

Travail de fin d'études

Auteur : Fotseu Kouam, Arnold Landry

Promoteur(s) : 8792

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/16403>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



UNIVERSITE DE LIEGE



FACULTE DES SCIENCES

Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Travail de Fin d'Etude

**EXPOSITION PRÉCOCE DES EMBRYONS DU RIVULUS
DES MANGROVES À LA PERMETHRINE, UN
PYRÉTHROÏDE NEUROTOXIQUE : EFFETS SUR LES
TRAITS PHÉNOTYPIQUES**

Réalisé Par

FOTSEU KOUAM Arnold Landry

Promoteur

Frédéric Silvestre

Encadrant

Anthony Mathiron

Année Académique : 2021-2022

Table des matières

Table de Matière.....	i
Dédicace.....	ii
Remerciements.....	iii
Résumé.....	iv
Liste des Abréviations.....	v
Liste des Figures.....	vi
I. Introduction.....	1
I.1. Epigénétique.....	1
I.1.1. Historique et concepts.....	1
I.1.2. Mécanismes épigénétiques.....	1
I.1.3. La méthylation de l'ADN comme principal mécanisme d'étude.....	2
I.1.4. Dynamique de reprogrammation.....	5
I.1.5. La perméthrine comme source de stress environnemental.....	6
I.2. Un modèle biologique pas comme les autres.....	8
I.3. Problématique et objectifs de l'étude.....	9
II. MATERIEL ET METHODES.....	10
II.1. Elevage en laboratoire.....	10
II.2. Prélèvement et exposition des œufs à la PM.....	11
II.3. Détermination des effets de la PM sur les œufs.....	14
II.4. Quantification de la Perméthrine par HPLC.....	15
II.5. Extraction d'ADN/ARN.....	15
II.6. Analyse des données.....	16
III. Résultats.....	17
III.1 Mortalité.....	17
III.2 Flux Sanguin.....	17
III.3. Fréquence cardiaque (battements/min).....	18
III.4. Activité.....	19
III.5. Expression génique relative.....	19
IV. Discussion.....	20
Conclusion et perspectives.....	23
Références Bibliographiques.....	24
Liste des Annexes.....	32

À

MES PARENTS

KOUAM MICHEL

&

NGAINTCHOU MARIE NOËL

POUR LES EFFORTS CONSENTIS À MON

ÉDUCATION

Remerciements

Je ne saurais trouver les mots justes pour remercier mon promoteur le Professeur Frédéric Silvestre du Laboratoire de Physiologie Evolutive et Adaptative de l'Université de Namur et mon encadrant Anthony Mathiron, pour leur disponibilité, leur précieux conseils, leur rigueur dans le travail et l'esprit de collaboration dans la recherche.

Qu'il me soit permis de remercier par anticipation tous les éminents membres du jury qui me font le grand honneur de juger ce travail et qui ont accepté d'y consacrer une part importante de leur précieux temps pour apporter leurs observations pertinentes.

Je remercie également les enseignants qui m'ont tenu à l'Université de Yaoundé I, tout particulièrement le Professeur AJEAGAH Gideon AGHAINDUM qui a été un maillon indispensable dans ma formation.

Je tiens à remercier également tous les étudiants, chercheurs et membres du Laboratoire de Physiologie Evolutive et Adaptative de l'Université de Namur.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes camarades, collègues et amis du *Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture*, promotion 2021-2022. A mes frères et sœurs, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, mes neveux et nièces et tous mes camarades de la Promotion Symbiose à l'Université de Yaoundé I.

Mes sincères remerciements à la coopération belge au développement, qui à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur a mis à ma disposition tout le nécessaire qui m'ont permis de mener à bien cette formation.

Comment terminer cette rubrique sans remercier tous les enseignants qui m'ont tenu durant ma formation en *Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture* et qui m'ont inculqué de nouvelles notions dans ce précieux domaine.

Résumé

Chez les animaux, la reprogrammation épigénétique de l'ADN est un processus très important se déroulant souvent pendant les phases critiques de développement. L'exposition à la perméthrine (PM) un composé neurotoxique durant cette phase critique de développement pourrait influencer ce processus de reprogrammation. C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail donc l'objectif était d'évaluer l'influence de la PM sur les œufs du rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*, le seul vertébré connu où les individus hermaphrodites sont capables d'autofécondation. Cette capacité unique permet la production naturelle de lignées isogéniques au sein desquelles la variabilité génétique inter-individuelle est très faible et donc d'étudier la part de l'environnement et celle des mécanismes épigénétiques sur les traits phénotypiques. Ici, nous avons évalué d'une part les effets de différentes concentrations de la PM sur la mortalité, le comportement (activité) et la physiologie (battement cardiaque, circulation sanguine) lors des phases critiques de développement et d'autre part d'évaluer l'expression associée des gènes impliqués dans les mécanismes épigénétiques (DNMT3aa, DNMT3ab) et le comportement (*Mecp2*). Les œufs ont été récoltés à partir d'individus hermaphrodites et leur stade de développement a été déterminé à l'aide d'un stéréomicroscope.

Ces œufs ont par la suite été exposés pendant 5 jours à la perméthrine à différentes concentrations, à savoir 0 µg/L (dose "contrôle" ; N=40), 149,7±37,5µg/L (concentration 1 : "C1" ; N=40) et 312,7±116,5µg/L (concentration 2 : "C2" ; N=40). La mortalité, le flux sanguin, la fréquence cardiaque et l'activité du corps ont par la suite été évalués. Les analyses moléculaires ont été réalisées à partir de pools de 7 œufs pour garantir une quantité suffisante d'ARN lors de l'extraction. L'expression génique relative des gènes d'intérêts (DNMT-3aa, DNMT-3ab et *Mecp2*) a été déterminée par qPCR.

Les analyses statistiques réalisées ont montré une différence significative sur le taux de mortalité, mais aucune concernant le flux sanguin, la fréquence cardiaque et l'activité du corps, bien qu'il y ait une légère tendance à la baisse en fonction de la concentration. Il ressort ainsi que la PM aurait induit 20% de mortalité chez les individus exposés à la concentration C2 contre 5% chez les individus témoins et ceux exposés à la concentration C1. Les moyennes du flux sanguin obtenues sont de : 7.21±0.04 % (moyenne ± SE, contrôle) ; 6.02±0.74% (moyenne ± SE, C1) ; 4.36±0.67% (moyenne ± SE, C2). Les moyennes de la fréquence cardiaque obtenues sont de 90±5 /min (moyenne ± SE, contrôle) ; 104 ± 2/min (moyenne ± SE, C1) et 89 ± 6/min (moyenne ± SE, concentration 2). Les moyennes de l'activité du corps sont de 1.74±0.4/5 min (moyenne ± SE, contrôle) ; 1.63±0.25 /5min (moyenne ± SE, concentration 1) ; 1.16±0.18/5min (moyenne ± SE, concentration 2).

Cette étude met donc en évidence que la PM est une molécule toxique, car elle entraîne significativement la mortalité des embryons, tend à réduire le flux sanguin, le battement cardiaque et entraîne une hypoactivité au cours des phases critiques de développement. Cependant aucun effet sur l'expression des gènes au cours de cette phase critique de développement n'a été observé.

Mots clés : *Kryptolebias marmoratus*, Perméthrine, Méthylation de l'ADN, Toxicité Reprogrammation génétique.

