.L., Friedland, A.E., Liu, X., Kim, S.K., 2016. Deactivation of the GATA transcription factor ELT-2 is a major driver of normal aging in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 12, e1005956.
- Maremonti, E., Eide, D.M., Oughton, D.H., Salbu, B., Grammes, F., Kassaye, Y.A., Guédon, R., Lecomte-Pradines, C., Brede, D.A., 2019. Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* via impairment of spermatogenesis. *Sci. Total Environ.* 695, 133835.
- Maremonti, E., Eide, D.M., Rossbach, L.M., Lind, O.C., Salbu, B., Brede, D.A., 2020. In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 583–596.
- Mueller, M.M., Castells-Roca, L., Babu, V., Ermolaeva, M.A., Müller, R.U., Frommolt, P., Williams, A.B., Greiss, S., Schneider, J.I., Benzing, T., Schermer, B., Schumacher, B., 2014. DAF-16/FOXO and EGL-27/GATA promote developmental growth in response to persistent somatic DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 16 (12), 1168–1179.
- Mullaney, B.C., Ashrafi, K., 2009. *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids* 1791 (6), 474–478.
- O'Brien, D., Jones, L.M., Good, S., Miles, J., Vijayabaskar, M.S., Aston, R., Smith, C.E., Westhead, D.R., van Oosten-Hawle, P., 2018. A PQM-1-mediated response triggers transcellular chaperone signaling and regulates organismal proteostasis. *Cell Rep.* 23 (13), 3905–3919.
- O'Rourke, E.J., Ruvkun, G., 2013. MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nat. Cell Biol.* 15 (6), 668–676.
- Quach, T.K., Chou, H.T., Wang, K., Milledge, G.Z., Johnson, C.M., 2013. Genome-wide microarray analysis reveals roles for the REF-1 family member HLH-29 in ferritin synthesis and peroxide stress response. *PLoS One* 8 (3), 59719.
- Samson, M., Jow, M.M., Wong, C.C., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S.K., Yates, J.R., Chu, D.S., 2014. The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 10 (10), 1004588.
- Stergiou, L., Hengartner, M., 2004. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ.* 11 (1), 21–28.
- Tabuchi, T.M., Rechtsteiner, A., Jeffers, T.E., Egelhofer, T.A., Murphy, C.T., Strome, S., 2018. *Caenorhabditis elegans* sperm carry a histone-based epigenetic memory of both spermatogenesis and oogenesis. *Nat. Commun.* 9 (1), 1–11.
- Tepper, R.G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C.T., Bussemaker, H.J., 2013. PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell* 154 (3), 676–690.
- Thabit, S., Handoussa, H., Roxo, M., El Sayed, N.S., Cestari de Azevedo, B., Wink, M., 2018. Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. *PeerJ* 6, 5159.
- Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K., Alonzo, F., 2018. Transgenerational DNA methylation changes in *Daphnia magna* exposed to chronic γ irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 52 (7), 4331–4339.
- UNSCEAR, 2008. Sources and Effects of Ionizing Radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR 2008 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes, United Nations.
- UNSCEAR, 2006. Effects of Ionizing Radiation: UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly, With Scientific Annexes. United Nations Publications.
- UNSCEAR, 2012. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.
- Wiesenfahrt, T., Berg, J.Y., Osborne Nishimura, E., Robinson, A.G., Goszczynski, B., Lieb, J.D., McGhee, J.D., 2016. The function and regulation of the GATA factor ELT-2 in the *C. elegans* endoderm. *Development* 143 (3), 483–491.
- Yang, Y., Han, S.M., Miller, M.A., 2010. MSP hormonal control of the oocyte MAP kinase cascade and reactive oxygen species signaling. *Dev. Biol.* 342 (1), 96–107.
- Zecic, A., Braeckman, B.P., 2020. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and its role in metabolic remodeling. *Cells* 9 (1), 109.

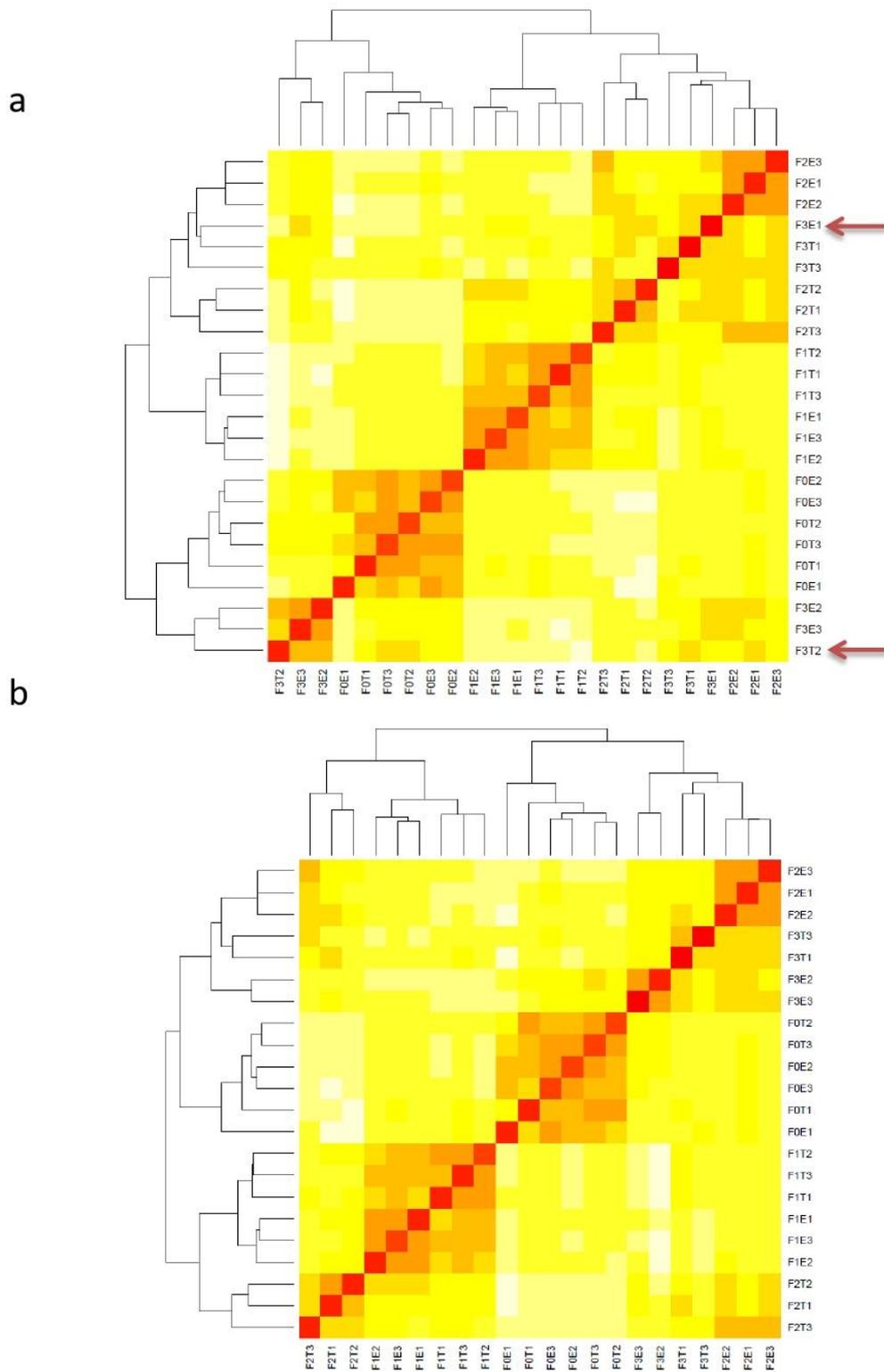


Figure S1 : Estimation of the biological variability of samples by hierarchical clustering. a) Hierarchical clustering of all samples. Potential outliers are indicated by a red arrow. b) Hierarchical clustering of samples included in the analysis. Potential outliers are removed. The generations are indicated for each sample (F0, F1, F2 and F3) as well as the conditions (E for exposed, T for control,) and the number of the biological replica (1, 2 or 3)

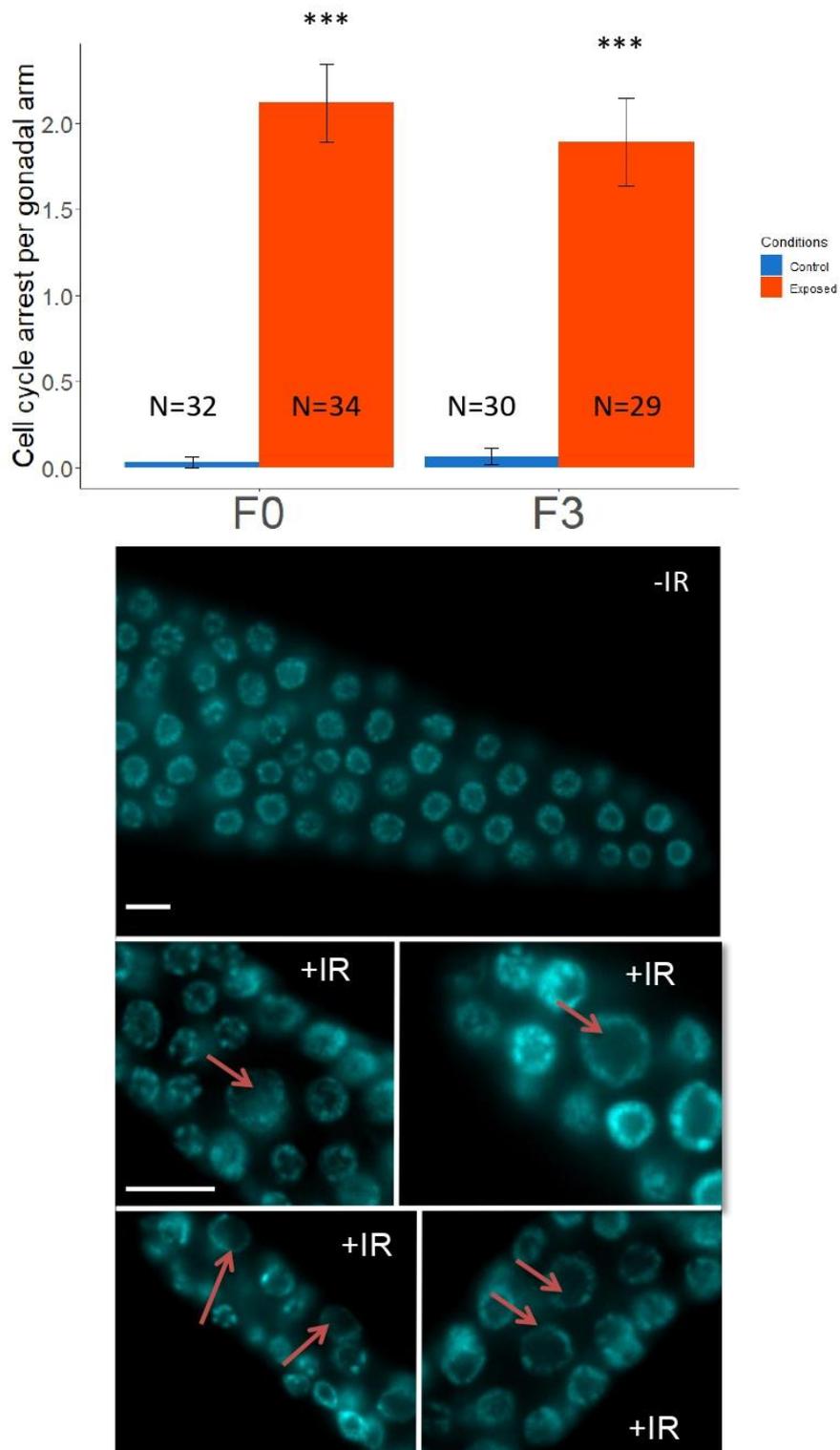
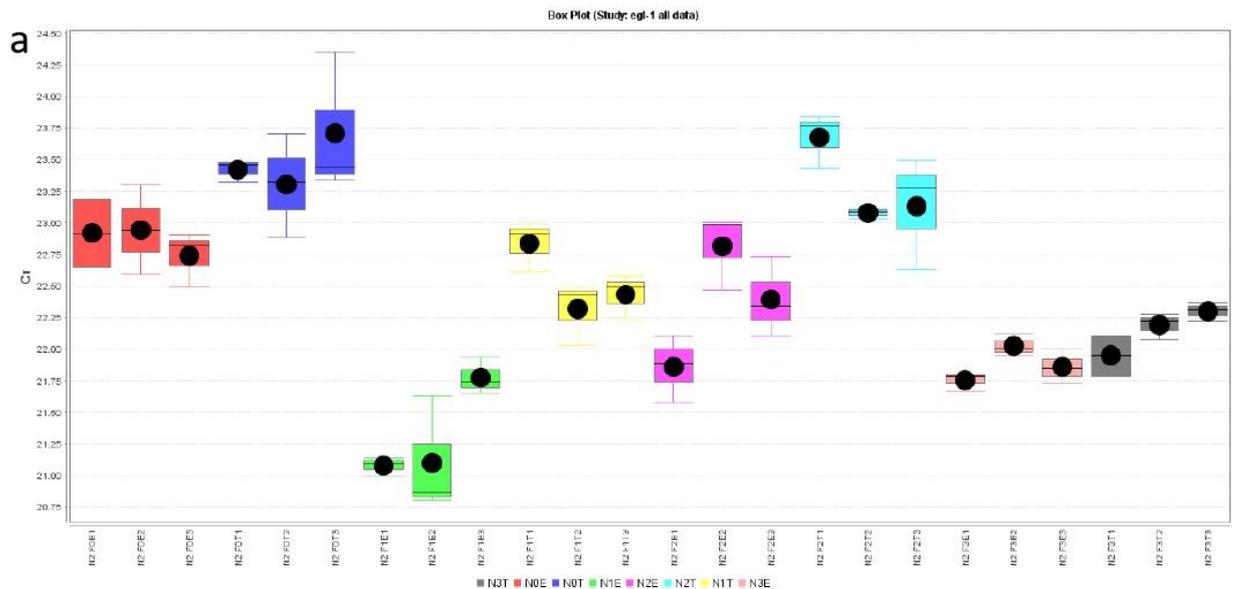
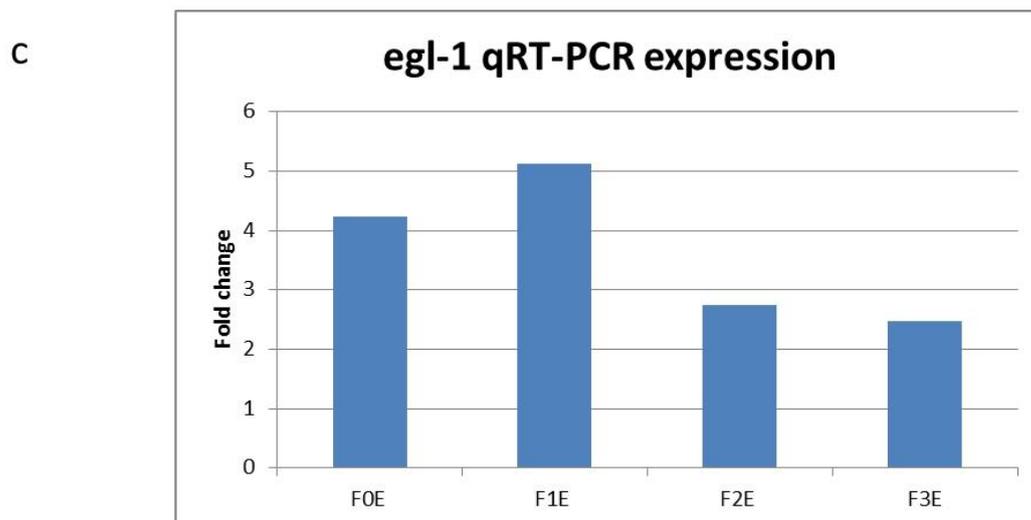


Figure S2. a) Bar plot of cell cycle arrest per gonadal arm. Triple asterisks indicate a p-value < 0.001 from generalized linear model and multiple comparison using Dunnett's test approach. (N) indicates the number of different gonadal arms measured in the mitotic germ cells assays. b) Distal germ cells from control (-IR) and exposed (+IR) *C.elegans* stained with DAPI. Mitotic germ cells under cell cycle arrest are indicated with white arrows. Scale bar = 10 μ m



b

FOE (RQ)	FOE (P-value)	F1E (RQ)	F1E (RQ)	F2E(P-value)	F2E(P-value)	F3E(RQ)	F3E(P-value)
4.2352	0.0098	5.1256	0.0586	2.7457	0.1018	2.4675	0.0049



d

	Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
Target	egl-1	CCTCAACCTCTTCGGATCTT	TGCTGATCTCAGAGTCATCAA
Housekeeping gene	PMP-3	TGGCCGGATGATGGTGTCGC	ACGAACAATGCCAAAGGCCAGC
Housekeeping gene	CDC-42	AGCCATTCTGGCCGCTCTCG	GCAACCGTCTCTGTTTGGC
Housekeeping gene	ACT-2	GCGCAAGTACTCCGTCTGGATCG	GGGTGTGAAAATCCGTAAGGCAGA

Figure S3 : Transcriptomic validation of *egl-1* expression by qRT-PCR. QC analysis on Ct, sample normalization , relative quantification and t-test were performed with dataassist software V3.01. a) A sample centric Box Plot of Ct expression. Each biological replicate represented is composed of 3 technical replicates. The generations are indicated for each sample (F0, F1, F2 and F3) as well as the conditions (E for exposed, T for control). The black horizontal line and the black dot denote the median Ct and mean Ct respectively. b) Statistical analysis of Fold Change (RQ) calculated from 3 endogenous control (housekeeping genes), Maximum allowable Ct value = 38, adjusting p-value using Benjamini-Hochberg False Discovery rate. c) Bar plot of Fold change for all generations. d) Primer sequenced used.

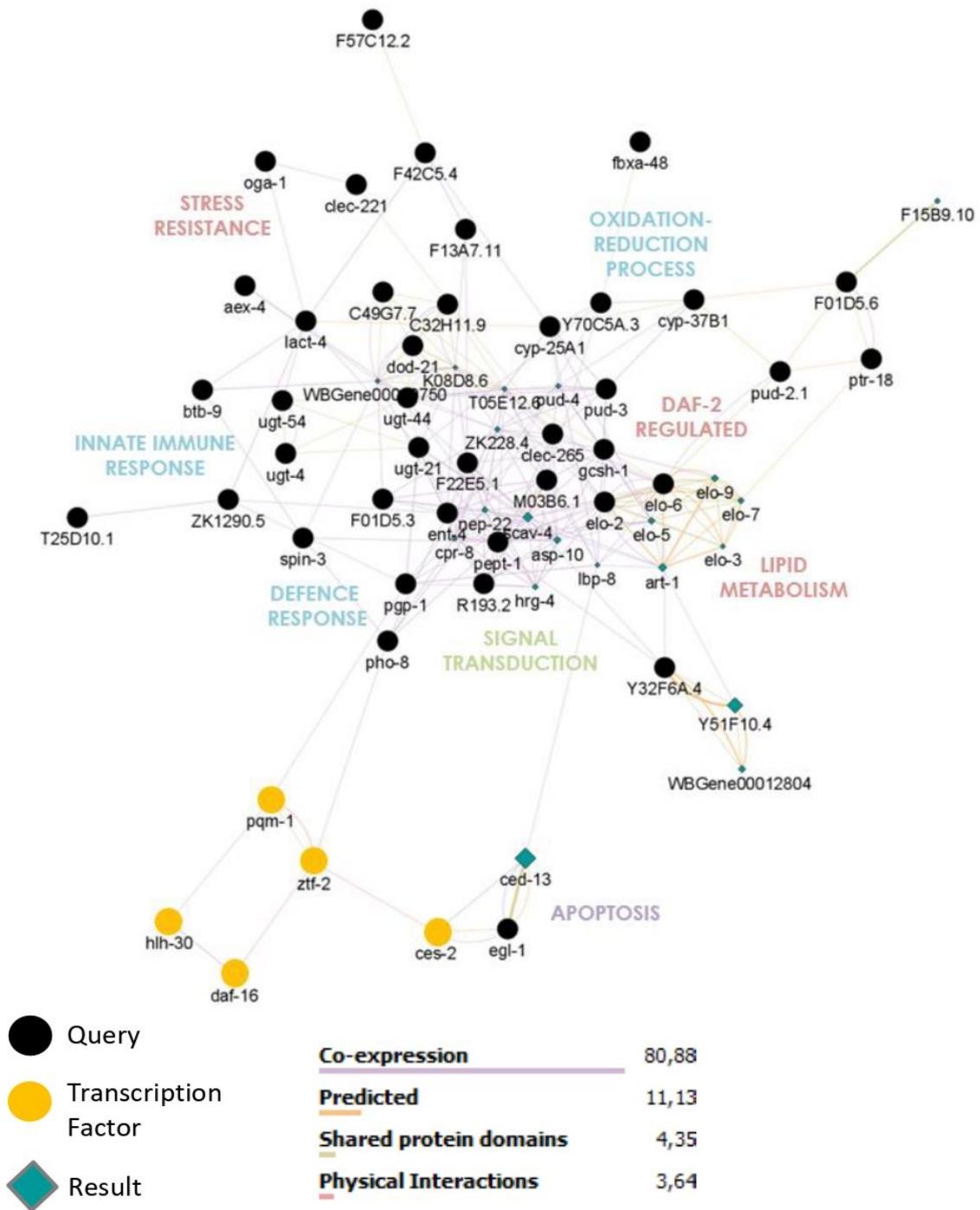


Figure S4 : Network analysis of 72 DEGs and significantly regulated Transcription Factors (yellow circles) shared by three generations of *C. elegans* continuously exposed to 50 mGy/h of gamma radiation. Eight main categories were identified by Gene Ontology analysis and Genemania plug-in within the software Cytoscape.

Generations	GenestableID	log2FoldChange	p-val adj	WikiGene.description	Gene.name
F0E	WBGene00001942	-0.684	0.024	Histone H2A	his-68
F1E	WBGene00001878	-1.482	0.010	Histone H2B 2	his-4
F1E	WBGene00009663	-0.554	0.012	Histone deacetylase	hda-5
F2E	WBGene00001906	-1.150	0.012	Histone H3	his-32
F2E	WBGene00001933	-1.254	0.038	Histone H3	his-59
F2E	WBGene00001880	-1.318	0.009	Histone H3	his-6
F2E	WBGene00001937	-1.298	0.037	Histone H3	his-63
F2E	WBGene00001881	-0.863	0.042	Histone H2A	his-7
F2E	WBGene00001944	-0.872	0.001	Histone H3.3-like type 1	his-70
F2E	WBGene00012302	-1.486	0.013	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific	dot-1.3
F2E	WBGene00014240	-0.508	0.003	Histone H2A	htas-1
F3E	WBGene00001890	-1.822	0.025	Histone H2A	his-16
F3E	WBGene00001899	-2.330	0.011	Histone H3	his-25
F3E	WBGene00001878	-1.782	0.005	Histone H2B 2	his-4
F3E	WBGene00001934	-1.036	0.049	Histone H4	his-60
F3E	WBGene00001882	-0.869	0.036	Histone H2B 2	his-8
F3E	WBGene00001852	-0.914	0.001	Histone H1.X	hil-1
F3E	WBGene00001858	-1.467	0.048	Histone H1 Like	hil-7
F3E	WBGene00010120	0.676	0.030	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific	dot-1.4
F3E	WBGene00007953	-1.008	0.007	Histone DeAcetylase	hda-11
F3E	WBGene00012802	0.590	0.001	Histone-lysine N-methyltransferase set-25	set-25
F3E	WBGene00017482	0.828	0.018	Histone-lysine N-methyltransferase set-9	set-9

Table S4: DEG of transcriptomic analysis playing a role in histone synthesis and regulation. Log2FC and p-value were calculated as described previously in material and methods section.

GenestableID	Generation	log2FC	adj p-val	WikiGene.description	Gene.name
WBGene00007239	F2E	-0.468	0.041268	Major sperm protein	C01G10.14
WBGene00015696	F2E	-0.692	0.000423	Major sperm protein	C10H11.7
WBGene00007613	F2E	-0.473	0.013900	Major sperm protein	C15H11.1
WBGene00007714	F2E	-0.473	0.013900	Major sperm protein	C25D7.1
WBGene00007948	F2E	-0.643	0.037980	Major sperm protein	C35A5.4
WBGene00016461	F2E	-0.737	0.000021	Major sperm protein	C35E7.9
WBGene00007987	F2E	-1.004	0.000000	Major sperm protein	C36H8.1
WBGene00021006	F2E	-0.566	0.010226	Major sperm protein	dct-9
WBGene00008724	F2E	-0.803	0.000000	Major sperm protein	F13A7.1
WBGene00009031	F2E	-0.777	0.000000	Major sperm protein	F21H7.5
WBGene00009470	F2E	-0.534	0.000069	Major sperm protein	F36D3.4
WBGene00018119	F2E	-0.665	0.001000	Major sperm protein	F36H12.3
WBGene00009550	F2E	-0.745	0.005686	Major sperm protein	F38H4.6
WBGene00018336	F2E	-0.659	0.002395	Major sperm protein	F42A9.7
WBGene00009941	F2E	-0.618	0.013161	Major sperm protein	F52F12.8
WBGene00009959	F2E	-0.624	0.000000	Major sperm protein	F53B6.4
WBGene00018840	F2E	-0.656	0.004197	Major sperm protein	F54H5.3
WBGene00018840	F3E	-0.642	0.024096	Major sperm protein	F54H5.3
WBGene00010254	F2E	-0.608	0.000980	Major sperm protein	F58E6.5
WBGene00019410	F2E	-0.662	0.000001	Major sperm protein	K05F1.9
WBGene00019431	F2E	-0.668	0.000703	Major sperm protein	K06A5.3
WBGene00003462	F2E	-1.067	0.012354	Major Sperm Protein	msp-74
WBGene00003462	F2E	-1.067	0.012354	Major Sperm Protein	msp-74
WBGene00003467	F2E	-0.678	0.000000	Major Sperm Protein	msp-81
WBGene00021271	F2E	-0.792	0.002223	Major sperm protein	spe-47
WBGene00011478	F2E	-0.683	0.007355	Major sperm protein	T05D4.5
WBGene00011911	F2E	-0.729	0.000002	Major sperm protein	T22B3.3
WBGene00020987	F2E	-0.651	0.004730	Major sperm protein	W03D8.5
WBGene00021428	F2E	-0.741	0.002657	Major sperm protein	Y38F2AR.10
WBGene00012979	F2E	-0.672	0.001082	Major sperm protein	Y48B6A.5
WBGene00013165	F2E	-0.725	0.000015	Major sperm protein	Y53F4B.19
WBGene00022708	F2E	-0.630	0.001010	Major sperm protein	ZK354.7
WBGene00003425	F2E	-0.749	0.000000	Major sperm protein 10/36/56/76	msp-10
WBGene00003432	F2E	-0.597	0.000000	Major sperm protein 10/36/56/76	msp-36
WBGene00003449	F2E	-0.648	0.000000	Major sperm protein 10/36/56/76	msp-56
WBGene00003463	F1E	-0.330	0.003176	Major sperm protein 10/36/56/76	msp-76
WBGene00003463	F2E	-0.750	0.000000	Major sperm protein 10/36/56/76	msp-76
WBGene00003470	F2E	-0.637	0.000000	Major sperm protein 152	msp-152
WBGene00003468	F2E	-0.687	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-113
WBGene00003469	F2E	-0.843	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-142
WBGene00003426	F2E	-0.595	0.000001	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-19
WBGene00003429	F2E	-0.683	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-31
WBGene00003435	F2E	-0.644	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-40
WBGene00003438	F2E	-0.696	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-45
WBGene00003443	F2E	-0.598	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-50
WBGene00003443	F3E	-0.305	0.045000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-50
WBGene00003444	F1E	-0.310	0.007461	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-51
WBGene00003444	F2E	-0.609	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-51
WBGene00003446	F2E	-0.583	0.000004	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-53

WBGene00003452	F2E	-0.686	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-59
WBGene00003457	F2E	-0.764	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-64
WBGene00003458	F1E	-0.344	0.012518	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-65
WBGene00003458	F2E	-0.794	0.000000	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-65
WBGene00003458	F3E	-0.411	0.008005	Major sperm protein 19/31/40/45/50/51/53/59/61/65/81/113/142	msp-65
WBGene00003424	F2E	-0.845	0.000000	Major sperm protein 3	msp-3
WBGene00003431	F2E	-0.760	0.000000	Major sperm protein 33	msp-33
WBGene00003434	F1E	-0.306	0.035411	Major sperm protein 38	msp-38
WBGene00003434	F2E	-0.561	0.000012	Major sperm protein 38	msp-38
WBGene00003442	F1E	-0.333	0.010638	Major sperm protein 49	msp-49
WBGene00003442	F2E	-0.609	0.000000	Major sperm protein 49	msp-49
WBGene00003448	F1E	-0.346	0.002951	Major sperm protein 55/57	msp-55
WBGene00003448	F2E	-0.704	0.000000	Major sperm protein 55/57	msp-55
WBGene00003450	F1E	-0.304	0.004733	Major sperm protein 55/57	msp-57
WBGene00003450	F2E	-0.634	0.000000	Major sperm protein 55/57	msp-57
WBGene00003456	F2E	-0.819	0.000035	Major sperm protein 63	msp-63
WBGene00003464	F2E	-0.735	0.000000	Major sperm protein 77/79	msp-77
WBGene00003466	F1E	-0.321	0.009480	Major sperm protein 77/79	msp-79
WBGene00003466	F2E	-0.731	0.000000	Major sperm protein 77/79	msp-79
WBGene00003465	F2E	-0.718	0.000001	Major sperm protein 78	msp-78
WBGene00009680	F2E	-0.956	0.038607	Major Sperm protein Domain containing	msd-1
WBGene00009682	F2E	-0.827	0.000000	Major Sperm protein Domain containing	msd-2
WBGene00016447	F2E	-0.960	0.000000	Major Sperm protein Domain containing	msd-4
WBGene00004964	F2E	-0.664	0.015513	Palmitoyltransferase spe-10	spe-10
WBGene00004965	F2E	-0.574	0.003631	Spermatocyte protein spe-11	spe-11
WBGene00004965	F3E	-0.775	0.000427	Spermatocyte protein spe-11	spe-11
WBGene00004966	F2E	-0.687	0.007365	hypothetical protein	spe-12
WBGene00004969	F2E	-0.504	0.000014	hypothetical protein	spe-15
WBGene00004971	F2E	-0.883	0.002755	Spermatogenesis-defective protein spe-17	spe-17
WBGene00004972	F2E	-0.441	0.036815	Spermatocyte protein spe-26	spe-26
WBGene00007732	F3E	0.334	0.040268	hypothetical protein	spe-44
WBGene00012296	F2E	-0.518	0.006386	hypothetical protein	spe-46
WBGene00021271	F2E	-0.792	0.002223	Major sperm protein	spe-47
WBGene00004960	F2E	-0.445	0.021627	Serine/threonine-protein kinase spe-6	spe-6
WBGene00004962	F2E	-1.014	0.000000	Spermatocyte protein spe-8	spe-8
WBGene00004963	F2E	-0.987	0.002075	Sperm transmembrane protein 9	spe-9
WBGene00006039	F2E	-0.945	0.000000	Sperm-specific class P protein 10	ssp-10
WBGene00006040	F2E	-1.386	0.000910	Sperm-specific class P protein 9/11	ssp-11
WBGene00006044	F2E	-0.871	0.000000	Sperm-specific class P protein 16	ssp-16
WBGene00006047	F0E	-0.626	0.044229	Sperm-specific class P protein 19	ssp-19
WBGene00006047	F2E	-1.217	0.000037	Sperm-specific class P protein 19	ssp-19
WBGene00006048	F2E	-0.541	0.001479	Sperm-specific class P protein 31	ssp-31
WBGene00011134	F2E	-0.836	0.000015	Sperm Specific family, class P	ssp-33
WBGene00013858	F2E	-0.777	0.000001	Sperm-specific class P protein 34	ssp-34
WBGene00010091	F2E	-0.552	0.000122	Sperm Specific family, class P	ssp-35
WBGene00006038	F2E	-1.432	0.000926	Sperm-specific class P protein 9/11	ssp-9
WBGene00006050	F2E	-1.781	0.000009	Sperm-Specific family, class Q	ssq-1
WBGene00006051	F2E	-1.424	0.000051	Sperm-Specific family, class Q	ssq-2
WBGene00006052	F2E	-1.851	0.000217	Sperm-Specific family, class Q	ssq-3
WBGene00006053	F2E	-1.968	0.000091	Sperm-Specific family, class Q	ssq-4

WBGene00006056	F2E	-0.480	0.001892	Sperm-Specific family, class S	sss-1
WBGene00006056	F3E	-0.464	0.011906	Sperm-Specific family, class S	sss-1
WBGene00006058	F2E	-0.564	0.003660	Sperm Specific Transcript	sst-20

Table S2: List of DEGs playing a role in sperm formation, activation and mobility in exposed generations

Generations	TF Name	TF ID	Z-score	Fisher score	KS score
FOE	atf-7	MA1438.1	-3.212	0.017	2.187
FOE	blmp-1	MA0537.1	-4.032	0.175	0.355
FOE	cebp-1	MA1444.1	4.101	2.137	0.014
FOE	ceh-10::ttx-3	MA0263.1	6.055	2.977	0.147
FOE	ceh-22	MA0264.1	-7.777	0.107	0.025
FOE	ceh-28	MA1445.1	2.373	1.595	0.824
FOE	ceh-38	MA1699.1	2.591	1.779	2.155
FOE	ceh-48	MA0921.1	10.643	0	0.616
FOE	ces-2	MA0922.1	3.907	0.956	1.993
FOE	che-1	MA0260.1	-5.055	1.15	1.433
FOE	daf-12	MA0538.1	-2.903	0.179	0.939
FOE	daf-16	MA1446.1	3.597	0.43	0.331
FOE	dpy-27	MA0540.1	1.106	0.747	0.006
FOE	dsc-1	MA0919.1	-3.632	0.001	0.884
FOE	efl-1	MA0541.1	-2.347	0.319	0.672
FOE	elt-2	MA1701.1	14.013	3.65	1.448
FOE	elt-3	MA0542.1	15.013	2.996	2.356
FOE	elt-6	MA1439.1	15.926	0.349	0.659
FOE	eor-1	MA0543.1	-7.471	0.069	0.007
FOE	fkx-2	MA0920.1	5.523	0	0.305
FOE	fkx-9	MA1440.1	10.431	0	0.755
FOE	fos-1	MA1448.1	2.541	0.123	0.398
FOE	hlh-1	MA0545.1	1.958	1.174	0.296
FOE	hlh-30	MA1449.1	1.857	0.515	0.41
FOE	lim-4	MA0923.1	-5.393	0.699	0.806
FOE	lim-7	MA1441.1	4.664	0	0.192
FOE	lin-14	MA0261.1	6.572	0	1.262
FOE	lin-54	MA1450.1	2.06	3.384	3.301
FOE	mab-3	MA0262.1	2.687	2.176	0.685
FOE	mab-5	MA1442.1	-1.608	0.68	1.775
FOE	nhr-6	MA1451.1	5.031	0.68	2.351
FOE	pal-1	MA0924.1	11.671	0.874	2.477
FOE	pha-4	MA0546.1	7.916	0.874	0.931
FOE	pqm-1	MA1703.1	24.725	7.237	1.829
FOE	skn-1	MA0547.1	6.74	1.702	2.763
FOE	sma-4	MA0925.1	2.053	0.614	0.241
FOE	snpc-4	MA0544.1	-2.731	0.349	1.263
FOE	unc-30	MA1443.1	-0.244	0.336	0.145
FOE	unc-62	MA0918.1	1.21	1.361	1.031
FOE	unc-86	MA0926.1	-1.874	1.904	0.398
FOE	vab-7	MA0927.1	-3.924	0.131	0.013
FOE	zfh-2	MA0928.1	-5.344	0.001	0.223
FOE	zip-8	MA1704.1	-1.03	0.208	0.436
F1E	atf-7	MA1438.1	5.745	0.126	1.624
F1E	blmp-1	MA0537.1	-9.456	0.222	0.963
F1E	cebp-1	MA1444.1	9.651	3.291	0.038
F1E	ceh-10::ttx-3	MA0263.1	3.594	1.994	0.139
F1E	ceh-22	MA0264.1	-0.22	1.856	1.468
F1E	ceh-28	MA1445.1	0.609	1.55	2.065