Liste des Abréviations

°C : degrés Celsius

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AID/APOBEC : Activation-induced deaminase and Apolipoprotein B mRNA editing enzyme

ARN : Acide RiboNucléique

C1 : Concentration 1

C2 : Concentration 2

CpG : Cytosine directement suivie d'une Guanosine

EPP : Population Emerson Point

Fig. : Figure

GLM : Modèles Linéaires Généralisés

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

LEAP : Laboratoire de Physiologie évolutive et adaptative

ng : Nanogramme

PM : Perméthrine

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

SAM : S-Adenosyl Methionine

TET : Ten-eleven Translocation Enzyme

Liste des Figures

- Figure 1 : Principaux mécanismes épigénétiques. La chromatine ajoute une information à celle de l'ADN sous la forme de méthylation de l'ADN, de modifications post traductionnelles des histones et des ARN non codants (Puumala & Hoyme, 2015). .. 2
- Figure 2 : Voies actives de déméthylation de l'ADN. Les enzymes AID/APOBEC et/ou les enzymes TET peuvent convertir les cytosines méthylées en thymine, 5-hmU, 5-fC ou 5-caC. Finalement, ces produits sont reconnus et remplacés par une cytosine non méthylée grâce au système de base excision-repair et `a des enzymes TDG. (Moore et al., 2012). 4
- Figure 3 : Dynamique de la reprogrammation du méthylome depuis les gamètes jusqu'à l'embryogenèse chez les mammifères et les poissons. Au moment de la genèse de la génération F0 (parentale) (Brander et al., 2017). 5
- Figure 4: Formule de la molécule de perméthrine (Soderlund et al., 2002)..... 7
- Figure 5 : Différents phénotypes de *Kryptolebias marmoratus* obtenus après autofécondation d'un hermaphrodite. (a) Hermaphrodite ; (b) Mâle (Frederic Silvestre). 9
- Figure 6 : Récolte des œufs sur le coussinet en coton à l'intérieur des bacs (photo : Fotseu, 2022) 11
- Figure 7 : Illustration des 32 stades de développement de *Kryptolebias marmoratus* selon (Mourabit et al., 2011) 12
- Figure 8 : Design expérimental, exposition des œufs dès le stade critique de développement (i.e. stade 16 à 22) et mesures des paramètres vitaux (mortalité, flux sanguin, fréquence cardiaque et mouvement du corps) puis fixation des œufs à l'azote liquide et conservation à -80°C pour analyse moléculaire par qPCR. 13
- Figure 9 : Observation au Danioscope. (A) exposition des échantillons à la perméthrine, (B) Danioscope. (C) mesure des paramètres d'intérêt. 14
- Figure 10 : Pourcentage de mortalité chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N = 40 pour chaque traitement). NS : non significatif. Différentes lettres indiquent des différences significatives. 17
- Figure 11 : Moyenne (\pm SE) du flux sanguin chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif. 18
- Figure 12 : Fréquence cardiaque moyenne (\pm SE) chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif. 18
- Figure 13 : Activité (mouvement du corps) moyenne (\pm SE) observée pendant 5 min chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif. 19
- Figure 14 : Expression génique relative moyenne (\pm SE) observée chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N = 5, 5 et 4, respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif. 20

I. Introduction

I.1. Epigénétique

I.1.1. Historique et concepts

L'augmentation considérable des connaissances concernant les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes a permis une évolution de la perception du terme épigénétique depuis sa première utilisation en 1939 par Conrad Waddington, lorsqu'elle faisait référence à l'étude des "interactions causales entre les gènes et leurs produits, qui font naître le phénotype" (Felsenfeld, 2014). Les mécanismes épigénétiques sont des modifications hérissables mitotiques et/ou méiotiques des gènes et/ou méiotiquement hérissables dans la fonction des gènes qui ne peuvent pas être expliqués par des changements dans la séquence de l'ADN, et qui peuvent en outre conduire à des altérations de la fonction cellulaire et altérer la physiologie d'un organisme (Holliday, 2006) ; Deans et Maggert 2015). L'épigénétique se concentre donc sur la régulation de l'expression des gènes indépendamment de la séquence génomique.

I.1.2. Mécanismes épigénétiques

Les mécanismes constituant un signal ou un processus épigénétique peuvent être classés en trois catégories ayant pour point commun la régulation des interactions ADN-protéine (Chu et al. 2011 ; Dixon et al. 2012) : (1) la modification covalente de l'ADN par méthylation des cytosines, (2) la modification covalente des histones via l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation et autres modifications post-traductionnelles, (3) la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par des ARN non codants (Srinageshwar et al., 2016). Ces trois mécanismes associés (Fig 1) peuvent définir des zones euchromatiques favorables à l'activation de la transcription, et des zones hétéromatiques favorables à la répression de la transcription. Cette vision est toutefois simpliste, et plusieurs travaux démontrent que la dynamique associée à l'état chromatidien est en réalité plus complexe (Hubert, 2010).

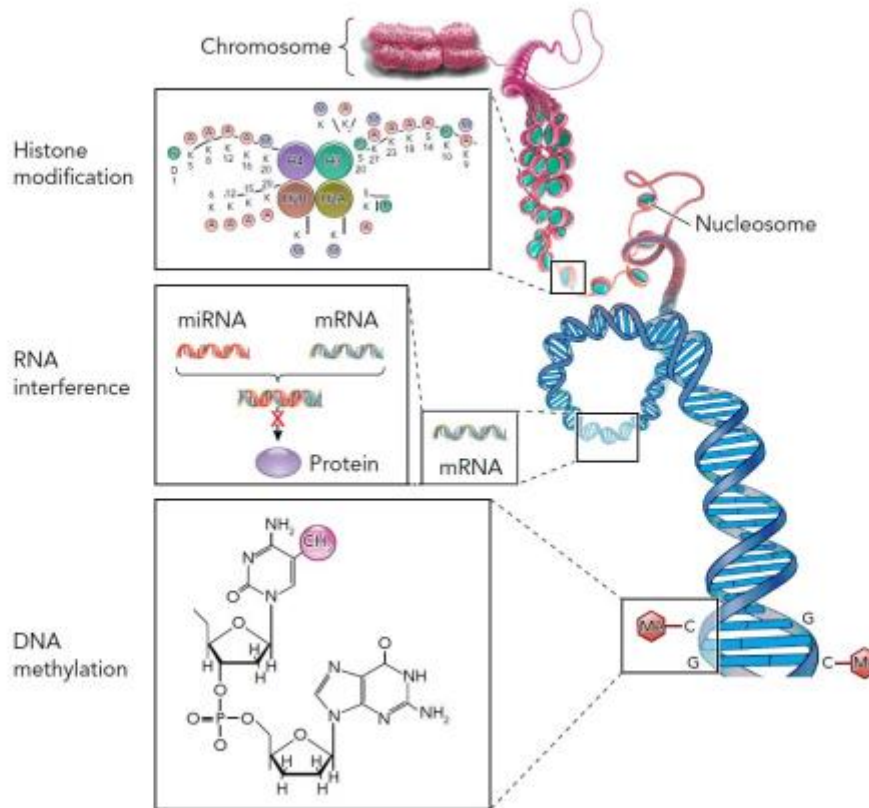


Figure 1: Principaux mécanismes épigénétiques. La chromatine ajoute une information à celle de l'ADN sous la forme de méthylation de l'ADN, de modifications post traductionnelles des histones et des ARN non codants (Puumala & Hoyme, 2015).

I.1.3. La méthylation de l'ADN comme principal mécanisme d'étude

La recherche concernant la méthylation de l'ADN est devenue extrêmement florissante depuis la découverte de son implication dans une grande variété de fonctions cellulaires incluant l'expression génique spécifique au tissu, la différenciation cellulaire, le développement, la reprogrammation, l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X, la régulation du degré de condensation de la chromatine et son rôle dans certaines pathologies (Varriale, 2014).