F1E	ceh-38	MA1699.1	-6.657	0.263	2.716
F1E	ceh-48	MA0921.1	10.038	0	0.221
F1E	ces-2	MA0922.1	3.462	0.57	2.406
F1E	che-1	MA0260.1	-4.848	1.092	1.492
F1E	daf-12	MA0538.1	-1.189	0.178	0.851
F1E	daf-16	MA1446.1	3.705	1.616	0.679
F1E	dpy-27	MA0540.1	0.449	0.633	0.499
F1E	dsc-1	MA0919.1	-7.486	0.032	0.752
F1E	efl-1	MA0541.1	-5.23	0.576	1.388
F1E	elt-2	MA1701.1	23.839	12.257	3.595
F1E	elt-3	MA0542.1	23.703	6.656	1.29
F1E	elt-6	MA1439.1	28.669	0.443	3.299
F1E	eor-1	MA0543.1	-4.457	0.272	0.293
F1E	fkh-2	MA0920.1	-2.734	0	0.85
F1E	fkh-9	MA1440.1	-0.499	0	1.429
F1E	fos-1	MA1448.1	5.936	0.874	3.897
F1E	hlh-1	MA0545.1	-1.771	0.587	2.31
F1E	hlh-30	MA1449.1	4.911	1.308	0.627
F1E	lim-4	MA0923.1	-3.264	0.301	3.049
F1E	lim-7	MA1441.1	2.163	0	3.926
F1E	lin-14	MA0261.1	4.121	0	0.251
F1E	lin-54	MA1450.1	0.549	0.577	2.647
F1E	mab-3	MA0262.1	-0.404	0.402	0.094
F1E	mab-5	MA1442.1	-4.393	0.101	1.636
F1E	nhr-6	MA1451.1	0.506	0.97	2.03
F1E	pal-1	MA0924.1	2.892	1.109	2.437
F1E	pha-4	MA0546.1	0.597	0.157	0.744
F1E	pqm-1	MA1703.1	34.753	5.69	2.576
F1E	skn-1	MA0547.1	-0.544	1.878	5.036
F1E	sma-4	MA0925.1	5.564	4.456	0.825
F1E	snpc-4	MA0544.1	-9.752	0.026	0.525
F1E	unc-30	MA1443.1	-2.4	0.156	0.869
F1E	unc-62	MA0918.1	-0.197	1.494	0.706
F1E	unc-86	MA0926.1	-1.371	0.612	2.851
F1E	vab-7	MA0927.1	-4.083	0.017	0.522
F1E	zfh-2	MA0928.1	-7.601	0.006	0.848
F1E	zip-8	MA1704.1	11.541	3.573	0.084
F2E	atf-7	MA1438.1	4.811	0.696	1.626
F2E	blmp-1	MA0537.1	-8.782	0.261	1.649
F2E	cebp-1	MA1444.1	-3.557	0.418	3.029
F2E	ceh-10::ttx-3	MA0263.1	0.764	0.985	0.84
F2E	ceh-22	MA0264.1	0.003	0.771	0.387
F2E	ceh-28	MA1445.1	1.33	3.371	0.886
F2E	ceh-38	MA1699.1	4.582	2.054	1.05
F2E	ceh-48	MA0921.1	7.201	0	0.087
F2E	ces-2	MA0922.1	7.445	3.758	0.702
F2E	che-1	MA0260.1	1.069	0.969	0.933
F2E	daf-12	MA0538.1	-1.48	0.45	0.207
F2E	daf-16	MA1446.1	2.068	0.638	2.578
F2E	dpy-27	MA0540.1	-4.415	0.106	0.026

F2E	dsc-1	MA0919.1	-1.504	0.282	2.428
F2E	efl-1	MA0541.1	-5.683	0.434	3.616
F2E	elt-2	MA1701.1	12.548	5.254	0.103
F2E	elt-3	MA0542.1	8.852	2.566	1.423
F2E	elt-6	MA1439.1	19.755	0.522	0.91
F2E	eor-1	MA0543.1	-8.617	0.084	1.295
F2E	fkx-2	MA0920.1	-0.774	0	1.795
F2E	fkx-9	MA1440.1	-10.238	0	1.909
F2E	fos-1	MA1448.1	-3.028	0.177	0.524
F2E	hlh-1	MA0545.1	-1.652	0.851	1.53
F2E	hlh-30	MA1449.1	4.944	2.361	1.232
F2E	lim-4	MA0923.1	2.951	1.045	0.469
F2E	lim-7	MA1441.1	0.303	0	1.073
F2E	lin-14	MA0261.1	4.694	0	2.239
F2E	lin-54	MA1450.1	-3.956	0.54	0.731
F2E	mab-3	MA0262.1	-3.859	0.367	0.001
F2E	mab-5	MA1442.1	-2.122	0.341	3.147
F2E	nhx-6	MA1451.1	0.502	0.655	0.177
F2E	pal-1	MA0924.1	2.182	1.307	2.331
F2E	pha-4	MA0546.1	1.146	0.54	0.832
F2E	pqm-1	MA1703.1	5.876	1.597	1.672
F2E	skn-1	MA0547.1	-6.039	0.328	0.504
F2E	sma-4	MA0925.1	2	0.657	0.763
F2E	snpc-4	MA0544.1	-12.007	0.009	0.086
F2E	unc-30	MA1443.1	4.152	1.052	0.087
F2E	unc-62	MA0918.1	-2.595	0.718	3.205
F2E	unc-86	MA0926.1	-1.778	0.314	0.835
F2E	vab-7	MA0927.1	1.952	0.784	1.353
F2E	zfh-2	MA0928.1	4.046	0.271	1.065
F2E	zip-8	MA1704.1	-1.72	0.713	0.265
F3E	atf-7	MA1438.1	6.375	0.402	0.028
F3E	blmp-1	MA0537.1	-4.157	0.71	0.491
F3E	cebp-1	MA1444.1	5.259	3.564	0.529
F3E	ceh-10::ttx-3	MA0263.1	4.404	2.072	1.142
F3E	ceh-22	MA0264.1	-3.518	0.586	1.381
F3E	ceh-28	MA1445.1	2.299	1.648	3.129
F3E	ceh-38	MA1699.1	-9.862	0.317	2.352
F3E	ceh-48	MA0921.1	11.225	0	2.093
F3E	ces-2	MA0922.1	6.965	2.373	1.107
F3E	che-1	MA0260.1	-9.976	0.682	0.901
F3E	daf-12	MA0538.1	6.041	1.201	0.594
F3E	daf-16	MA1446.1	21.854	3.461	0.684
F3E	dpy-27	MA0540.1	5.062	1.427	1.182
F3E	dsc-1	MA0919.1	-7.199	0.005	0.681
F3E	efl-1	MA0541.1	0.872	0.996	1.333
F3E	elt-2	MA1701.1	25.137	5.756	1.586
F3E	elt-3	MA0542.1	31.434	5.641	2.55
F3E	elt-6	MA1439.1	38.019	1.421	2.943
F3E	eor-1	MA0543.1	1.898	0.277	0.104
F3E	fkx-2	MA0920.1	13.678	0	3.379

F3E	fkf-9	MA1440.1	10.759	0	2.27
F3E	fos-1	MA1448.1	1.544	0.513	0.505
F3E	hlh-1	MA0545.1	-8.362	0.536	0.058
F3E	hlh-30	MA1449.1	13.92	5.133	0.621
F3E	lim-4	MA0923.1	-1.002	0.731	2.971
F3E	lim-7	MA1441.1	3.132	0	3.808
F3E	lin-14	MA0261.1	3.45	0	1.404
F3E	lin-54	MA1450.1	-3.703	2.51	1.177
F3E	mab-3	MA0262.1	0.099	1.11	0.012
F3E	mab-5	MA1442.1	0.038	0.981	5.665
F3E	nhr-6	MA1451.1	6.1	1.644	4.269
F3E	pal-1	MA0924.1	11.183	0.348	3.944
F3E	pha-4	MA0546.1	10.693	0.507	2.565
F3E	pqm-1	MA1703.1	32.672	6.475	2.215
F3E	skn-1	MA0547.1	3.538	2.065	0.552
F3E	sma-4	MA0925.1	7.721	2.884	0.161
F3E	snpc-4	MA0544.1	-8.582	0.197	0.261
F3E	unc-30	MA1443.1	0.883	1.957	0.75
F3E	unc-62	MA0918.1	-2.924	1.326	1.669
F3E	unc-86	MA0926.1	-11.36	0.239	0.011
F3E	vab-7	MA0927.1	1.527	0.446	3.077
F3E	zfh-2	MA0928.1	-4.302	0.023	1.35
F3E	zip-8	MA1704.1	9.06	3.483	0.39

Table S3: List of transcription factor enriched after chronic exposure to ionizing radiation

III.3 Principales conclusions

La première question de recherche consistait à déterminer les effets délétères et les mécanismes d'action sous-jacents d'une exposition chronique aux rayonnements gamma sur plusieurs générations, à un débit de dose de $50\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, pour une dose cumulée de $3,3\text{Gy}$. Les effets initiateurs, à savoir les dommages à l'ADN et l'augmentation du stress oxydant, ainsi que les stades de vie les plus sensibles ont été déterminés en laboratoire (Maremonti et al., 2019). Dans cet article, nous mesurons l'impact sur la reproduction de nématodes soumis à l'irradiation du stade embryon au stade jeune adulte L4. Nous démontrons une diminution de ce paramètre de 23% sur la première génération (F0) puis une réduction supérieure à 40% sur les 3 générations suivantes (F1 à F3). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les générations F1 à F3 sont issues d'organismes irradiés, notamment pendant la période de la gamétogénèse, à la différence de la génération F0. Ceci est également corroboré par le fait que les embryons issus d'une irradiation parentale présentent des dommages à l'ADN (Figure 16.a.b). Ces données sont en accord avec les données de la littérature indiquant que la reproduction est l'un des paramètres les plus radiosensibles (Adam-Guillermin et al., 2018). Ni le succès d'éclosion, la mortalité et la morbidité des embryons, ni la durée de vie ne sont affectés par l'irradiation chronique.

En l'absence de phénotypes sur les embryons, nous avons investigué l'impact des gamètes et de la gamétogénèse. Nous démontrons que le nombre de spermatozoïdes, facteur limitant de la reproduction chez *C. elegans*, est diminué de 42 à 50% sur l'ensemble des générations. Cette expérimentation indique que les spermatozoïdes de *C. elegans* sont particulièrement sensibles à l'irradiation, comme démontré précédemment sur d'autres espèces telles que les oiseaux, les poissons, les rongeurs ou les crustacés (Fuller et al., 2019). La problématique principale chez *C. elegans* est que les spermatozoïdes ne peuvent pas entrer en apoptose en réponse à un stress génotoxique, ce qui peut compromettre la qualité du matériel génétique délivré aux générations suivantes.

Par la suite, nous réalisons une analyse du transcriptome par RNA-Seq, au stade L4 jeune adulte, permettant de mesurer les conséquences d'une exposition chronique, du stade embryon au stade L4 jeune adulte, sur l'expression génique. Premièrement, le nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) augmente entre la F0 et la F1, respectivement 272 et 351 DEG, en comparaison avec la F2 et la F3, respectivement 1357 et 1465 DEG. L'enrichissement des fonctions biologiques met en lumière une augmentation des gènes impliqués dans la réponse au stress, les voies de signalisation biologiques et le métabolisme. Ces données démontrent que l'irradiation chronique entraîne un effet cumulatif sur le transcriptome et souligne l'importance de réaliser des études sur plusieurs générations. Cette analyse met également en lumière l'intérêt de réaliser ce type d'expérience sur plus de générations, pour analyser si le phénotype est modulé dans un sens ou dans l'autre au fil des générations, signe d'une aggravation ou d'une acclimatation.

Deuxièmement, l'enrichissement de phénotypes sur les quatre générations démontre le rôle de ces gènes dans les processus liés à la reproduction comme la fertilité, la gamétogénèse, la morphologie de la gonade et le développement de la lignée germinale. Ces résultats nous ont aiguillés sur l'analyse de deux paramètres au niveau cellulaire : l'analyse du nombre de cellules mitotiques dans la partie distale de la gonade et la mesure du nombre de cellules en arrêt de cycle cellulaire. Nous démontrons ainsi que la lignée germinale, responsable de la création des gamètes est impactée par l'irradiation. La répression de 70 gènes impliqués dans la spermatogénèse et la spermiogénèse nous ont

également conduits à analyser la qualité des spermatozoïdes à travers un test d'activation des spermatides en spermatozoïdes. Nous démontrons à travers ce test que la qualité, en plus de la quantité, des spermatozoïdes est diminuée en réponse à une irradiation chronique.

Troisièmement, 72 DEG sont communs à 3 générations exposées et 23 DEG à l'ensemble des générations, principalement impliqués dans la reproduction et la réponse au stress. Cette donnée suggère qu'une partie de la réponse transcriptionnelle à l'irradiation est maintenue entre les générations. L'expression du marqueur de l'apoptose germinale induite par un stress génotoxique *egl-1*, commun à toutes les générations, est validée par qRT-PCR.

Enfin, nous avons analysé les séquences en amont et en aval des DEGs pour identifier des sites de liaisons des facteurs de transcription. Dix facteurs de transcription sont enrichis sur au moins une génération dont 9 sur la dernière génération (F3). Cette dernière information corrobore un impact cumulatif sur le transcriptome. Deux facteurs impliqués dans la réponse au stress, PQM-1 et HLH-30, agissent en synergie avec le facteur de transcription DAF-16, significativement enrichi sur la F3, mais à la limite de la significativité sur la F0 et la F1. L'analyse de deux autres jeux de données transcriptomiques réalisés dans le cadre de ce projet et d'une analyse protéomique réalisée au sein de notre laboratoire confirment qu'entre 12,5% et 50,9% des DEGs ou des protéines modulées en condition d'irradiation chronique sont des cibles du facteur de transcription DAF-16/FOXO. Nous confirmons cette hypothèse avec l'utilisation d'une souche DAF-16:GFP, démontrant que la présence de DAF-16 dans le noyau augmente de 15 à 47% en réponse à l'irradiation.

Dans le cadre de ce projet, cet article permet de faire le lien entre les événements initiateurs des effets délétères et les conséquences phénotypiques. L'augmentation de dommages à l'ADN et du stress oxydatif affecte la lignée germinale, et plus particulièrement les cellules mitotiques et les spermatides, entraînant une diminution du nombre de descendants. La mise en place des systèmes de défenses de l'organisme, notamment via le facteur de transcription DAF-16, et l'augmentation du nombre de DEG sur les deux dernières générations suggèrent que l'organisme augmente ses capacités de défenses pour répondre à l'accumulation des conséquences de l'irradiation. Outre les questionnements sur les générations suivantes, la présence de dommages à l'ADN dans les embryons de la première génération non exposée, la modulation de gènes impliqués dans les voies biologiques de miRNAs et des modifications post-traductionnelles des histones en réponse à l'irradiation nous laisse penser que les générations non exposées peuvent être affectées et transmettre des informations au fil des générations en réponse à l'irradiation parentale. À travers cet article, nous confirmons également l'intérêt de notre modèle biologique, associés à de nombreux outils de biologie moléculaire, et de l'analyse sans a priori du transcriptome, associés à des outils informatiques, permettant de décrypter et de valider des modes d'action à différentes échelles biologiques.

L'exposition chronique aux rayonnements gamma induit une diminution de la reproduction via de multiples impacts délétères sur la lignée germinale. Ce phénotype s'aggrave entre la première et la deuxième génération puis se stabilise sur la troisième et quatrième génération. La réponse transcriptomique montre une activation des mécanismes de réponse au stress, avec une augmentation drastique du nombre de gènes entre la deuxième et la troisième génération.

Quatrième partie

IV. Implication des microARNs dans l'héritage transgénérationnel des effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez *C. elegans*

Table des matières

IV.1 Objectifs de l'article.....	124
IV.2 MiRNAs involvement in the transgenerational inheritance of ionizing radiation effects in <i>C. elegans</i>	125
IV.3 Principales conclusions	158

IV.1 Objectifs de l'article

Dans le but de contribuer à l'amélioration de l'évaluation des risques, la compréhension des mécanismes subcellulaires des effets des RI est nécessaire. Bien que les effets de RI sur l'ADN à de fortes doses soient connus, les effets de faibles doses ainsi que l'héritabilité des caractères en réponse à un stress radiobiologique restent peu étudiés. L'implication des mécanismes épigénétiques dans l'héritabilité des modifications de l'environnement, au fil des mitoses ou des méioses, est un fait admis par la communauté scientifique. L'objectif de cet article est d'évaluer la contribution des microARNs, l'un des marqueurs de l'épigénétique, dans la réponse au stress radiologique. Afin d'aborder cette problématique, une analyse de 260 microARNs est réalisée à l'aide de l'une des techniques les plus robustes et spécifiques, basée sur la technologie TaqMan, les TaqMan Low Density Array (TLDA). L'analyse porte sur 4 générations exposées et 3 générations placées en environnement contrôle après irradiation parentale. L'analyse de la cohorte exposée permet de faire le lien avec notre premier article sur la modulation du transcriptome au fil des générations et les fonctions biologiques impactées par l'irradiation. La cohorte recovery permet d'analyser la transmission d'informations et l'héritage transgénérationnel d'une exposition aux RI. Le lien entre ces deux cohortes est également étudié.

IV.2 MiRNAs involvement in the transgenerational inheritance of ionizing radiation effects in *C. elegans*

L'article sera prochainement soumis à Journal of International Radiology. Les données supplémentaires sont insérées à la suite de l'article.

Liste des données supplémentaires incluses dans l'article :

Figure S1: Clustering of microRNAs with pearson's correlation, average linkage and assay centric methods.

Figure S2: Principal component analysis using all miRNAs from control (T), exposed (E) and recovery (R) conditions in F0, F2 and F3 generations.

Figure S3: Tree map of top non redundant enriched GO-term biological processes of the targeted mRNAs from specific recovery (green), exposed (red) and overlap miRNAs (orange).

Table S1: List of differentially expressed miRNAs.

Table S2: A summary of master regulators targeted by microRNAs in network analysis (Figure 4.a).

Table S3: Overexpressed miRNAs correlated with the measured expression of their validated target by RNA-Seq.

MiRNAs involvement in the transgenerational inheritance of ionizing radiation effects in *C. elegans*

Guédon R^a, Tarlet G^b, Maramonti E^c, Galas S^d, Anders Brede D^c, Souidi M^b, Milliat F^b, Lecomte-Pradines C^a

a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SRTE, Laboratoire d'ECOTOxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France

b Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative Medicine (SERAMED), Laboratory of Medical Radiobiology (LRMed), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France.

c Centre for Environmental Radioactivity (CERAD), Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management (MINA), Norwegian University of Life Sciences (NMBU), 1432 Ås, Norway

d Institut des biomolécules Max Mousseron (IBMM), University of Montpellier, Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), ENSCM, Montpellier, France

Abstract

Increased evidence has highlighted the critical role of epigenetic mechanisms in the response to radiological stress and the impact on subsequent generations. In the current study, we investigated the impact of chronic exposure to ionizing radiation on *C. elegans* microRNAs as well as its implication for the regulation of biological functions on four continuously exposed generations (F0, F1, F2 and F3) and transgenerational inheritance on three generations placed in recovery after parental exposure (F1R, F2R and F3R). Our analysis demonstrates that continuous radiation over 4 generations affected microRNAs involved in the regulation of metabolism, fertility and biological signalling pathways such as DAF-16/FOXO and MAPK. Thirteen microRNAs including 4 members of the *mir-35* family, 1 member of the *mir-58* family and *mir-71* were involved in a regulatory network of biological functions modulated across generations. The present study also showed that the F3R recovery generations present a different microRNA profile from the control and exposed conditions, 3 generations after parental irradiation. Targeted analysis showed that *mir-36*, *mir-436* and *mir-71* were consistently overexpressed from F0 to F3R and thus constitute candidates for transgenerational inheritance of radiation effects. Furthermore, transcriptomic analysis on the F3R revealed a repression of twelve mRNAs targeted by seventeen overexpressed miRNAs. The specific biological functions modulated by miRNAs in the F3R recovery generation included ATP biosynthesis, nucleotide metabolism and tyrosine kinase regulation. The present results provide new knowledge on the miRNAs involvement in the multi-transgenerational effects of chronic exposure to ionizing radiation in *C. elegans*.

1. Introduction

The effects of chronic exposure to pollutants constitute a major public health problem. According to the World Health Organization, environmental pollution causes premature death of several million people each year (WHO., 2016). During the last decade, accumulating evidence show that effect of pollutants can be passed on thus causing deteriorating adverse effects to populations (Xin et al., 2015; Kubsad et al., 2019; Liberman et al., 2019). In addition, the window of exposure must be taken into account because it has been reported that exposure to a pollutant during the early

stages of life can lead to consequences and pathologies later in life, or even affect subsequent generations (Dupont et al., 2019; Maremonti et al., 2019; Kim et al., 2020).

Among the environmental pollutants, the expanded use of ionizing radiations for medical, military and industrial applications, as well as nuclear reactor accidents, have led to a general increase of exposure to ionizing radiation. In addition, the consequences on health of chronic exposure to ionizing radiation remain rudimentary and the long-term effects largely unknown. There is a great need to improve understanding of the effects of chronic exposure to low doses or multigenerational exposure to ionizing radiation (Hu et al., 2010; UNSCEAR 2012; Kreuzer et al., 2017). Studies measuring the consequences of chronic exposure to a pollutant are mainly carried out over a single generation whereas some studies highlight a non-linear or adaptive response induced by parental exposure in non-irradiated offspring (Lorimore et al., 2003; Adam-Guillermin et al., 2018). The few studies on multi and transgenerational effects show that sensitivity can evolve over generations and that the effects can be transmitted to unexposed generations, highlighting the contribution of epigenetic mechanisms (Kamstra et al., 2018; 2019; Belli et al., 2020; Martin et al., 2021).

Depending on the dose and dose rate, exposure to ionizing radiation can affect cells by disrupting atomic structure or generating free radicals from water radiolysis, causing damage to macromolecules such as nucleic acids, lipids or proteins (Hall et al., 2020). When the harmful effects overwhelm the cellular defences, changes in cellular metabolism can be transmitted to the daughter cell, as well as to non-targeted bystander cells through intercellular communication, or to the offspring if the gametes are affected (Lorimore et al., 2003; Azzam et al., 2012). Transmission of such radiological stress may thus have profound consequences for subsequent generations.

Transgenerational inheritance is mediated by changes in the DNA nucleotide sequence as well as by epigenetic mechanisms such as DNA methylation, non-coding RNAs and histone modifications, which can be transmitted through gametes (Adam-Guillermin et al., 2018). In this context, we hypothesized that miRNAs have a significant role in the response to chronic irradiation and induce effects over several generations, exposed or unexposed after parental irradiation. miRNAs are endogenous small non-coding RNAs (20-25 nucleotides), highly conserved, involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, by inhibiting or inducing degradation of specific target mRNA (Lim et al., 2003). They are implied in many essential functions such as cell development, metabolism, behaviour, lifespan, and cell death. Moreover, miRNAs are major players in stress response, and in restoration or reprogramming of the transcriptome in processes such as DNA damage response, cellular metabolism and oxidative stress (Leung et al., 2010; Kato et al., 2016; Yang et al., 2016; Watson et al., 2018). In addition, miRNAs are key regulators of spermatogenesis, fertilization, embryonic development and can confer an inheritable survival advantage to deal with environmental disturbance or, if perturbed, the ability to respond to stress and increase the risk of diseases (Marczylo et al., 2012; Nixon et al., 2015; Rodgers et al., 2015; Klengel et al., 2016). The dysfunction or aberrant production of miRNAs can induce a modification of biological processes, cell homeostasis and is involved in a wide range of pathologies, including cancer (Ha et al., 2011). Even in humans, paternal stress history (stress, food, tobacco, exercise) can induce a change in the profile of miRNAs in sperm, and ultimately affect the development of the foetus and the endometrial environment (Dupont et al., 2019).

Several studies have investigated the role of miRNAs in response to high doses of ionizing radiation, demonstrating their involvement in cell cycle arrest and cell death, while the miRNAs profile induced by low dose of ionizing radiation has scarcely been studied (Metheetraitur et al., 2013). Nevertheless, a recent study has shown the potential use of miRNAs as biomarkers for chronic low-dose irradiation (Duale et al., 2020). A study on the first 139 referenced miRNAs, showed that half are conserved between *C. elegans*, *D. melanogaster* and *H. sapiens* (Ibanez-Ventoso, et al 2008). These fundamental findings are consistent with research showing that homologous miRNAs respond in the same way to irradiation between *C. elegans* and *H. sapiens* (Metheetraitur et al., 2017). In a previous study, we showed that chronic irradiation over four continuously exposed generations, from the embryonic stage to the young adult stage, leads to a decrease in fertility, number of mitotic germ cells as well as spermatids quantity and quality (Guédon et al., 2021). Furthermore, the transcriptomic response revealed modulation of biological functions related to metabolism, stress response, reproduction and signalling pathway such as DAF-16/FOXO and pri-miRNAs transcription (Guédon et al., 2021).

Understanding the underlying mechanism of multi- transgenerational effect of chronic exposure is essential to improve the robustness of radiation protection. In the present study, we investigated the contribution of miRNAs in: 1) the multigenerational response, by means of canonical pathways and gene networks, to identify radiation induced alterations of biological functions in four exposed generations; 2) the transgenerational response through the impact of miRNAs over 3 unexposed generations after parental exposure.

2. Material and methods

2.1 Chronic exposure to ionizing radiation and sampling

Chronic exposure to ionizing radiation was based on our previously published method (Guédon et al., 2021). Briefly, N2 (wild type) strain was cultured by standard methods at 19°C, 80% humidity, on NGM petri dishes seeded with *E. coli* OP50. Embryo's synchronisation was obtained by bleaching method. Four consecutive generations (F0-F3) of nematodes were continuously exposed for 65 hours, from synchronized embryos to L4 young adult stage to monitor the multigenerational effect. In parallel, to analyse transgenerational effects after parental exposure of the first generation (F0), 3 subsequent generations (F1-F3) were placed in control environment without irradiation. Seven replicates with 5000 worms per replicate were used for each condition and generation. Chronic gamma irradiation to 50 mGy.h⁻¹ was performed in incubators under controlled conditions using MICADO irradiation facility (IRSN, Cadarache, France). Data loggers and radio-photo luminescent dosimeters were used to monitor humidity, temperature and dose rate received from the Cesium-137 source during irradiation. Samples for miRNAs analysis were collected after 65h of continuous irradiation, to cover the entire life cycle of *C. elegans*.

2.2 miRNAs expression analysis

From the design of a Taq Man Low Density Array (TLDA) (Fig 1a), the number of miRNAs and replicas desired, we made the methodological choice to analyse 3 generations and 3 conditions (control, exposed and recovery). F0 was chosen because it represents the initial control, allowing the assessment of stress response on the first

generation. The F3 was chosen to measure a transgenerational effect on the recovery cohort and to assess the evolution of the stress response on the exposed cohort. The F2 generation was analysed to assess whether miRNAs, subjected to a maternal effect from parental exposure, were derepressed, or on the contrary, transgenerationally transmitted from F2 to F3.

Worms (1000 per sample) were washed 3 times with M9 buffer and homogenized on ice with a FastPrep® (MP Biomedicals). At the end of the incubation, the tubes were centrifuged and the beads removed. miRNAs were extracted following the procedure of the mirVana miRNA isolation Kit (Ambion by life technologies). Total RNA and small RNA integrity, quality and concentration were assessed with RNA 6000 Nano and Small RNA Chips (Bioanalyzer 2011, Agilent).

Reverse transcription (RT) was carried out using 100 ng of RNA template with the Taqman microRNA reverse transcription kit according to the manufacturers protocol ("protocol for running Custom RT and Preamplification Pools on Custom Taqman Array MicroRNA Cards" Life technology). The preamplification was made from the TaqMan PreAmp Master Mix and a Custom PreAmp Primer Pool. Preamplification and RT were performed on a GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler. Control qRT-PCR were performed to validate RT and preamplification with a Taqman Small RNA Assay on U18 and cel-mir-47 with QuantStudio 12K Flex (Life technologies).

TLDA plates for selected probes were prepared prior qPCR analysis. They were stored at 4°C and equilibrated at room temperature for 30 minutes before loading the mix. The PCR mix was prepared according to the "Protocol for Running Custom RT and Preamplification Pools on Custom Taqman® Array MicroRNA Cards" (Life Technologies). Briefly, 105 µL of the PCR mix was introduced into each port of the TLDA plate. The plate was centrifuged twice for 1 minute at 2400 rpm, sealed before launch of the qPCR in the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies). The data was pre-processed using the Expression Suite and DataAssist softwares (Life technologies). Expression Suite Version 1.0.4 software was used to normalize data by setting detection threshold and baseline. DataAssist V.3.01 software was used to analyse data by clustering tests and exclude outliers among replicates with a refined Grubbs' outlier test, prior normalization, and statistical tests to identify differentially expressed miRNAs. For statistical analysis a maximum allowable CT value was set at 38, Benjamini-Hochberg False Discovery Rate was used as adjusted p-value, and a Global Normalization Method was adopted. miRNAs with |fold change| > 1.2 and FDR < 0.05 were considered significant.

2.3 Network and pathway analysis

In order to analyse the biological functions impacted by chronic irradiation, a network analysis was performed using the experimentally validated miRNAs-mRNAs interactions mirTarbase (V7.0). Network interactions were visualized with mirnet.ca, before target mRNAs were analysed for biological functions by GOTERMs and phenotype enrichment. For the comparison of the biological functions of the exposed generations, we used WormCat (Holdorf et al., 2020) for two reasons. First, this new algorithm and associated database enables comparison and visualization of large datasets. Secondly, it takes into account the phenotypes associated with mRNAs as well as physiological, molecular and cellular functions. Biological functions with P-values from Fisher's exact test < 0.05 were considered significantly enriched. Phenotype enrichment terms were retrieved from WormBase Phenotype Ontology and enrichment analysis was performed using modPhEA. Phenotypes with a (Benjamini-

Hochberg False Discovery Rate) $FDR < 0.05$ were considered significantly enriched. For the F3 Recovery cohort, biological functions were analysed using the R package topGO. Enriched functions with p-values from Fisher's exact test < 0.05 were considered significant. KEGG pathways were analysed using DIANA mirPath v.3 to identify the regulatory role as well as the canonical controlled pathways regulated by miRNAs, based on in silico and experimental data.

3. Results

3.1 Investigating the miRNAs involvement in the multigenerational and transgenerational response of chronic exposure to ionizing radiation

As part of our continued effort to study the effects of long-term chronic irradiation, 260 microRNAs were analysed after chronic exposure to ionizing radiation over three generations (F0, F2 and F3) and three conditions (control, exposed and recovery) (Figure 1.a). To obtain robust results, we analysed seven biological replicates per conditions using a high specificity and sensitivity TaqMan Low Density Array (TLDA). Correlation analysis showed that all replicates within each treatment were positively correlated ($R_2 > 0.98$) (Figure S1). Hierarchical clustering using Pearson's correlation to distance measure and average linkage clustering method revealed that irradiation modified microRNAs expression in all generations and conditions (Figure S1.a). As shown in Figure 1.b, a total of 145 differentially expressed microRNAs (DEmir) were found significant in response to chronic irradiation. Another 70 DEmir were found significant in one condition only, while 75 DEmir were found significant in at least 2 conditions (Table S1). In the F0 and F3 exposed populations, we identified forty-five DEmir, while there were 67 DEmir in F2 (Figure 1.b). 59 and 55 microRNAs were differentially expressed in F2 and F3 recovery. The results thus show the involvement of miRNAs in multigenerational and transgenerational response to chronic ionizing radiation exposure.

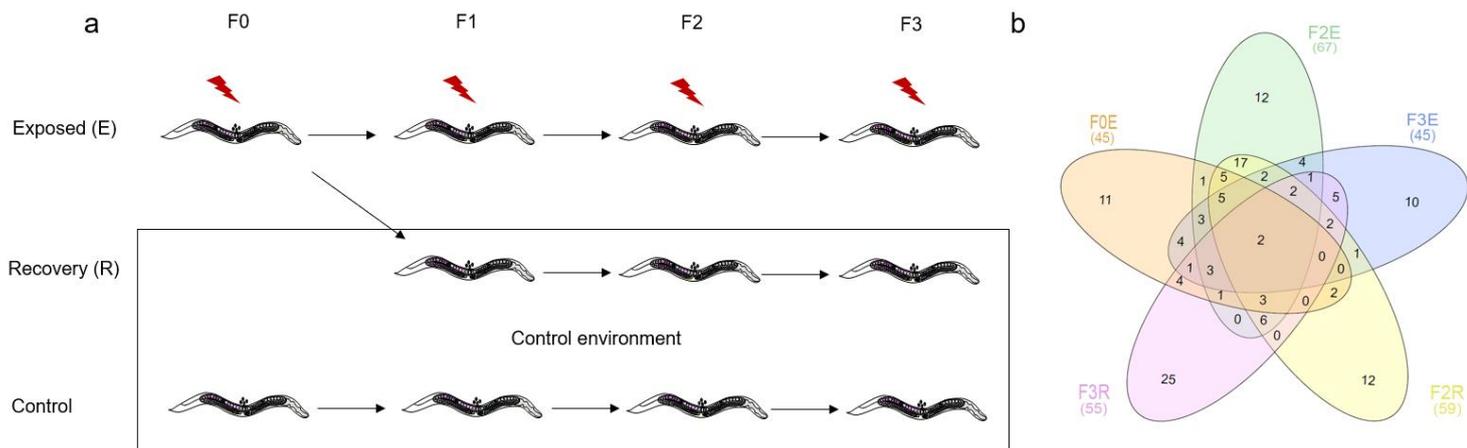


Figure.1. a) Experimental design of chronic exposure to ionizing radiation performed in the current study. The red lightning indicates exposure to 50mGy.h⁻¹ from embryos to L4 young adult stage (65 hours). b) Venn diagram of differentially expressed miRNAs (7 replicates, $FDR < 0.05$, $FC > 1.2$) in the F0, F2 and F3 generations, exposed (E) or placed in environment control after parental exposure (R). The total numbers of significantly regulated miRNAs are indicated in brackets.

3.1.1 Continuous exposure to ionizing radiation induces persistent multigenerational effects on microRNAs expression.

In order to identify the biological functions regulated by the miRNAs in response to chronic irradiation, mirTarBase was used to retrieve experimentally validated target mRNAs. In F0, 27 miRNAs showed validated interactions with 273 mRNAs, whereas 34 miRNAs showed interaction with 302 mRNAs in F2 and 23 miRNAs with 226 mRNAs in F3.

-Biological functions: A significant proportion of the DE miR target genes were involved in metabolism (Figure 2.a). The mitochondrial metabolism and consequently energy production, was modulated over all generations. The metabolism of amino acids, lipids and nucleotides was significantly enriched over F0 and F2 generations. Other metabolic processes such as amine metabolic process specifically modulated in F3, were driven by *mig-38*, C02D5.2, C09D4.4, and C05C10.3, which are orthologues of human OXCT1, NUS1 and FAM135, respectively. Trafficking and transmembrane transport were also biological functions affected by chronic irradiation in all generations, indicating a miRNAs-dependent regulation of macromolecules distribution via transmembrane trafficking. In addition, these processes could be linked to exosome vesicle which can be transport miRNAs to adjacent cells, alleged to transmit non targeted bystander signals (Xu et al., 2015). The mRNAs functions, binding and transcription were modulated in all generations through regulation of target mRNAs *gld-1*, *vig-1*, *slrp-1*, *pno-1*, *rmb-26*, *tiar-1*, *akap-1*, *hrpk-1* and *fust-1*. The genes linked to general development and to apoptosis were modulated in F0 and F2 generations, as well as transcription through chromatin modification through *swn-7*, *bet-2*, *jhdm-1*, *rcor-1*, *let-526* and *bet-2*. Signalling pathways were also differentially regulated in all generations and included Glycosaminoglycan (GAGs), Calcium, MAPK and FOXO signalling pathway (Figure 2a.c).

-Phenotype enrichment: Next, we identified significantly enriched phenotypes shared by multiple generations. In line with the reprotoxic effects observed in our previous study (Guédon et al 2021), the phenotype related to sterility (p-value<3.10⁻²) was significantly enriched in all exposed generations (Figure 2.b). Phenotypes related to fertility reduced (p-value<4.10⁻²), reproductive system physiology (p-value<5.10⁻²), organism development (p-value<1.10⁻²) and organ system physiology (p-value<1.10⁻²) were significantly enriched in F0 and F2 exposed generations. Potential impact onto the germ cell compartment was also shown by nuclei number and oocytes lack nucleus terms, which were significantly enriched in F2 and F3 generations (p-value<2.10⁻²).

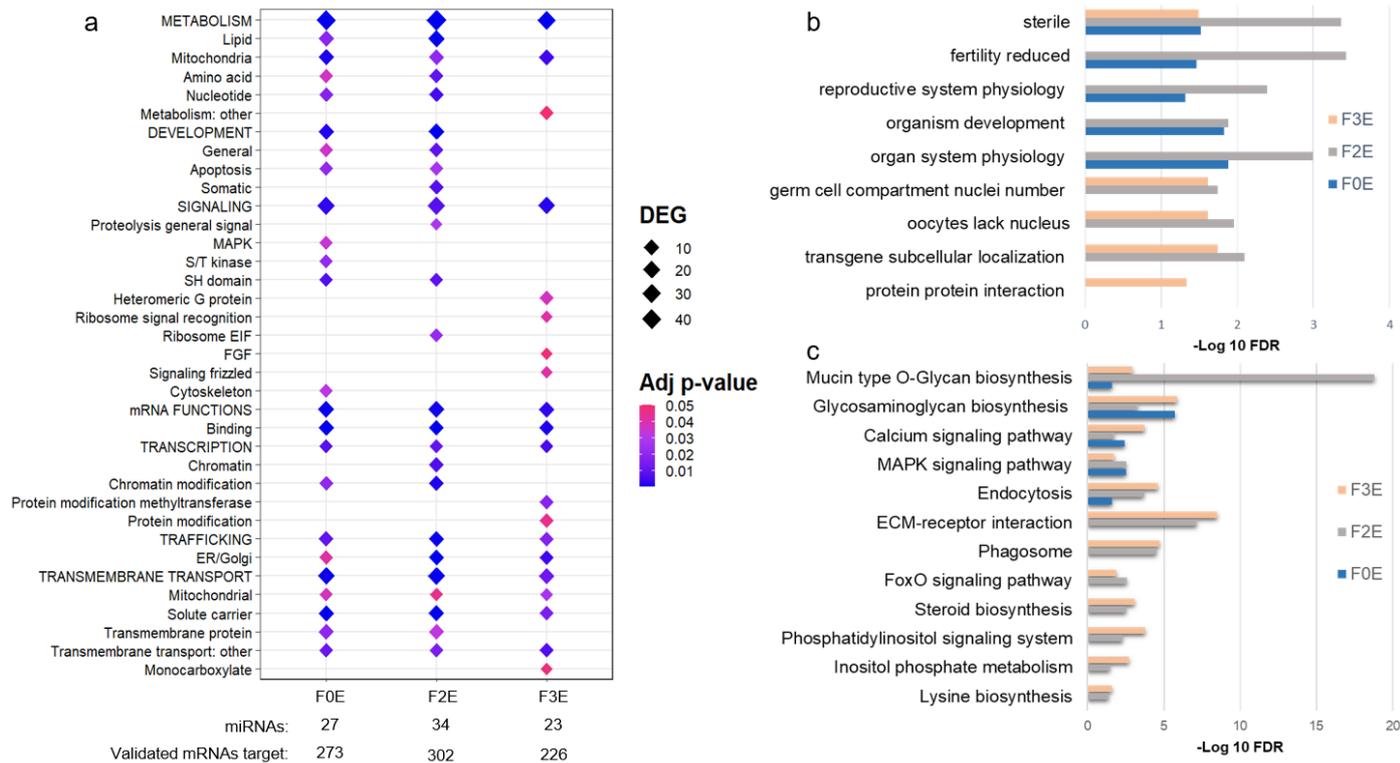


Figure 2. a) Heatmap of biological functions of mRNAs modulated by miRNAs in response to chronic exposure to ionizing radiation in three exposed generations (FDR < 0,05). The main categories of wormcat are represented in capital letters, above the secondary categories. Colours indicate the enrichment p-values obtained from Fisher's exact test. b) Bar plot of phenotype enriched terms of mRNAs targeted by miRNAs in response to chronic irradiation from multigenerational exposure (FDR < 0.05). c) Enrichment of KEGG pathways modulated by miRNAs after chronic exposure to ionizing radiation in three continuously exposed generations (FDR<0.05).

-Kegg pathways: In order to gain insights into the modulation of molecular interaction reaction and relation networks induced by chronic exposure to gamma radiation, we performed a KEGG pathway analysis. Five KEGG pathways showed significant enrichment in all exposed generation with FDR < 0,05 (Figure 2.c). Carbohydrate and glycosylation linked to processes such as development, immune response and protein folding were enriched (Berninsone., 2018). Glycosaminoglycans (GAGs) involved in cell signaling, regulation of cell growth, proliferation and promotion of cell adhesion was also enriched (Casale et al., 2019). GO terms analysis revealed significant regulation of functions related to transmembrane transport endocytosis (p-value<10⁻²) in all generations. MAPK (p-value<10⁻²), the transducers of extracellular stimuli into cellular adaptation, and calcium signalling pathway (p-value<10⁻²), which acts in Wnt, IP3 and MAPK signalling pathway, were enriched in all generations. Interestingly, MAPK and calcium signalling pathways interact to allow activation of spermatids into mature sperm, which is consistent with the reduced sperm count observed in our previous study (Guédon et al 2021). Seven KEGG pathways were enriched in F2 and F3, suggesting that a response exacerbated from the third generation onwards. Steroid biosynthesis, know to modulate metabolic processes essential to development, apoptosis, reproduction and lifespan in *C. elegans* was enriched in F2 and F3 generations (p-value<10⁻³). The FoxO signalling pathway constituting a main regulatory mechanism of stress response that facilitates the switch between reproduction and lifespan, was enriched in the last two generations (p-

value<10⁻²). This is in line with our previous study (Guédon et al 2021) that showed the modulation of DAF-16/FOXO transcription factor in response to multigenerational chronic exposure to ionizing radiation. Phagosome (p-value<10⁻⁵) plays an essential role in autophagy, recycling of intracellular compounds and to maintain homeostasis of membrane trafficking and was found significantly modulated in F2 and F3 exposed generations.

These enrichment analyses provided new insights on the impact of ionizing radiation in continuously exposed generations. Metabolism, development, fertility and signalling pathways showed to be the main targets of miRNAs in response to chronic exposure to ionizing radiation, corroborating the results of our previous studies (Maremonti et al., 2019 ; Maremonti et al., 2020; Guédon et al., 2021).

3.1.2 miRNAs and miRNAs families shared by exposed generations.

Thirty-seven miRNAs were modulated in at least two generations chronically exposed to ionizing radiation, as shown in the Venn diagram (Figure 3.a). Specifically, ten miRNAs were modulated in F0 and F2 generations, five in F0 and F3, nine in F2 and F3 generations, and thirteen in all exposed generations. Each circle in the radar graph (Figure.3.b) represents the fold change of the 37 miRNAs modulated in at least 2 generations. Overall, the miRNAs from the F0 generation showed a higher fold change compared to the following generations, with the least pronounced changes observed in the F3 generation. In addition, we observed that miRNAs 35 to 39 showed a more significant fold change in F0 and F2. The highest fold changes (4.3 and 4.2 respectively) were reported for *cel-mir-35-5p* in F0 and *cel-mir-38-3p* in F3, two members of the *mir-35* family, which reside in the same locus. Collectively, these data show that the miRNAs modulation was greater in the first exposed generation F0, and that the most significantly regulated miRNAs were 35-5p, 37-3p, 38-3p, 39-3p and 41-3p.

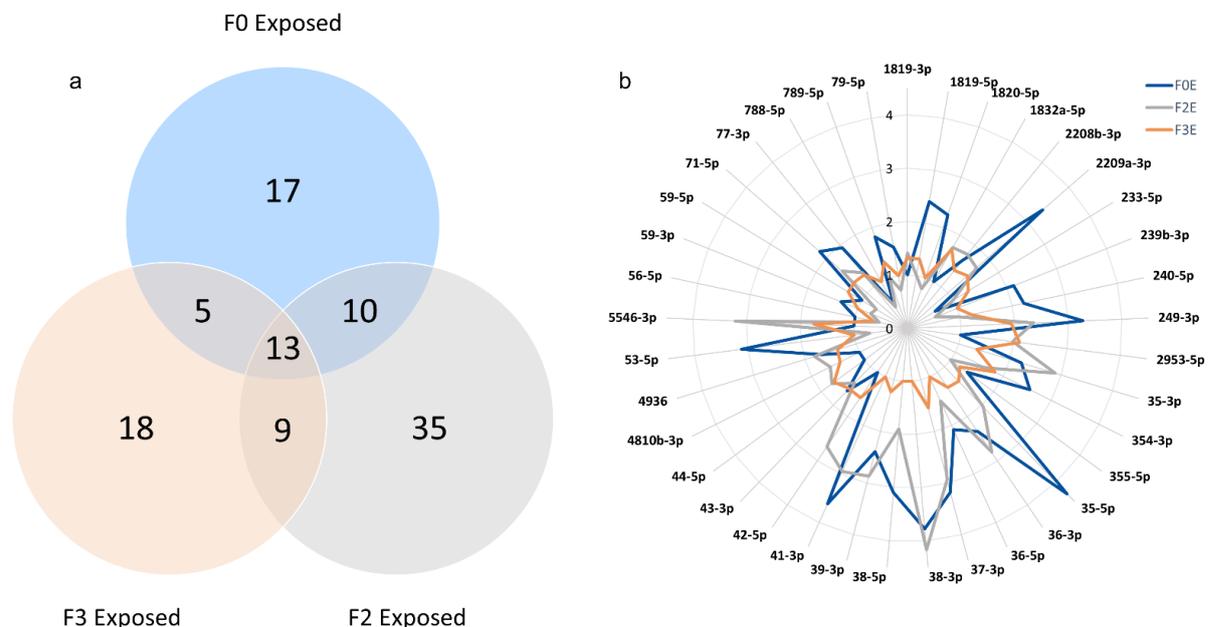


Figure.3. a) Venn diagram of differentially expressed miRNAs in response to chronic irradiation over three exposed generations (|fold change| > 1.2 and adjusted p-value < 0.05). b) Radar graph showing general patterns of 37 miRNAs modulated in, at least, two exposed generations. Each concentric rim represents 1-fold change decrease or increase compared to control.

A mirTarBase network analysis on the thirty-seven miRNAs modulated in 2 or 3 exposed generations identified 231 mRNAs targeted by 17 miRNAs (Figure 4. a). Analysis of the GOTERMs of these 271 mRNAs shows that the miRNAs target mRNAs were involved in metabolism with generation of precursor metabolites and energy (p-value<10⁻⁴), energy derivation by oxidation of organic compounds (p-value<10⁻⁴), neutral lipid metabolic process (p-value<10⁻³), and triglyceride metabolism process (p-value<10⁻³) (Fig. 4. b). Lipid metabolism is partly regulated by *hosl-1*, a hormone-sensitive lipase, which is an ortholog of human lipase E (LIPE) (Table S2). miRNAs also showed to target signalling pathways, by regulating peptide-tyrosine phosphorylation (p-value<10⁻⁴), and by negative regulation of catalytic activity (p-value<10⁻⁴). The latter network included three main regulators of protein kinase activity targeted by miRNA. This included the *age-1* phosphatidylinositol-3-kinase, ortholog of human PIK3CA and PIK3CD, involved in the regulation of lifespan. The *akap-1* protein kinase A is an ortholog of human cGMP-dependent protein kinase, AKAP1, with a predicted RNA-binding activity. The *pkg-2*, an ortholog of human PRKG1 involved in serotonin mediated signaling and the *pkn-1* protein kinase N, an ortholog of human PKN3. In addition, *gld-1/ QKI*, a tumour suppressor involved in the regulation of germline, oogenesis and spermatogenesis was also targeted by miRNAs in this network.

Thirteen miRNAs, within the same miRNAs family, were found differentially regulated across all exposed generations (Figure 4. c). These showed highly conserved seed regions, which may explain the overlapping targets within the same network. Five out of thirteen miRNAs (*mir-35-3p*, *mir-35-5p*, *mir-36-3p*, *mir-37-3p* and *mir-39-3p*) belonged to the mir-35 family. Mir-35 family is known to play an important role in DNA damage response, fecundity and embryonic development (Alvarez-Saavedra et al., 2010). Notably, *mir-71*, which is involved in regulation and adaptation to germline damage through DAF-16 / FOXO, *mir-239b-3p*, a member of *mir-238* family involved in lifespan through DAF-2/DAF-16, and *mir-2209*, a member of *mir-58* family (bantam in *Drosophila*) involved in stress response and egg laying were also significantly regulated in all exposed generations.

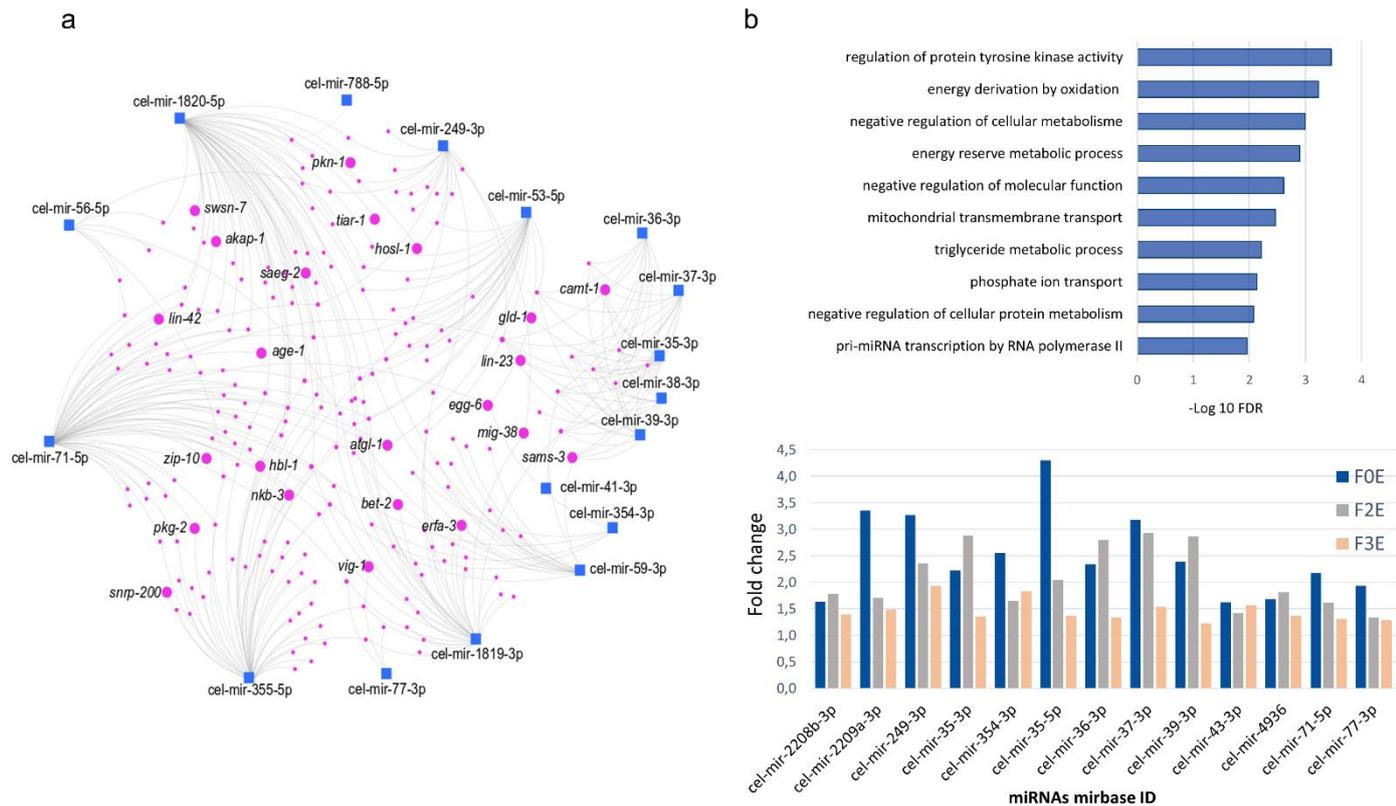


Figure.4. a) Network analysis of miRNAs in, at least, 2 exposed generations of *C. elegans* continuously exposed to 50 mGy/h of gamma radiation. Each interaction validated experimentally between miRNAs (blue) and mRNAs (purple) was identified within mirTarBase. The larger circles indicate the targeted mRNAs with a major physiological role. b) Bar plot of the top non redundant enriched GO-term biological processes of the targeted mRNAs ($p < 0,001$), retrieved from the R package topGO. c) Bar plot of thirteen miRNAs modulated in all exposed generations in response to chronic exposure to ionizing radiation.

These results indicated a multigenerational response to chronic ionizing radiation exposure, which involved specific miRNAs families, mostly related to radiation-induced damage and stress. A considerable proportion of the DEMir response was maintained across all generations. Furthermore, the observed DEMirs were involved in central processes of reproduction, development and stress response, suggesting a potential for transmission onto subsequent unexposed generations. For this reason, we proceeded to analyse miRNA expression in F2R and F3R cohorts placed under recovery conditions after parental exposure.

3.2 Transgenerational impact of chronic exposure to ionizing radiation

3.2.1 Transgenerational inheritance of miRNAs after parental exposure to ionizing radiation

The Venn diagram in Figure.5.a shows the differential regulation of five miRNAs in both recovery and parental generations. Twelve miRNAs were modulated in F0 and F2 but not sustained in F3. Ten miRNAs were common to F2R and F3R generations and may be part of a recovery response to parental exposure. However, irradiation of F0 generation implied exposure of their gametes and the cognate F1 germline stem cells.

Modulation of miRNAs in the F2 recovery cohort may thus be due to direct exposure of parental generation F0 that would constitute a potential transgenerational effect. For this reason, a comparison between F2 and F3 modulated miRNAs was performed in order to identify potential transgenerational inheritance of such effects. In the ten miRNAs shared between the F2 and F3 recovery cohorts, only *mir-1823-3p* and *mir-1819-3p* were found upregulated, indicating a potential transgenerational effect (Fig.5.b).

The remaining miRNAs were found downregulated in F2 and then upregulated in F3. This could suggest that the expression of these eight miRNAs was derepressed following the cessation of the direct or maternal effect of chronic exposure to ionizing radiation, and thus that they were not inherited, but may represent a disturbance to the epigenetic program. Five miRNAs were modulated in response to chronic irradiation in F0, F2 and F3 recovery cohorts, which is consistent with transgenerational epigenetic inheritance (Fig.5.c). *Cel-mir788-5p* was downregulated in F0 and F2 generations but upregulated in F3. Conversely, *cel-mir-1820-5p* was upregulated in the F0 and F3 generations but downregulated in F2 generation. *Cel-mir-36-5p*, *cel-mir-71-5p* and *cel-mir-4936* were found upregulated from F0 to F3, indicating transgenerational inheritance of such response from F0 parental irradiation. Interestingly, *cel-mir 4936* and *cel-mir-71* were found upregulated in both exposed and recovery generations. These data strongly suggest that *cel-mir-36-5p*, *cel-mir-4936* and *cel-mir-71-5p* were upregulated in response to direct irradiation and as well as transmitted to subsequent unexposed generations.

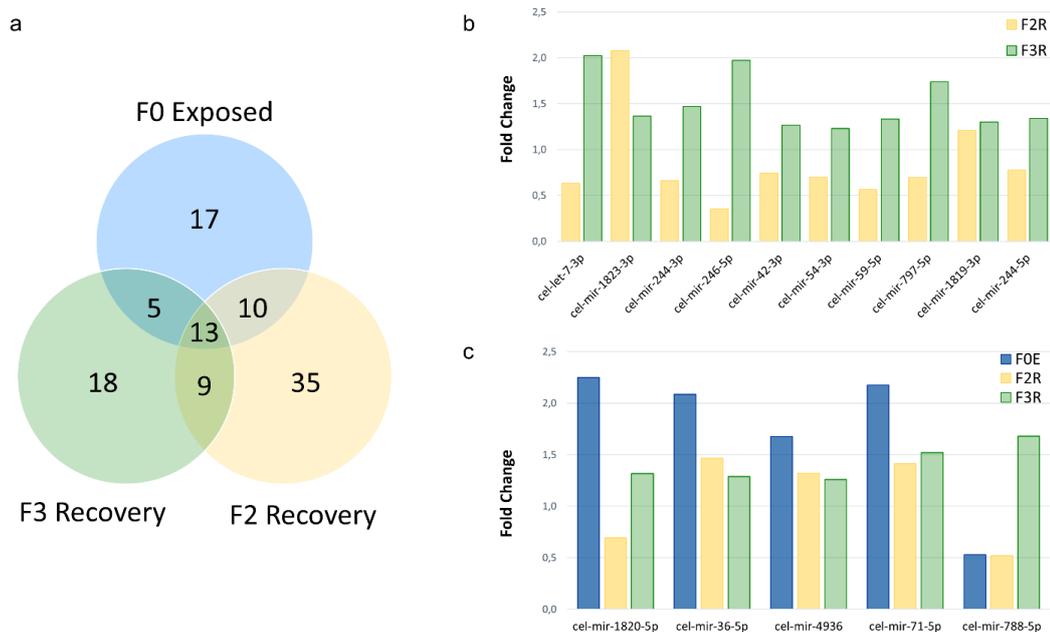


Figure.5. a) Venn diagram of differentially expressed miRNAs in response to parental exposure (F0) to chronic irradiation (lfold change > 1.2 and adjusted p-value < 0.05). Bar plot of miRNAs shared by b) F2 and F3 recovery generations (F2R, F3R) and c) parental (FOE) and recovery generations (F2R, F3R).

3.2.2 Biological functions affected by transgenerational inheritance of miRNAs in F3 recovery generation

DNA damage on embryonic cells has been previously observed in the first generation after parental exposure to gamma irradiation (Maremonti et al., 2019). Therefore, one of the objectives of this study was to elucidate whether ionizing

radiation effects on miRNAs expression were transmitted in a transgenerational manner. Thus, after parental exposure (F0), three consecutive generations of recovery cohorts were monitored at the molecular level to identify transgenerational effects without maternal influence. Moreover, in order to investigate differences between potential heritable and transgenerational effects, a comparison of DEIRs was performed onto the fourth generation (F3) from control, exposed and recovery treatments.

Environmental stressors can induce differential regulations of miRNAs, affecting key pathways of germ line development (Brieno-Enriquez et al., 2015). In addition, miRNAs interact with other transgenerational epigenetic processes, such as the biogenesis of siRNAs and histone methylation, to modulate gene expression and orchestrate physiological changes (Corrêa et al., 2010; Tao et al., 2017). From the PCA analysis on F0 miRNAs a clear separation was observed between exposed and control groups (Figure S2). In the 3rd generation (F2), the control group did not correlate with the recovery and exposed groups, which still showed significant overlap. This data showed that the miRNAs of the F2 recovery clustered closer to the exposed than to control populations. PCA analysis on the 4th generation (F3) showed a consistent negative correlation between the F3 recovery and the control groups, with a significant miRNA-profile modification three generations after parental exposure (Figure.6. a).

In addition, the Venn diagram of the miRNAs modulated in the fourth generations (F3) shows an overlap of 16 miRNAs (19%) between the exposed and recovery cohorts, indicating that part of the miRNAs and biological processes are maintained due to the irradiation (Figure.6. b; Figure S3). Nevertheless, the recovery cohort showed 39 separate miRNAs (46.4%), indicating that specific processes were affected three generations after parental exposure. This suggests that chronic irradiation did modify the profile of miRNAs in a transgenerational manner.

To further investigate the biological functions associated with F3 recovery Demir, mirTarBase pathway enrichment analysis was adopted to retrieve experimentally validated miRNAs-mRNAs interactions and associated Gene Ontology (GO). Key processes such as development, energy metabolism, and regulation of protein tyrosine kinase activity were modulated three generations after parental exposure (Figure.6. c). A substantial proportion of significant GOTERMS linked to metabolism and energy derivation by oxidation of organic compounds (P-value $<10^{-8}$), small molecule metabolic process (p-value $<10^{-7}$), cellular glucan metabolic process (P-value $<10^{-5}$) and ATP metabolic process (P-value $<10^{-4}$). Gene ontology enrichment of the 16 miRNAs in common between the recovery and exposed cohorts of the F3 generation showed that the main shared biological functions were vesicle coating and targeting (P-value $<10^{-3}$), protein localization and import (P-value $<10^{-3}$) and glycerolipid catabolism (P-value $<10^{-3}$) (Figure 6.b, Figure S3).

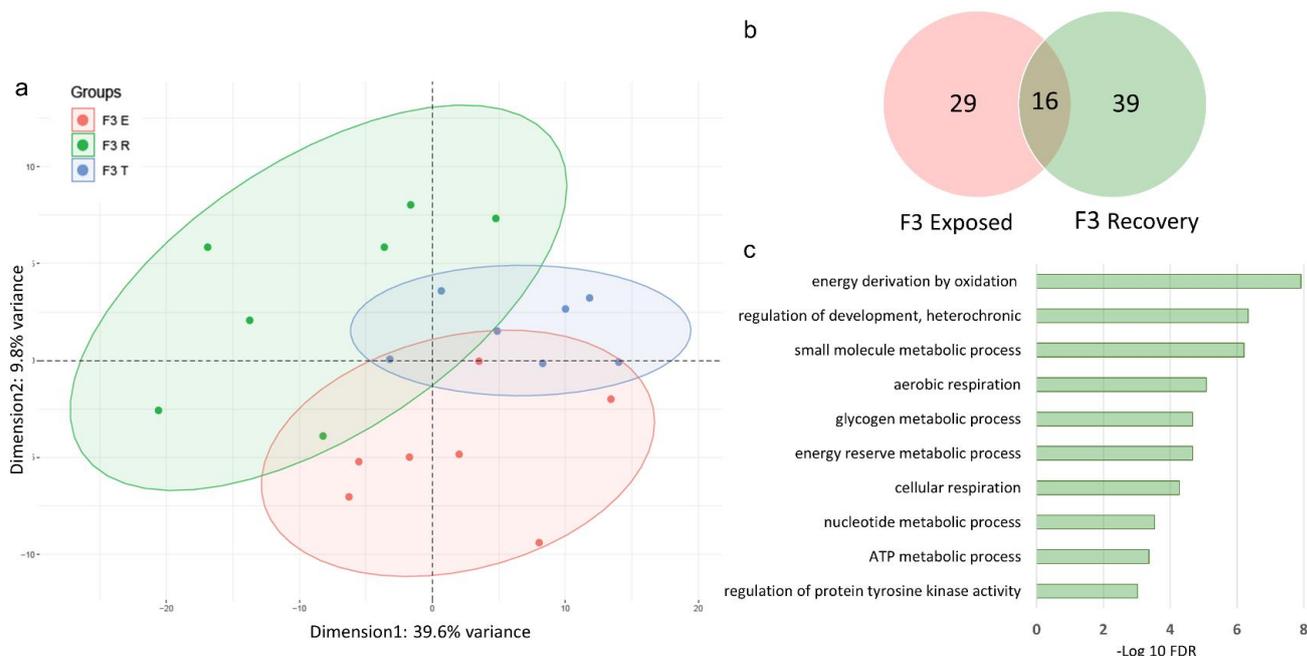


Figure.6. a) Principal component analysis using all miRNAs from control (T), exposed (E) and recovery (R) conditions in the fourth generation F3. b) Venn diagram of differentially expressed miRNAs in response to chronic irradiation over F3 Exposed and F3 Recovery cohorts. c) Bar plot of the top non redundant enriched GO-term biological processes of F3 recovery ($p < 0.005$), retrieved from the R package topGO.

These results showed that radiation-induced effects were maintained 3 generations after parental exposure. Furthermore, some of the effects were identified also in the continuously exposed cohort. The remaining proportion was common between exposed and recovery cohorts, whereas the majority of the Demir (39) were distinctive of the F3 recovery cohort, suggesting a change in their epigenetic program. To further substantiate transgenerational inheritance of radiation induced effects, we searched for DemiRs conserved across all recovery generations.

4. Discussion

Mounting evidence suggest that parental exposure to ionizing radiation may induce alteration of biological processes over several generations, due to transgenerational inheritance (Trijau et al., 2015; Liberman et al., 2019). In the current study, we investigated potential transgenerational inheritance of radiation effects related to expression of and biological functions modulated by miRNAs in *C. elegans*. We analysed the multigenerational and intergenerational character of this response, focusing on the miRNAs in common over the exposed generations and their respective targets. We then assessed potential transgenerational effects by investigating the influence of parental irradiation on the expression of miRNAs on the three subsequent generations.

4.1 MiRNAs regulate metabolic, reproductive and signalling pathways in response to chronic multigenerational irradiation

The current study shows the involvement of miRNAs in the multigenerational response to chronic ionizing radiation exposure. Specially, more than 45 miRNAs per each exposed generation were regulated in response to continuous irradiation (Figure 1.b). The miRNAs functions, further validated by means of relative mRNAs target analysis, included reproduction, metabolism, signalling pathways, regulation of transcription and membrane transport in all exposed generations, demonstrating a significant radiation-induced multigenerational effect (Figure 2.a.b.c). The results were consistent with the transcriptomic analysis from our previous study, where we validate 17 interactions between *Demir* and mRNAs (Table S3). The data show an important contribution of *mir-71* which regulates 6 mRNAs, including *lin-42* which is involved in the biogenesis and regulation of miRNAs during development (Van Wynsberghe et al., 2014).

Metabolism, reproduction and signalling pathways are known to be modulated under exposure to environmental stressors and diseases. The phenotypic, cellular, and transcriptomic effects induced by multigenerational irradiation were described in our previous study (Guédon et al., 2021). Briefly, continuous chronic exposure over four generations lead to a 23% decrease in fertility on the first generation followed by 40% on the following generations, as well as to a modulation of the transcriptome. Reduced fertility was due to reduced number and quality of sperm, as well as reduced number of mitotic cells in the germ line and increased apoptosis. In *C. elegans*, spermatozoa transmit information between generations and therefore possess epigenetic memory of both oogenesis and spermatogenesis (Tabuchi et al., 2018). Transcriptomic analysis by RNA-Seq revealed a significant modulation of genes involved in stress response. This was partially mediated by the transcription factor DAF-16/FOXO, which is known to modulate a metabolic switch from reproduction/growth functions to stress response/metabolism. In addition, there was a significant increase in the number of DEGs between F0-F1 (between 200 and 300 genes) and F2-F3 (more than 1200 genes), mainly linked to stress response, signal transduction and metabolism.

These effects were consistent with the phenotype enrichment of mRNAs targeted by miRNAs from the current study, showing an impact on fertility, reproductive system and germ line (Figure 2.c). Interestingly, the two specific argonaute proteins *alg-1* and *alg-2* of the miRISC complex, essential to the silencing pathway of miRNAs, have been shown to high expression in the distal mitotic part of the gonad (Bukhari et al., 2012). Loss-of-function of *alg-1* and *alg-2* induces a decrease in fertility and in the number of mitotic cells indicating that their role is essential to maintain germ cell proliferation and gamete formation. Additionally, *alg-1* interacts with different germline pathways such as *gld-1*, a tumour suppressor essential for oogenesis, spermatogenesis, and germ line stem cells as well as GLP-1/Notch and Major Sperm Protein (MSP) signalling pathways. *Gld-1* is one of the targets of the miRNAs network shared by the exposed generations (Figure 4.a, Table S2). Moreover, some miRNAs are known to be specifically enriched in the germ line, such as *mir-35* or *mir-788* families, which were found differentially regulated in response to chronic irradiation (Figure 4.c and 6.a) (McEwen et al., 2016). These data strongly suggest the involvement of miRNA pathways in the modulation of germline homeostasis, as also shown by increased apoptosis and cell cycle arrest under multigenerational exposure to ionizing radiation (Guédon et al., 2021).

In parallel to the radiation-induced reproductive toxic effect, our previous study showed a significant increase in the number of DEGs between F0-F1 (between 200 and 300 genes) and F2-F3 (more than 1200 genes), mainly linked to stress response, metabolic changes, and biological signalling pathways such as DAF-16 / FOXO or pri-

miRNAs biosynthesis over four exposed generations. Therefore, we hypothesised that due to germline-to-soma communication in response to damage onto the *C. elegans* germline, a metabolic switch between reproduction and development towards resource conservation, stress response and longevity occurred (Hsin and Kenyon., 1999 ; Zecic et al., 2020). This process is known to be modulated by the integration of several signals by DAF-16 / FOXO via shuttling from cytoplasm to nucleus and can be transmitted to subsequent generations via epigenetic mechanisms (Sun et al., 2017; Kishimoto et al., 2017). These mechanisms include the activation of PI3K age-1, which was targeted by the miRNAs network shared by all the exposed generations, as well as mir-71, which is known to facilitate the localization and transcription of DAF-16 in the nucleus to promote longevity and stress response (Boulias et al.,2012) and was found overexpressed in all exposed and unexposed generations (Figure 2.c). This was consistent with our previous study showing increased localization of DAF-16 in the nucleus and FOXO modulation after multigenerational chronic irradiation, which links miRNAs to radiation induced stress response and transgenerational inheritance effects (Guédon et al., 2021).

Moreover, miRNAs showed to be involved in a multigenerational stress response to chronic irradiation. Specifically, 35% of miRNAs were modulated in 2 generations while more than 12% were modulated over the 3 exposed generations (F0, F2, F3) (Figure 3.a). Seventeen of these miRNAs were involved in gene regulatory networks, acting on biological functions linked to metabolism and development (Figure 4.a.b). Among the most important targets regulated by this network, we found protein kinases, lipases and transcription factors, (Table S1). Among the transcription factor, *vig-1* which is required for maintaining genome stability in response to both endogenous and exogenous genotoxic stress and is a genetic enhancer of *gld-1* (Akay et al., 2013; Vasamsetti et al., 2018). Moreover, *vig-1* is a putative component of the RNA-induced silencing complex (RISC) and *vig-1* deletion leads to a repression of several miRNAs, such as *let-7*, in worms and human (Caudy et al., 2003; Wang et al., 2017).

Gld-1 is a tumour suppressor gene, related to mammalian Quaking/QKI proteins, required for gamete development, mitosis and meiosis germ cell control, embryonic development, and targeted by the *mir-35* family (Figure 4 a.c). Interestingly, *gld-1* is a regulator of DNA-damage induced apoptosis through p53 / Cep-1 (Schumacher et al., 2005), a process of cell death demonstrated in the *C. elegans* germline in response to chronic irradiation (Maremonti et al.,2020; Guédon et al.,2021). Members of miRNAs families are characterize by common mature or seed sequences that regulate one or more biological functions. In *C. elegans*, mutant strains of 12 of the 23 families of miRNAs did not result in any obvious phenotype, supporting the theory that certain families of miRNAs only act in a specific physiological context or in response to stress as well as a functional redundancy safety mechanism to compensates for loss of function (Alvarez-Saavedra et al., 2010).

In the identified radiation response network (Fig 4a), 6 members of the *mir 35* family, one member of the conserved *mir 51* family (*mir-53*) involved in miRNAs regulation and one member of the conserved *mir-58* family (*mir-2209*) involved in apoptosis and dauer formation (Ambros et al., 2018) were modulated in response to chronic exposure to ionizing radiation. *Mir-71*, involved in development timing, stress response, lifespan and *mir-59*, involved in embryonic and adult viability as well as gonadal morphogenesis were also differentially regulated (Brenner et al., 2010; Boulias et al.,2012).

Analysis of miRNAs shared by 3 generations highlights the presence of the mir-35 family in the multigenerational response to chronic ionizing radiation exposure. Mir-35 family mutant results in embryonic lethality, demonstrating an essential role of this family for *C. elegans* embryonic development (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010). In addition, the deletion of Droscha (*drsh-1*) and Pasha / DGCR8 (*pash-1*), necessary for the biogenesis of canonical miRNAs, results in the absence of embryo development, while the re-introduction of *mir-35* allows normal development of the larva, indicating an essential role for embryonic patterning (Dexheimer et al., 2020). During somatic development, mir-35 interacts with *gld-1*/QKI and *vig-1*, two modulators of miRNAs functions, to ensure proper development (Liu et al., 2011; Akay et al., 2013). Mir-35 also controls the number of progenies produced, through the regulation of spermatozoa and somatic gonad, as well as G1/S transition in the germline (McJunkin et al., 2014). Interestingly, mir-35 contributes to RNAi sensitivity through modulation of *lin-35*/Rb and affects RNAi effectiveness of progeny, probably by affecting small interfering RNAs (siRNAs) (Massirer et al., 2012). Furthermore, this family is involved in apoptosis regulation in *C. elegans* germline through MAPK and binding site of *egl-1*/BH3 threshold to modulate germline cell death threshold in response to genotoxic stress (Sherrard et al., 2017; Tran et al., 2019). Consistent with our previous studies showing increased DNA damage, cell death and apoptosis in response to chronic irradiation, upregulation of the mir-35 family may indicate a buffering effect on cell death in the germline. The impact on the germ line provides further indication of transmission of effects to subsequent generations.