Chez les eucaryotes, l'addition covalente d'un groupement méthyle provenant d'une S-Adenosyl Methionine (SAM) à une base cytosine, définissant la réaction de méthylation de l'ADN, est catalysée par une famille d'enzymes appelée DNMT (pour DNA méthyltransferase). Le carbone en position 5' des dinucléotides CpG (une cytosine directement suivie d'une guanosine) est la principale cible de ces enzymes. Le résultat de sa méthylation est une 5-méthylcytosine (5-mC) (Bestor, 2000), bien que des cytosines méthylées puissent également apparaître sur des sites non CpG comme les motifs palindromiques CpHpG et asymétriques CpHpH (où H = A, C ou T) ; ces derniers motifs, rares chez les animaux, sont prédominants

dans le paysage épigénétique des plantes (Law & Jacobsen, 2010). A son tour, une 5-mC peut être déméthylée. Bien que les mécanismes exacts de déméthylation soient encore incertains, ils font intervenir des dioxygénases, des enzymes de la famille des TET (Ten-eleven Translocation Enzyme) et des TDG (G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase). La voie la mieux caractérisée fait intervenir un processus en plusieurs étapes passant tout d'abord par l'hydroxylation des 5-mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) via les protéines TET. Le rôle des 5-hmC reste encore flou (Cadet & Wagner, 2014) mais elles ont été principalement identifiées dans les cellules souches embryonnaires et les neurones adultes, où elles représentent 15 à 40% des 5-mC ; elles sont aussi présentes dans tous les types cellulaires mais n'y constituent que 1 à 5% des 5-mC (Tahiliani et al., 2009). Leur spécificité tissulaire suggère qu'elles ne peuvent pas être exclusivement un état intermédiaire d'un processus de déméthylation actif mais, au contraire, qu'elles ont probablement une fonction unique encore à élucider (Münzel et al., 2011). Une 5-hmC peut encore être oxydée en 5-formylcytosine (5-fC) et ensuite en 5-caC (5-carboxylcytosine). Enfin, ces derniers peuvent être ramenés à la cytosine originelle par le biais du système de base excision repair et des enzymes de la famille TDG. En outre, une déméthylation passive de l'ADN peut se produire lorsque les DNMT-1 ne parviennent pas à reproduire les motifs de méthylation au cours de la réplication. Un autre mécanisme possible comprend l'action de l'enzyme AID/APOBEC (Activation-induced deaminase and Apolipoprotein B mRNA editing enzyme) capable, soit de convertir une 5-mC en thymine, soit de convertir une 5-hmC en 5-hydroxyméthyluracile (5-hmU). La thymine et la 5-hmU peuvent également être clivées par les enzymes TDG et remplacées par une cytosine non méthylée (Moore et al., 2012) (Fig 2).

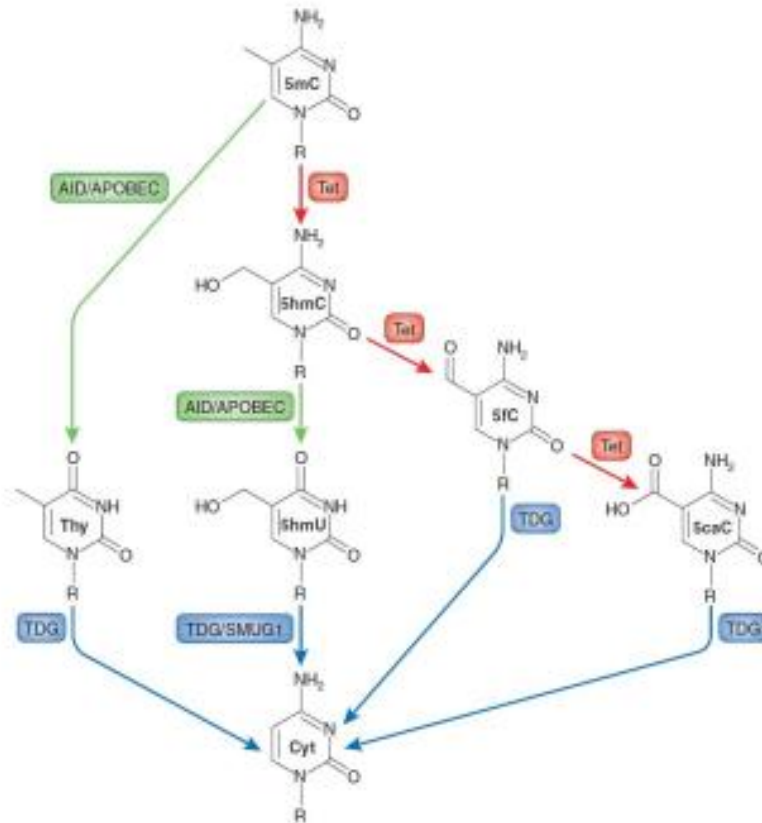


Figure 2: Voies actives de déméthylation de l'ADN. Les enzymes AID/APOBEC et/ou les enzymes TET peuvent convertir les cytosines méthylées en thymine, 5-hmU, 5-fC ou 5-caC. Finalement, ces produits sont reconnus et remplacés par une cytosine non méthylée grâce au système de base excision-repair et `a des enzymes TDG. (Moore et al., 2012).

Chez les vertébrés, l'établissement et la maintenance de ce type de modification épigénétique sont sous la responsabilité de trois familles de DNMT : les DNMT-1, les DNMT-2, et les DNMT-3 comprenant les Dnmt-3aa, 3b, 3c et 3l. Leur activité est régulée transcriptionnellement et post-transcriptionnellement par des modifications (phosphorylation et ubiquitination) ainsi que par des cofacteurs protéiques, notamment via le domaine N-terminal des méthyltransférases (Trelle & Jensen, 2007). Les DNMT1 sont impliquées dans le maintien de la méthylation après chaque division cellulaire, au moment où les molécules d'ADN sont des substrats hémiméthylés (Reik et al., 2001), alors que les Dnmt3aa et 3b sont responsables des méthylation *de novo* et jouent un rôle crucial dans les cellules germinales et au cours du développement précoce. Les DNMT3-l sont exprimées spécifiquement dans les cellules germinales et sont, notamment, responsables de l'empreinte génomique. Les DNMT-2 sont considérées comme un type de DNMT en raison de leurs fortes similarités structurales mais

leur activité catalytique est faible, de mécanismes flous, et ne semble toucher que les ARNt (Kiani et al., 2013).

I.1.4. Dynamique de reprogrammation

Le terme reprogrammation désigne les étapes de suppression et rétablissement des marques épigénétiques se produisant lors de la gamétogenèse et lors de l'initiation du développement embryonnaire (Reik et al., 2001). Chez les mammifères, la première phase de déméthylation survient au cours de la migration et de la prolifération des cellules germinales primordiales (Fig. 3). Elle est suivie d'une reméthylation post-migratoire. Une deuxième phase de déméthylation survient peu de temps après la fécondation, pendant les étapes de clivage jusqu'au stade blastocyste. Finalement, une méthylation *de novo* rétablit les profils de méthylation à partir du stade morula (Edwards et al., 2017).