4.2 Parental exposure to chronic irradiation induced transgenerational inheritance effects on miRNAs.

In order to analyse whether the impact of the germline and the regulation of miRNAs is passed on to unexposed generations, three generations after parental exposure were analysed. The main component analysis and the Venn diagram of miRNAs clearly showed that the F3 recovery cohort, placed in controlled environment after parental exposure (F0), had a distinct profile from the exposed and control cohorts (Figure 6.a.b). Links between transgenerational transmission of miRNAs in response to parental metabolic or chemical stresses have been established in mice, rats and *C. elegans* (Taki et al., 2014; Brieno-Enriquez et al., 2017; Dupont et al., 2019). Our study shows that ionizing radiation affects miRNAs at least three generations post parental exposure. In *C. elegans*, histone modifications and non-coding RNAs such as siRNAs and piRNAs have been shown to act as inheritance effectors of epigenetic character via regulation of primordial germ cells and RNAi inheritance machinery (Furuhashi et al., 2010; Rechavi et al., 2017; Liberman et al., 2019). miRNAs can induce changes in the differentiation of germ cells, gonad environment and embryonic development as well as siRNAs biogenesis through RDE-1, which can lead to transmission of character over several generations (Corrêa et al., 2010; Brieno-Enriquez et al., 2017). MiRNAs also compete with other small RNAs such as endo-siRNAs for RNAi machinery which are directly involved in transgenerational inheritance as well as feedback loop of the methylation of histone H3K9 (Hourii-Zeevi et al., 2016;). These data suggest that the disruption of the flow of small RNAs may have consequences on subsequent generations via effects on the endo-RNAi or microRNA pathway.

Biological functions modulated by F3 recovery miRNAs were linked to metabolism and energy production, regulation of development, ATP metabolic process and

nucleotide processes through transcriptome modulation (Figure 6.c). This data is consistent with previous studies showing that exposure to stress can induce modification in the germ line, carrying transgenerational modification, ultimately shaping transcriptome, physiology, development and behaviour (Crews et al.,2012). Analysis of modulated miRNAs in the Recovery generations revealed two types of profiles. Firstly, miRNAs that were subjected to non-monotonous regulation over generations. (Figure 6.b), and secondly, 5 miRNAs which were upregulated in F2 and F3 recovery, showing a transgenerational profile in response to chronic exposure to ionizing radiation (Figure 6.a.b). According to our previous study, the impact of the germ line as well as the quality and quantity of sperm could possibly be the triggering events of the inter and transgenerational epigenetic mechanisms. Mir-36, a member of the mir-35 family involved in multiple aspects of fertility and apoptosis as well as mir-71, involved in stress response, lifespan regulation and DAF-16 / FOXO are the most significant miRNAs transmitted to the F3 recovery. This notion was further corroborated by comparison of validated targets of miRNAs with the RNA-Seq from our previous study (Guédon 2021), on the F3 recovery cohort. This analysis identified 29 validated interactions between DEmiR and mRNAs in the F3 recovery cohort (Table S3).

The comparison between the recovery and exposed cohorts of the F3 generation defines which miRNAs and biological functions are maintained or specific to each condition. Among the differentially expressed miRNAs of the F3 generation, 34.5% are specific to direct exposure, 46.5% are specific to the recovery condition, while 19% are present in both cohorts (Figure 6.b). Analysis of the biological functions showed that the shared miRNAs were involved in the coating and targeting of vesicles, the localization of proteins in the endoplasmic reticulum and the mitochondrial matrix as well as in the metabolic process of glycerolipids (Figure S3). It appears that these functions are therefore modulated and then maintained after parental exposure. Interestingly, miRNAs are transported across tissues via extracellular vesicles, to modulate aging, stress response and homeostasis (Zhou et al., 2019). Exposed-specific miRNAs are involved in the energy reserve metabolic process, negative regulation of cellular protein metabolism, cellular catabolic process, and metabolic process of the cellular ketone body, as discussed previously. Recovery-specific miRNAs are involved in the metabolic process of energy reserve, cellular respiration, the metabolic process of nucleotides and the regulation of protein tyrosine kinase activity as well as the process of ATP biosynthesis (Figure S3). Effects on ATP production and nucleotide metabolic process can lead to severe adverse effect on the population dynamics, especially considering that these were only parentally exposed. Nevertheless, the imbalance in the metabolism of nucleotides leads to harmful consequences for the organism, especially for germ cells proliferation, but can also initiate protective cellular responses at the transcriptomic and metabolic level in *C. elegans* (Jia et al., 2020). In the same way, alteration in ATP metabolism may also be a signal for mitochondrial adaptation to stress, a transgenerational process demonstrated through the DNA 6mA (Ma et al., 2020). A dedicated study will have to be carried out to deepen these questions.

5. Conclusion

In the present study, modulation of miRNAs in *C. elegans* showed to play a considerable role in the multigenerational and transgenerational responses to chronic exposure to ionizing radiation. Continuously exposed generations showed that specific

miRNAs can affect biological functions related to stress response, metabolism, fertility and signalling pathways and that these were linked to observed phenotypic effects and molecular pathways. A portion of miRNAs were modulated in all exposed generations thus showing a collective multigenerational response. Specifically, the mir-35 family and mir-71, involved in fertility, stress response, cell death and longevity have shown a central role in the identified radiation stress induced network. In addition, we show that an effect on miRNAs expression was transmitted at least 3 generations post irradiation. This implies a transgenerational epigenetic adaptation or a modulated stress response in the offspring of parents exposed to chronic ionizing radiation. These results substantiate the contribution of epigenetic inheritance and adds to the growing body of evidence linking changes in epigenetic components in gametes to impact on subsequent generations (Kishimoto et al., 2017; Dupont et al., 2019). The results presented here provides new insights with respect to transgenerational effects on miRNAs and their role in response to chronic environmental stress.

Supplementary Materials:

Figure S1: Clustering of microRNAs with Pearson's correlation, average linkage and assay centric methods. Figure S2: Principal component analysis using all miRNAs from control (T), exposed (E) and recovery (R) conditions in F0, F2 and F3 generations. Figure S3: Tree map of top non redundant enriched GO-term biological processes of the targeted mRNAs from specific recovery (green), exposed (red) and overlap miRNAs (orange). Table S1: List of differentially expressed miRNAs. Table S2: A summary of master regulators targeted by microRNAs in network analysis (Figure 4.a). Table S3: Overexpressed miRNAs correlated with the measured expression of their validated target by RNA-Seq.

Author Contributions:

Rémi Guédon: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing original draft-review-editing. **George Tarlet:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation Resources, Review. **Erica Maremonti:** Methodology, Software, Writing original draft Review. **Simon Galas:** Conceptualization, Resources, Review. **Dag Anders Brede:** Methodology, Software, Writing original draft Review. **Maamar Soudi :** Conceptualization, Project administration, Methodology, Software, Formal analysis, Supervision, Writing original draft Review. **Fabien Milliat:** Conceptualization, Project administration, Supervision, Resources, Formal analysis, Methodology, Writing original draft Review. **Catherines Lecomte-Pradines:** Conceptualization, Data curation, Project administration, Resources, Supervision, Methodology, Validation, Writing original draft-review-editing.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses with the support of the Cancer TMOI of the French Alliance for Life and Health Sciences (AVIESAN)(2015/1/212). DAB and EM were supported by the Research Council of Norway through its Center of Excellence (CoE) Center for Environmental Radioactivity (CERAD, project No. 223268).

Acknowledgments: We want to thank Nicolas Dubourg for his help with irradiation and dosimetry calculations. We also thank Christelle Adam-Guillermin and François Paquet for their support in setting up and carrying out this project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation.

References

- Adam-Guillermin et al., 2018 Adam-Guillermin, Christelle, et al. "Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species." *Annals of the ICRP* 47.3-4 (2018): 327-341.
- Akay et al., 2013 Akay, Alper, et al. "RNA-binding protein GLD-1/quaking genetically interacts with the mir-35 and the let-7 miRNA pathways in *Caenorhabditis elegans*." *Open biology* 3.11 (2013): 130151.
- Alvarez-Saavedra and Horvitz 2010 Alvarez-Saavedra, Ezequiel, and H. Robert Horvitz. "Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability." *Current Biology* 20.4 (2010): 367-373.
- Ambros et al., 2018 Ambros, Victor, and Gary Ruvkun. "Recent molecular genetic explorations of *Caenorhabditis elegans* microRNAs." *Genetics* 209.3 (2018): 651-673.
- Azzam et al., 2012 Azzam, Edouard I., Jean-Paul Jay-Gerin, and Debkumar Pain. "Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury." *Cancer letters* 327.1-2 (2012): 48-60.
- Belli et al., 2020 Belli, Mauro, and Maria Antonella Tabocchini. "Ionizing radiation-induced epigenetic modifications and their relevance to radiation protection." *International Journal of Molecular Sciences* 21.17 (2020): 5993.
- Berninsone., 2018 Berninsone, Patricia M. "Carbohydrates and glycosylation." *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet] (2018).
- Boulias et al., 2012 Boulias, Konstantinos, and H. Robert Horvitz. "The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO." *Cell metabolism* 15.4 (2012): 439-450.
- Brenner et al., 2010 Brenner, John L., et al. "Identification of mutant phenotypes associated with loss of individual microRNAs in sensitized genetic backgrounds in *Caenorhabditis elegans*." *Current biology: CB* 20.14 (2010): 1321.
- Brieno-Enriquez et al., 2015 Briño-Enríquez, Miguel A., et al. "Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells." *PloS one* 10.4 (2015): e0124296.
- Bukhari et al., 2012 Bukhari, Syed Irfan Ahmad, et al. "The microRNA pathway controls germ cell proliferation and differentiation in *C. elegans*." *Cell research* 22.6 (2012): 1034-1045.
- Casale et al., 2019 Casale, Jarett, and Jonathan S. Crane. "Biochemistry, Glycosaminoglycans." (2019).
- Caudy et al., 2003 Caudy, Amy A., et al. "A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes." *Nature* 425.6956 (2003): 411-414.
- Corrêa et al., 2010 Corrêa, Régis L., et al. "MicroRNA-directed siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS genetics* 6.4 (2010): e1000903.
- Crews et al., 2012 Crews, D., Gillette, R., Scarpino, S. V., Manikkam, M., Savenkova, M. I., & Skinner, M. K. (2012). Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9143-9148.

Dexheimer et al., 2020 Dexheimer, Philipp J., Jingkui Wang, and Luisa Cochella. "Two MicroRNAs Are Sufficient for Embryonic Patterning in *C. elegans*." *Current Biology* 30.24 (2020): 5058-5065.

Duale et al., 2020 Duale, Nur, et al. "Using prediction models to identify miRNA-based markers of low dose rate chronic stress." *Science of the Total Environment* 717 (2020): 137068.

Dupont et al., 2019 Dupont, Charlotte, et al. "Role of miRNA in the transmission of metabolic diseases associated with paternal diet-induced obesity." *Frontiers in genetics* 10 (2019): 337.

Furuhashi et al., 2010; Furuhashi, Hirofumi, et al. "Trans-generational epigenetic regulation of *C. elegans* primordial germ cells." *Epigenetics & chromatin* 3.1 (2010): 1-21.

Guédon et al., 2021 Guédon, Rémi, et al. "A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in *C. elegans*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225 (2021): 112793.

Ha et al., 2011 Ha, Tai-You. "MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease." *Immune network* 11.3 (2011): 135-154.

Hall et al., 2012 Hall, Eric J., and Amato J. Giaccia. "Radiobiology for the radiologist." (2020).

Holdorf et al., 2020 Holdorf, Amy D., et al. "WormCat: an online tool for annotation and visualization of *Caenorhabditis elegans* genome-scale data." *Genetics* 214.2 (2020): 279-294.

Houri-Ze'evi et al., 2016; Houry-Ze'evi, Leah, et al. "A tunable mechanism determines the duration of the transgenerational small RNA inheritance in *C. elegans*." *Cell* 165.1 (2016): 88-99.

Hsin et Kenyon., 1999; Hsin, Honor, and Cynthia Kenyon. "Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*." *Nature* 399.6734 (1999): 362-366.

Hu et al., 2010 Hu, Qin-Hong, Jian-Qing Weng, and Jin-Sheng Wang. "Sources of anthropogenic radionuclides in the environment: a review." *Journal of environmental radioactivity* 101.6 (2010): 426-437.

Ibanez-Ventoso., et al 2008 Ibáñez-Ventoso, Carolina, Mehul Vora, and Monica Driscoll. "Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology." *PloS one* 3.7 (2008): e2818.

Jia et al., 2020 Jia, Fan, Congwu Chi, and Min Han. "Regulation of nucleotide metabolism and germline proliferation in response to nucleotide imbalance and genotoxic stresses by EndoU nuclease." *Cell reports* 30.6 (2020): 1848-1861.

Kamstra et al., 2018 Kamstra, Jorke H., et al. "Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-13.

Kato et al., 2016 Kato, Masaomi, Mohammed Abul Kashem, and Chao Cheng. "An intestinal microRNA modulates the homeostatic adaptation to chronic oxidative stress in *C. elegans*." *Aging (Albany NY)* 8.9 (2016): 1979.

Kim et al., 2020 Kim, Juyong Brian, et al. "Cumulative lifetime burden of cardiovascular disease from early exposure to air pollution." *Journal of the American Heart Association* 9.6 (2020): e014944.

Kishimoto et al., 2017 Kishimoto, Saya, et al. "Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*." *Nature communications* 8.1 (2017): 1-12.

Klengel et al., 2016 Klengel, Torsten, Brian G. Dias, and Kerry J. Ressler. "Models of intergenerational and transgenerational transmission of risk for psychopathology in mice." *Neuropsychopharmacology* 41.1 (2016): 219-231.

Kreuzer et al., 2017 Kreuzer, Michaela, et al. "Multidisciplinary European Low Dose Initiative (MELODI): strategic research agenda for low dose radiation risk research." *Radiation and environmental biophysics* 57.1 (2018): 5-15.

Kubsad et al., 2019 Kubsad, Deepika, et al. "Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 1-17.

Leung et al., 2010 Leung, Anthony KL, and Phillip A. Sharp. "MicroRNA functions in stress responses." *Molecular cell* 40.2 (2010): 205-215.

Lieberman et al., 2019 Lieberman, Noa, Simon Yuan Wang, and Eric Lieberman Greer. "Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms." *Current opinion in neurobiology* 59 (2019): 189-206.

Lim et al., 2003 Lim, Lee P., et al. "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." *Genes & development* 17.8 (2003): 991-1008.

Liu et al., 2011 Liu, Min, et al. "mir-35 is involved in intestine cell G1/S transition and germ cell proliferation in *C. elegans*." *Cell research* 21.11 (2011): 1605-1618.

Lorimore et al., 2003 Lorimore, Sally A., Philip J. Coates, and Eric G. Wright. "Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation." *Oncogene* 22.45 (2003): 7058-7069.

Ma et al., 2020 Ma, Chengchuan, et al. "N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for mitochondrial stress adaptation." *Nature cell biology* 21.3 (2019): 319-327.

Marczylo et al., 2012 Marczylo, Emma L., et al. "Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern?." *Epigenetics* 7.5 (2012): 432-439.

Maremonti et al., 2019 Maremonti, Erica, et al. "Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* via impairment of spermatogenesis." *Science of the Total Environment* 695 (2019): 133835.

Maremonti et al., 2020 Maremonti, Erica, et al. "In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*." *Free radical biology and medicine* 152 (2020): 583-596.

Martin et al., 2021 Martín, Leonardo, et al. "Altered non-coding RNA expression profile in F1 progeny 1 year after parental irradiation is linked to adverse effects in zebrafish." *Scientific reports* 11.1 (2021): 1-17.

Massirer et al., 2012 Massirer, Katlin B., et al. "The miR-35-41 family of microRNAs regulates RNAi sensitivity in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS genetics* 8.3 (2012): e1002536.

McEwen et al., 2016 McEwen, Tamara J., et al. "Small RNA in situ hybridization in *Caenorhabditis elegans*, combined with RNA-seq, identifies germline-enriched microRNAs." *Developmental biology* 418.2 (2016): 248-257.

McJunkin et al., 2014 McJunkin, Katherine, and Victor Ambros. "The embryonic mir-35 family of microRNAs promotes multiple aspects of fecundity in *Caenorhabditis elegans*." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4.9 (2014): 1747-1754.

Metheetraitut et al., 2013 Metheetraitut, Chanatip, and Frank J. Slack. "MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy." *Current opinion in genetics & development* 23.1 (2013): 12-19.

Metheetraitut et al., 2017 Metheetraitut, Chanatip, et al. "cel-mir-237 and its homologue, hsa-miR-125b, modulate the cellular response to ionizing radiation." *Oncogene* 36.4 (2017): 512-524.

Nixon et al., 2015 Nixon, Brett, et al. "The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation." *Biology of reproduction* 93.4 (2015): 91-1.

Rechavi et al., 2017 Rechavi, Oded, and Itamar Lev. "Principles of transgenerational small RNA inheritance in *Caenorhabditis elegans*." *Current Biology* 27.14 (2017): R720-R730.

Rodgers et al., 2015 Rodgers, Ali B., et al. "Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.44 (2015): 13699-13704.

Schumacher et al., 2005 Schumacher, Björn, et al. "Translational repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis." *Cell* 120.3 (2005): 357-368.

Sherrard et al., 2017 Sherrard, Ryan, et al. "miRNAs cooperate in apoptosis regulation during *C. elegans* development." *Genes & development* 31.2 (2017): 209-222.

Sun et al., 2017 Sun, Xiaojuan, Wei-Dong Chen, and Yan-Dong Wang. "DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity." *Frontiers in pharmacology* 8 (2017): 548.

Tabuchi et al., 2018 Tabuchi, Tomoko M., et al. "*Caenorhabditis elegans* sperm carry a histone-based epigenetic memory of both spermatogenesis and oogenesis." *Nature communications* 9.1 (2018): 1-11.

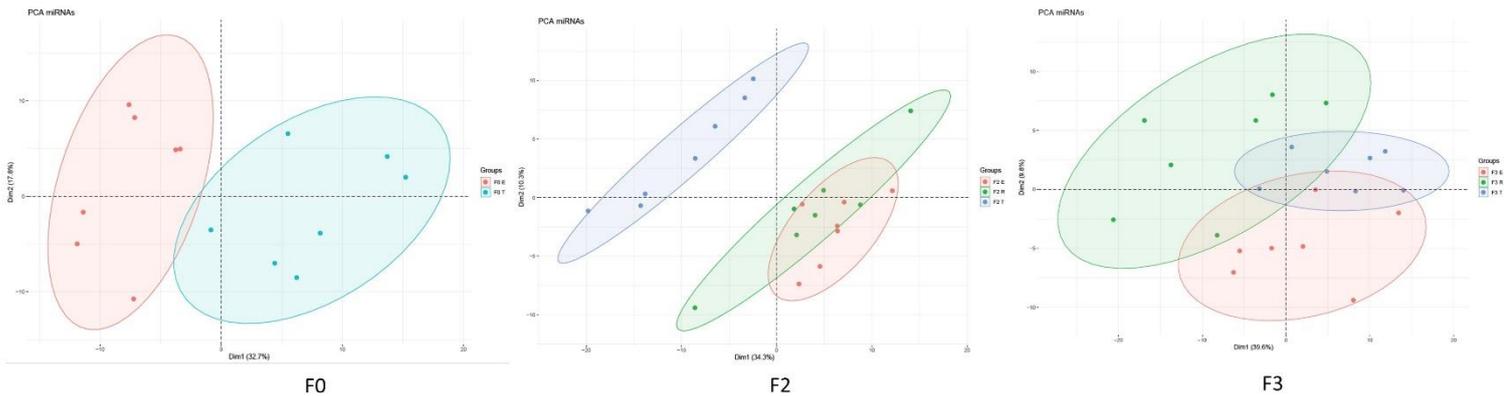
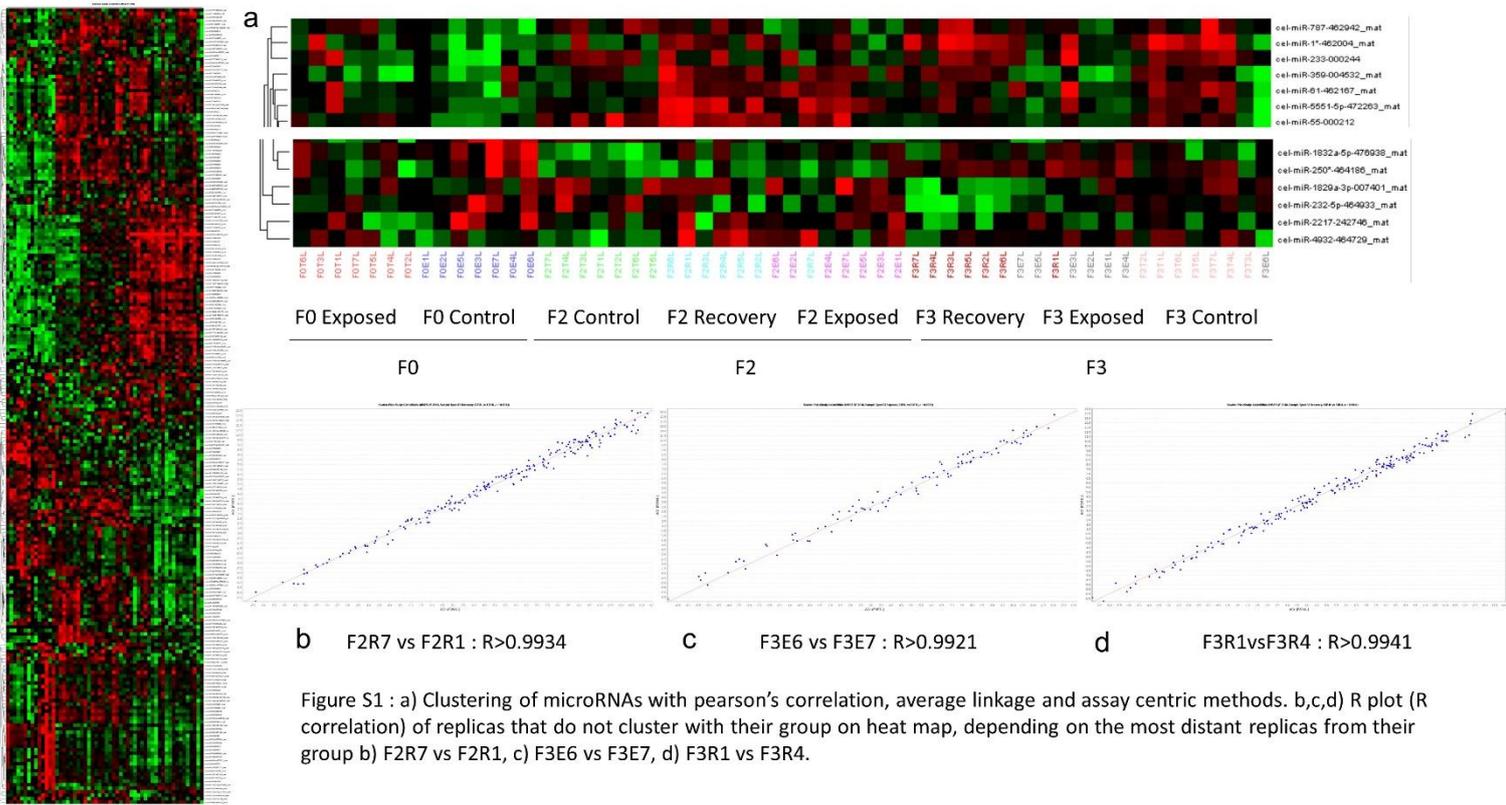
Taki et al., 2014 Taki, Faten A., et al. "Nicotine exposure and transgenerational impact: a prospective study on small regulatory microRNAs." *Scientific reports* 4.1 (2014): 1-15.

Tao et al., 2017 Tao, Bang-Bao, et al. "Evidence for the association of chromatin and microRNA regulation in the human genome." *Oncotarget* 8.41 (2017): 70958.

Tran et al., 2019 Tran, Anh T., et al. "MiR-35 buffers apoptosis thresholds in the *C. elegans* germline by antagonizing both MAPK and core apoptosis pathways." *Cell Death & Differentiation* 26.12 (2019): 2637-2651.

- Trijau et al., 2015 Trijau, Marie, et al. "Transgenerational DNA methylation changes in *Daphnia magna* exposed to chronic γ irradiation." *Environmental science & technology* 52.7 (2018): 4331-4339.
- UNSCEAR 2012 United Nations. Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Biological mechanisms of radiation actions at low doses: a white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. UN, 2012.
- Van Wynsberghe et al., 2014 Van Wynsberghe, Priscilla M., et al. "The Period protein homolog LIN-42 negatively regulates microRNA biogenesis in *C. elegans*." *Developmental biology* 390.2 (2014): 126-135.
- Vasamsetti et al., 2018 Vasamsetti, Bala Murali Krishna, Yang-Seo Park, and Nam Jeong Cho. "VIG-1 is required for maintenance of genome stability in *Caenorhabditis elegans*." *Animal cells and systems* 22.3 (2018): 197-204.
- Wang et al., 2017 Wang, Chris, et al. "TEG-1 CD2BP2 controls miRNA levels by regulating miRISC stability in *C. elegans* and human cells." *Nucleic acids research* 45.3 (2017): 1488-1500.
- Watson et al., 2018 Watson, Emma, and Albertha JM Walhout. "Caenorhabditis elegans metabolic gene regulatory networks govern the cellular economy." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25.10 (2014): 502-508.
- Xin et al., 2015 Xin, Frances, Martha Susiarjo, and Marisa S. Bartolomei. "Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation?." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 43. Academic Press, 2015.
- Xu et al., 2015 Xu, Shuai, et al. "Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect." *RNA biology* 12.12 (2015): 1355-1363.
- Yang et al., 2016 Yang, Ruilong, et al. "A mir-231-regulated protection mechanism against the toxicity of graphene oxide in nematode *Caenorhabditis elegans*." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-12.
- Zecic et al., 2020 Zečić, Aleksandra, and Bart P. Braeckman. "DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and its role in metabolic remodeling." *Cells* 9.1 (2020): 109.
- Zhou et al., 2019 Zhou, Yifei, et al. "A secreted microRNA disrupts autophagy in distinct tissues of *Caenorhabditis elegans* upon ageing." *Nature communications* 10.1 (2019): 1-14.

Supplementary data :



□ F3E □ F3R □ Overlap

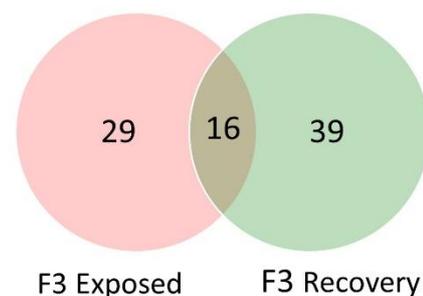
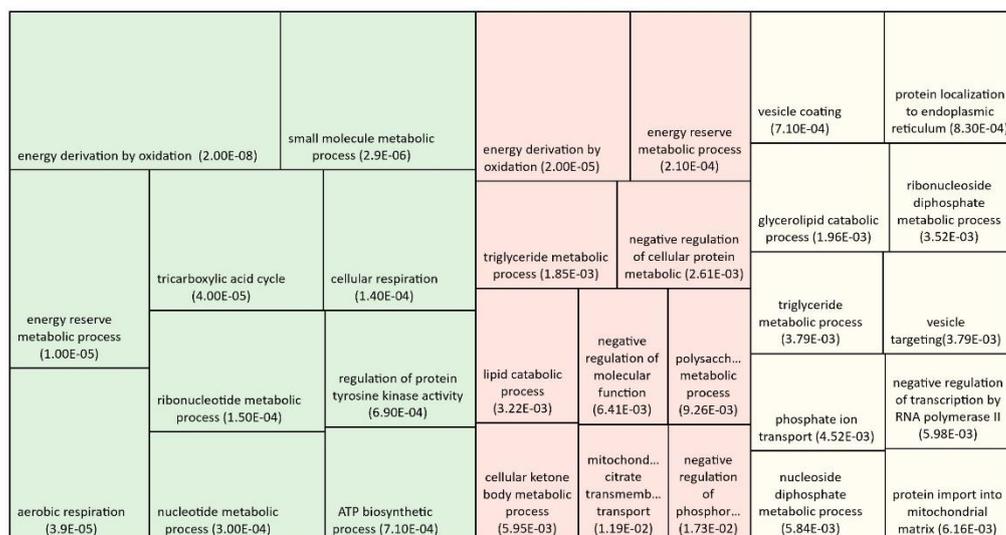


Figure S3 : Tree map of top non redundant enriched GO-term biological processes of the targeted mRNAs from specific recovery (green), exposed (red) and overlap miRNAs (orange).

Table S1 : List of differentially expressed miRNAs

Conditions	mirbase ID	FC	FDR	miRbase ACCESSION
FOE	cel-mir-1819-5p	2,407	0,103	MIMAT0020358
FOE	cel-mir-1820-5p	2,252	0,103	MIMAT0006587
FOE	cel-mir-1829c-5p	1,524	0,050	MIMAT0006771
FOE	cel-mir-2208b-3p	1,641	0,074	MIMAT0011430
FOE	cel-mir-2209a-3p	3,356	0,103	MIMAT0011432
FOE	cel-mir-2210-3p	2,746	0,103	MIMAT0011436
FOE	cel-mir-233-5p	0,608	0,030	MIMAT0020329
FOE	cel-mir-239b-3p	2,134	0,089	MIMAT0015115
FOE	cel-mir-239b-5p	2,071	0,103	MIMAT0000295
FOE	cel-mir-240-5p	2,218	0,103	MIMAT0015116
FOE	cel-mir-242	2,425	0,075	MIMAT0000298
FOE	cel-mir-243-3p	2,182	0,099	MIMAT0000299
FOE	cel-mir-245-3p	2,338	0,075	MIMAT0000301
FOE	cel-mir-247-3p	0,487	0,040	MIMAT0000303
FOE	cel-mir-249-3p	3,271	0,028	MIMAT0000305
FOE	cel-mir-35-3p	2,224	0,026	MIMAT0000006
FOE	cel-mir-354-3p	2,557	0,103	MIMAT0000696
FOE	cel-mir-354-5p	0,546	0,030	MIMAT0031894
FOE	cel-mir-355-5p	1,385	0,103	MIMAT0000697
FOE	cel-mir-35-5p	4,301	0,076	MIMAT0020303
FOE	cel-mir-359	1,325	0,103	MIMAT0000701
FOE	cel-mir-36-3p	2,340	0,003	MIMAT0000007
FOE	cel-mir-36-5p	2,086	0,037	MIMAT0020304
FOE	cel-mir-37-3p	3,178	0,026	MIMAT0000008
FOE	cel-mir-38-3p	3,777	0,016	MIMAT0000009
FOE	cel-mir-38-5p	3,092	0,003	MIMAT0020305

F0E	cel-mir-39-3p	2,392	0,026	MIMAT0000010
F0E	cel-mir-40-5p	1,578	0,076	MIMAT0020307
F0E	cel-mir-41-3p	3,612	0,026	MIMAT0000012
F0E	cel-mir-43-3p	1,626	0,074	MIMAT0020308
F0E	cel-mir-47-5p	2,808	0,079	MIMAT0015097
F0E	cel-mir-4936	1,678	0,074	MIMAT0020142
F0E	cel-mir-53-5p	3,120	0,034	MIMAT0000024
F0E	cel-mir-58a-3p	2,229	0,107	MIMAT0000030
F0E	cel-mir-58b-5p	2,204	0,103	MIMAT0020361
F0E	cel-mir-59-3p	1,334	0,089	MIMAT0000031
F0E	cel-mir-65-3p	2,565	0,103	MIMAT0015106
F0E	cel-mir-70-3p	1,504	0,103	MIMAT0000042
F0E	cel-mir-71-5p	2,177	0,007	MIMAT0000043
F0E	cel-mir-77-3p	1,936	0,037	MIMAT0000049
F0E	cel-mir-788-5p	0,529	0,020	MIMAT0004223
F0E	cel-mir-789-5p	1,814	0,026	MIMAT0032016
F0E	cel-mir-791-3p	0,747	0,076	MIMAT0004226
F0E	cel-mir-791-5p	2,220	0,103	MIMAT0020350
F0E	cel-mir-79-5p	1,538	0,099	MIMAT0020322
F2E	cel-let-7-3p	0,512	0,002	MIMAT0015091
F2E	cel-mir-124-3p	0,748	0,072	MIMAT0000282
F2E	cel-mir-1817	0,726	0,008	MIMAT0006584
F2E	cel-mir-1819-3p	1,408	0,028	MIMAT0006586
F2E	cel-mir-1820-5p	0,784	0,089	MIMAT0006587
F2E	cel-mir-1832a-5p	1,733	0,027	MIMAT0032039
F2E	cel-mir-2208b-3p	1,782	0,013	MIMAT0011430
F2E	cel-mir-2208b-5p	1,847	0,043	MIMAT0011429
F2E	cel-mir-2209a-3p	1,711	0,011	MIMAT0011432
F2E	cel-mir-2213-3p	2,264	0,075	MIMAT0011442
F2E	cel-mir-239a-3p	0,557	0,021	MIMAT0020334
F2E	cel-mir-239b-3p	0,630	0,037	MIMAT0015115
F2E	cel-mir-241-3p	0,739	0,075	MIMAT0020335
F2E	cel-mir-244-3p	0,730	0,080	MIMAT0015118
F2E	cel-mir-244-5p	0,767	0,075	MIMAT0000300
F2E	cel-mir-246-5p	0,493	0,005	MIMAT0020337
F2E	cel-mir-249-3p	2,354	0,004	MIMAT0000305
F2E	cel-mir-252-5p	0,776	0,059	MIMAT0000308
F2E	cel-mir-254-5p	0,695	0,052	MIMAT0031891
F2E	cel-mir-2953-5p	1,978	0,030	MIMAT0014446
F2E	cel-mir-34-3p	0,696	0,022	MIMAT0015093
F2E	cel-mir-35-3p	2,879	0,017	MIMAT0000006
F2E	cel-mir-354-3p	1,650	0,027	MIMAT0000696
F2E	cel-mir-35-5p	2,047	0,001	MIMAT0020303
F2E	cel-mir-36-3p	2,803	0,001	MIMAT0000007
F2E	cel-mir-36-5p	1,501	0,069	MIMAT0020304
F2E	cel-mir-37-3p	2,934	0,008	MIMAT0000008
F2E	cel-mir-37-5p	2,589	0,002	MIMAT0015094
F2E	cel-mir-38-3p	4,168	0,000	MIMAT0000009
F2E	cel-mir-38-5p	1,898	0,026	MIMAT0020305

F2E	cel-mir-39-3p	2,868	0,000	MIMAT0000010
F2E	cel-mir-40-3p	3,157	0,001	MIMAT0000011
F2E	cel-mir-41-3p	2,946	0,020	MIMAT0000012
F2E	cel-mir-41-5p	2,480	0,000	MIMAT0020770
F2E	cel-mir-42-5p	2,682	0,006	MIMAT0015095
F2E	cel-mir-43-3p	1,425	0,060	MIMAT0020308
F2E	cel-mir-44-3p	0,789	0,010	MIMAT0000015
F2E	cel-mir-44-5p	1,748	0,066	MIMAT0020771
F2E	cel-mir-45-5p	0,435	0,004	MIMAT0020772
F2E	cel-mir-4810b-3p	1,610	0,013	MIMAT0032822
F2E	cel-mir-4923a	1,493	0,022	MIMAT0020129
F2E	cel-mir-4932	1,702	0,098	MIMAT0020138
F2E	cel-mir-4936	1,813	0,085	MIMAT0020142
F2E	cel-mir-49-3p	0,782	0,035	MIMAT0000020
F2E	cel-mir-50-3p	0,541	0,022	MIMAT0020310
F2E	cel-mir-53-5p	0,708	0,008	MIMAT0000024
F2E	cel-mir-54-3p	0,772	0,022	MIMAT0000025
F2E	cel-mir-5546-3p	3,211	0,006	MIMAT0022184
F2E	cel-mir-56-5p	0,541	0,031	MIMAT0000027
F2E	cel-mir-58b-3p	1,475	0,070	MIMAT0006776
F2E	cel-mir-59-3p	0,737	0,042	MIMAT0000031
F2E	cel-mir-59-5p	0,680	0,060	MIMAT0015101
F2E	cel-mir-67-3p	0,671	0,010	MIMAT0000039
F2E	cel-mir-70-5p	0,769	0,022	MIMAT0020317
F2E	cel-mir-71-5p	1,621	0,038	MIMAT0000043
F2E	cel-mir-72-3p	1,598	0,000	MIMAT0020318
F2E	cel-mir-74-5p	1,776	0,004	MIMAT0020320
F2E	cel-mir-77-3p	1,341	0,094	MIMAT0000049
F2E	cel-mir-78	1,374	0,008	MIMAT0000050
F2E	cel-mir-784-5p	1,235	0,074	MIMAT0004219
F2E	cel-mir-787-3p	0,610	0,010	MIMAT0004222
F2E	cel-mir-788-5p	0,455	0,001	MIMAT0004223
F2E	cel-mir-789-2-5p	0,741	0,063	MIMAT0032017
F2E	cel-mir-792-3p	0,734	0,070	MIMAT0004227
F2E	cel-mir-79-3p	0,750	0,002	MIMAT0000051
F2E	cel-mir-79-5p	0,726	0,075	MIMAT0020322
F2E	cel-mir-797-5p	0,702	0,053	MIMAT0004232
F2R	cel-let-7-3p	0,634	0,008	MIMAT0015091
F2R	cel-let-7-5p	0,657	0,023	MIMAT0000001
F2R	cel-lin-4-5p	0,764	0,063	MIMAT0000002
F2R	cel-mir-1819-3p	1,210	0,041	MIMAT0006586
F2R	cel-mir-1820-5p	0,695	0,026	MIMAT0006587
F2R	cel-mir-1822-3p	0,726	0,027	MIMAT0006589
F2R	cel-mir-1823-3p	2,078	0,012	MIMAT0006590
F2R	cel-mir-2210-3p	0,774	0,041	MIMAT0011436
F2R	cel-mir-2218a-5p	0,539	0,042	MIMAT0011455
F2R	cel-mir-238-3p	0,736	0,068	MIMAT0000293
F2R	cel-mir-239a-5p	0,650	0,014	MIMAT0000294
F2R	cel-mir-239b-3p	0,555	0,008	MIMAT0015115