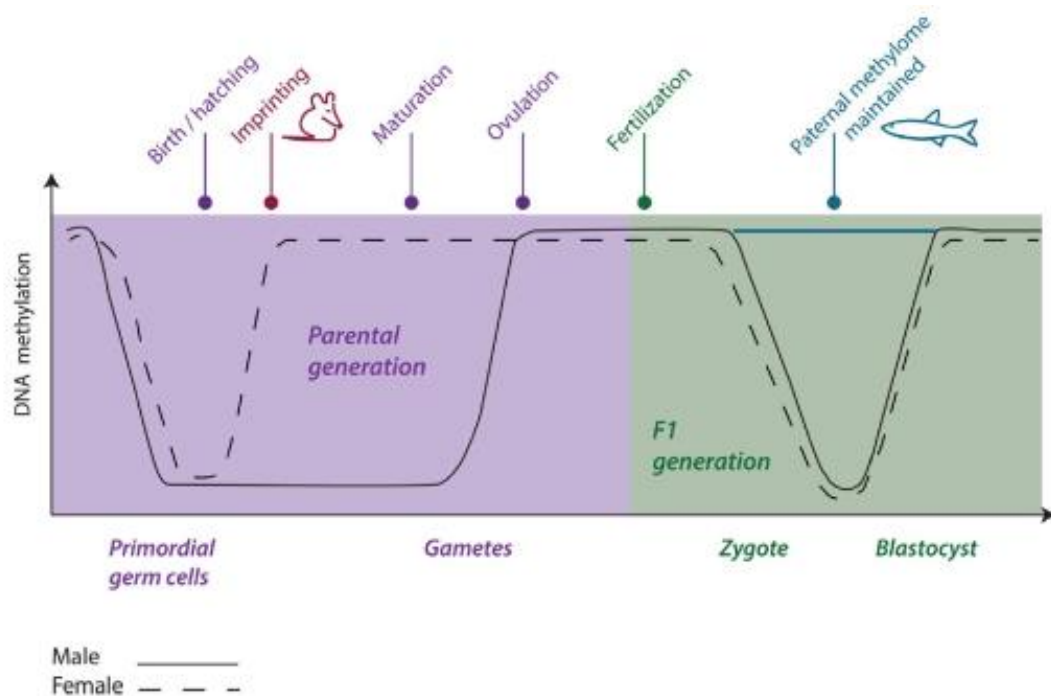


Figure 3 : Dynamique de la reprogrammation du méthylome depuis les gamètes jusqu'à l'embryogenèse chez les mammifères et les poissons. Au moment de la genèse de la génération F0 (parentale), le méthylome est complètement effacé dans les cellules germinales primordiales. Les gamètes subissent alors une méthylation de novo suivie du phénomène d'empreinte chez les mammifères que l'on ne retrouve pas chez les poissons, probablement en raison du manque d'homologue à la DNMT-3l). Un deuxième cycle de déméthylation/reprogrammation se produit peu après la fécondation en génération F1 chez les mammifères. Chez le zebrafish, le méthylome maternel subit ce cycle, alors que l'équivalent paternel persiste. (Brander et al., 2017).

Ces évènements permettent aux cellules germinales de se différencier correctement et sont cruciaux au bon développement de l'embryon (Seisenberger et al., 2013). Bien que le génome ait initialement été supposé uniformément affecté par la reprogrammation, il semble aujourd'hui que les différentes régions génomiques, ainsi que les génomes paternel et maternel, diffèrent dans le moment et l'ampleur de leur reprogrammation. Ainsi durant cette période, l'individu subit une réinitialisation complète du méthylome, à l'exception des gènes à empreintes (pour les mammifères), des régions centromériques/péricentromériques, et des rétrotransposons (Edwards et al., 2017). Malgré une dynamique de reprogrammation semblable entre la souris et le poisson zèbre, des différences de reprogrammation distinguent ces deux organismes. Une des dissemblances majeures réside dans le fait que le zygote de *D. rerio* atteint la totipotence lorsque son génome est activé en conservant les degrés de méthylation du génome paternel tout en reprogrammant le génome maternel (ovocyte) pour qu'il coïncide avec l'état de méthylation des spermatozoïdes contrairement à la souris, chez qui ce serait le génome maternel qui servirait de modèle. Le phénomène de reprogrammation pourrait également jouer un rôle important durant cette fenêtre critique (ou période sensible) qu'est le développement embryonnaire au cours duquel le phénotype d'un organisme peut réagir à des facteurs intrinsèques ou extrinsèques (environnementaux). En effet, le méthylome pourrait être particulièrement sensible à des signaux environnementaux, et les altérations épigénétiques qui en résulteraient pourraient influencer le développement, le comportement, la structure et/ou la fonction des tissus et des organes voir même les propriétés épigénomiques futures de l'individu en question (Champagne, 2013).

I.1.5. La perméthrine comme source de stress environnemental

La perméthrine (PM) fut le premier pyréthroïde à avoir été utilisé en agriculture pour ses propriétés stables face à la lumière (Soderlund, 2012). Ce pyréthroïde de type I dont la formule chimique est $C_{21}H_{20}O_3Cl_2$ (Fig. 4) possède une masse molaire de 391,3 grammes par mol et une demi-vie de 13 jours (Aznar-Alemany & Eljarrat, 2020). C'est l'un des insecticides pyréthroïdes domestiques et agricoles les plus courants dans le monde (Barr et al., 2010), également utilisé pour imprégner des vêtements militaires ou encore des moustiquaires.

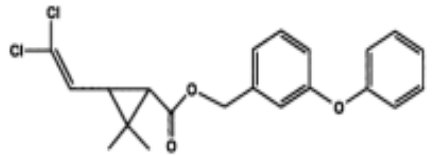


Figure 4: Formule de la molécule de perméthrine (Soderlund et al., 2002)

Elle est considérée comme une alternative plus sûre par rapport à de nombreux autres pesticides, car en théorie elle ne s'accumule pas dans l'environnement et est rapidement métabolisée et excrétée par les organismes (Zhu et al., 2020). Néanmoins, la PM est fréquemment retrouvée dans les poussières des maisons avec des concentrations pouvant atteindre 1062 ng/g de PM par gramme de poussière (Deziel et al., 2015). Elle est également retrouvée dans l'environnement à des concentrations assez variables. Des études révèlent des concentrations en PM de 160-210 ng/L dans des rivières (Tang et al., 2018) mais aussi de 125 ng/L dans des eaux de ruissellement urbaines dans les environs de Sacramento en Californie (Weston, Holmes, et Lydy 2009 ; Weston et Lydy 2010).

Une étude récente a montré que les produits de photodégradation de la PM peuvent potentiellement être plus nocifs pour les organismes aquatiques que le composé parent (Zhu et al., 2020). En raison de leur utilisation croissante, les pyréthroïdes sont détectés dans les fluides humains dans des faibles gammes de l'ordre du µg/L (Barr et al., 2010) ; Saillenfait et al., 2015) et dans les compartiments aquatiques (Budd et al., 2020).

L'exposition à la PM peut provoquer une variété d'effets néfastes indésirables chez diverses espèces, non-cibles tels que des effets neurotoxiques ainsi qu'un stress oxydatif ; (Saito et al., 2019 ; Nunes et al. 2020). Il a ainsi été démontré que chez certains poissons, la PM pouvait avoir des impacts très importants sur le fitness des individus. En effet, une exposition embryonnaire à la PM chez le poisson zèbre affecterait le développement en perturbant la signalisation endocrine (Zhang et al., 2017). De plus des expériences antérieures, indiquent que la PM peut provoquer des altérations au début de la vie du poisson et peut induire des effets transgénérationnels (LeBlanc et al., 2010). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux effets de la PM sur les mécanismes moléculaires lors du développement embryonnaire des poissons.

I.2. Un modèle biologique pas comme les autres

Le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus* (anciennement *Rivulus marmoratus*), est un Actinoptérygien de la famille des Rivulidae (Turko & Wright, 2015). Ce poisson tropical et subtropical vit en eau saumâtre typiques du milieu des mangroves peuplées notamment par le palétuvier rouge (*Rizophora mangle*) (Taylor, Davis, et Turner 1995). Son aire de répartition s'étend de l'Amérique continentale de la Floride au sud-est du Brésil en passant par les Antilles, le Nord-est du Mexique, Caraïbes et l'Est de l'Amérique centrale (Taylor 2000 ; Avise & Tatarenkov, 2015). *Kryptolebias marmoratus* est un poisson carnivore qui se nourrit de microinvertébrés aquatiques, terrestres et de petits poissons (Harrington, 1961). En captivité, il se nourrit principalement de copépodes et d'artémias (Grageda et al., 2004).

Le cycle de vie du rivulus des mangroves comprend trois stades : embryonnaire, juvénile et âge adulte. Le stade embryonnaire commence dès la fécondation jusqu'à l'éclosion. Le stade juvénile débute du premier jour de l'éclosion à la maturité sexuelle. Tout le cycle de vie se déroule dans les mangroves, dans lesquelles le rivulus peut vivre 3 à 4 ans. Les adultes atteignent 75 mm et la maturité est atteinte 3 à 4 mois après éclosion (Kanamori et al., 2006) ; Lee, Raisuddin, et Schlenk 2008).

Ces poissons sont remarquablement tolérants aux différentes conditions environnementales, cette espèce est euryhaline et supporte des eaux avec des salinités allant de 0 à 114 ppt et des températures de 13 ° à 28 °C (Taylor 2000 ; Turko & Wright, 2015). De plus, diverses adaptations physiologiques favorisent les capacités de cette espèce (Taylor, 1992). Celles-ci incluent la présence d'ionocytes dans la peau et les branchies afin de maintenir leur équilibre ionique lors de l'émergence hors de l'eau, et l'expansion des cellules neuro-épithéliales qui permettent la détection de l'oxygène sur les branchies et la peau pour favoriser leur tolérance à l'hypoxie (Blanc et al., 2010). Le rivulus est ainsi capable de survivre dans l'air jusqu'à 66 jours (Taylor, 2012). Cette caractéristique lui permet de gérer les conditions biotiques (compétition, prédation, recherche de nourriture) et abiotiques (sécheresse, baisse de la qualité de l'eau) variables.

Kryptolebias marmoratus présente un mode de reproduction unique au sein des vertébrés. Le rivulus est en effet l'une des deux seules espèces connues capable d'autofécondation grâce à la présence d'un ovotestis fonctionnel chez les individus hermaphrodites (Farmer & Orlando, 2012). De ce fait, tous les individus identifiés sont androdioïques, c'est-à-dire qu'ils sont mâles, ou hermaphrodites (Tatarenkov et al., 2011). *Kryptolebias marmoratus* présente un dimorphisme sexuel permettant de différencier les mâles

des hermaphrodites. Les hermaphrodites, sont caractérisés par une couleur brunâtre sur une palette variant du transparent au plus prononcé et affichent une ocelle sur leur nageoire caudale (Fig 5A), par contre les mâles sont caractérisés par une couleur orangée relativement pâle (Fig 5B ; Grageda et al. 2004 ; Fellous et al. 2018). La fécondation interne se produit dans la lumière gonadique, contenant à la fois le tissu ovarien et testiculaire, où les spermatozoïdes sont directement évacués (Sakakura et al., 2006) . Vers la fin de leur cycle de vie (3 à 4 ans), environ 60 % des individus hermaphrodites se transforment en mâles secondaires (Lee et al., 2008). Les vrais mâles peuvent être induits directement en exposant les embryons à de basses températures (inférieures à 20 °C) pendant les derniers stades du développement embryonnaire (Harrington, 1961). Ces mâles peuvent être induits plus efficacement en traitant les embryons à haute température (Kanamori et al., 2006).

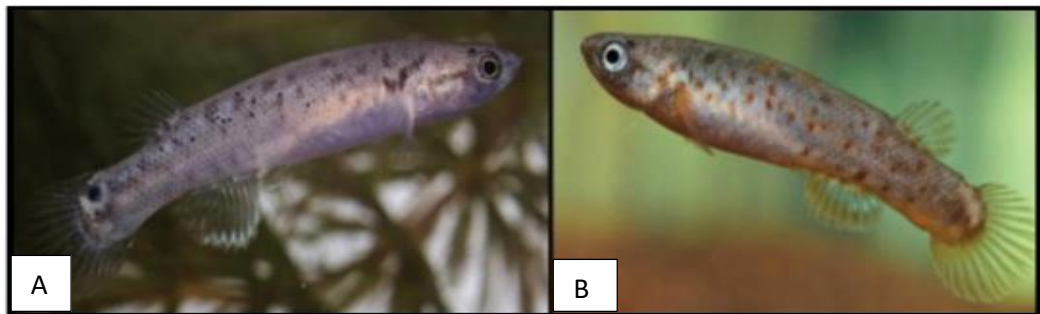


Figure 5 : Différents phénotypes de *Kryptolebias marmoratus* obtenus après autofécondation d'un hermaphrodite. (a) Hermaphrodite ; (b) Mâle (Frederic Silvestre).

I.3. Problématique et objectifs de l'étude

Du fait de sa capacité d'autofécondation, le rivulus des mangroves possède un vaste potentiel en tant que poisson modèle en écotoxicologie et présente un grand intérêt pour la physiologie, l'écologie et la biologie du développement. L'autofécondation permet d'observer une très faible variabilité génétique entre les individus d'une même lignée isogénique et donc d'étudier les effets des facteurs environnementaux sur l'épigénétique tout en minimisant les effets génétiques.

L'un des principaux obstacles à l'héritabilité des épimutations est la reprogrammation de la méthylation de l'ADN, qui se produit dans lignée germinale et dans l'embryon précoce. Cette reprogrammation est très efficace dans le développement de l'embryon et la mise sur pieds des schémas de méthylation de l'ADN chez l'individu. Pendant le développement de

l'embryon et au début de la vie, l'exposition aux modificateurs épigénétique est préoccupante en raison de la forte plasticité épigénétique qui peut affecter le développement normal et pathologique par la suite (Stel & Legler, 2015).

Les études réalisées ont suggéré que chez le rivulus la reprogrammation de la méthylation représente une fenêtre critique sensible au stress environnemental et l'exposition aux pesticides peut influencer ce phénomène de reprogrammation durant la mise en place de certains organes (Fellous et al., 2018). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'influence de la PM sur les œufs de rivulus des mangroves durant la phase de reprogrammation. Ici, nous avons donc pour but d'évaluer l'influence de la PM sur les œufs de *Kryptolebias marmoratus*. Plus spécifiquement, nous avons évalué d'une part les effets de différentes concentrations de la PM sur la mortalité, le comportement (activité) et la physiologie (battement cardiaque, circulation sanguine) lors des phases critiques de développement et d'autre part d'évaluer l'expression associée des gènes impliqués dans les mécanismes épigénétiques (DNMT3aa, DNMT3ab) et le comportement (*Mecp2*). Nous nous attendons ainsi à observer un effet négatif dose dépendant de la PM sur les traits phénotypiques des œufs, associés à des différences d'expression des gènes d'intérêt.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Elevage en laboratoire

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire du Professeur Frédéric Silvestre, Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology (LEAP) à l'université de Namur. Les individus utilisés ont été prélevés à partir d'hermaphrodites adultes de la lignée EPP, dont la population stock a initialement été obtenue via des rivulus des mangroves collectées par Valentine Chapelle et Frédéric Silvestre en 2019 dans les Keys de Floride (Emerson Point Preserve ; N27°53'29.80", W82°62'55.01"). Les poissons reproducteurs sont actuellement maintenus dans les locaux de l'UNamur à 26±1°C, une salinité de 12±1ppt (parts per thousand ; sel Instant Ocean™), un cycle jour/nuit de 12h/12h et nourris quotidiennement ad *libitum* avec des nauplies d'*Artemia salina*.