F2R	cel-mir-240-3p	0,537	0,009	MIMAT0000296
F2R	cel-mir-241-3p	0,554	0,005	MIMAT0020335
F2R	cel-mir-244-3p	0,659	0,041	MIMAT0015118
F2R	cel-mir-244-5p	0,777	0,058	MIMAT0000300
F2R	cel-mir-246-5p	0,353	0,002	MIMAT0020337
F2R	cel-mir-252-5p	0,730	0,015	MIMAT0000308
F2R	cel-mir-254-5p	0,530	0,008	MIMAT0031891
F2R	cel-mir-255-3p	0,709	0,013	MIMAT0004216
F2R	cel-mir-34-3p	0,686	0,025	MIMAT0015093
F2R	cel-mir-35-3p	1,997	0,007	MIMAT0000006
F2R	cel-mir-35-5p	1,829	0,009	MIMAT0020303
F2R	cel-mir-36-3p	2,279	0,001	MIMAT0000007
F2R	cel-mir-36-5p	1,470	0,086	MIMAT0020304
F2R	cel-mir-37-3p	2,349	0,001	MIMAT0000008
F2R	cel-mir-37-5p	2,672	0,054	MIMAT0015094
F2R	cel-mir-38-3p	2,324	0,004	MIMAT0000009
F2R	cel-mir-39-3p	1,928	0,007	MIMAT0000010
F2R	cel-mir-40-3p	2,712	0,005	MIMAT0000011
F2R	cel-mir-41-3p	3,435	0,002	MIMAT0000012
F2R	cel-mir-41-5p	2,349	0,000	MIMAT0020770
F2R	cel-mir-42-3p	0,741	0,037	MIMAT0000013
F2R	cel-mir-42-5p	2,776	0,007	MIMAT0015095
F2R	cel-mir-45-5p	0,652	0,039	MIMAT0020772
F2R	cel-mir-4811-3p	0,656	0,056	MIMAT0019997
F2R	cel-mir-4932	2,416	0,036	MIMAT0020138
F2R	cel-mir-4936	1,320	0,086	MIMAT0020142
F2R	cel-mir-49-3p	0,691	0,012	MIMAT0000020
F2R	cel-mir-50-3p	0,573	0,026	MIMAT0020310
F2R	cel-mir-53-5p	0,774	0,052	MIMAT0000024
F2R	cel-mir-54-3p	0,698	0,020	MIMAT0000025
F2R	cel-mir-54-5p	0,753	0,073	MIMAT0020773
F2R	cel-mir-5545-5p	0,661	0,051	MIMAT0022181
F2R	cel-mir-5546-3p	1,785	0,036	MIMAT0022184
F2R	cel-mir-5551-5p	1,262	0,011	MIMAT0022193
F2R	cel-mir-58b-5p	2,432	0,051	MIMAT0020361
F2R	cel-mir-59-3p	0,715	0,041	MIMAT0000031
F2R	cel-mir-59-5p	0,565	0,015	MIMAT0015101
F2R	cel-mir-64-3p	0,552	0,041	MIMAT0015105
F2R	cel-mir-67-3p	0,712	0,039	MIMAT0000039
F2R	cel-mir-71-5p	1,413	0,003	MIMAT0000043
F2R	cel-mir-72-3p	1,492	0,001	MIMAT0020318
F2R	cel-mir-74-5p	1,737	0,016	MIMAT0020320
F2R	cel-mir-788-5p	0,521	0,005	MIMAT0004223
F2R	cel-mir-789-2-5p	0,703	0,039	MIMAT0032017
F2R	cel-mir-792-3p	0,528	0,010	MIMAT0004227
F2R	cel-mir-79-3p	0,747	0,008	MIMAT0000051
F2R	cel-mir-797-5p	0,697	0,039	MIMAT0004232
F3E	cel-mir-1819-3p	1,319	0,053	MIMAT0006586
F3E	cel-mir-1819-5p	1,320	0,012	MIMAT0020358

F3E	cel-mir-1821-3p	1,475	0,028	MIMAT0006588
F3E	cel-mir-1823-3p	2,220	0,001	MIMAT0006590
F3E	cel-mir-1832a-5p	1,694	0,014	MIMAT0032039
F3E	cel-mir-2208b-3p	1,394	0,066	MIMAT0011430
F3E	cel-mir-2209a-3p	1,485	0,012	MIMAT0011432
F3E	cel-mir-230-3p	1,243	0,053	MIMAT0000285
F3E	cel-mir-233-5p	1,334	0,080	MIMAT0020329
F3E	cel-mir-240-5p	1,218	0,013	MIMAT0015116
F3E	cel-mir-241-5p	1,245	0,039	MIMAT0000297
F3E	cel-mir-249-3p	1,938	0,103	MIMAT0000305
F3E	cel-mir-250-3p	1,201	0,053	MIMAT0000306
F3E	cel-mir-250-5p	1,410	0,029	MIMAT0020339
F3E	cel-mir-259-3p	0,546	0,053	MIMAT0020342
F3E	cel-mir-2953-5p	2,109	0,072	MIMAT0014446
F3E	cel-mir-35-3p	1,351	0,024	MIMAT0000006
F3E	cel-mir-354-3p	1,825	0,049	MIMAT0000696
F3E	cel-mir-355-5p	1,218	0,072	MIMAT0000697
F3E	cel-mir-35-5p	1,377	0,050	MIMAT0020303
F3E	cel-mir-36-3p	1,339	0,027	MIMAT0000007
F3E	cel-mir-37-3p	1,542	0,012	MIMAT0000008
F3E	cel-mir-39-3p	1,230	0,097	MIMAT0000010
F3E	cel-mir-42-3p	1,533	0,014	MIMAT0000013
F3E	cel-mir-42-5p	1,572	0,023	MIMAT0015095
F3E	cel-mir-43-3p	1,569	0,018	MIMAT0020308
F3E	cel-mir-43-5p	1,937	0,053	MIMAT0020308
F3E	cel-mir-44-5p	1,698	0,012	MIMAT0020771
F3E	cel-mir-4810b-3p	1,406	0,103	MIMAT0032822
F3E	cel-mir-4923b	1,869	0,012	MIMAT0020131
F3E	cel-mir-4936	1,365	0,053	MIMAT0020142
F3E	cel-mir-49-5p	1,303	0,087	MIMAT0020309
F3E	cel-mir-52-3p	1,454	0,053	MIMAT0020311
F3E	cel-mir-54-5p	1,519	0,029	MIMAT0020773
F3E	cel-mir-5546-3p	1,746	0,012	MIMAT0022184
F3E	cel-mir-56-5p	0,657	0,097	MIMAT0000027
F3E	cel-mir-57-3p	1,432	0,014	MIMAT0020314
F3E	cel-mir-59-5p	1,295	0,080	MIMAT0015101
F3E	cel-mir-71-5p	1,312	0,103	MIMAT0000043
F3E	cel-mir-72-5p	1,222	0,014	MIMAT0000044
F3E	cel-mir-77-3p	1,284	0,049	MIMAT0000049
F3E	cel-mir-789-5p	1,314	0,084	MIMAT0032016
F3E	cel-mir-794-5p	1,321	0,090	MIMAT0004229
F3E	cel-mir-795-5p	1,256	0,050	MIMAT0004230
F3E	cel-mir-87-3p	1,236	0,021	MIMAT0000060
F3R	cel-let-7-3p	2,024	0,002	MIMAT0015091
F3R	cel-lsy-6-3p	1,848	0,006	MIMAT0000749
F3R	cel-mir-1018	1,903	0,020	MIMAT0005031
F3R	cel-mir-1022-5p	1,535	0,027	MIMAT0005523
F3R	cel-mir-1819-3p	1,303	0,041	MIMAT0006586
F3R	cel-mir-1819-5p	1,323	0,002	MIMAT0020358

F3R	cel-mir-1820-5p	1,316	0,061	MIMAT0006587
F3R	cel-mir-1821-3p	1,535	0,008	MIMAT0006588
F3R	cel-mir-1823-3p	1,366	0,078	MIMAT0006590
F3R	cel-mir-1829a-3p	0,227	0,028	MIMAT0006769
F3R	cel-mir-1830-3p	1,484	0,024	MIMAT0020778
F3R	cel-mir-229-3p	1,540	0,013	MIMAT0015112
F3R	cel-mir-229-5p	1,217	0,041	MIMAT0000284
F3R	cel-mir-230-3p	1,290	0,058	MIMAT0000285
F3R	cel-mir-231-3p	1,324	0,092	MIMAT0000286
F3R	cel-mir-232-5p	0,605	0,020	MIMAT0020777
F3R	cel-mir-242	1,201	0,037	MIMAT0000298
F3R	cel-mir-243-3p	1,271	0,052	MIMAT0000299
F3R	cel-mir-244-3p	1,470	0,022	MIMAT0015118
F3R	cel-mir-244-5p	1,341	0,091	MIMAT0000300
F3R	cel-mir-246-5p	1,971	0,031	MIMAT0020337
F3R	cel-mir-247-5p	2,292	0,060	MIMAT0015119
F3R	cel-mir-2953-5p	2,140	0,030	MIMAT0014446
F3R	cel-mir-354-3p	2,039	0,006	MIMAT0000696
F3R	cel-mir-358-3p	1,207	0,057	MIMAT0000700
F3R	cel-mir-36-5p	1,290	0,087	MIMAT0020304
F3R	cel-mir-42-3p	1,266	0,089	MIMAT0000013
F3R	cel-mir-43-3p	1,478	0,016	MIMAT0020308
F3R	cel-mir-4923b	1,849	0,018	MIMAT0020131
F3R	cel-mir-4925	1,694	0,006	MIMAT0020132
F3R	cel-mir-4936	1,260	0,024	MIMAT0020142
F3R	cel-mir-54-3p	1,229	0,092	MIMAT0000025
F3R	cel-mir-56-3p	1,308	0,039	MIMAT0000028
F3R	cel-mir-57-5p	1,552	0,006	MIMAT0000029
F3R	cel-mir-58a-5p	1,371	0,054	MIMAT0015100
F3R	cel-mir-59-5p	1,333	0,039	MIMAT0015101
F3R	cel-mir-62	1,491	0,024	MIMAT0000034
F3R	cel-mir-66-3p	1,561	0,028	MIMAT0020315
F3R	cel-mir-70-3p	1,310	0,061	MIMAT0000042
F3R	cel-mir-71-5p	1,521	0,040	MIMAT0000043
F3R	cel-mir-76-3p	1,412	0,054	MIMAT0000048
F3R	cel-mir-77-3p	1,353	0,037	MIMAT0000049
F3R	cel-mir-785-3p	1,645	0,035	MIMAT0004220
F3R	cel-mir-788-5p	1,679	0,003	MIMAT0004223
F3R	cel-mir-791-5p	1,434	0,041	MIMAT0020350
F3R	cel-mir-793	1,285	0,054	MIMAT0004228
F3R	cel-mir-794-5p	1,727	0,015	MIMAT0004229
F3R	cel-mir-79-5p	1,736	0,020	MIMAT0020322
F3R	cel-mir-797-5p	1,737	0,036	MIMAT0004232
F3R	cel-mir-799	1,263	0,022	MIMAT0004234
F3R	cel-mir-800-5p	1,294	0,022	MIMAT0020354
F3R	cel-mir-81-3p	1,373	0,024	MIMAT0000054
F3R	cel-mir-83-5p	1,489	0,040	MIMAT0020775
F3R	cel-mir-86-5p	1,236	0,022	MIMAT0000059
F3R	cel-mir-87-3p	1,264	0,039	MIMAT0000060

Table S2 : A summary of master regulators targeted by miRNAs in network analysis (Figure 4)

mRNAs TARGETED ²	mRNAs Functions	HUMAN ORTHOLOG	MIRNAS
age-1 (AGEing alteration)	Is predicted to have 1-phosphatidylinositol-3-kinase activity. Is involved in several processes, including dauer entry; insulin receptor signaling pathway involved in determination of adult lifespan; and regulation of synaptic growth at neuromuscular junction.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in several diseases, including CLOVES syndrome; epidermal nevus; and gastrointestinal system cancer (multiple). Is an ortholog of human PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) and PIK3CD (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta).	cel-mir-71-5p
akap-1 (A-Kinase Anchor Protein, mitochondrial homolog)	Is predicted to have RNA binding activity and protein kinase A regulatory subunit binding activity. Is expressed in several structures, including gonad and neurons.	Is an ortholog of human AKAP1 (A-kinase anchoring protein 1).	cel-mir-1820-5p
atgl-1 (Adipose TriGlyceride Lipase)	Is predicted to have triglyceride lipase activity. Localizes to lipid droplet. Human ortholog(s) of this gene are implicated in autosomal recessive congenital ichthyosis 10.	Is an ortholog of human PNPLA2 (patatin like phospholipase domain containing 2) and PNPLA3 (patatin like phospholipase domain containing 3).	cel-mir-53-5p; cel-mir-71-5p
bet-2 (BET (two bromodomains) family protein)	Is enriched in OLL; PVD; and germ line based on proteomic; microarray; and RNA-seq studies. Is affected by several genes including daf-2; daf-12; and dpy-10. Is affected by seven chemicals including rotenone; Cry5B; and Quercetin based on RNA-seq and microarray studies.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in spermatogenic failure 21. Human BRD2 exhibits chromatin binding activity and lysine-acetylated histone binding activity. Is predicted to encode a protein with the following domains: Bromodomain; Bromodomain; and Bromodomain-like superfamily. Is an ortholog of human BRD2 (bromodomain containing 2) and BRDT (bromodomain testis associated).	cel-mir-1819-3p
camt-1 (CAMTA (CAIModulin-binding Transcriptional activator))	Is predicted to have DNA binding activity.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in nonprogressive cerebellar ataxia with mental retardation. Is an ortholog of human CAMTA2 (calmodulin binding transcription activator 2).	cel-mir-35-3p; cel-mir-36-3p; cel-mir-37-3p; cel-mir-38-3p; cel-mir-39-3p
egg-6 (EGG sterile (unfertilizable))	Is expressed in excretory system; neurons; pharynx; rectal epithelial cell; and vulva. Is predicted to encode a protein with the following domains: Leucine rich repeat; Leucine rich repeat; Leucine-rich repeat, typical subtype; and Leucine-rich repeat domain superfamily.		cel-mir-53-5p; cel-mir-71-5p; cel-mir-354-3p
erfa-3 (Eukaryotic Release FAcTOR homolog)	Is predicted to have GTP binding activity and GTPase activity.	Is an ortholog of human GSPT1 (G1 to S phase transition 1).	cel-mir-59-3p; cel-mir-1819-3p
gld-1 (defective in Germ Line Development)	Exhibits mRNA 3'-UTR binding activity; mRNA 5'-UTR binding activity; and single-stranded RNA binding activity. Is involved in several processes, including negative regulation of macromolecule metabolic process; oocyte fate determination; and positive regulation of female gonad development.	Is an ortholog of human QKI (QKI, KH domain containing RNA binding).	cel-mir-35-3p
hbl-1 (HunchBack Like (fly gap gene related))	Exhibits RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding activity. Is involved in several processes, including negative regulation of transcription by RNA polymerase II; nematode larval development; and oviposition. Localizes to nucleus.	Is an ortholog of human ZNF131 (zinc finger protein 131); ZNF518A (zinc finger protein 518A); and ZNF518B (zinc finger protein 518B).	cel-mir-71-5p
hosl-1 (HORMone-Sensitive Lipase homolog)	Is predicted to have lipase activity. Is expressed in tail. Human ortholog(s) of this gene are implicated in familial partial lipodystrophy type 6.	Is an ortholog of human LIPE (lipase E, hormone sensitive type).	cel-mir-249-3p
lin-23 (abnormal cell LINeage)	Exhibits beta-catenin binding activity and phosphatase binding activity. Is involved in several processes, including negative regulation of centrosome duplication; regulation of protein stability; and ubiquitin-dependent protein catabolic process.	Is an ortholog of human FBXW11 (F-box and WD repeat domain containing 11).	cel-mir-35-3p
lin-42 (abnormal cell LINeage)	Exhibits RNA polymerase II transcription factor binding activity. Is involved in negative regulation of dauer larval development; negative regulation of pri-miRNA transcription by RNA polymerase II; and regulation of development, heterochronic.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in advanced sleep phase syndrome 1 and advanced sleep phase syndrome 3. Is an ortholog of human PER2 (period circadian regulator 2).	cel-mir-71-5p
mig-38 (abnormal cell MIGration)	Is predicted to have copper ion binding activity; primary amine oxidase activity; and quinone binding activity. Is expressed in gonad; head; neurons; somatic gonad precursor; and tail.	Is an ortholog of human BICRAL (BRD4 interacting chromatin remodeling complex associated protein like).	cel-mir-249-3p
nkb-3 (Na ⁺ /K ⁺ ATPase, Beta subunit)	Is enriched in AVK; head mesodermal cell; intestine; and muscle cell based on RNA-seq and microarray studies. Is affected by several genes including <i>egl-1</i> ; <i>let-7</i> ; and <i>dpy-10</i> .	Human ATP1B1 exhibits ATPase activator activity and ATPase binding activity. Is an ortholog of human ATP1B1 (ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1); ATP1B2 (ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2); and ATP1B3 (ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 3).	cel-mir-71-5p
pkg-2 (Protein Kinase, cGMP-dependent)	Is predicted to have ATP binding activity and cGMP-dependent protein kinase activity.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in thoracic aortic aneurysm. Is an ortholog of human PRKG1 (protein kinase cGMP-dependent 1).	cel-mir-71-5p
pkn-1 (Protein Kinase N (PKN) homolog)	Is predicted to have ATP binding activity and protein serine/threonine kinase activity. Localizes to M band and striated muscle dense body. Is expressed in neurons and pharyngeal muscle cell.	Is an ortholog of human PKN3 (protein kinase N3).	cel-mir-1820-5p
saeg-2 (Suppressor of Activated EGL-4)	Is predicted to have DNA binding activity. Localizes to nucleus.	Is an ortholog of human DNTIP1 (deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 1).	cel-mir-1820-5p
sams-3 (S-Adenosyl Methionine Synthetase)	Is predicted to have ATP binding activity; metal ion binding activity; and methionine adenosyltransferase activity.	Is an ortholog of human MAT1A (methionine adenosyltransferase 1A) and MAT2A (methionine adenosyltransferase 2A).	cel-mir-37-3p
snrp-200 (Small Nuclear RibonucleoProtein homolog)	Is predicted to have ATP binding activity; RNA helicase activity; and nucleic acid binding activity. Is expressed in excretory cell; gonad; head ganglion; intestine; and pharynx.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in retinitis pigmentosa 33. Is an ortholog of human SNRNP200 (small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200).	cel-mir-355-5p
swn-7 (SWI/SNF nucleosome remodeling complex component)	Is predicted to have DNA binding activity. Is used to study alcohol use disorder.	Human ortholog(s) of this gene are implicated in Coffin-Siris syndrome 6. Is an ortholog of human ARID2 (AT-rich interaction domain 2).	cel-mir-1820-5p
tia-1 (TIA-1/TIAL RNA binding protein homolog)	Is predicted to have RNA binding activity. Is involved in several processes, including determination of adult lifespan; nematode larval development; and response to UV.	Is an ortholog of human TIA1 (TIA1 cytotoxic granule associated RNA binding protein) and TIAL1 (TIA1 cytotoxic granule associated RNA binding protein like 1).	cel-mir-1820-5p
vig-1 (VIG (Drosophila Vasa Intronic Gene) ortholog)	Is predicted to have RNA binding activity. Localizes to RISC complex. Is expressed in neurons.	Is an ortholog of human SERBP1 (SERPINE1 mRNA binding protein 1).	cel-mir-77-3p
zip-10 (bZIP transcription factor family)	Exhibits core promoter binding activity. Is involved in regulation of gene expression. Localizes to nucleus. Is expressed in neurons.		cel-mir-71-5p

Table S3 : Overexpressed miRNAs correlated with the measured expression of their validated target by RNA-Seq

MiRNAs TLDA			RNA Seq			
Generation	mir	FC	GenestableID	log2FC	padj	Gene name
F2E	cel-mir-71-5p	1,621	WBGene00010321	-0,700	1,25E-02	F59B10.5
	cel-mir-78	1,374	WBGene00010321	-0,700	1,25E-02	
	cel-mir-71-5p	1,621	WBGene00018572	-0,728	7,01E-05	lin-42
	cel-mir-58b-3p	1,475	WBGene00022679	-1,057	6,90E-05	ZK180.5
cel-mir-71-5p	1,621					
F2R	cel-mir-1819-3p	1,210	WBGene00009218	-0,561	4,05E-05	acs-20
	cel-mir-71-5p	1,413	WBGene00007170	-0,561	1,11E-02	B0393.5
	cel-mir-71-5p	1,413	WBGene00015541	-0,524	1,52E-03	C06E7.4
	cel-mir-71-5p	1,413	WBGene00010321	-0,852	3,49E-03	F59B10.5
	cel-mir-1823-3p	2,078	WBGene00019148	-1,008	6,05E-04	H03E18.1
	cel-mir-238-3p	0,736	WBGene00010256	0,718	2,36E-02	hrg-3
	cel-mir-239a-5p	0,650				
	cel-mir-71-5p	1,413	WBGene00018572	-1,324	1,57E-14	lin-42
	cel-mir-1819-3p	1,210	WBGene00012256	-1,448	6,97E-03	lpr-5
	cel-mir-71-5p	1,413				
cel-mir-71-5p	1,413	WBGene00022679	-1,320	5,02E-07	ZK180.5	
F3E	cel-mir-355-5p	1,218	WBGene00015172	-0,988	6,10E-09	B0410.3
	cel-mir-71-5p	1,312	WBGene00015541	-0,715	7,06E-04	C06E7.4
	cel-mir-71-5p	1,312	WBGene00007405	-0,555	4,89E-04	C07A9.9
	cel-mir-250-3p	1,201	WBGene00015619	-0,830	2,00E-06	C08G9.1
	cel-mir-43-3p	1,569				
	cel-mir-1821-3p	1,475	WBGene00016407	-0,696	3,74E-04	unk-1
	cel-mir-43-3p	1,569				
	cel-mir-1819-5p	1,320	WBGene00008711	-0,562	1,64E-02	F11E6.8
	cel-mir-87-3p	1,236	WBGene00017563	-0,632	1,86E-05	F18C5.10
	cel-mir-71-5p	1,312	WBGene00017834	-0,689	3,11E-07	F26F12.3
cel-mir-355-5p	1,218	WBGene00018602	-0,509	6,67E-05	F48D6.4	
cel-mir-87-3p	1,236	WBGene00011692	-1,097	2,86E-09	T10G3.1	
F3R	cel-mir-358-3p	1,207	WBGene00015619	-0,619	2,27E-04	C08G9.1
	cel-mir-43-3p	1,478				
	cel-mir-797-5p	1,737				
	cel-mir-1022-5p	1,535	WBGene00016407	-0,838	2,02E-06	unk-1
	cel-mir-1821-3p	1,535				
	cel-mir-43-3p	1,478				
	cel-mir-62	1,491				
	cel-mir-1820-5p	1,316	WBGene00008436	-0,625	3,33E-06	DH11.2
	cel-mir-788-5p	1,679				
	cel-lsy-6-3p	1,848	WBGene00017717	-0,628	1,71E-03	F22F4.4
	cel-lsy-6-3p	1,848	WBGene00017834	-0,522	7,72E-05	F26F12.3
	cel-mir-231-3p	1,324				
	cel-lsy-6-3p	1,848	WBGene00009677	-0,793	1,45E-04	F44A6.5
	cel-mir-785-3p	1,645				
	cel-mir-81-3p	1,373				
cel-mir-797-5p	1,737	WBGene00010047	-0,642	8,11E-04	F54D1.6	
cel-mir-243-3p	1,271	WBGene00011154	-0,657	1,36E-02	R09A8.5	
cel-lsy-6-3p	1,848	WBGene00011692	-0,541	3,14E-03	T10G3.1	
cel-mir-1820-5p	1,316	WBGene00011692	-0,541	3,14E-03	T10G3.1	
cel-mir-1823-3p	1,366					
	cel-mir-229-5p	1,217	WBGene00012140	-0,754	1,63E-04	T28F4.5
	cel-lsy-6-3p	1,848				
	cel-mir-1018	1,903				
	cel-mir-1819-3p	1,303				
	cel-mir-81-3p	1,373	WBGene00010755	-0,621	1,33E-03	vglu-2
	cel-mir-1022-5p	1,535				
	cel-mir-81-3p	1,373	WBGene00022313	-0,780	1,38E-02	Y77E11A.12
	cel-mir-43-3p	1,478				
	cel-mir-797-5p	1,737				

IV.3 Principales conclusions

La deuxième question de recherche consiste à analyser le rôle des miRNAs et les fonctions biologiques médiées par ces derniers, en réponse à l'irradiation chronique, ainsi que leur impact dans un contexte multi- et transgénérationnel.

Dans un premier temps, nous démontrons que l'irradiation chronique impacte les miRNAs sur l'ensemble des générations des cohortes exposées et recovery. En effet, nous mesurons 45, 67 et 45 DEmiR (differentially expressed miRNAs), respectivement sur les générations exposées F0E, F2E et F3E. Sur les générations recovery, 59 et 55 DEmiR sont respectivement modulés sur les générations F2R et F3R. Pour analyser les fonctions biologiques modulées par les DEmiR et dans un souci de cohérence avec la robustesse de l'analyse, nous n'utilisons que les ARNm ciblés par les miRNAs dont l'interaction est validée expérimentalement.

L'analyse des fonctions biologiques modulées par les miRNAs sur les 4 générations continuellement exposées démontre un impact sur le métabolisme (lipide, nucléotide et mitochondrie), des voies de signalisation biologique, de la transcription et du transport transmembranaire. Ces données sont cohérentes avec notre analyse transcriptomique et les données de la littérature faisant un lien étroit entre la modulation du métabolisme et la réponse au stress ainsi que la reproduction (Dufourcq-Sekatcheff et al., 2021; M. Hansen et al., 2013; Zečić & Braeckman, 2020). La modulation des voies de signalisation est approfondie par l'analyse des miRNAs directement impliqués dans la régulation des voies métaboliques et biochimiques (Kegg Pathway). Cette analyse démontre l'implication des miRNAs dans la régulation de diverses voies dont les MAP kinases, DAF-16/FOXO, l'endocytose, la phagocytose ou encore la biosynthèse des glycosaminoglycanes, des molécules notamment impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire.

L'enrichissement phénotypique des ARNm ciblés par les miRNAs met en avant un impact sur le développement et la reproduction. De nombreux miRNAs sont impliqués dans la régulation du développement, de la mise en place et du maintien de la lignée germinale ainsi que dans la reproduction. Par exemple, la famille mir-35, composée des miRNAs 35 à 42, est essentielle au développement de la lignée germinale. La délétion des miRNAs 34 à 41 impacte la production de spermatozoïdes, le fonctionnement de la gonade et la fécondité (McJunkin & Ambros, 2014). La délétion des enzymes *pacha* et *drosha*, essentielle à la biogenèse des miRNAs canoniques, bloque le développement des embryons, mais peut être relancée grâce à l'introduction de *mir-35* (Dexheimer et al., 2020).

Une des questions centrales de cet article était de déterminer la présence, ou non, d'une réponse multigénérationnelle, c'est-à-dire de la présence de DEmiRs sur plus d'une génération. Nous démontrons la modulation de 37 miRNAs dans au moins 2 générations et de 13 miRNAs sur l'ensemble des générations. La modélisation d'un réseau d'interaction entre les 37 DEmiRs et leurs cibles validées expérimentalement fournit quatre informations principales. Premièrement, certains DEmiRs agissent ensemble pour réguler les mêmes ARN messagers, un mécanisme de sécurité qualifié de redondance fonctionnelle, permettant notamment de compenser une potentielle perte de fonctions.

Deuxièmement, certains gènes ciblés par les miRNAs de ce réseau sont des facteurs de transcriptions ou des gènes ayant une influence importante sur des processus biologiques. Par exemple, les protéines kinases *pkg-2* *pkn-1* et l'orthologue de la PIK3CA humaine, *age-1*, étudié pour son rôle dans le développement, le vieillissement et la voie DAF-2/DAF-16. Notons la régulation de *gld-1* par les membres de la famille mir-35, un gène impliqué dans le développement des gamètes, de la lignée germinale ainsi que dans

le développement embryonnaire et l'apoptose. La protéine VIG-1, un composant essentiel du complexe RISC et de la stabilité du génome en réponse à un stress génotoxique, est également une cible de ce réseau (Vasamsetti et al., 2018).

Troisièmement, ce réseau de miRNAs module des gènes impliqués dans le métabolisme et la production d'énergie, la régulation des tyrosines kinases comme précédemment évoquée ou encore le transport transmembranaire. Les processus biologiques évoqués font échos aux processus modulés sur chaque génération, laissant supposer qu'une réponse multigénérationnelle se met en place pour moduler prioritairement ces fonctions biologiques.

Enfin, la réponse multigénérationnelle est en partie médiée par des familles de miRNAs. La famille *mir-35*, dont 4 membres ainsi que des membres de la famille *mir-238* et *mir-58*, impliqués dans la reproduction, la régulation de la lignée germinale et la réponse au stress, sont surexprimés sur l'ensemble des générations continuellement exposées. *Mir-71*, un miRNA impliqué dans la réponse au stress et la régulation de DAF-16 en réponse à des signaux de la lignée germinale est également modulé sur l'ensemble des générations.

La deuxième partie de cette question de recherche est de déterminer le rôle des miRNAs dans l'héritage transgénérationnel. Parmi les dix DEmiRs régulés en commun sur les générations F2R et F3R, huit sont réprimés en F2 et surexprimés en F3, laissant penser à une cessation des effets maternels. *Mir-1823-3p* et *mir-1819-3p* sont surexprimés en F2 et en F3 suggérant une transmission transgénérationnelle. De plus, cinq DEmiRs sont modulés sur la génération parentale et les générations F2R et F3R. *Mir-36-5p*, *mir-71-5p* et *mir-4936* sont régulés sur les 3 générations, indiquant un héritage transgénérationnel de la F0 à la F3R. En outre, l'analyse en composante principale (ACP) montre clairement que la cohorte recovery de la quatrième génération (F3R) est différente de la cohorte contrôle et de la cohorte exposée. Ces données suggèrent fortement que des miRNAs sont exprimés en réponse à l'irradiation parentale puis transmis au fil des générations. La transmission de miRNAs a également été démontrée chez *C. elegans*, sur 2 générations après exposition parentale à la nicotine (Taki et al., 2015).

De plus, nous démontrons que les miRNAs et les processus biologiques diffèrent entre la cohorte recovery et la cohorte exposée de la quatrième génération. La cohorte recovery module spécifiquement la synthèse de l'ATP et des nucléotides, la respiration cellulaire et l'activité des protéines kinases. Bien qu'une modulation de la synthèse de l'ATP et des nucléotides puisse engendrer des conséquences délétères au niveau de l'organisme, il peut également s'agir d'un signal de réponse au stress permettant de conférer un avantage sélectif de l'organisme. En effet, il a récemment été démontré que la modulation du taux de nucléotides entraîne une modulation de la reproduction et du métabolisme via ENDU-2 et CTPS-1, permettant d'améliorer la résistance au stress génotoxique (Jia et al., 2020). De la même façon, le stress mitochondrial et la modulation de la production d'ATP peuvent entraîner un héritage transgénérationnel dans le but d'améliorer la réponse de la descendance (Ma et al., 2019).

Cet article démontre la mise en place d'une réponse multigénérationnelle et transgénérationnelle des miRNAs, notamment médié par la famille *mir-35* et *mir-71*.

V. Discussion générale et perspectives

Bien que des différences de radiosensibilité entre espèces aient été largement observées au cours de ces dernières décennies, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont une énigme scientifique de longue date (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation UNSCEAR 2006). La différence de radiosensibilité observée laisse entrevoir l'implication du type, de la nature et de la durée d'exposition, mais également le rôle des facteurs environnementaux, et leurs impacts sur les mécanismes génétiques et épigénétiques (Horemans et al., 2019).

Pour évaluer l'impact des RI sur l'hérédité, quelques récentes études montrent des modifications du phénotype au fil des générations. Par exemple, il a été montré une augmentation de la radiosensibilité des daphnies sur la deuxième et la troisième génération suite à une exposition multigénérationnelle à l'américium, à l'uranium et aux rayonnements gamma (Alonzo et al., 2008; Parisot et al., 2015). Ces études démontrent que la sensibilité d'une espèce peut évoluer au fil des générations, aboutissant à un seuil d'apparition des effets bien différents de ceux observés sur une seule génération. Une publication récente énumère plusieurs facteurs pouvant influencer la radiosensibilité des organismes comme le scénario d'exposition, les stades de développement exposés, la physiologie et le métabolisme des organismes, les mécanismes de défense moléculaires, cellulaires ainsi que l'épigénétique (Adam-Guillermin et al., 2018). Au regard de ces données, l'influence de l'héritabilité dans l'évaluation des risques induits par une exposition chronique aux rayonnements ionisants doit être prise en compte. Notre projet de recherche a pour objectif de mieux comprendre la vulnérabilité des stades de développement et des tissus, les mécanismes subcellulaires impliqués ainsi que les conséquences moléculaires et phénotypiques au fil des générations.

Les études conduites lors de cette thèse ont pour but d'évaluer les effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un invertébré du sol, le nématode *Caenorhabditis elegans*, dont le cycle de vie rapide permet d'aborder les effets de l'exposition chronique sur plusieurs générations. Pour ce faire, une approche de biologie des systèmes sans a priori a été utilisée pour analyser les effets d'une irradiation chronique aux rayonnements gamma provenant d'une source de Césium 137 (50mGy.h⁻¹). Un point central a été la validation des observations issues des analyses haut débit par des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, dans le but de décrypter et de valider les processus subcellulaires induits par l'exposition chronique. De plus, cette étude a nécessité la mise au point de nombreuses techniques comme l'isolement et l'activation des spermatozoïdes, la mesure des dommages à l'ADN, le traitement et l'analyse de données haut débit ainsi que l'individualisation des noyaux cellulaires par lyse mécanique et la mise au point d'un protocole de Chip-Seq (Annexe I et II). Cette étude a permis de générer de nouvelles connaissances sur les effets reprotoxiques multigénérationnels d'une exposition aux RI, les sensibilités radio-induites de certaines cellules, les mécanismes de défense ainsi que la transmission d'informations biologiques au fil des générations.

Les fonctions biologiques impactées par l'irradiation chronique chez *C. elegans* par une approche de biologie des systèmes

L'objectif principal de la première partie de cette étude a été d'étudier les effets d'une exposition multigénérationnelle aux RI, en analysant l'évolution de la radiosensibilité au fil des générations et les mécanismes subcellulaires impliqués. Pour cela, l'organisme modèle *C. elegans* a été continuellement exposé à des rayonnements gamma pendant 4 générations. En accord avec les données de la littérature, l'exposition chronique à une dose cumulée de 3,3 Gy (débit de dose de 50mGy.h⁻¹) n'affecte pas la survie, la morbidité, ou le succès d'éclosion des nématodes (Dubois et al., 2018; Maremonti et al., 2019). Néanmoins, nos résultats, mesurés sur 5 réplicas biologiques indépendants et confirmés lors de 3 expérimentations, démontrent que l'irradiation chronique, du stade embryon au stade L4 jeune adulte, diminue significativement le nombre de descendants. Ce résultat est également en accord avec les données de littérature montrant une diminution de la reproduction chez d'autres invertébrés, à des doses similaires d'irradiation chronique (Hertel-Aas et al., 2011; Parisot et al., 2015).

De plus, *C. elegans* est historiquement considéré comme radiorésistant, car des doses d'irradiation aiguë jusqu'à 50 Gy, même délivrées lors du stade L4 jeune adulte, n'affectent pas le nombre de descendants ni le succès d'éclosion (Dhakal et al., 2021; Dubois et al., 2018). Cette différence de radiosensibilité entre exposition aiguë et chronique est également observée chez d'autres espèces, telles que les rongeurs ou les plantes, et suggère l'implication de mécanismes de toxicité différents entre ces deux modes d'exposition (Kovalchuk et al., 2007; Mancuso et al., 2015). Les effets délétères mesurés à de plus faibles doses en irradiation chronique indiquent la pertinence de s'intéresser à ce mode d'exposition particulier, et notamment l'altération de la reproduction pouvant impacter la survie de l'espèce.

Pour caractériser les modes d'action toxiques, l'une des premières étapes a consisté à définir les stades de vie les plus sensibles. Il a été démontré que la période où apparaissent les dommages responsables des effets reprotoxiques, c'est-à-dire les stades de vie les plus radiosensibles, se situe entre les stades L1 et L4 (Maremonti et al., 2019). Contrairement à ce qui est observé chez d'autres espèces (Honjo & Ichinohe, 2020), inclure les stades embryonnaires n'aggrave pas le phénotype mesuré après irradiation des stades L1 à L4, suggérant que les stades embryonnaires ne sont pas les plus sensibles chez *C. elegans*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules germinales des larves sont moins résistantes que les cellules somatiques et que, durant l'embryogenèse, les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN sont particulièrement robustes (Clejan et al., 2006; Stevens et al., 2016; Vermezovic et al., 2012). En effet, on observe durant l'embryogenèse une activité importante de la recombinaison homologue (HR) et de la kinase ATR, responsable de la réponse au stress replicatif, couplée à une répression de la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) pouvant causer des erreurs. Ces données sont cohérentes avec le fait que la majorité des dommages induits par les RI apparaît lors des stades de développement larvaire, durant lesquels l'appareil reproducteur se développe à partir des cellules Z1-Z4 pour la gonade somatique et Z2-Z3 pour la lignée germinale (Figure 11.A.).

Le second objectif de cette première question de recherche était d'évaluer la radiosensibilité tissulaire et cellulaire pour identifier les mécanismes sous-jacents induisant une altération (diminution) de la reproduction. Il a été démontré que les spermatozoïdes sont sensibles à l'irradiation, avec une baisse de 44% induit par

l'irradiation chronique sur la première génération. La radiosensibilité des cellules spermatiques peut s'expliquer par le fait que ce type cellulaire ne peut entrer en apoptose, malgré l'activation de la cascade de signalisation apoptotique induite par un stress génotoxique incluant l'activation de CEP-1 et d' EGL-1 (Jaramillo-Lambert et al., 2010). Ces données sont cohérentes avec les données de précédentes études réalisées sur des espèces plus radiosensibles telles que le ver de terre (Hertel-Aas et al., 2011), les crustacés (Fuller et al., 2019), les oiseaux (Møller et al., 2008), les poissons (KNOWLES, 1999) ou les rongeurs (G. Liu et al., 2006). De manière intéressante, l'irradiation prolongée du stade L1 à la fin de la reproduction (15Gy) n'impacte pas plus fortement la reproduction que l'irradiation du stade L1 au stade L4, indiquant que les spermatozoïdes matures sont tolérants aux RI (Maremonti et al., 2019). Cette information est cohérente avec le fait que les spermatozoïdes matures sont transcriptionnellement silencieux et présentent une chromatine compacte (Chu et al., 2006; Samson et al., 2014). En effet, une chromatine compacte présente un taux de cassures double brins de 5 à 50 inférieurs à une chromatine décondensée, démontrant le rôle important de la structure chromatinienne dans la préservation de l'intégrité génomique (Takata et al., 2013). L'ensemble de ces données indiquent l'irradiation à un effet délétère sur le nombre de spermatozoïdes et que cet impact se produit avant le stade L4, confirmant la sensibilité des stades larvaires.

Une diminution supérieure de 19% est mesurée sur le nombre de larves de la génération F1 (-42%), en comparaison avec la génération F0 (-23%), qui n'est que de 5 % sur le nombre de spermatozoïdes entre ces deux générations. Cette observation suggère que d'autres processus que la baisse du nombre de spermatozoïdes sont impliqués dans la diminution du nombre de descendants. L'analyse des GOMERMS et l'enrichissement phénotypique issus de l'analyse transcriptomique révèle deux autres processus impliqués dans l'effet reprotoxique : l'activation des spermatides en spermatozoïdes, ou spermiogenèse, ainsi que la diminution du nombre et l'arrêt de division des cellules germinales mitotiques, permettant de former les oocytes.

L'analyse fine de ces processus indique plusieurs impacts sur les spermatozoïdes. Premièrement, les 3 protamines de *C. elegans*, *spch-1*, *spch-2* et *spch-3*, permettant la compaction de l'ADN dans les spermatozoïdes et la protection de la chromatine, sont réprimées en réponse à l'irradiation chronique. Cette répression laisse présager d'une modification de la structure de la chromatine (Chu et al., 2006). Cette donnée est cohérente avec l'analyse transcriptomique révélant la modulation de nombreux gènes impliqués dans la régulation des modifications post traductionnelles des histones et la structure de la chromatine (Guédon et al., 2021). De plus, de nombreux gènes sous contrôle de la méthyltransférase d'H3K4me2 *spr-5* sont modulés sur l'ensemble des générations (F0 : 24, F1 : 31, F2 : 242, F3 : 84). Il a été démontré que l'inhibition de *spr-5* perturbe la réparation des cassures doubles brins, augmente l'apoptose dans la lignée germinale et induit une stérilité progressive liée à la modulation des gènes de la spermatogénèse sur de nombreuses générations (Katz et al., 2009). Ces données suggèrent une modification de la structure de la chromatine dans les spermatozoïdes en réponse à l'irradiation.

Deuxièmement, nous mesurons une répression de 46 Major sperm Protein (MSP), l'élément central du cytosquelette nécessaire à la mobilité des spermatozoïdes et à la maturation des oocytes ainsi que de *spe-9*, impliqué dans la fécondation des gamètes. L'inhibition de la lysine méthyltransférase *set-17*, contrôlant la transcription des gènes *msp* en association avec le facteur de transcription ELT-1, induit une diminution du nombre et de la morphologie des spermatozoïdes (Engert et al., 2018). La répression de

set-17 en réponse à l'irradiation chronique chez *C. elegans* a été démontrée au cours de ce projet et laisse présager d'un impact fonctionnel sur les spermatozoïdes (Maremonti et al., 2019; Guédon et al., 2021).

Troisièmement, la répression des gènes *spe-10* et *spe-15*, impliqués dans la formation des spermatides ainsi que de *spe-8* et *spe-12*, membres essentiels de la voie de signalisation *spe-8* responsable de la spermiogenèse, semble indiquer une diminution de l'activation des spermatides en spermatozoïdes. En effet, la mutation hétérozygote d'un des 4 membres de la voie *spe-8* entraîne une accumulation de spermatides ne pouvant effectuer la spermiogenèse (L'Hernault, 2006). De plus, la répression des gènes *spe-10* et *spe-15*, induite par une exposition à la toxine microcystine-LA, est corrélée à une diminution de la spermiogenèse, de la mobilité et de la compétition chez les spermatozoïdes (Y. Li et al., 2015). Cette hypothèse est validée en démontrant que l'activation *in vitro* des spermatides en spermatozoïdes par la pronase E est significativement diminuée suite à une exposition chronique aux RI (Guédon et al., 2021). Chez *C. elegans*, les spermatozoïdes portent un héritage épigénétique maternel et paternel (Tabuchi et al., 2018). Les impacts délétères de l'irradiation chronique sur les gamètes mâles, combinés à la présence de dommage à l'ADN chez les descendants, laissent présager d'une modulation de la réponse transcriptomique et épigénétique au fil des générations.

Bien que la mort des cellules germinales soit un événement physiologique programmé, l'apoptose dépendante de CEP-1/p53 est quant à elle activée uniquement en réponse à un stress génotoxique (Gartner et al., 2008). En effet, si des dommages à l'ADN sont détectés dans une cellule, les mécanismes de surveillance vont arrêter la progression du cycle cellulaire pour lui permettre de se réparer, au niveau des cellules mitotiques de la zone distale de la gonade. Le cas échéant, l'apoptose permet d'éliminer les cellules endommagées pour ne pas affecter le fonctionnement de l'organisme et assurer une stabilité génomique, lors du dernier stade pachytène méiotique au niveau du coude de la gonade (Gartner et al., 2000). La diminution de 25% des cellules mitotiques dans la partie distale de la gonade ainsi que l'augmentation de cellules présentant un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose dépendante de CEP-1/p53 dans la lignée germinale démontrent que les ovocytes sont également vulnérables à l'irradiation chronique. Pour la première fois, cette étude montre que l'augmentation de l'apoptose et la baisse du nombre de cellules mitotiques surviennent à des doses beaucoup plus faibles que précédemment mesurées dans la littérature (<60Gy) (Gartner et al., 2000; Schumacher et al., 2001).

L'analyse transcriptomique a également montré un impact sur le métabolisme, en réponse à l'irradiation et à l'impact sur la reproduction. De nombreuses études suggèrent une association entre la lignée germinale, le métabolisme des lipides et la longévité ou la réponse au stress chez de nombreuses espèces, bien que le lien explicatif, corrélatif ou causal, ne soit pas clairement identifié (M. Hansen et al., 2013). En effet, lors de la reproduction, de nombreuses espèces mobilisent leur réserve énergétique, dans une relation inverse largement décrite et appelée « coût de la reproduction », pouvant compromettre la capacité de l'organisme à assurer sa maintenance somatique et sa survie (Kirkwood, 2002). En condition de stress, l'organisme peut soit retarder sa période de reproduction dans l'attente d'un environnement favorable, soit augmenter son métabolisme et sa capacité à répondre au stress pour continuer ce processus.

Une récente étude réalisée au sein de notre laboratoire montre que l'irradiation chronique (3.3 Gy) de *C. elegans* induit une modification du métabolisme lipidique dans les cellules somatiques et germinales (Dufourcq-Sekatcheff et al., 2021). Dans les cellules

somatiques, une diminution du taux de triglycérides somatiques, la principale source de stockage énergétique, est mesurée. Cette donnée suggère que l'organisme va mobiliser plus de ressources pour maintenir la fonctionnalité des tissus somatiques, ce qui est cohérent avec l'augmentation du catabolisme des lipides mesurée dans notre analyse transcriptomique. Il a été démontré que l'expression de protéines de réponse au stress ainsi que la modulation du métabolisme lipidique permet de maintenir le fonctionnement somatique en réponse à des dommages à l'ADN, via les facteurs de transcription DAF-16 et EGL-27 (Mueller et al., 2014; Edifizi et al., 2017).

Dans la lignée germinale, l'irradiation chronique induit une augmentation des phospholipides et des acides gras, lesquels sont les principaux composants des granules de vitellus. Cette donnée est cohérente avec l'augmentation du métabolisme des acides gras observée dans l'analyse transcriptomique. De plus, les vitellogénines, protéines essentielles au transport des granules de vitellus, sont surexprimées en réponse à l'irradiation chronique, dans les mêmes conditions d'irradiation que la présente étude (Dubois et al., 2019). Ces données suggèrent fortement que *C. elegans* renforce son métabolisme pour maintenir la production d'ovocytes.

L'enrichissement des facteurs de transcription sur les séquences en amont (-1500 paires de bases) et en aval (+200 paires de bases) des sites d'initiations de la transcription (TSS) démontre que ELT-2 et ELT-3 sont les deux facteurs enrichis sur l'ensemble des générations continuellement exposées. ELT-2 est un facteur de transcription essentiel au fonctionnement de l'intestin ainsi qu'au métabolisme des lipides via la séquence GATA étendue (AHTGATAARR ; McGhee et al., 2007). Exprimé du stade 4 cellules à la fin du cycle de vie, il peut remplacer l'ensemble des facteurs GATA de l'endoderme et assurer la différenciation et la maintenance de l'intestin (Wiesenfahrt et al., 2016). De plus, ELT-2 peut également moduler certains gènes de la lignée germinale (King et al., 2021). Ces données suggèrent que la signalisation entre le soma et la lignée germinale permet de soutenir l'homéostasie en modulant le catabolisme lipidique pour répondre au besoin de l'organisme en réponse à un stress radioinduit. L'un des effecteurs de la signalisation entre la gonade et les cellules somatiques est le miRNA *mir-71*, facilitant la localisation nucléaire et l'expression du facteur de transcription DAF-16 (Boulias & Horvitz, 2012). *Mir-71* est surexprimé sur l'ensemble des générations des cohortes « exposées » et « recovery ».

Ainsi, nous confirmons que l'irradiation chronique induit une diminution du nombre de larves sur la F0 et que cet effet s'aggrave sur la F1 puis persiste sur les générations F2 et F3. L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires en réponse à une irradiation chronique montre que cette diminution est due à un impact délétère des RI sur la lignée germinale durant une période critique du développement larvaire, comprise entre le stade L1 et le stade L4. Les effets délétères sont associés à une radiosensibilité des gamètes et une diminution de la quantité et de la qualité des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de l'apoptose radio induite et une diminution des cellules germinales mitotiques. L'effet direct des RI sur la lignée germinale est associé à une modification du métabolisme des lipides, permettant de soutenir le fonctionnement de l'organisme en réponse au stress radiologique. Nous démontrons ici que chez un organisme considéré comme « radiorésistant », certains processus moléculaires et cellulaires vulnérables peuvent être affectés à des stades de vie précoces, à des doses beaucoup plus faibles en irradiation chronique. Ces données justifient la réalisation et la prise en compte d'études de toxicogénomique, permettant de décrypter les mécanismes subcellulaires. Nos travaux ont permis de mettre en lumière, qu'outre la diminution du nombre de spermatozoïdes, l'exposition chronique aux rayonnements gamma au cours des stades de développement

diminue la capacité fonctionnelle des gamètes mâles et femelles, laissant présager d'un effet délétère sur les générations continuellement exposées, mais également sur les générations suivantes non exposées.

Modification des phénotypes et des mécanismes de régulation suite à une irradiation chronique multigénérationnelle.

Une diminution de 23% de la reproduction est mesurée sur la première génération F0 puis de l'ordre de 40% sur les 3 générations suivantes. Cette donnée corrobore les résultats précédemment mesurés au sein de notre laboratoire chez *C. elegans* en réponse à une irradiation chronique (Buisset-Goussen et al., 2014). Néanmoins, la diminution du nombre de spermatozoïdes mesurée reste stable au fil des générations (~50%), contrairement à une diminution plus importante de la reproduction entre la F0 (23%) et la F1 (<40%). Cette observation nous a permis de démontrer que d'autres processus tels que la spermiogenèse, l'apoptose radio induite et la diminution du nombre de cellules mitotiques étaient impliqués dans le phénotype reprotoxique. Cette différence peut également s'expliquer par le fait que les générations F1 à F3 sont issues de parents irradiés présentant des dommages à l'ADN, notamment au sein de leur lignée germinale (Figure 16). On observe également une stabilisation du phénotype sur les trois générations F1 à F3, qui suggère que les organismes arrivent à réguler le taux de dommages induits par les RI.

La surexpression de nombreux gènes et fonctions cellulaires impliqués dans différents mécanismes de réponse au stress, sur l'ensemble des générations, démontre une activation des mécanismes de défense pour répondre aux effets induits par l'exposition chronique. L'augmentation de la réponse aux protéines non repliées est cohérente avec l'augmentation des 3 sous unités du protéasome induites par une exposition chronique aux RI chez *C. elegans* sur la F0 (Dubois et al., 2018). L'augmentation de la réponse au stress oxydant a également été validée grâce à des souches reportrices et a permis de démontrer qu'à des débits de doses supérieures à 40mGy.h⁻¹, les défenses antioxydantes ne peuvent plus répondre à l'augmentation des ROS, induisant des effets subcellulaires délétères (Maremonti et al., 2020b). Ces données sont en adéquation avec la réponse transcriptionnelle multigénérationnelle mise en évidence dans notre étude, montrant que la majorité des gènes surexprimés en commun sur l'ensemble des générations continuellement exposées sont impliqués dans le processus d'oxydoréduction et de la réponse au stress (Guédon et al., 2021).

Néanmoins, l'augmentation drastique du nombre de gènes modulés entre les générations F0 et F1 en comparaison avec les générations F2 et F3, principalement impliqués dans la réponse au stress, mais également dans le métabolisme lipidique suggère fortement que les mécanismes de défense et les besoins de l'organisme augmentent sur les deux dernières générations.

L'enrichissement des facteurs de transcription HLH-30 et CES-2 sur les générations F2 et F3 corrobore cette hypothèse. HLH-30 régule des gènes impliqués dans la lipolyse et l'autophagie, deux fonctions impliquées dans le métabolisme, le vieillissement et la réponse aux dommages à l'ADN (Lapierre et al., 2013; Edifizi et al., 2017). HLH-30 participe également à la modulation de la réponse au stress, en corégulation avec DAF-16 (Lin et al., 2018). L'enrichissement d'HLH-30 est cohérent avec l'augmentation des dommages à l'ADN et de la réponse au stress induite par une exposition chronique.

L'enrichissement significatif de plusieurs facteurs de transcription agissant en corégulation avec DAF-16 sur l'ensemble des générations, de DAF-16 sur la F3 ainsi que

de son rôle dans le métabolisme lipidique et la réponse au stress a fortement suggéré son implication dans la modulation transcriptomique observée. La validation fonctionnelle de la translocation de DAF-16 dans le noyau en réponse à l'irradiation confirme l'implication de la voie DAF-2/DAF-16. L'enrichissement du facteur DAF-16, de 12,5% à 52,8 % sur des jeux de données issues d'analyses transcriptomiques et protéomiques en réponse à l'irradiation chronique chez *C. elegans* permet de renforcer l'implication de ce facteur de transcription. Cette analyse est cohérente avec les localisations antagonistes de DAF-16 et PQM-1 dans le noyau, permettant de contrôler finement les modifications métaboliques induisant un changement de la reproduction et la croissance vers la maintenance, la réparation cellulaire et la réponse au stress (Tepper et al., 2013). De plus, la localisation nucléaire de DAF-16 permet de favoriser le développement de l'organisme et la maintenance des tissus somatiques en réponse à des dommages à l'ADN persistant (Mueller et al., 2014).

Ainsi, l'analyse transcriptomique a permis de décrypter les mécanismes de réponse au stress modulés en réponse à l'irradiation chronique, avec un renforcement de ces processus sur les deux dernières générations étudiées et de démontrer le rôle central de régulation de DAF-16. Cet effet cumulatif de l'irradiation sur la réponse transcriptomique, ainsi que l'enrichissement d'un nombre plus important de facteurs de transcription sur la dernière génération, souligne l'importance de réaliser des expositions multigénérationnelles. Cette observation pose la question d'une augmentation potentielle des effets délétères sur le phénotype et les gamètes sur les générations post F3, si les mécanismes de défense ne peuvent plus contrer les effets moléculaires des RI, ainsi que l'impact sur les générations non exposées. De plus, l'utilisation d'une approche de biologie des systèmes a permis de mettre en lumière différents mécanismes subcellulaires puis de réaliser des validations fonctionnelles, confirmant la pertinence et l'intérêt de réaliser des approches sans a priori en toxicogénomique pour élucider l'impact d'exposition chronique à des polluants.

Rôle des miRNAs à la réponse multi- et transgénérationnelle suite à une exposition chronique aux rayonnements ionisants

La seconde partie de cette thèse concerne l'étude du rôle des miRNAs dans la modulation des effets multi- et transgénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez *C. elegans*. Les miRNAs jouent un rôle clé dans les processus cellulaires, y compris dans la façon dont les cellules réagissent aux stress, et leur dysfonctionnement peut engendrer des maladies métaboliques ou des cancers (Leung & Sharp, 2010). Néanmoins, aucune étude n'a traité la question du rôle des miRNAs à la suite d'une irradiation dans un contexte multi- et transgénérationnel.

Dans un premier temps, l'analyse des miRNAs modulés en réponse aux RI, sur les quatre générations continuellement exposées, confirme leur implication dans la régulation du métabolisme, de la transcription, des voies de signalisation et de la reproduction (Guédon et al., 2022, in prep). La réponse multigénérationnelle est portée par 13 miRNAs surexprimés sur l'ensemble des générations et 37 miRNAs surexprimés sur au moins deux générations. Ces miRNAs agissent en réseau pour réguler de nombreux gènes, dont des gènes au sommet de voies de régulations (« master regulator»), impliqués dans le métabolisme et la réponse au stress. Néanmoins, et de façon surprenante au regard de l'augmentation de l'intensité des effets sur le transcriptome, les ratios

d'expressions (fold change) de ces miRNAs sont globalement plus importants sur la première génération F0 que sur les dernières.

Cette observation peut s'expliquer par le fait que sur la première génération, l'organisme n'ayant jamais été soumis à un stress radiologique réagit fortement pour moduler les processus biologiques impliqués dans la réponse au stress et les modifications de phénotype. Sur les générations suivantes, la mise en place de nouveaux processus biologiques, corroborée par l'analyse transcriptomique et la modulation de miRNAs différents sur les générations F2 F3, permet de répondre différemment au stress radiobiologique.

La réponse multigénérationnelle des miRNAs est principalement portée par la famille *mir-35*, dont 5 membres sont surexprimés sur l'ensemble des générations et *mir-71-5p*. Le rôle de *mir-71* dans la signalisation entre la lignée germinale et les cellules intestinales, entraînant la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de DAF-16, est en accord avec les conclusions de la première question de recherche. La surexpression de la famille *mir-35* est particulièrement intéressante, car elle est l'une des deux seules familles de miRNAs essentielles au développement et à la viabilité chez *C. elegans* (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010). De plus, la famille *mir-35* permet de réguler la prolifération de la lignée germinale, l'apoptose via EGL-1 ainsi que d'autres voies de régulation des courts ARN non codants comme les siRNAs, impliqués dans la transmission d'information entre les générations (M. Liu et al., 2011; Massirer et al., 2012; Tran et al., 2019). Le mutant *mir-35* est particulièrement sensible au stress durant les stades L1 et L2, une période que nous avons démontrée comme critique lors de l'exposition chronique aux RI. De plus, ce mutant montre une augmentation de l'apoptose importante dans la lignée germinale ainsi qu'une baisse drastique des spermatozoïdes et de la descendance, ce qui suggère que la surexpression de *mir-35* permet de limiter l'augmentation de l'apoptose, la diminution du nombre de cellules mitotiques et la baisse de la reproduction mesurée dans la première partie de nos recherches. Une expérience de validation fonctionnelle dédiée est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Cette étude est la première à mesurer une transmission transgénérationnelle de miRNAs en réponse à l'irradiation. En effet, trois miRNAs sont surexprimés après exposition parentale sur la F0 puis transmis jusqu'à la génération F3. De plus, l'analyse en composante principale montre clairement que sur la 4^{ème} génération, les cohortes « exposée », « contrôle » et « recovery » sont distinctes. Les fonctions biologiques modulées sur la cohorte « recovery » suggèrent un impact sur le métabolisme de l'ATP et des nucléotides, pouvant entraîner des conséquences délétères, mais également un signal d'adaptation au stress parental (Ma et al., 2019).

Même si le mécanisme de transmission de miRNAs au fil des générations n'est pas défini, plusieurs hypothèses sur leur modulation sont possibles. Premièrement, les miRNAs régulent différents processus pouvant affecter la transmission d'informations à travers les générations comme la régulation des cellules germinales, la production des gamètes, l'environnement de la gonade ou le développement embryonnaire. En outre, la diminution de la biogenèse des miRNAs entraîne des défauts dans la lignée germinale et une diminution du nombre de spermatozoïdes, associés à une diminution de la reproduction (Maniates et al., 2021). La modulation de ces fonctions biologiques peut entraîner une réponse des miRNAs sur la génération suivante, comme observée un an après irradiation parentale chez le zebrafish (Martín et al., 2021).

La seconde hypothèse, compatible avec la première, concerne la compétition des miRNAs avec les siRNAs et les piRNAs. En effet, ces trois classes d'ARN non codants

utilisent les mêmes protéines essentielles à leur biogenèse dans le cadre de l'ARN interférence, dont les protéines argonautes et RdRPs (Houry-Zeevi & Rechavi, 2017). Certains miRNAs, comme *mir-243*, peuvent également diriger la biogenèse de siRNAs en se liant à la protéine RDE-1, aboutissant à l'amplification de siRNAs secondaires et la répression des ARNm cibles (Corrêa et al., 2010). De plus, la famille *mir-35* régule l'ARN interférence en modulant l'expression de la protéine lin-35/Rb (Massirer et al., 2012). La contribution maternelle de la famille *mir-35* est suffisante pour réduire l'efficacité de l'ARNi chez les descendants. Ces différentes études indiquent que les miRNAs peuvent moduler directement ou indirectement d'autres classes d'ARN non codants, dont certaines ont un mécanisme de transmission transgénérationnelle identifié, aboutissant à un rétrocontrôle sur plusieurs générations (Rechavi & Lev, 2017). Cette hypothèse est confortée par le fait que l'enzyme DRSH-1, essentielle à la biogenèse des miRNAs, est impliquée à la fois dans l'acquisition et l'hérédité de l'homéostasie pour répondre à des changements environnementaux (Okabe et al., 2021). Néanmoins, même si le mécanisme n'est pas clairement défini, l'altération du profil des miRNAs sur 3 générations après exposition parentale constitue un véritable effet transgénérationnel.

Ainsi, les résultats de cette étude sont cohérents avec les données de la littérature montrant un impact transgénérationnel des RI chez différentes espèces, dont la daphnie et le poisson-zèbre, via des modifications épigénétiques (Kamstra et al., 2018; Trijau et al., 2018). Les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la transmission d'informations aux générations non exposées, ce qui permet de les envisager comme biomarqueur d'une exposition, sous réserve du maintien de leur expression et de leur spécificité. Il convient de continuer les recherches dans ce domaine pour déterminer si la transmission d'informations épigénétiques confère un avantage aux générations non exposées, ou au contraire une sensibilité accrue au stress.

Conclusion générale

Les résultats présentés dans cette thèse fournissent de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'action toxique induits par une exposition chronique aux RI, dans un contexte multi- et transgénérationnel. Chez un organisme pouvant survivre à des doses de 5000Gy, il a été démontré qu'une irradiation chronique à une dose totale de 3,3 Gy entraîne un effet délétère sur la reproduction, pouvant impacter la dynamique des populations. Ces données indiquent clairement que les mécanismes d'action de toxicité diffèrent entre exposition chronique et aiguë.

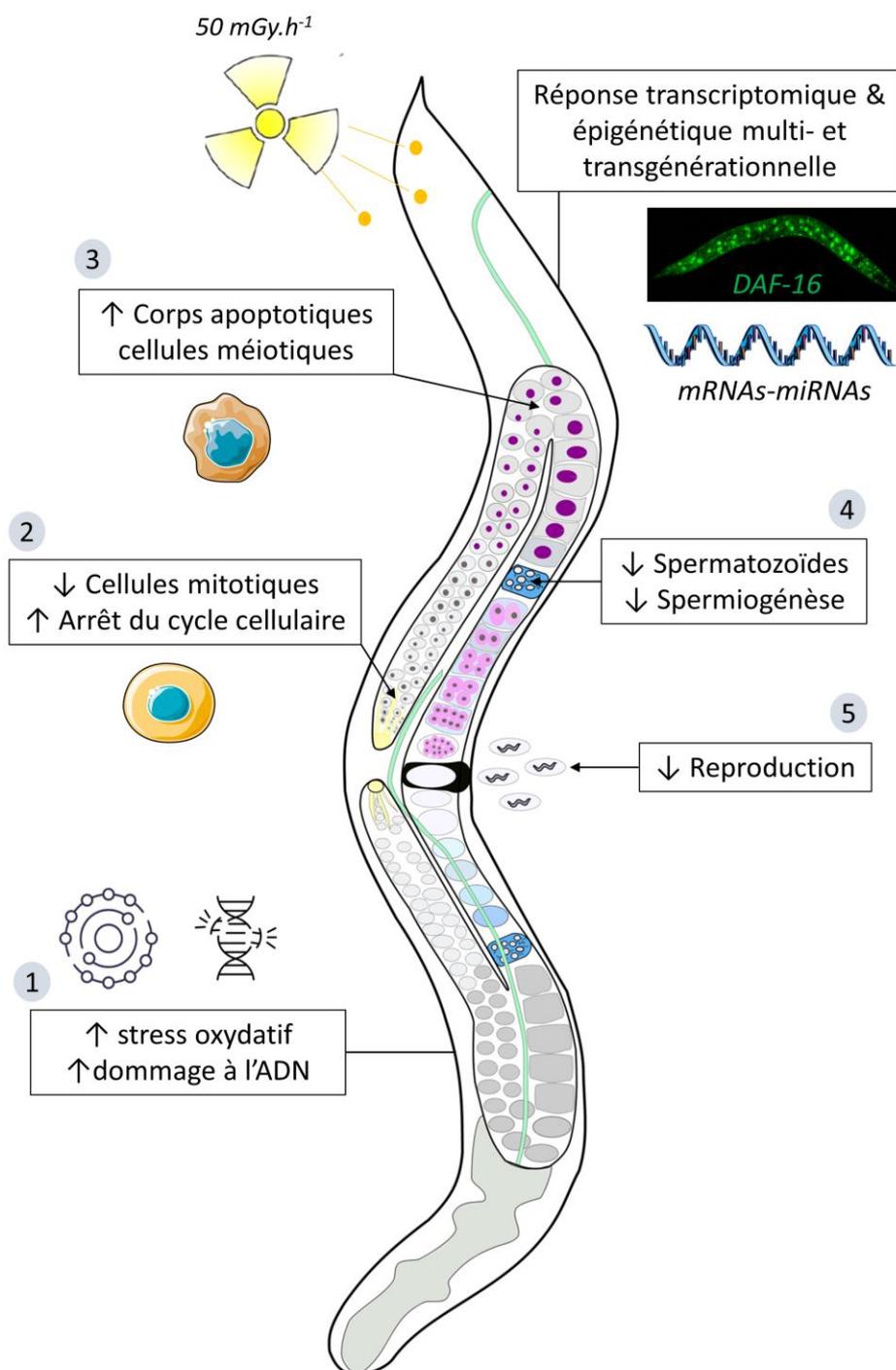


Figure 30 Schéma de synthèse des principaux résultats

La reproduction est particulièrement sensible si les stades larvaires L1 à L4 et les cellules prolifératives de la lignée germinale sont soumis à une irradiation chronique. Durant cette période, l'irradiation impacte la spermatogénèse, la spermiogénèse, le nombre de cellules mitotiques ainsi que la méiose via l'augmentation de l'apoptose radioinduite (Figure 30). Ces données démontrent que sur un organisme considéré comme radiorésistant, certains mécanismes subcellulaires vulnérables peuvent être affectés à des stades de vie précoces et entraîner des conséquences délétères, à des doses relativement faibles. La compréhension des mécanismes de toxicité doit contribuer à évaluer le risque pour les populations exposées. Dans le but de faciliter cet axe de recherche, le concept d'AOP a été établi pour fournir un cadre conceptuel permettant de lier l'exposition à un polluant à une réponse indésirable de l'organisme. Les principaux résultats acquis dans le cadre de cette thèse, et plus largement dans le cadre de la collaboration entre le NMBU et l'IRSN ont été intégrés dans un Adverse Outcome Pathway (<https://aopwiki.org/aops/396>).

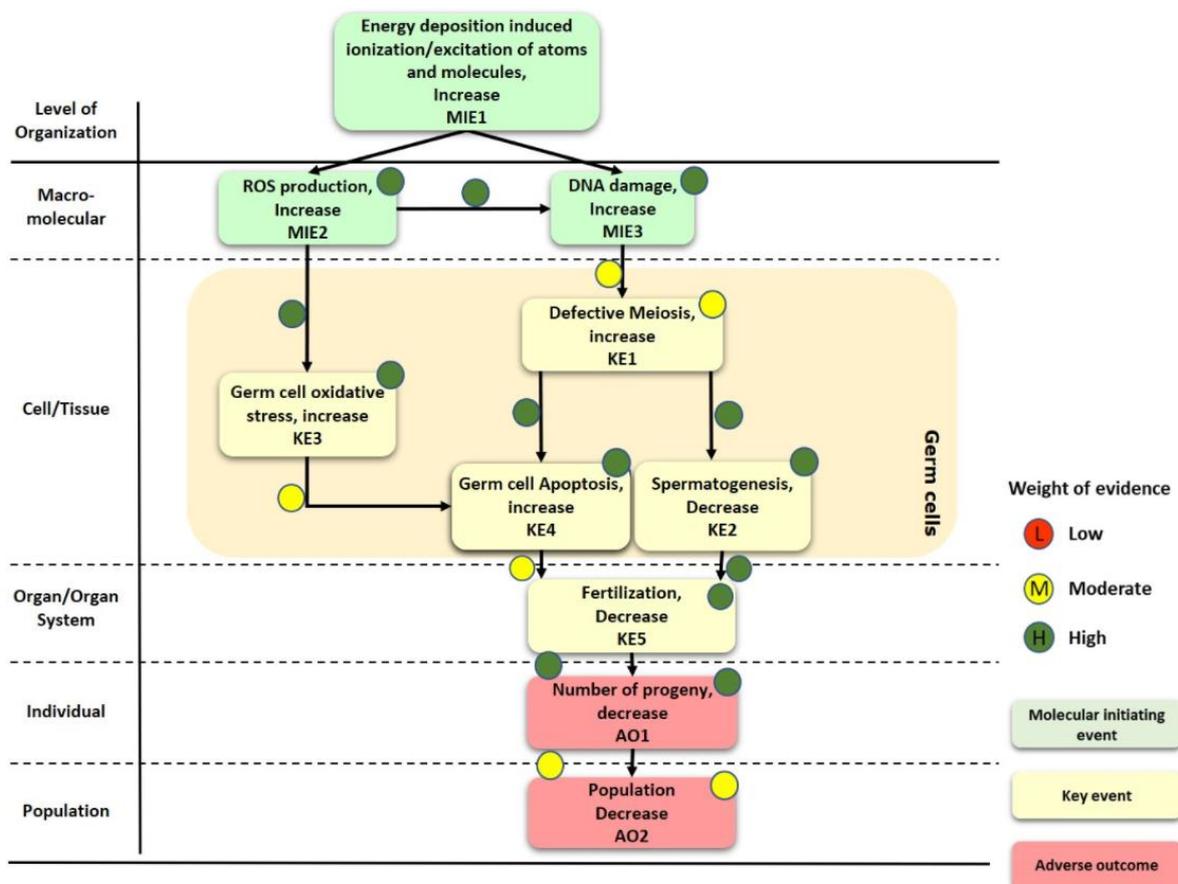


Figure 31 - AOP 396 : L'exposition aux rayonnements ionisants entraîne un déclin de la population via l'altération de la méiose

Cet AOP relie les événements initiateurs que sont les dommages à l'ADN et l'augmentation du stress oxydatif, à des éléments clés précédemment discutés, induisant des effets reprotoxiques et génotoxiques, pouvant impacter la population. Il permet de fournir de nouvelles informations sur les événements moléculaires et cellulaires clés qui gouvernent la réponse à une exposition chronique aux RI. L'identification des étapes clés de la réponse à l'irradiation chronique permet d'améliorer la compréhension des différences de radiosensibilité (entre génération et espèce), mais également d'identifier les homologues avec d'autres polluants (famille de toxine, synergie).

Dans le cadre de cette thèse, il a été démontré que *C. elegans* active de multiples mécanismes de défense, incluant la réparation de l'ADN, la réplication du génome mitochondrial, l'augmentation des défenses antioxydantes, la modification du métabolisme lipidique, l'activation du facteur de transcription DAF-2/DAF-16, la réponse transcriptomique et l'apoptose, pour assurer le maintien des fonctions biologiques. Aucun effet délétère sur les cellules somatiques ou le développement de l'organisme n'a été observé, indiquant que l'organisme parvient à maintenir son fonctionnement somatique, mais pas son fonctionnement germinale. L'effet délétère sur la lignée germinale impacte les générations suivantes via les gamètes et la présence de dommage à l'ADN sur la descendance directe issue de parents irradiés. Le seuil observé sur la reproduction entre les générations F0 et F1 ainsi que l'augmentation drastique de gènes modulés entre la génération F1 et F2 suggère fortement que les générations continuellement exposées subissent une accumulation du stress (Annexe 1). Cette analyse multigénérationnelle montre une modulation des phénotypes et des effets subcellulaires au fil des générations, démontrant la pertinence de réaliser et de prendre en compte ce type d'étude sur plusieurs générations dans le cadre de l'évaluation des risques.