II.2. Prélèvement et exposition des œufs à la PM

Afin d'évaluer l'influence de l'exposition de la PM sur le développement embryonnaire de *Kryptolebias marmoratus*, des œufs provenant d'individus hermaphrodites (N=43) ont été récoltés à partir des cotons placés à l'intérieur des bacs en plastique pour permettre aux poissons de frayer (Fig 6). Les œufs récoltés ont par la suite été observés au microscope pour déterminer leur stade de développement. En effet, en raison du développement intra parental présent chez *K. marmoratus*, les œufs peuvent être pondus à différents stades (Fig 7; (Mourabit et al., 2011).

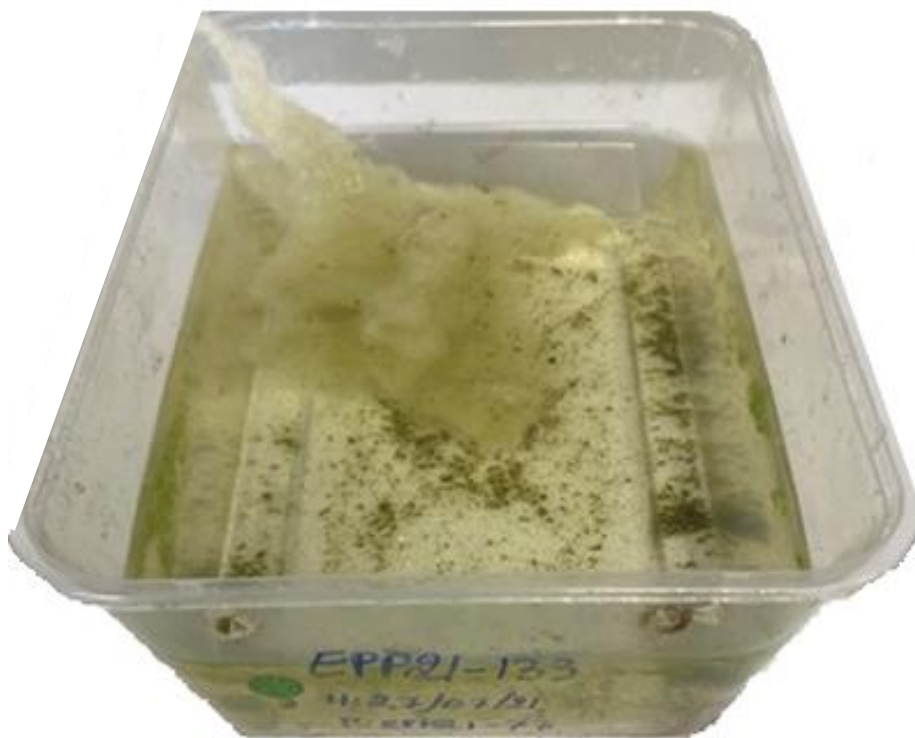


Figure 6 : Récolte des œufs sur le coussinet en coton à l'intérieur des bacs (photo : Fotseu, 2022)

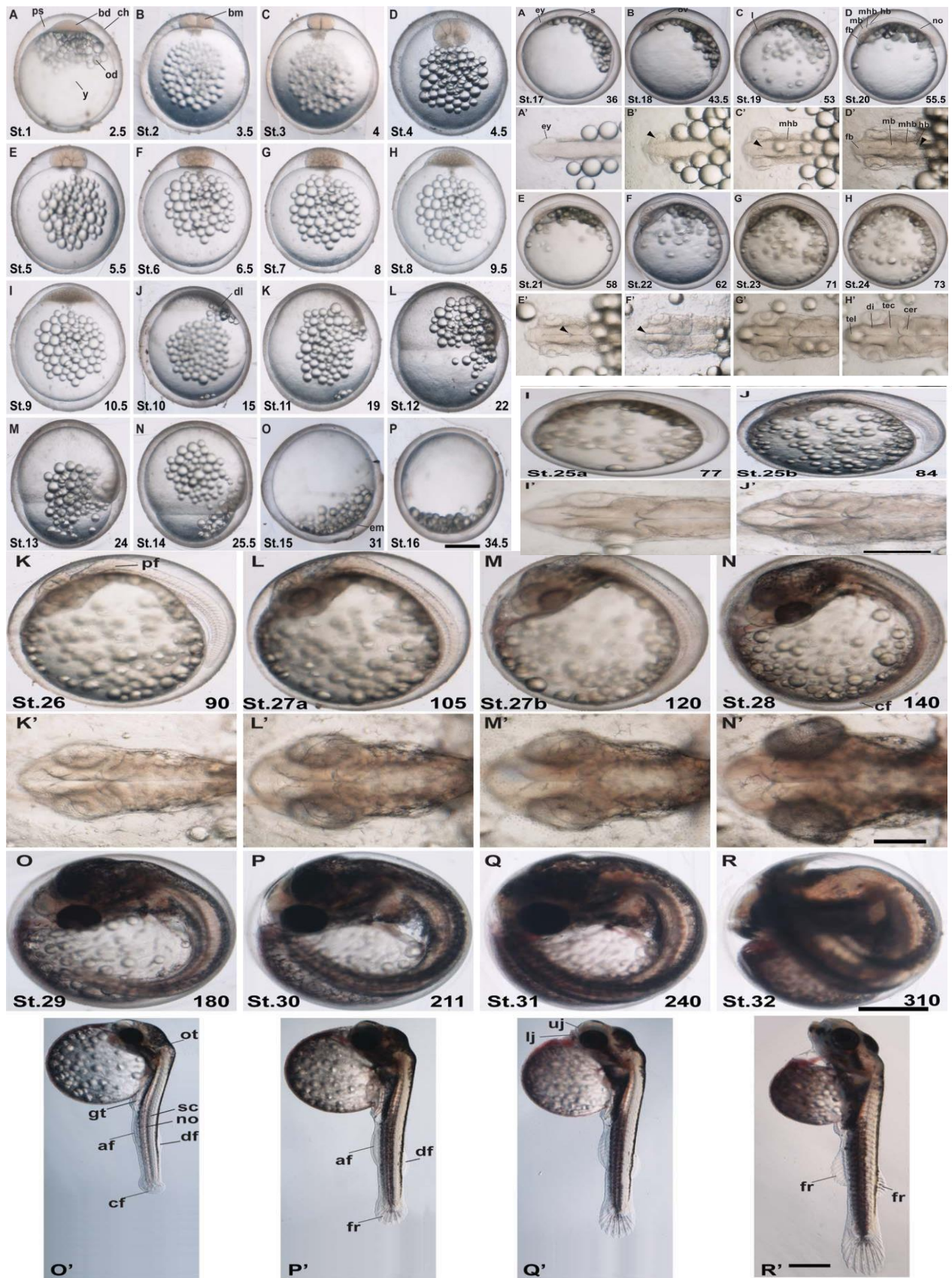


Figure 7 : Illustration des 32 stades de développement de *Kryptolebias marmoratus* selon Mourabit et al. (2011)

Les œufs au stade critique de développement (i.e. stades 16 à 22 ; Mourabit et al., 2011; Fig. 8) ont été prélevés immédiatement puis placés dans les plaques multi-puits (4mL) contenant une solution de PM à différentes concentrations pendant 5 jours. Les embryons ont été exposés respectivement à une concentration nominale de 0 µg/L (dose " contrôle " : C ; N=40), 200 µg/L (N=40) et 1000µg/L (N=40 ; Fig.8). Les solutions mères de PM (acheté chez Sigma-Aldrich, 45614-250MG - Permethrin, PESTANAL®, analytical standard) ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour éviter les interférences de solvants, les solutions de travail ont été obtenues en diluant les solutions mères dans de l'eau salée (12±1ppt) ; la concentration finale de DMSO dans chaque traitement, y compris le groupe contrôle, était de 0,1 % (v/v). Nous avons renouvelé l'eau chaque jour pendant l'exposition à la PM afin de maintenir les conditions de traitement aussi constantes que possible. Nous avons également collecté des échantillons (1 ml) de la solution de travail avant de renouveler l'eau pour évaluer plus en détail la teneur réelle en PM par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC). Nous avons immédiatement congelé ces échantillons à -80°C dans des tubes de verre dans l'obscurité.

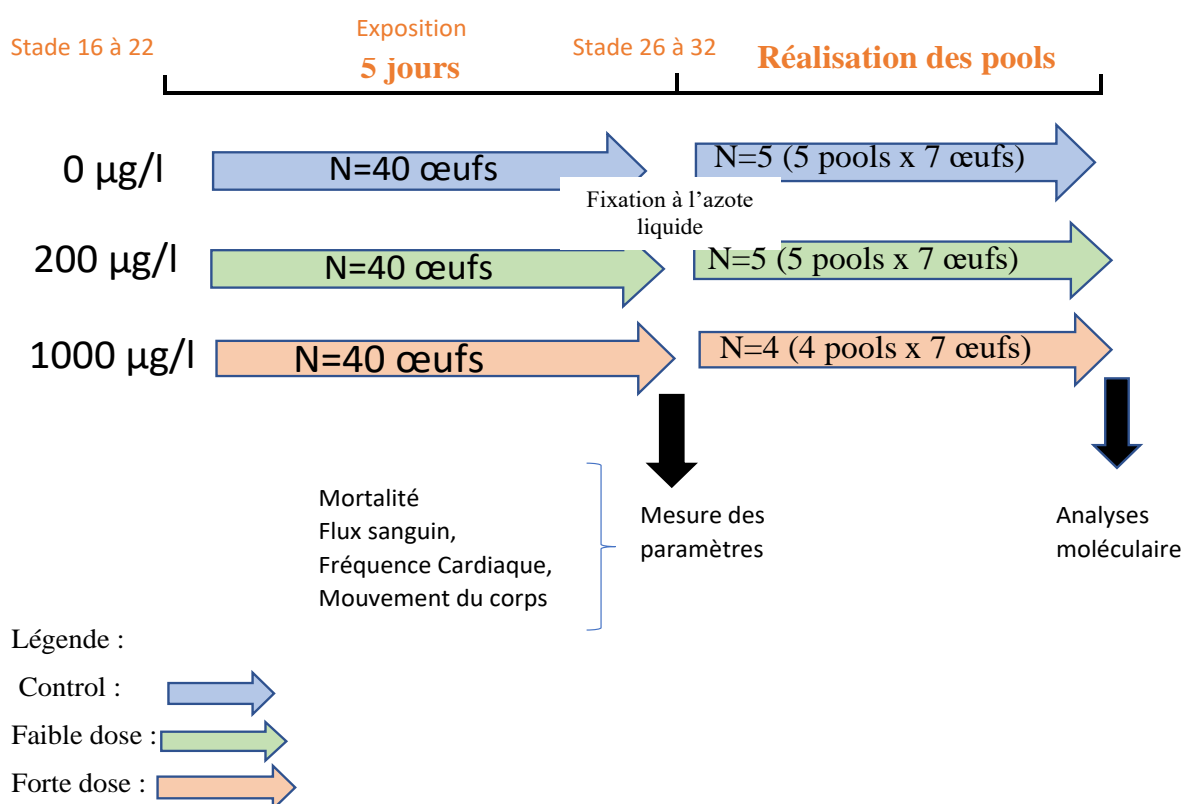


Figure 8 : Design expérimental, exposition des œufs dès le stade critique de développement (i.e. stade 16 à 22) et mesures des paramètres vitaux (mortalité, flux sanguin, fréquence cardiaque et mouvement du corps) puis fixation des œufs à l'azote liquide et conservation à -80°C pour analyse moléculaire par qPCR.

II.3. Détermination des effets de la PM sur les œufs

Les œufs exposés à la PM (Fig. 9A) ont été observés grâce au logiciel Danioscope (Noldus ; Fig.9B) afin de déterminer leurs paramètres physiologiques à travers les battements cardiaques de l'embryon (stade 20) et la circulation sanguine (stade 22), ainsi qu'une mesure d'activité du corps (stade 32 ; Fig.9C).

La détermination du débit du flux sanguin a été faite à partir du ciblage de 4 vaisseaux sanguin présentant une circulation régulière du sang, à l'aide du dispositif de calibrage du Danioscope. Chaque vaisseau sanguin a été délimité et les variations des nuances de grilles estimant le débit sanguin par seconde qui circulent dans le vaisseau sanguin a été donné en pourcentage. La mesure a été répétée pour les quatre vaisseaux sanguins de chaque œuf, donnant ainsi une moyenne du flux sanguin par individu.

Pour la mesure de la fréquence cardiaque et de l'activité, des vidéos ont été prises à l'aide du Danioscope. Le nombre de battements cardiaques a ensuite été déterminé à l'œil nu sur une durée de 20 s et l'ensemble a été ramené par minute, tandis que l'activité de l'embryon a été évaluée à l'œil nu en comptant le nombre de retournement de l'embryon sur une période de 5 min.

A la fin des observations, les œufs ont été placés individuellement dans des tubes Eppendorf et congelés immédiatement dans de l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C pour les futures analyses moléculaires.



**Exposition des œufs
à la perméthrine**

Danioscope

**Activité cardiaque
Circulation sanguine
Activité du corps**

Figure 9 : Observation au Danioscope. (A) exposition des échantillons à la perméthrine, (B) Danioscope. (C) mesure des paramètres d'intérêt.

II.4. Quantification de la PM par HPLC

Les concentrations réelles de PM dans les solutions utilisées (nominal 200 µg/L et 1000 µg/L) ont été mesurées en utilisant une méthode par HPLC. Un système HPLC Dionex équipé d'une pompe à gradient GP50, d'un injecteur automatique (UltiMate 3000 RS) et d'un détecteur spectrophotométrique UV-VIS Shimadzu SPD-6AV ont été utilisés. Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur une colonne NUCLEODUR C18 de 5 µm (Macherey-Nagel, Allemagne) (125x4,6 mm) maintenue dans un four à colonne Dionex à 35°C. La phase mobile consistait en un gradient d'acétonitrile-H₃PO₄ (0-2 min : 50 / 50% ; 2-30min : 100/ 0%, 30-40min : 100/ 0%) à un débit de 1 mL/min et un volume d'injection de 0,2 mL. La détection UV a été effectuée à 210 nm et des pics ont été identifiés avec des temps de rétention par rapport aux standards (13.5 et 14.1 min respectivement pour les isomères trans et cis). La courbe standard s'étendait de 125 à 2000 µg/L (Annexe 1). L'analyse a montré que la concentration moyenne (\pm S.E.) des échantillons provenant des solutions de travail avec une concentration nominale en PM de 200µg/L était de 149,7 \pm 37,5µg/L (N=2), tandis la moyenne obtenue pour les échantillons provenant des solutions de travail avec une concentration nominale en PM de 1000µg/L était de 312,7 \pm 116,5µg/L (N=2). Au vu de la très grande différence existante entre la concentration nominale à 1000µg/L et celle détectée par HPLC, qui pourrait s'expliquer soit par un problème dans la solution mère de départ, soit dans la préparation de la solution de travail, nous avons choisi d'utiliser les termes de concentration 1 ("C1" : 149,7 \pm 37,5µg/L) et concentration 2 ("C2" : 312,7 \pm 116,5) dans la suite du mémoire.