Cette thèse a également permis de démontrer la contribution des miRNAs dans la réponse multi- et transgénérationnelle induite par un stress radiologique. Ces réponses sont notamment portées par mir-71 et la famille mir-35, impliqués respectivement dans l'accumulation nucléaire de DAF-16 et plusieurs processus liés à la reproduction. Cette étude confirme l'intérêt d'étudier les mécanismes épigénétiques dans la réponse à de faibles doses de rayonnements ionisants. La réponse multi- et transgénérationnelle des miRNAs montre qu'une partie des miRNAs agissent ensemble pour réguler la réponse physiologique de l'organisme en réponse à un stress, mais également que les générations non exposées conservent un héritage épigénétique de l'irradiation parentale. L'étude de l'épigénétique en toxicogénomique pourrait permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action toxiques et des effets générationnels voir de développer de nouveaux biomarqueurs d'exposition.

Ce travail de thèse, soutenu en partie par le Programme Environnement-Santé-Travail de l'Anses, a permis de fournir de nouvelles connaissances scientifiques liées à l'exposition chronique aux RI. L'utilisation d'une approche sans a priori, combinée à la validation de ces données par des mesures de phénotypes ou grâce à l'utilisation de souches reportrices ou d'outils moléculaires, permet de fournir des informations robustes sur les effets délétères de l'exposition chronique aux rayonnements gamma sur plusieurs générations.

Perspectives

La présente étude a décrypté les mécanismes d'action toxique induits par une exposition chronique aux RI. Les effets d'une exposition chronique sont mal connus, tout particulièrement dans le cadre d'exposition sur plusieurs générations, mais leur compréhension est indispensable afin d'améliorer l'évaluation du risque radiobiologique. Cette thèse a mis en évidence une sensibilité accrue des stades larvaires chez un invertébré. Il semble donc pertinent de valider cette observation sur mammifère. En effet, l'essai N°443 de l'OECD « Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération » est basé sur une exposition de rongeurs à maturité sexuelle. Il semble approprié de valider sur un modèle rongeur que l'exposition durant les stades de développement n'a pas un impact plus important que l'exposition sur des stades sexuellement matures, comme mesuré dans la présente étude sur *C. elegans*.

Les effets sur les mécanismes moléculaires et cellulaires essentiels dans un contexte multigénérationnel, laisse présager d'un impact exacerbé sur la progéniture pendant plusieurs générations. A contrario, une acclimatation ou une adaptation des organismes ne peut pas être exclue. Il conviendrait de réaliser une étude sur 10 générations ou plus, en analysant les mécanismes subcellulaires impactant la lignée germinale mis en avant dans la présente étude, pour pouvoir conclure sur cette hypothèse. C'est ainsi qu'une thèse est en cours au sein de notre laboratoire pour évaluer les réponses évolutives de *C. elegans* sur 20 générations, en analysant les effets démographiques, phénotypiques et génétiques.

L'analyse transcriptomique pourrait être couplée avec une étude de la compaction de l'ADN par ATAC-Seq (« Assay for Transposase-Accessible Chromatine with high throughput sequencing »). En effet, l'analyse de la structure de la chromatine est aisément corrélable avec l'expression génique et pourrait renforcer les connaissances sur le rôle de l'épigénétique dans la modulation de la transcription en réponse à un stress radiologique. Il serait également pertinent de réaliser une analyse transcriptomique aux différents stades de développement sensibles (L1, L2, L3 et L4) pour identifier précisément les processus impactés et la mise en place de la réponse au stress. La modification du métabolisme lipidique suggéré par l'analyse transcriptomique fait actuellement l'objet de recherches approfondies selon une approche métabolique dans le cadre d'une thèse IRSN dont l'objectif est d'évaluer le rôle précis de ce paramètre dans la lignée germinale et somatique, en réponse à l'irradiation chronique.

La régulation multi-et transgénérationnelle des miRNAs en réponse à l'irradiation chronique a permis de montrer la prépondérance de la famille *mir-35* et de *mir-71*. L'utilisation d'une souche mutante *mir-71* et d'une souche déficiente pour les *mir-35* à *41*, permettrait d'approfondir les mécanismes subcellulaires contrôlés par ces miRNAs ainsi que leur implication dans la réponse au stress. La perturbation transcriptomique de gènes codants pour des variants d'histones, des enzymes de régulation des modifications post traductionnelles et des gènes sous contrôle de la méthyltransférase d'hH3K4me2 *spr-5* suggèrent également d'analyser les autres paramètres épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN en 6mA, les PTMs et les autres classes d'ARN non codant impliqués dans la réponse au stress et les effets transgénérationnels que sont les piRNAs et les siRNAs.

Enfin, l'impact sur les spermatozoïdes suggère fortement un transfert de modifications épigénétiques au fil des générations. En effet, les spermatozoïdes de *C. elegans* transfèrent une mémoire épigénétique maternelle et paternelle via les PTMs, suffisante pour gouverner le développement de la lignée germinale de la descendance (Tabuchi et al., 2018; Kaneshiro et al., 2019). La technique de Chip-Seq actuelle chez *C. elegans* présente deux limitations principales : le temps de réalisation du protocole ainsi que la quantité de matérielle génétique nécessaire. En collaboration avec l'équipe norvégienne du NMBU, nous avons développé un protocole permettant de s'affranchir de ces limitations (Annexe I). Les premiers résultats obtenus par Chip-PCR montrent un impact de la triméthylation de l'histone H3K9me3 sur les embryons de la F1 Recovery. Ce résultat apporte la preuve de principe que l'irradiation entraîne des modifications des PTMs après arrêt de l'irradiation. Une thèse de doctorat démarrera au NMBU pour approfondir ce sujet.

Annexe 2 : C. elegans ChIP-Seq protocole

Guédon R, Maremonti E, D Anders Bred, L Lindeman

Introduction : le protocole d'immunoprécipitation suivie d'un séquençage de la chromatine (ChIP-Seq) permet d'analyser les modifications post-traductionnelles des histones ainsi que les interactions ADN-protéines. Bien que les protocoles standards de Chip-Seq fonctionnent bien sur la majorité des organismes modèles, la présence de la cuticule chez *C. elegans*, entravant la lyse et la pénétration des agents de réticulation, la quantité importante de matériel génétique nécessaire ainsi que le temps de réalisation des protocoles sont des freins à l'utilisation d'un protocole rapide et efficace de Chip-Seq. Nous avons donc développé un protocole permettant de réaliser le Chip-Seq ou le Chip-PCR avec une quantité relativement faible de matériel génétique, de manière rapide.

Fixation

1. Check developmental stage, bleach embryos from 10 000 - 30 000 L4 YA and wash embryos 4 times with M9 buffer in 1.5mL eppendorf tubes (pellets must be visible).
2. Cross link in cross linking solution (2% paraformaldehyde in M9) for 30 minutes at 20°C. Mixing with DiaMag rotator EU during this step
3. Stop the crosslinking reaction by adding 0.1M Tris-HCl ph 7.5. Incubate at room temp for 5 minutes, mixing with DiaMag rotator. Wash the pellets twice with M9 buffer at 4°C.
4. For later use, store at -80 °C or place samples on ice and proceed to sonication.

Sonication

5. Prepare enough Lysis Buffer (LB) for all your samples. Leave at room temp.
6. Precool Bioruptor sonicator water bath. Precool centrifuge.
7. Add 100 µL LB to each sample. *Additional step: Mix and mortar until homogenous, being careful not to create bubbles.*
8. Sonicate cell lysate on bioruptor, 4 cycles with 30 seconds on of.
9. Centrifuge at 12,000g for 10 min at 4°C to spin down debris or unsonicated cells (may be invisible to naked eye).
10. Carefully pipette out the supernatant (which contains the chromatin, 80 µl) into a new tube.
11. Measure the concentration (A_{260}) on nanodrop.
12. Add RIPA ChIP buffer to make ChIP-Ready chromatin. Dilute to 0,2 A_{260} units, this works ok for ChIP-pcr.
13. Keep on ice until IP or store at -20 or -80 (preferred).

Binding of Antibodies to paramagnetic beads (THIS STEP CAN BE DONE THE DAY BEFORE SONICATION)

14. Add 10 µl Dynal protein a beads and 90 µL RIPA for all of your samples. Wash beads with RIPA buffer on a magnetic rack (DiaMag02, Diagenode) to remove ethanol.
15. Add 2 µg of antibody to each tube, e.g. H3K9me3 (cat. # C15410193, Diagenode)
16. Incubate on a rotator at least 2 h at 4°C or overnight.

Immunoprecipitation and Washes

17. Spin the 8-strip tubes in a minicentrifuge to recover any liquid caught in the lid. Place the tubes in a magnetic rack on ice to capture the beads, remove the supernatant.
18. Immediately aliquot 100 µL of ChIP ready chromatin into each tube.

19. Add the same amount of chromatin used in an IP to an empty 1.5mL tube chilled on ice. This will be used as input control. Store at 4°C until Step 52.
20. Remove the PCR tube strip from the magnetic rack and gently shake PCR tubes by hand to fully bring the beads in suspension.
21. Place the tubes on a rotator for at least 3 hr at 4°C or ON.
22. Place the PCR tubes in a magnetic rack cooled on ice to capture the beads.
23. Discard the supernatant containing the unbound fraction.
24. Add 100 µL ice cold RIPA buffer. Remove the tubes from the magnetic rack and resuspend the beads, vortex.
25. Rotate 4 min at 4°C.
26. Repeat wash three times.
27. After the last wash place the PCR tubes in the magnetic rack.
28. Remove the supernatant and add 100 µL ice-cold TE buffer.
29. Resuspend, Incubate on a rotator at 4°C for 4min at 40rpm.
30. Centrifuge the PCR tubes in a minicentrifuge for 1 second.
31. Place the PCR tubes on ice (not on the magnetic rack), resuspend to a homogenous suspension with a pipette and transfer the content of each tube into separate clean 200 µL PCR tubes on ice.
32. Add 50 µL ice-cold TE buffer to each of the emptied tubes and mix with a pipette to get any remaining beads in suspension, transfer the remaining beads to the same tube as the previous 100uL of bead suspension.
33. Capture the complexes by placing the PCR tubes in the magnetic rack and remove the TE buffer. Immediately proceed to DNA isolation and purification.

DNA Isolation and Purification

34. Prepare complete elution buffer, CEB, 300 µl for each ChIP reaction.
35. Add 150 µl CEB to each of the PCR tubes. Vortex tube strips to make sure that all beads are well suspended.
36. Incubate 3h on Thermomixer at 68°C, 1,200 rpm.
37. For the input sample (100 µl chromatin), add EB to to 500 µl and add 2 µl proteinase K (20 mg/ml), incubate at 68°C, 3h.
38. After the incubation, spin down the samples to collect the condensate from the top. Do the same for the input samples.
39. Use the magnetic rack to capture the beads, collect the supernatant containing ChIP DNA and place it into a clean 1.5mL tube.
40. Add 150 µL CEB to the PCR tubes to wash the beads and incubate for 15 min at 68°C, 1,200 rpm.
41. Remove PCR tubes from the Thermomixer, use the magnetic rack to capture the beads, collect the supernatant and pool it with the first supernatant.
42. Add 200 µL EB to the eluted ChIP material, resulting in a final volume of 500 µL for all ChIP samples and inputs.
43. Extract DNA using 500 µl of phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1). Vortex and shake all tubes vigorously.
44. Centrifuge at 15,000g for 5 min at 20°C to separate the aqueous and organic phases and transfer 460 µl of the aqueous (top) phase to a clean 1.5mL tube.
45. To rid your samples of phenol, extract the DNA again using an equal volume (460 µL) of chloroform:isoamylalcohol (24:1).
46. Vortex and shake all tubes vigorously.
47. Centrifuge at 15,000g for 5 min at 20°C to separate the aqueous and organic phases and transfer 460 µl of the aqueous (top) phase to a clean 1.5mL tube.
48. Add 44 µL of 3M NaAc (pH 7.0), 10 µL of 5mg/mL acrylamide carrier, and 1mL of ice-cold 100% ethanol. Mix well and place at -80°C for at least 1hr or until frozen solid.
49. Thaw the tubes and immediately centrifuge at 20,000g for 15 min at 4°C. Keep cold.
50. Visually inspect each tube to ensure that there is a visible pellet in the bottom of the tube.
51. Remove the supernatant while leaving ~50 µL with the pellet.

52. Add 1 ml of ice-cold 70% ethanol and vortex briefly to get the DNA pellet to detach from the bottom of the tube.
53. Centrifuge tubes at 20,000g for 10 min at 4°C.
54. Repeat washing steps once more.
55. Remove as much as possible of the supernatant without touching the pellet.
56. Dry the pellet (open lid) at room temp to get rid of all ethanol. Visually check that the pellet is dry.
57. Add 50 µl TE, be sure to cover the pellet.
58. Let the DNA dissolve for at least 1h, 37 °C or at 4 °C ON (preferred) before analyzing on with real time pcr.
59. For quantitative detection, we need a standard curve of fragmented DNA. Measure DNA concentration on a input sample and make a standard curve with 20, 10, 2, 0,4, 0,1, 0,02, 0,005 ng/u. Calculate the percent of precipitation compared to input chromatin.

BUFFERS

LYSIS BUFFER LB			
<i>Stock Solution</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>For 50 mL Stock</i>	<i>Add into 960 µL of Stock</i>
1M Tris-HCl, pH 8.0	50 mM	2.5mL	
0.5M EDTA	10 mM	1mL	
10% SDS	1% (wt/vol)	5mL	
H2O			
Add immediately before use			
Protease inhibitor mix	1X		10µL
0.1M PMSF	1 mM		10µL
Nabutyrate	20 mM		20µL

RIPA buffer			
<i>Stock Solution</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>For 200 mL Stock</i>	<i>Add into 960 µL of Stock</i>
1M Tris-HCl, pH 7.5	10 mM	2 mL	
5M NaCl	140 mM	5,6 mL	
0.5M EDTA	1 mM	400 µL	
0,4 M EGTA	0.5 mM	250 µL	
10% Triton X-100	1% (vol/vol)	2 mL	
10% SDS	0.1% (wt/vol)	500µ	
H2O		41.95mL	
Na-deoxycholate (DOC)		0,2 g	
10% SDS		2 mL	
Add immediately before use			
Proteinase inhibitor			10 µL
PMSF			10 µL
Nabutyrate			20 µL

(TE) TE BUFFER		
<i>Stock Solution</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>For 1 L Stock</i>
1M Tris-HCl, pH 8.0	10 mM	10mL
0.5M EDTA	1 mM	2mL
H2O		

COMPLETE ELUTION BUFFER			
<i>Stock Solution</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>For 50mL Stock</i>	<i>Add into 900µL of Stock</i>
1M Tris-HCl, pH 7.5	20 mM	1mL	
0.5M EDTA	5 mM	0.5mL	
5M NaCl	50 mM	0.5mL	
H2O		43mL	
Na-butyrate	20 mM		
Add immediately before use			
10% SDS	1% (wt/vol)	5mL	100µL
Proteinase K	50 µg/ml		2µl/reaction

M9 buffer : (22 mM KH₂PO₄, 34 mM K₂HPO₄, 86 mM NaCl, and 1mM MgSO₄)

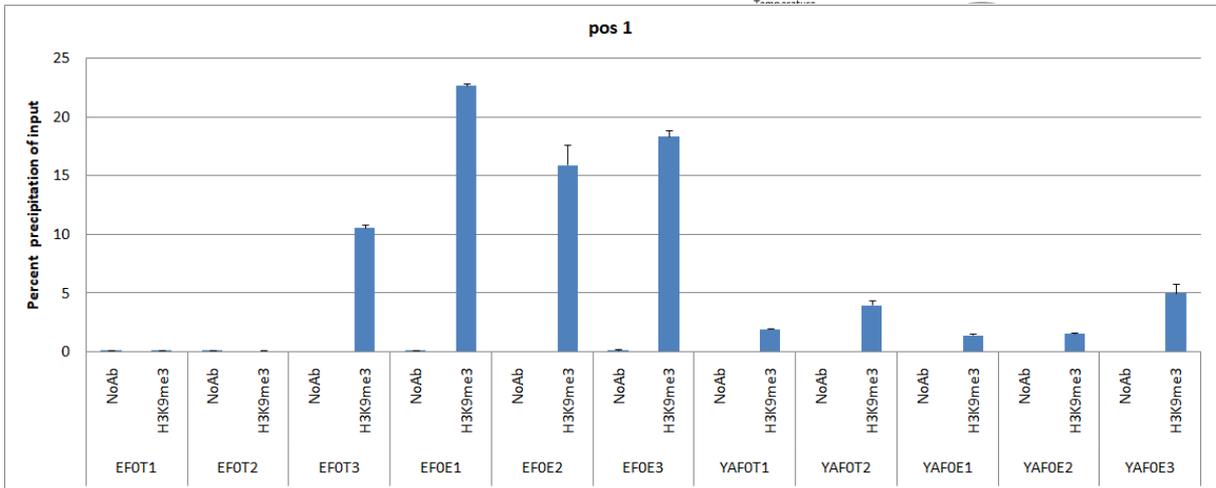
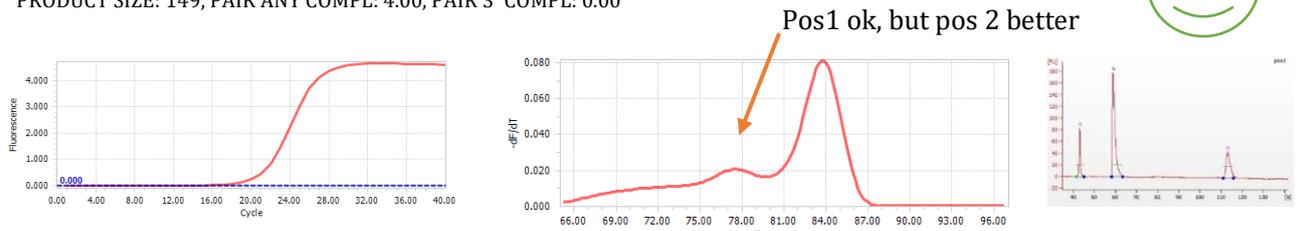
Validation des primers pour H3K9m3 et Chip PCR

Caractérisation des primers pour les contrôles positifs et négatifs d'H3K9m3 : l'analyse de la courbe de fusion (ou de dissociation) permet de déterminer la spécificité de l'amplification et donc de l'analyse. Il est important de valider que l'analyse ne produit que le produit souhaité (1 amplicon). Si la courbe a plus d'un pic majeur, il convient de faire d'identifier la taille des produits, de diminuer la concentration d'amorce ou de concevoir de nouvelles amorces. La présence d'ADNg non traité, de dimer d'amorces ou la mauvaise conception des amorces sont les principales causes aboutissant à la présence de plus d'un pic.

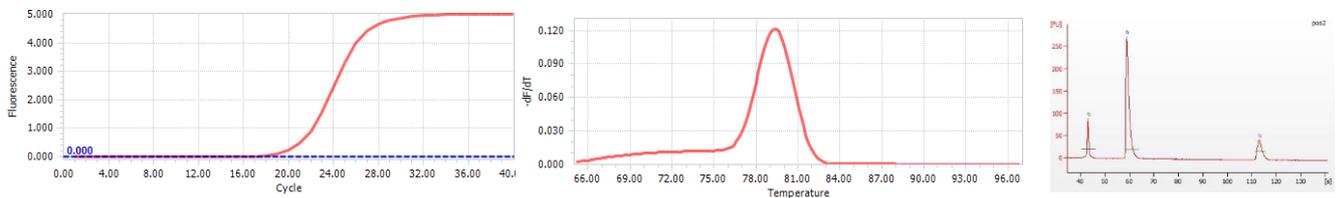
POSITIVE CONTROL

Y64G10A.6

LEFT PRIMER POS1_H3K9me3_f 179 20 60.29 50.00 2.00 0.00 cttgctgggtttgtctcgtt
 RIGHT PRIMER POS1_H3K9me3_r 327 20 60.47 50.00 2.00 1.00 cgggtccttttctccact
 PRODUCT SIZE: 149, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00



LEFT PRIMER POS2_H3K9me3_f 197 20 60.30 45.00 4.00 0.00 gtttgatctttgggccttt
 RIGHT PRIMER POS2_H3K9me3_r 350 20 58.62 45.00 4.00 0.00 tggcctaattgtgttgagg
 SEQUENCE SIZE: 415
 INCLUDED REGION SIZE: 415

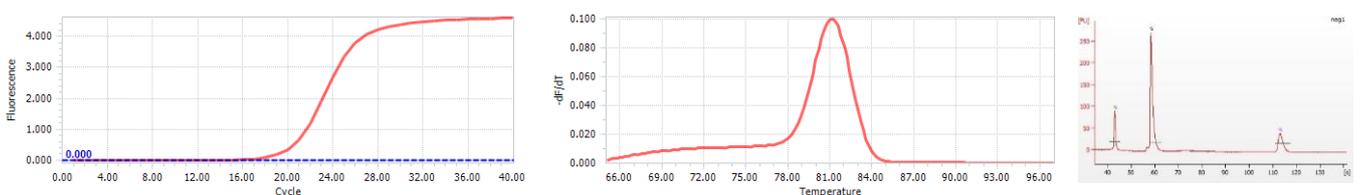


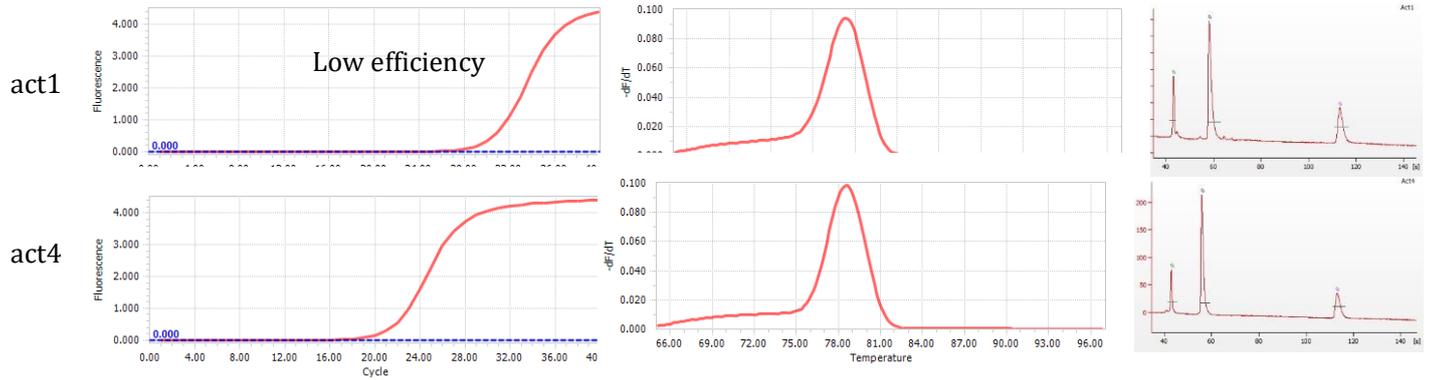
PRODUCT SIZE: 154, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

NEGATIVE CONTROL

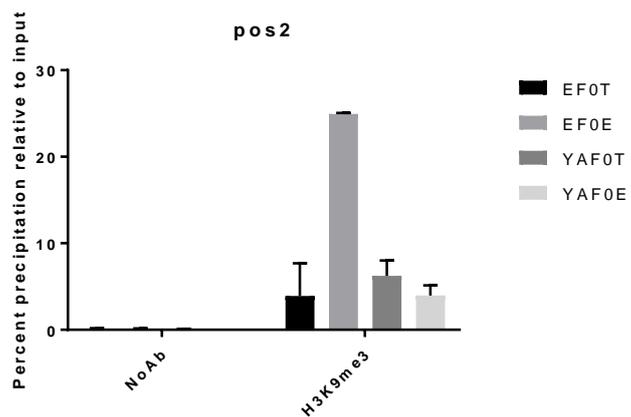
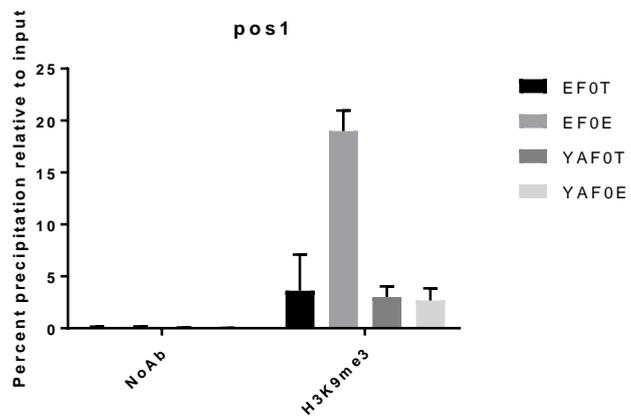
C04C3.2

LEFT PRIMER NEG1_H3K9me3_f 767 20 59.98 40.00 6.00 2.00 acgacaatttcggtttttgc
 RIGHT PRIMER NEG1_H3K9me3_r 918 20 59.90 45.00 6.00 0.00 TTGGATCCCTCCACTTTTG
 SEQUENCE SIZE: 3552
 INCLUDED REGION SIZE: 3552
 PRODUCT SIZE: 152, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00





Chip PCR sur les embryons et les L4 jeunes adultes : Les primers positifs fonctionnent correctement sur les embryons.



Annexe 3 : Extraction mécanique des noyaux pour ATAC-Seq

1. Cultiver des vers synchronisés puis les congeler en pelote.
 - a. Bleacher une seule plaque de 6 cm de mixte stage et diviser les œufs en 4 plaques de 10 cmensemencées avec ~ 500 uL de 2x OP50. Évitez la starvation en raison d'éventuels problèmes d'héritage transgénérationnel modifiant la signature de la chromatine
 - b. Cultiver à 20C jusqu'au début de la ponte.
 - c. Lavage M9 puis laisser pondre pendant 5h.
 - d. Cultiver à 20°C jusqu'au stade L4 jeune adulte, sous irradiation ou en étuve contrôle.
 - e. Lavage avec M9x3
 - f. re suspendre dans 300 ml de M9
 - g. Avec une pipette en verre, laisser tomber en goûte à goûte dans un mortier rempli d'azote.
 - h. Récolter les gouttes congelées (pelotes) contenant les vers dans un Eppendorf puis conserver à -80°C. Cette technique peut être utilisée pour conserver du matériel génétique pour d'autres applications.

2. Extraction mécanique des noyaux

Ceci est adapté de « Chromatin accessibility dynamics reveal novel functional enhancers in *C. elegans* Daugherty *et al.*2017.

L'utilisation d'un pilon en céramique et de tube anti-adhésion permet d'augmenter le rendement

1. Faire 4x NPB- (voir ci-dessous) et le filtrer.

Making 4x stock, volume =		100	mL
final []mM		starting []	mL to add
40	Hepes, pH 7.6	1000	4
40	KCl	1000	4
6	MgCl ₂	1000	0,6
4	EGTA	500	0,8
1000	Sucrose*	342,3 g/mol	
0,10%	Triton		0,1
	H ₂ O		90,5

Avant de commencer, ajoutez des réactifs frais, jusqu'à la concentration finale de 2X
µL for 5mL

1770	H ₂ O
2500	4x from above
500	0.5M NaF
20	0.25M DTT
200	1M β-glycerol P
10	1M Na ₃ VO ₄

2. Refroidir le mortier en acier inoxydable Wheaton à 4°C et le pilon en remplissant la cuve d'azote liquide ainsi que la centrifugeuse à 4°C

b. Décongeler les pellets de ver sur glace et effectuer toutes les étapes suivantes sur de la glace.

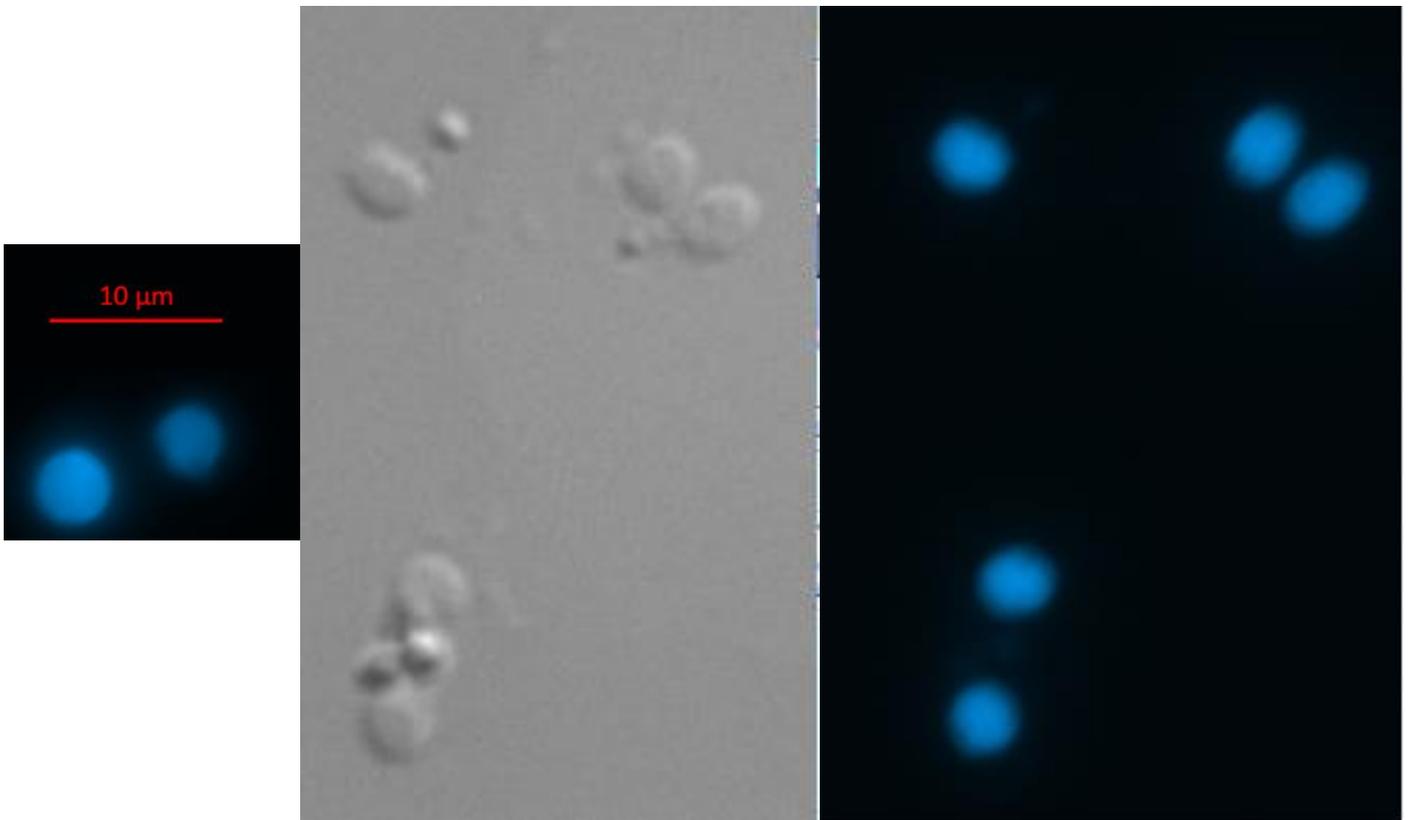
c. Transférer les vers dans le mortier en acier inoxydable Wheaton pré-refroidi. Ajouter un volume égal d'azote

e 2x NPB glacé. Assurez-vous que le volume final est d'au moins ~150µL ou le Wheaton ne fonctionnera pas bien

d. Broyer les pellets en réalisant 2 à 4 coups, mais pas plus de 5 pour ne pas éclater les noyaux. Transférer la poudre dans un Eppendorf et re suspendre dans ~300µL de 2X NPB.

- e. Laissez les vers non broyés et les gros morceaux de vers se déposer au fond du tube
- f. Séparer le surnageant (contenant des noyaux) du culot en le faisant tourner à la vitesse la plus basse possible (200 g) dans une centrifugeuse réfrigérée
- g. Transférer le SN dans un tube frais sur de la glace
- h. Remettre en suspension le culot dans $\sim 300\mu\text{L}$ de NPB 2x
- i. Répétez les étapes d-h jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de morceaux de ver visibles, en ajoutant à chaque fois le SN dans le même tube (sur glace). Après avoir regroupé les échantillons de surnageant, effectuez une autre centrifugation à 200 g et transférer le surnageant dans un tube final. Lavez le mortier et le pilon avec le 2xNPB pour les autres échantillons puis répéter les étapes c-i.
- k. Pour culotter les noyaux, centrifuger à 1000g pendant 10min puis :
 - Retirer le SN pour une extraction (protéinase K, RNase + kit d'extraction d'ADN standard)
 - Marquage au DAPI pour microscopie (noyaux des cellules germinales et oocytes : 3 à $7\mu\text{m}$; noyaux des cellules de l'hypoderme : 2 à $3\mu\text{m}$)

Marquage au DAPI des noyaux extraits



Références bibliographiques

- Adam-Guillermin, C., Hertal-Aas, T., Oughton, D., Blanchard, L., Alonzo, F., Armant, O., & Horemans, N. (2018). Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. *Annals of the ICRP*, 47(3-4), 327-341. <https://doi.org/10.1177/0146645318756844>
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F. A., & Garnier-Laplace, J. (2008). Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 87(3), 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.015>
- Alvarez-Saavedra, E., & Horvitz, H. R. (2010). Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Current Biology: CB*, 20(4), 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.051>
- Ambros, V., & Ruvkun, G. (2018). Recent Molecular Genetic Explorations of *Caenorhabditis elegans* MicroRNAs. *Genetics*, 209(3), 651-673. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300291>
- Angelo, G., & Van Gilst, M. R. (2009). Starvation Protects Germline Stem Cells and Extends Reproductive Longevity in *C. elegans*. *Science*, 326(5955), 954-958. <https://doi.org/10.1126/science.1178343>
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., & Skinner, M. K. (2005). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science*, 308(5727), 1466-1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Mitchell, J., Bagijn, M. P., Cording, A. C., Doebley, A.-L., Goldstein, L. D., Lehrbach, N. J., Le Pen, J., Pintacuda, G., Sakaguchi, A., Sarkies, P., Ahmed, S., & Miska, E. A. (2012). PiRNAs Can Trigger a Multigenerational

- Epigenetic Memory in the Germline of *C. elegans*. *Cell*, 150(1), 88-99.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.018>
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P., & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*, 327(1-2), 48-60.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- Bailly, A., & Gartner, A. (2013). Germ cell apoptosis and DNA damage responses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 757, 249-276.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_9
- Barker, S., Weinfeld, M., Zheng, J., Li, L., & Murray, D. (2005). Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33826-33838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502477200>
- Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 24.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>
- Baugh, L. R., & Day, T. (2020). Nongenetic inheritance and multigenerational plasticity in the nematode *C. elegans*. *ELife*, 9, e58498. <https://doi.org/10.7554/eLife.58498>
- Boulias, K., & Horvitz, H. R. (2012). The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metabolism*, 15(4), 439-450. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.014>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
<https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Brenner, S., Stretton, A. O. W., & Kaplan, S. (1965). Genetic Code : The 'Nonsense' Triplets for Chain Termination and their Suppression. *Nature*, 206(4988), 994-998.
<https://doi.org/10.1038/206994a0>

- Buisset-Goussen, A., Goussen, B., Della-Vedova, C., Galas, S., Adam-Guillermin, C., & Lecomte-Pradines, C. (2014). Effects of chronic gamma irradiation: A multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Radioactivity*, *137*, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.07.014>
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*, *51*(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., & Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *424*(1-2), 9-21. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00004-4)
- Cannon, M. B., & James Remington, S. (2008). Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein: Probes for Dynamic Intracellular Redox Responses. A Review. In J. T. Hancock (Éd.), *Redox-Mediated Signal Transduction* (Vol. 476, p. 50-64). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-129-1_4
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, *10*(5), 295-304. <https://doi.org/10.1038/nrg2540>
- Choi, K.-M., Kang, C.-M., Cho, E., Kang, S., Lee, S., & Um, H.-D. (2007). Ionizing radiation-induced micronucleus formation is mediated by reactive oxygen species that are produced in a manner dependent on mitochondria, Nox1, and JNK. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.17.5.1183>
- Choudhary, S. (2018). Deterministic and Stochastic Effects of Radiation. *Cancer Therapy & Oncology International Journal*, *12*(2). <https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2018.12.555834>

- Chu, D. S., Liu, H., Nix, P., Wu, T. F., Ralston, E. J., Yates, J. R., & Meyer, B. J. (2006). Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature*, *443*(7107), 101-105. <https://doi.org/10.1038/nature05050>
- Clejan, I., Boerckel, J., & Ahmed, S. (2006). Developmental Modulation of Nonhomologous End Joining in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *173*(3), 1301-1317. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058628>
- Copplestone, D., Hingston, J., & Real, A. (2008). The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. *Journal of Environmental Radioactivity*, *99*(9), 1456-1463. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.01.006>
- Corre, I., Niaudet, C., & Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *704*(1-3), 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.014>
- Corrêa, R. L., Steiner, F. A., Berezikov, E., & Ketting, R. F. (2010). MicroRNA-directed siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, *6*(4), e1000903. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000903>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology : A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *200*(2), 387-407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Coutellec, M.-A., & Barata, C. (2011). An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, *20*(3), 493-496. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0637-x>
- Cox, M. M., & Battista, J. R. (2005). *Deinococcus radiodurans*—The consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(11), 882-892. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1264>

- Dallas, L. J., Keith-Roach, M., Lyons, B. P., & Jha, A. N. (2012). Assessing the Impact of Ionizing Radiation on Aquatic Invertebrates: A Critical Review. *Radiation Research*, 177(5), 693-716. <https://doi.org/10.1667/RR2687.1>
- Davidovich, C., & Cech, T. R. (2015). The recruitment of chromatin modifiers by long noncoding RNAs: Lessons from PRC2. *RNA*, 21(12), 2007-2022. <https://doi.org/10.1261/rna.053918.115>
- del Castillo-Olivares, A., Kulkarni, M., & Smith, H. E. (2009). Regulation of sperm gene expression by the GATA factor ELT-1. *Developmental Biology*, 333(2), 397-408. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.044>
- Desouky, O., Ding, N., & Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>
- Dexheimer, P. J., Wang, J., & Cochella, L. (2020). Two MicroRNAs Are Sufficient for Embryonic Patterning in *C. elegans*. *Current Biology: CB*, 30(24), 5058-5065.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.066>
- Dhakal, R., Yosofvand, M., Yavari, M., Abdulrahman, R., Schurr, R., Moustaid-Moussa, N., & Moussa, H. (2021). Review of Biological Effects of Acute and Chronic Radiation Exposure on *Caenorhabditis elegans*. *Cells*, 10(8), 1966. <https://doi.org/10.3390/cells10081966>
- Dubois, C., Lecomte, C., Ruys, S. P. dit, Kuzmic, M., Della-Vedova, C., Dubourg, N., Galas, S., & Frelon, S. (2018). Precoce and opposite response of proteasome activity after acute or chronic exposure of *C. elegans* to γ -radiation. *Scientific Reports*, 8(1), 11349. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29033-1>
- Dubois, C., Pophillat, M., Audebert, S., Fourquet, P., Lecomte, C., Dubourg, N., Galas, S., Camoin, L., & Frelon, S. (2019). Differential modification of the *C. elegans* proteome

- in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. *Science of The Total Environment*, 676, 767-781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.039>
- Dufourcq-Sekatcheff, E., Cuiné, S., Li-Beisson, Y., Quevarec, L., Richaud, M., Galas, S., & Frelon, S. (2021). Deciphering Differential Life Stage Radioinduced Reproductive Decline in *Caenorhabditis elegans* through Lipid Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10277. <https://doi.org/10.3390/ijms221910277>
- Edifizi, D., Nolte, H., Babu, V., Castells-Roca, L., Mueller, M. M., Brodesser, S., Krüger, M., & Schumacher, B. (2017). Multilayered Reprogramming in Response to Persistent DNA Damage in *C. elegans*. *Cell Reports*, 20(9), 2026-2043. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.028>
- Ellis, R. E., & Stanfield, G. M. (2014). The regulation of spermatogenesis and sperm function in nematodes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29, 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.005>
- Engert, C. G., Droste, R., van Oudenaarden, A., & Horvitz, H. R. (2018). A *Caenorhabditis elegans* protein with a PRDM9-like SET domain localizes to chromatin-associated foci and promotes spermatocyte gene expression, sperm production and fertility. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007295. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007295>
- Escorcía, W., Ruter, D. L., Nhan, J., & Curran, S. P. (2018). Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *Journal of Visualized Experiments*, 133, 57352. <https://doi.org/10.3791/57352>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>

- Frankenberg-Schwager, M. (1990). Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 29(4), 273-292. <https://doi.org/10.1007/BF01210408>
- Fuller, N., Smith, J. T., & Ford, A. T. (2019). Impacts of ionising radiation on sperm quality, DNA integrity and post-fertilisation development in marine and freshwater crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186, 109764. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109764>
- Furuhashi, H., Takasaki, T., Rechtsteiner, A., Li, T., Kimura, H., Checchi, P. M., Strome, S., & Kelly, W. G. (2010). Trans-generational epigenetic regulation of *C. elegans* primordial germ cells. *Epigenetics & Chromatin*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-3-15>
- Gartner, A., Boag, P. R., & Blackwell, T. K. (2008). Germline survival and apoptosis. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1-20. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.145.1>
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., & Hengartner, M. O. (2000). A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell*, 5(3), 435-443. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80438-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80438-4)
- Gonzalez-Hunt, C. P., Rooney, J. P., Ryde, I. T., Anbalagan, C., Joglekar, R., & Meyer, J. N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Current Protocols in Toxicology*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2011s67>
- Greer, E. L., Beese-Sims, S. E., Brookes, E., Spadafora, R., Zhu, Y., Rothbart, S. B., Aristizábal-Corrales, D., Chen, S., Badeaux, A. I., Jin, Q., Wang, W., Strahl, B. D., Colaiácovo, M. P., & Shi, Y. (2014). A histone methylation network regulates transgenerational

- epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell Reports*, 7(1), 113-126.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.044>
- Greer, E. L., Blanco, M. A., Gu, L., Sendinc, E., Liu, J., Aristizábal-Corrales, D., Hsu, C.-H., Aravind, L., He, C., & Shi, Y. (2015). DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161(4), 868-878. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.005>
- Gu, S. G., Pak, J., Guang, S., Maniar, J. M., Kennedy, S., & Fire, A. (2012). Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nature Genetics*, 44(2), 157-164.
<https://doi.org/10.1038/ng.1039>
- Gudsnuk, K., & Champagne, F. A. (2012). Epigenetic Influence of Stress and the Social Environment. *ILAR Journal*, 53(3-4), 279-288. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.3-4.279>
- Guédon, R., Maremonti, E., Armant, O., Galas, S., Brede, D. A., & Lecomte-Pradines, C. (2021). A systems biology analysis of reproductive toxicity effects induced by multigenerational exposure to ionizing radiation in *C. elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112793.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112793>
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development (Cambridge, England)*, 126(5), 1011-1022.
- Handbook of Epigenetics—2nd Edition*. (s. d.). Consulté 26 décembre 2021, à l'adresse <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-epigenetics/tollefsbol/978-0-12-805388-1>
- Hansen, D., Wilson-Berry, L., Dang, T., & Schedl, T. (2004). Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation

- of GLD-1 protein accumulation. *Development*, 131(1), 93-104.
<https://doi.org/10.1242/dev.00916>
- Hansen, M., Flatt, T., & Aguilaniu, H. (2013). Reproduction, fat metabolism, and life span : What is the connection? *Cell Metabolism*, 17(1), 10-19.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.003>
- Harrison, F. L., & Anderson, S. L. (1996). *Taxonomic and developmental aspects of radiosensitivity* (UCRL-JC-125920; CONF-960529-1). Lawrence Livermore National Lab. (LLNL), Livermore, CA (United States).
<https://www.osti.gov/biblio/562332>
- Hartman, P. S., & Herman, R. K. (1982). RADIATION-SENSITIVE MUTANTS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*, 102(2), 159-178.
<https://doi.org/10.1093/genetics/102.2.159>
- Herman, R. K., Albertson, D. G., & Brenner, S. (1976). CHROMOSOME REARRANGEMENTS IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*, 83(1), 91-105.
<https://doi.org/10.1093/genetics/83.1.91>
- Hertel-Aas, T., Oughton, D. H., Jaworska, A., & Brunborg, G. (2011). Induction and repair of DNA strand breaks and oxidised bases in somatic and spermatogenic cells from the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to ionising radiation. *Mutagenesis*, 26(6), 783-793. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger048>
- Hesp, K., Smant, G., & Kammenga, J. E. (2015). *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease. *Experimental Gerontology*, 72, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.006>
- Ho, J. W. K., Jung, Y. L., Liu, T., Alver, B. H., Lee, S., Ikegami, K., Sohn, K.-A., Minoda, A., Tolstorukov, M. Y., Appert, A., Parker, S. C. J., Gu, T., Kundaje, A., Riddle, N. C., Bishop,

- E., Egelhofer, T. A., Hu, S. S., Alekseyenko, A. A., Rechtsteiner, A., ... Park, P. J. (2014). Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature*, *512*(7515), 449-452. <https://doi.org/10.1038/nature13415>
- Hochedlinger, K., & Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, *136*(4), 509-523. <https://doi.org/10.1242/dev.020867>
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, *187*(4173), 226-232.
- Honjo, Y., & Ichinohe, T. (2020). Stage-Specific Effects of Ionizing Radiation during Early Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), E3975. <https://doi.org/10.3390/ijms21113975>
- Horemans, N., Spurgeon, D. J., Lecomte-Pradines, C., Saenen, E., Bradshaw, C., Oughton, D., Rasnaca, I., Kamstra, J. H., & Adam-Guillermin, C. (2019). Current evidence for a role of epigenetic mechanisms in response to ionizing radiation in an ecotoxicological context. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *251*, 469-483. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.125>
- Houri-Zeevi, L., Korem Kohanim, Y., Antonova, O., & Rechavi, O. (2020). Three Rules Explain Transgenerational Small RNA Inheritance in *C. elegans*. *Cell*, *182*(5), 1186-1197.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.022>
- Houri-Ze'evi, L., Korem, Y., Sheftel, H., Faigenbloom, L., Toker, I. A., Dagan, Y., Awad, L., Degani, L., Alon, U., & Rechavi, O. (2016). A Tunable Mechanism Determines the Duration of the Transgenerational Small RNA Inheritance in *C. elegans*. *Cell*, *165*(1), 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.057>
- Houri-Zeevi, L., & Rechavi, O. (2017). A Matter of Time : Small RNAs Regulate the Duration of Epigenetic Inheritance. *Trends in Genetics: TIG*, *33*(1), 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.11.001>

- Houri-Zeevi, L., Teichman, G., Gingold, H., & Rechavi, O. (2021). Stress resets ancestral heritable small RNA responses. *ELife*, *10*, e65797. <https://doi.org/10.7554/eLife.65797>
- Hurem, S., Gomes, T., Brede, D. A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y. A., Olsen, A.-K., Oughton, D., Aleström, P., & Lyche, J. L. (2017). Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Research*, *159*, 564-578. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.053>
- Jaramillo-Lambert, A., Harigaya, Y., Vitt, J., Villeneuve, A., & Engebrecht, J. (2010). Meiotic Errors Activate Checkpoints that Improve Gamete Quality without Triggering Apoptosis in Male Germ Cells. *Current Biology*, *20*(23), 2078-2089. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.008>
- Jia, F., Chi, C., & Han, M. (2020). Regulation of Nucleotide Metabolism and Germline Proliferation in Response to Nucleotide Imbalance and Genotoxic Stresses by EndoU Nuclease. *Cell Reports*, *30*(6), 1848-1861.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.050>
- Kadhim, M., Salomaa, S., Wright, E., Hildebrandt, G., Belyakov, O. V., Prise, K. M., & Little, M. P. (2013). Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *752*(2), 84-98. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.12.001>
- Kamstra, J. H., Hurem, S., Martin, L. M., Lindeman, L. C., Legler, J., Oughton, D., Salbu, B., Brede, D. A., Lyche, J. L., & Aleström, P. (2018). Ionizing radiation induces transgenerational effects of DNA methylation in zebrafish. *Scientific Reports*, *8*(1), 15373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33817-w>

- Kaneshiro, K. R., Rechtsteiner, A., & Strome, S. (2019). Sperm-inherited H3K27me3 impacts offspring transcription and development in *C. elegans*. *Nature Communications*, *10*(1), 1271. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09141-w>
- Karp, X., & Greenwald, I. (2013). Control of cell-fate plasticity and maintenance of multipotency by DAF-16/FoxO in quiescent *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(6), 2181-2186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222377110>
- Kato, M., Kashem, M. A., & Cheng, C. (2016). An intestinal microRNA modulates the homeostatic adaptation to chronic oxidative stress in *C. elegans*. *Aging*, *8*(9), 1979-2005. <https://doi.org/10.18632/aging.101029>
- Katz, D. J., Edwards, T. M., Reinke, V., & Kelly, W. G. (2009). A *C. elegans* LSD1 demethylase contributes to germline immortality by reprogramming epigenetic memory. *Cell*, *137*(2), 308-320. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.015>
- Kelly, W. G. (2014). Transgenerational epigenetics in the germline cycle of *Caenorhabditis elegans*. *Epigenetics & Chromatin*, *7*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-6>
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, *366*(6454), 461-464. <https://doi.org/10.1038/366461a0>
- Kerachian, M. A., Javadmanesh, A., Azghandi, M., Mojtabanezhad Shariatpanahi, A., Yassi, M., Shams Davodly, E., Talebi, A., Khadangi, F., Soltani, G., Hayatbakhsh, A., & Ghaffarzadegan, K. (2020). Crosstalk between DNA methylation and gene expression in colorectal cancer, a potential plasma biomarker for tracing this tumor. *Scientific Reports*, *10*(1), 2813. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59690-0>

- Khabib, M. N. H., Sivasanku, Y., Lee, H. B., Kumar, S., & Kue, C. S. (2022). Alternative animal models in predictive toxicology. *Toxicology*, *465*, 153053. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153053>
- Kimble, J. (2005). Germline proliferation and its control. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.13.1>
- King, D. C., Williams, R. T. P., Mastroianni, I. R., Hill, J., Apenas, N. W., Ramirez, G., & Nishimura, E. O. (2021). *The transcription factor ELT-2 positively and negatively impacts direct target genes to modulate the Caenorhabditis elegans intestinal transcriptome* (p. 2021.08.29.457787). <https://doi.org/10.1101/2021.08.29.457787>
- Kioumourtzoglou, M.-A., Coull, B. A., O'Reilly, É. J., Ascherio, A., & Weisskopf, M. G. (2018). Association of Exposure to Diethylstilbestrol During Pregnancy With Multigenerational Neurodevelopmental Deficits. *JAMA Pediatrics*, *172*(7), 670-677. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.0727>
- Kirkwood, T. B. L. (2002). Evolution of ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, *123*(7), 737-745. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00419-5](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00419-5)
- Kishimoto, S., Uno, M., Okabe, E., Nono, M., & Nishida, E. (2017). Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, *8*(1), 14031. <https://doi.org/10.1038/ncomms14031>
- Klosin, A., Casas, E., Hidalgo-Carcedo, C., Vavouri, T., & Lehner, B. (2017). Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science*, *356*(6335), 320-323. <https://doi.org/10.1126/science.aah6412>
- KNOWLES, J. F. (1999). Long-term irradiation of a marine fish, the plaice *Pleuronectes platessa* : An assessment of the effects on size and composition of the testes and of

- possible genotoxic changes in peripheral erythrocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 75(6), 773-782. <https://doi.org/10.1080/095530099140122>
- Knowles, J. F., & Greenwood, L. N. (1994). The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (polychaeta, dorvilleidae). *Marine Environmental Research*, 38(3), 207-224. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)90008-6)
- Kocsisova, Z., Mohammad, A., Kornfeld, K., & Schedl, T. (2018). Cell Cycle Analysis in the *C. elegans* Germline with the Thymidine Analog EdU. *Journal of Visualized Experiments*, 140, 58339. <https://doi.org/10.3791/58339>
- Koturbash, I., Baker, M., Loree, J., Kutanzi, K., Hudson, D., Pogribny, I., Sedelnikova, O., Bonner, W., & Kovalchuk, O. (2006). Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*, 66(2), 327-330. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.06.012>
- Koturbash, I., Kutanzi, K., Hendrickson, K., Rodriguez-Juarez, R., Kogosov, D., & Kovalchuk, O. (2008). Radiation-induced bystander effects in vivo are sex specific. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 642(1-2), 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.04.002>
- Kovalchuk, I., Molinier, J., Yao, Y., Arkhipov, A., & Kovalchuk, O. (2007). Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutation Research*, 624(1-2), 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.04.009>
- Kulkarni, M., Shakes, D. C., Guevel, K., & Smith, H. E. (2012). SPE-44 Implements Sperm Cell Fate. *PLoS Genetics*, 8(4), e1002678. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002678>

- Kuwabara, P. E., & Perry, M. D. (2001). It ain't over till it's ova : Germline sex determination in *C. elegans*. *BioEssays*, 23(7), 596-604. <https://doi.org/10.1002/bies.1085>
- Kuzmic, M., Galas, S., Lecomte-Pradines, C., Dubois, C., Dubourg, N., & Frelon, S. (2019). Interplay between ionizing radiation effects and aging in *C. elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 657-665. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.002>
- Lapierre, L. R., De Magalhaes Filho, C. D., McQuary, P. R., Chu, C.-C., Visvikis, O., Chang, J. T., Gelino, S., Ong, B., Davis, A. E., Irazoqui, J. E., Dillin, A., & Hansen, M. (2013). The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 4(1), 2267. <https://doi.org/10.1038/ncomms3267>
- Leacock, S. W., & Reinke, V. (2006). Expression Profiling of MAP Kinase-Mediated Meiotic Progression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 2(11), e174. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020174>
- Leung, A. K. L., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Molecular Cell*, 40(2), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.027>
- L'Hernault, S. W. (2006). Spermatogenesis. In *WormBook : The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19752/>
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Li, Y., Zhang, M., Chen, P., Liu, R., Liang, G., Yin, L., & Pu, Y. (2015). Effects of Microcystin-LR Exposure on Spermiogenesis in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22927-22937. <https://doi.org/10.3390/ijms160922927>

- Lin, X.-X., Sen, I., Janssens, G. E., Zhou, X., Fonslow, B. R., Edgar, D., Stroustrup, N., Swoboda, P., Yates, J. R., Ruvkun, G., & Riedel, C. G. (2018). DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nature Communications*, *9*(1), 4400. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06624-0>
- Liu, G., Gong, P., Zhao, H., Wang, Z., Gong, S., & Cai, L. (2006). Effect of low-level radiation on the death of male germ cells. *Radiation Research*, *165*(4), 379-389. <https://doi.org/10.1667/rr3528.1>
- Liu, M., Liu, P., Zhang, L., Cai, Q., Gao, G., Zhang, W., Zhu, Z., Liu, D., & Fan, Q. (2011). Mir-35 is involved in intestine cell G1/S transition and germ cell proliferation in *C. elegans*. *Cell Research*, *21*(11), 1605-1618. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.102>
- Liu, Z., Huang, R., Roberts, R., & Tong, W. (2019). Toxicogenomics : A 2020 Vision. *Trends in Pharmacological Sciences*, *40*(2), 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.001>
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*, *25*(10), 578-585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
- Lousada, C. M., Soroka, I. L., Yagodzinskyy, Y., Tarakina, N. V., Todoshchenko, O., Hänninen, H., Korzhavyi, P. A., & Jonsson, M. (2016). Gamma radiation induces hydrogen absorption by copper in water. *Scientific Reports*, *6*(1), 24234. <https://doi.org/10.1038/srep24234>
- Luo, G.-Z., Blanco, M. A., Greer, E. L., He, C., & Shi, Y. (2015). DNA N6-methyladenine : A new epigenetic mark in eukaryotes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(12), 705-710. <https://doi.org/10.1038/nrm4076>

- Ma, C., Niu, R., Huang, T., Shao, L.-W., Peng, Y., Ding, W., Wang, Y., Jia, G., He, C., Li, C.-Y., He, A., & Liu, Y. (2019). N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for mitochondrial stress adaptation. *Nature Cell Biology*, *21*(3), 319-327. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0238-5>
- Mancuso, M., Pasquali, E., Braga-Tanaka, I., Tanaka, S., Pannicelli, A., Giardullo, P., Pazzaglia, S., Tapio, S., Atkinson, M. J., & Saran, A. (2015). Acceleration of atherogenesis in ApoE^{-/-} mice exposed to acute or low-dose-rate ionizing radiation. *Oncotarget*, *6*(31), 31263-31271. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5075>
- Maniates, K. A., Olson, B. S., & Abbott, A. L. (2021). Sperm fate is promoted by the mir-44 microRNA family in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Genetics*, *217*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa006>
- Maremonti, E., Eide, D. M., Oughton, D. H., Salbu, B., Grammes, F., Kassaye, Y. A., Guédon, R., Lecomte-Pradines, C., & Brede, D. A. (2019). Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* via impairment of spermatogenesis. *Science of The Total Environment*, *695*, 133835. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133835>
- Maremonti, E., Eide, D. M., Rossbach, L. M., Lind, O. C., Salbu, B., & Brede, D. A. (2020a). In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, *152*, 583-596. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.037>
- Maremonti, E., Eide, D. M., Rossbach, L. M., Lind, O. C., Salbu, B., & Brede, D. A. (2020b). In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*. *Free*

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.037>

- Martín, L., Kamstra, J. H., Hurem, S., Lindeman, L. C., Brede, D. A., Aanes, H., Babiak, I., Arenal, A., Oughton, D., Salbu, B., Lyche, J. L., & Aleström, P. (2021). Altered non-coding RNA expression profile in F1 progeny 1 year after parental irradiation is linked to adverse effects in zebrafish. *Scientific Reports*, 11(1), 4142. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83345-3>
- Massirer, K. B., Perez, S. G., Mondol, V., & Pasquinelli, A. E. (2012). The miR-35-41 family of microRNAs regulates RNAi sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002536. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002536>
- Maxwell, C. A., Fleisch, M. C., Costes, S. V., Erickson, A. C., Boissière, A., Gupta, R., Ravani, S. A., Parvin, B., & Barcellos-Hoff, M. H. (2008). Targeted and Nontargeted Effects of Ionizing Radiation That Impact Genomic Instability. *Cancer Research*, 68(20), 8304-8311. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1212>
- McGhee, J. D., Sleumer, M. C., Bilenky, M., Wong, K., McKay, S. J., Goszczynski, B., Tian, H., Krich, N. D., Khattrra, J., Holt, R. A., Baillie, D. L., Kohara, Y., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Moerman, D. G., & Robertson, A. G. (2007). The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. *Developmental Biology*, 302(2), 627-645. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.024>
- McJunkin, K., & Ambros, V. (2014). The embryonic mir-35 family of microRNAs promotes multiple aspects of fecundity in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 4(9), 1747-1754. <https://doi.org/10.1534/g3.114.011973>
- McKay, S. J., Johnsen, R., Khattrra, J., Asano, J., Baillie, D. L., Chan, S., Dube, N., Fang, L., Goszczynski, B., Ha, E., Halfnight, E., Hollebakken, R., Huang, P., Hung, K., Jensen, V., Jones, S. J. M., Kai, H., Li, D., Mah, A., ... Moerman, D. G. (2003). Gene Expression

- Profiling of Cells, Tissues, and Developmental Stages of the Nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 68(0), 159-170. <https://doi.org/10.1101/sqb.2003.68.159>
- Merrifield, M., & Kovalchuk, O. (2013). Epigenetics in radiation biology : A new research frontier. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00040>
- Metheetrairut, C., Adams, B. D., Nallur, S., Weidhaas, J. B., & Slack, F. J. (2017). Cel-mir-237 and its homologue, hsa-miR-125b, modulate the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*, 36(4), 512-524. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.222>
- Michaelson, D., Korta, D. Z., Capua, Y., & Hubbard, E. J. A. (2010). Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development*, 137(4), 671-680. <https://doi.org/10.1242/dev.042523>
- Møller, A. P., Mousseau, T. A., Lynn, C., Lynnn, C., Ostermiller, S., & Rudolfsen, G. (2008). Impaired swimming behaviour and morphology of sperm from barn swallows *Hirundo rustica* in Chernobyl. *Mutation Research*, 650(2), 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.006>
- MotherSill, C., & Seymour, C. (2012). Changing paradigms in radiobiology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(2), 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.007>
- Mueller, M. M., Castells-Roca, L., Babu, V., Ermolaeva, M. A., Müller, R.-U., Frommolt, P., Williams, A. B., Greiss, S., Schneider, J. I., Benzing, T., Schermer, B., & Schumacher, B. (2014). DAF-16/FOXO and EGL-27/GATA promote developmental growth in response to persistent somatic DNA damage. *Nature Cell Biology*, 16(12), 1168-1179. <https://doi.org/10.1038/ncb3071>
- Murphy, C. T. (2013). Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1-43. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.164.1>

- Nachman, R. M., Mao, G., Zhang, X., Hong, X., Chen, Z., Soria, C. S., He, H., Wang, G., Caruso, D., Pearson, C., Biswal, S., Zuckerman, B., Wills-Karp, M., & Wang, X. (2016). Intrauterine Inflammation and Maternal Exposure to Ambient PM_{2.5} during Preconception and Specific Periods of Pregnancy: The Boston Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 124(10), 1608-1615. <https://doi.org/10.1289/EHP243>
- Nakashima, J., & Duong, H. (2021). Radiation Physics. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554515/>
- Nuclear Energy Agency. (2007). *Scientific issues and emerging challenges for radiological protection*. OECD.
- O’Brown, Z. K., & Greer, E. L. (2016). N6-Methyladenine : A Conserved and Dynamic DNA Mark. In A. Jeltsch & R. Z. Jurkowska (Éds.), *DNA Methyltransferases—Role and Function* (Vol. 945, p. 213-246). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_10
- Okabe, E., Uno, M., Kishimoto, S., & Nishida, E. (2021). Intertissue small RNA communication mediates the acquisition and inheritance of hormesis in *Caenorhabditis elegans*. *Communications Biology*, 4(1), 207. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01692-3>
- O’Neil, N. (2006). DNA Repair. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.54.1>
- Parisot, F., Bourdineaud, J.-P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C., & Alonzo, F. (2015). DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 163, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002>

- Pazdernik, N., & Schedl, T. (2013). Introduction to Germ Cell Development in *Caenorhabditis elegans*. In T. Schedl (Éd.), *Germ Cell Development in C. elegans* (Vol. 757, p. 1-16). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_1
- Pedrazzini, T. (2015). Le cœur des ARN non codants : Un long chemin à découvrir. *médecine/sciences*, 31(3), 261-267. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153103011>
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., & Adam-Guillermin, C. (2011). Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12), 2831-2837. <https://doi.org/10.1002/etc.695>
- Pinkston-Gosse, J., & Kenyon, C. (2007). DAF-16/FOXO targets genes that regulate tumor growth in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, 39(11), 1403-1409. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.1>
- Prakash, K., & Fournier, D. (2017). *Deciphering the histone code to build the genome structure* [Preprint]. Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/217190>
- Prüss-Ustün, A., Wolf, J., Corvalán, C., Neville, T., Bos, R., & Neira, M. (2017). Diseases due to unhealthy environments : An updated estimate of the global burden of disease attributable to environmental determinants of health. *Journal of Public Health*, 39(3), 464-475. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw085>
- Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J. (2019). Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies. *Frontiers in Genetics*, 9, 636. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>
- Real, A., Sundell-Bergman, S., Knowles, J. F., Woodhead, D. S., & Zinger, I. (2004). Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals : Relevant data for

- environmental radiation protection. *Journal of Radiological Protection*, 24(4A), A123-A137. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/24/4A/008>
- Rechavi, O., & Lev, I. (2017). Principles of Transgenerational Small RNA Inheritance in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology: CB*, 27(14), R720-R730. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.043>
- Riddle, Donald L, and Patrice S Albert. "Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development." *C. elegans II*, edited by Donald L Riddle et. al., 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Rinaldo, C., Bazzicalupo, P., Ederle, S., Hilliard, M., & La Volpe, A. (2002). Roles for *Caenorhabditis elegans rad-51* in Meiosis and in Resistance to Ionizing Radiation During Development. *Genetics*, 160(2), 471-479. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.2.471>
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 129(7), 1311-1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>
- Robertson, K. D., & A.Jones, P. (2000). DNA methylation: Past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 461-467. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.461>
- Sakashita, T., Takanami, T., Yanase, S., Hamada, N., Suzuki, M., Kimura, T., Kobayashi, Y., Ishii, N., & Higashitani, A. (2010). Radiation Biology of *Caenorhabditis elegans*: Germ Cell Response, Aging and Behavior. *Journal of Radiation Research*, 51(2), 107-121. <https://doi.org/10.1269/jrr.09100>
- Samson, M., Jow, M. M., Wong, C. C. L., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S. R., Yates, J. R., & Chu, D. S. (2014). The Specification and Global

- Reprogramming of Histone Epigenetic Marks during Gamete Formation and Early Embryo Development in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, *10*(10), e1004588. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004588>
- Sarsour, E. H., Kumar, M. G., Chaudhuri, L., Kalen, A. L., & Goswami, P. C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(12), 2985-3011. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2513>
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J., & Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics : MicroRNAs and epigenetics. *FEBS Journal*, *278*(10), 1598-1609. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x>
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., & Gartner, A. (2001). The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Current Biology: CB*, *11*(21), 1722-1727. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00534-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00534-6)
- Sengupta, K., Kolla, J. N., Bagchi, D., & Bagchi, M. (2011). Applications of toxicogenomics in reproductive and developmental toxicology. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (p. 793-799). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10059-1>
- Shikazono, N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A., & Yokoya, A. (2009). The Yield, Processing, and Biological Consequences of Clustered DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Journal of Radiation Research*, *50*(1), 27-36. <https://doi.org/10.1269/jrr.08086>
- Skinner, M. K. (2009). *What is an Epigenetic Transgenerational Phenotype ? F3 or F2*. 9.
- Spitz, D. R., Azzam, E. I., Jian Li, J., & Gius, D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation : A unifying concept in stress

- response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(3/4), 311-322.
<https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc>
- Stevens, H., Williams, A. B., & Michael, W. M. (2016). Cell-Type Specific Responses to DNA Replication Stress in Early *C. elegans* Embryos. *PLoS One*, 11(10), e0164601.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164601>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*.
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64-119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., & Laval, J. (2000). Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 103-108.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.103>
- Svoboda, P., & Harms-Ringdahl, M. (2005). Influence of Chromatin Structure and Radical Scavengers on Yields of Radiation-Induced 8-oxo-dG and DNA Strand Breaks in Cellular Model Systems. *Radiation Research*, 164(3), 303-311.
<https://doi.org/10.1667/RR3418.1>
- Tabuchi, T. M., Rechtsteiner, A., Jeffers, T. E., Egelhofer, T. A., Murphy, C. T., & Strome, S. (2018). *Caenorhabditis elegans* sperm carry a histone-based epigenetic memory of both spermatogenesis and oogenesis. *Nature Communications*, 9(1), 4310.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06236-8>
- Takata, H., Hanafusa, T., Mori, T., Shimura, M., Iida, Y., Ishikawa, K., Yoshikawa, K., Yoshikawa, Y., & Maeshima, K. (2013). Chromatin compaction protects genomic

- DNA from radiation damage. *PloS One*, 8(10), e75622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075622>
- Taki, F. A., Pan, X., Lee, M.-H., & Zhang, B. (2015). Nicotine exposure and transgenerational impact : A prospective study on small regulatory microRNAs. *Scientific Reports*, 4(1), 7513. <https://doi.org/10.1038/srep07513>
- Tang, W. W. C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H. G., Floros, V. I., Bradshaw, C. R., Hackett, J. A., Chinnery, P. F., & Surani, M. A. (2015). A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell*, 161(6), 1453-1467.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.053>
- Tepper, R. G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C. T., & Bussemaker, H. J. (2013). PQM-1 Complements DAF-16 as a Key Transcriptional Regulator of DAF-2-Mediated Development and Longevity. *Cell*, 154(3), 676-690.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.006>
- The ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74.
<https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells : The molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(2), 158-246.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.06.002>
- Tran, A. T., Chapman, E. M., Flamand, M. N., Yu, B., Krempel, S. J., Duchaine, T. F., Eroglu, M., & Derry, W. B. (2019). MiR-35 buffers apoptosis thresholds in the *C. elegans* germline by antagonizing both MAPK and core apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation*, 26(12), 2637-2651. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0325-6>

- Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K. A. C., & Alonzo, F. (2018). Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna* Exposed to Chronic γ Irradiation. *Environmental Science & Technology*, *52*(7), 4331-4339. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05695>
- Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., & Masse, R. (2006). The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses. *Journal of Radiological Protection*, *26*(3), 317-324. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/26/3/N01>
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), N. Y., NY (United States). (1996). *Sources and effects of ionizing radiation UNSCEAR 1996 report to the General Assembly, with scientific annex*. UN.
- UNSCEAR 2012. (s. d.). *UNSCEAR, 2012. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., de Goede, R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S., Bardgett, R. D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J. E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S. R., Creamer, R., ... Crowther, T. W. (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*, *572*(7768), 194-198. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>
- van der Lee, G. H., Kraak, M. H. S., Verdonschot, R. C. M., & Verdonschot, P. F. M. (2020). Persist or perish : Critical life stages determine the sensitivity of invertebrates to disturbances. *Aquatic Sciences*, *82*(2), 24. <https://doi.org/10.1007/s00027-020-0698-0>
- Van Voorhies, W. A., Castillo, H. A., Thawng, C. N., & Smith, G. B. (2020). The Phenotypic and Transcriptomic Response of the *Caenorhabditis elegans* Nematode to

- Background and Below-Background Radiation Levels. *Frontiers in Public Health*, 8, 581796. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.581796>
- van Haften, G., Romeijn, R., Pothof, J., Koole, W., Mullenders, L. H. F., Pastink, A., Plasterk, R. H. A., & Tijsterman, M. (2006). Identification of Conserved Pathways of DNA-Damage Response and Radiation Protection by Genome-Wide RNAi. *Current Biology*, 16(13), 1344-1350. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.047>
- Vasamsetti, B. M. K., Park, Y.-S., & Cho, N. J. (2018). VIG-1 is required for maintenance of genome stability in *Caenorhabditis elegans*. *Animal Cells and Systems*, 22(3), 197-204. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1476410>
- Vastenhouw, N. L., Brunschwig, K., Okihara, K. L., Müller, F., Tijsterman, M., & Plasterk, R. H. A. (2006). Long-term gene silencing by RNAi. *Nature*, 442(7105), 882-882. <https://doi.org/10.1038/442882a>
- Vella, M. C. (2005). *C. elegans* microRNAs. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.26.1>
- Verma, I. (2002). 2002 Nobel Prize for Physiology and Medicine. *Molecular Therapy*, 6(6), 698. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0824>
- Vermezovic, J., Stergiou, L., Hengartner, M. O., & d'Adda di Fagagna, F. (2012). Differential regulation of DNA damage response activation between somatic and germline cells in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death & Differentiation*, 19(11), 1847-1855. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.69>
- Vitale, G., Pellegrino, G., Vollery, M., & Hofland, L. J. (2019). ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity : Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 27. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00027>

- Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2017). DNA Damage in Stem Cells. *Molecular Cell*, 66(3), 306-319. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.006>
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G. W., Geisler, R., Schirmer, K., & Scholz, S. (2007). Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 81(4), 355-364. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.013>
- Vowels, J. J., & Thomas, J. H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 130(1), 105-123. <https://doi.org/10.1093/genetics/130.1.105>
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10-13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Wade, P. A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays*, 23(12), 1131-1137. <https://doi.org/10.1002/bies.10008>
- Weiser, N. E., & Kim, J. K. (2019). Multigenerational Regulation of the *Caenorhabditis elegans* Chromatin Landscape by Germline Small RNAs. *Annual Review of Genetics*, 53(1), 289-311. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043505>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 314(1165), 1-340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Wiesenfahrt, T., Berg, J. Y., Osborne Nishimura, E., Robinson, A. G., Goszczynski, B., Lieb, J. D., & McGhee, J. D. (2016). The function and regulation of the GATA factor ELT-2 in the *C. elegans* endoderm. *Development (Cambridge, England)*, 143(3), 483-491. <https://doi.org/10.1242/dev.130914>

- Woodhead, D. (2002). Protection of the environment from the effects of ionising radiation. *Journal of Radiological Protection*, 22(3), 231-233. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/22/3/002>
- Yan, M. S.-C., Matouk, C. C., & Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology*, 109(3), 916-926. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00131.2010>
- Yang, R., Ren, M., Rui, Q., & Wang, D. (2016). A mir-231-Regulated Protection Mechanism against the Toxicity of Graphene Oxide in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 6(1), 32214. <https://doi.org/10.1038/srep32214>
- Youngman, E. M., & Claycomb, J. M. (2014). From early lessons to new frontiers : The worm as a treasure trove of small RNA biology. *Frontiers in Genetics*, 5, 416. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00416>
- Zečić, A., & Braeckman, B. P. (2020). DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells*, 9(1), E109. <https://doi.org/10.3390/cells9010109>
- Zeller, P., Padeken, J., van Schendel, R., Kalck, V., Tijsterman, M., & Gasser, S. M. (2016). Histone H3K9 methylation is dispensable for *Caenorhabditis elegans* development but suppresses RNA:DNA hybrid-associated repeat instability. *Nature Genetics*, 48(11), 1385-1395. <https://doi.org/10.1038/ng.3672>
- Zhang, F., & Wang, D. (2017). The Pattern of microRNA Binding Site Distribution. *Genes*, 8(11), 296. <https://doi.org/10.3390/genes8110296>
- Zhao, Y., Yang, J., & Wang, D. (2016). A MicroRNA-Mediated Insulin Signaling Pathway Regulates the Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 6(1), 23234. <https://doi.org/10.1038/srep23234>