II.5. Extraction d'ADN/ARN

Nous avons ici étudié les effets potentiels d'une exposition embryonnaire à la PM sur l'expression des gènes des ADN méthyltransférases (DNMT-3a et DNMT-3ba), qui jouent un rôle essentiel pour la méthylation de novo et dans le développement normal des individus (Okano et al., 1999), ainsi que le gène codant pour la protéine de liaison méthyl CpG 2 (mecp2) impliquées dans la coordination des mouvements ; (Pietri et al., 2013 ; Robinson & Pozzo-Miller, 2019).

Les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées sur des pools d'œufs. En effet, en se basant sur les observations de Virgilio Goujon (UNamur, 2019), il faut environ 4 à 7 œufs au stade 27 pour avoir une quantité d'information génétique (ADN/ARN) nécessaire pour des analyses moléculaires. Nous avons donc réalisé pour chaque traitement de PM 5 pools de 7 œufs chacun.

L'extraction d'ADN/ARN et le traitement à la DNase ont été réalisés avec le kit QuickDNA/RNA TM Miniprep Plus de ZYMO. La manipulation a été réalisée selon le protocole d'extraction spécifique fourni avec le kit. Nous avons utilisé l'ARN collecté pour réaliser une transcription inverse à l'aide du kit RevertAid RT de Thermo Fisher Scientific. Afin d'évaluer la qualité des différentes étapes décrites ci-dessus, la concentration d'ADN/ARN et la contamination éventuelle ont été évaluées avec un spectrophotomètre Nanodrop (les amorces pour la qPCR ont été conçues avec le génome Primer blast NCBI ; annexe 2). Ensuite, une qPCR sur nos gènes d'intérêt et sur des gènes de référence a été réalisée avec l'instrument QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Nous avons choisi les gènes de référence *eef1- α* et β -actine, codant respectivement pour l'une des protéines les plus abondantes dans la cellule comme le facteur d'élongation 1-alpha et la bêta actine. De plus, ces gènes ont déjà été utilisés comme référence dans des études sur l'expression génétique du cerveau à travers le temps et pour des études sur la neurotoxicité des molécules chez les poissons téléostéens (Wang et al., 2016) ; (Faheem et al., 2018)

II.6. Analyse des données

Nous avons effectué des analyses de données avec le logiciel R (version 4.0.2 ; 2020), avec un seuil $\alpha = 0,05$. Nous avons décidé d'utiliser dans la mesure du possible des analyses paramétriques dans lesquelles la distribution des résidus correspondait aux variables discrètes (Wilson & Hardy 2002 ; Hardy & Briffa 2013) et nous avons transformé, lorsque cela était possible, les données continues afin de respecter les conditions d'applications des tests. Cependant, nous avons effectué des tests non paramétriques lorsque les conditions paramétriques n'étaient pas satisfaites. Lorsque nous avons trouvé un effet significatif du traitement à la PM, nous avons effectué des tests post hoc de Tukey pour les ANOVA à 1 facteur et les tests post hoc de comparaison multiple de Dunn pour les modèles linéaires généralisés (GLM) et Kruskal-Wallis (Dunn 1961), afin d'établir quelles modalités différaient significativement les unes des autres.

Pour calculer l'expression relative des gènes, nous avons utilisé la méthode du $\Delta\Delta Ct$ avec la β -actine comme gène de référence, car l'efficacité du gène *eef1- α* n'était pas satisfaisante. Pour ce faire, nous avons calculé le ΔCt en soustrayant le Ct du gène de référence du Ct du gène d'intérêt pour la même condition. Nous avons calculé le $\Delta\Delta Ct$ en soustrayant le ΔCt du pool de référence, correspondant au pool 15 (condition contrôle). Nous avons enfin calculé l'expression relative des gènes en utilisant $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

III. Résultats

III.1 Mortalité

Nos analyses statistiques ont mis en évidence que l'exposition à la PM affectait significativement la mortalité des œufs (GLM avec une distribution binomiale des erreurs : $\chi^2 = 6.23$; ddl= 2,117 ; P = 0.044 ; Fig. 10). En effet, la mortalité des œufs exposés à la concentration C2 était supérieure (20%) à celle des œufs exposés à la concentration C1 (5% ; test de comparaison multiple de Dunn : P = 0.013) et les individus contrôles (5% ; P = 0.013). En revanche, aucune différence n'a été observée entre les individus contrôles et les œufs exposés à la concentration C1 (P = 0.5).

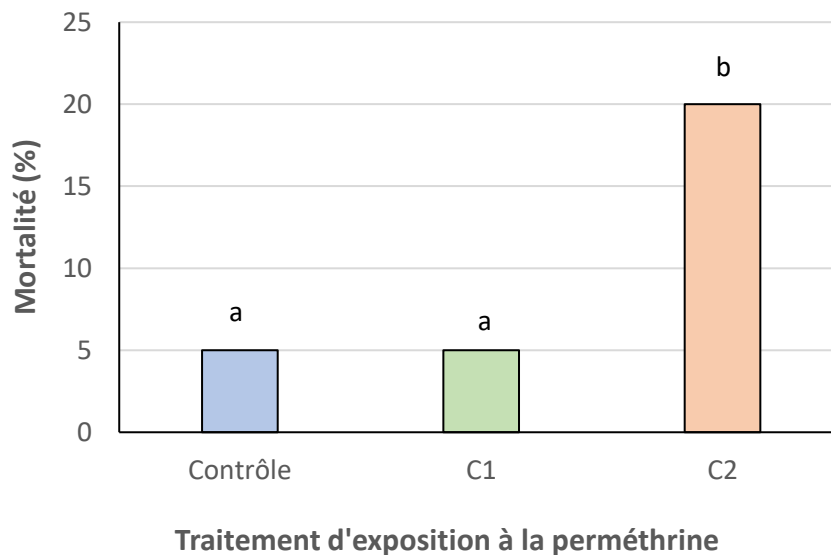


Figure 10 : Pourcentage de mortalité chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N = 40 pour chaque traitement). Différentes lettres indiquent des différences significatives.

III.2 Flux Sanguin

Nos analyses ont montré que le flux sanguin des œufs ne variait pas significativement avec l'exposition à la PM (GLM avec une distribution quasi-binomiale des erreurs : F = 2.92; ddl= 2,105 ; P = 0.06 ; Fig. 11). En effet, les œufs avaient un flux sanguin moyen (\pm SE) de 7.21 ± 0.04 %, 6.02 ± 0.74 % et 4.36 ± 0.67 %, respectivement pour les individus contrôles, exposés à une concentration C1 et une concentration C2.

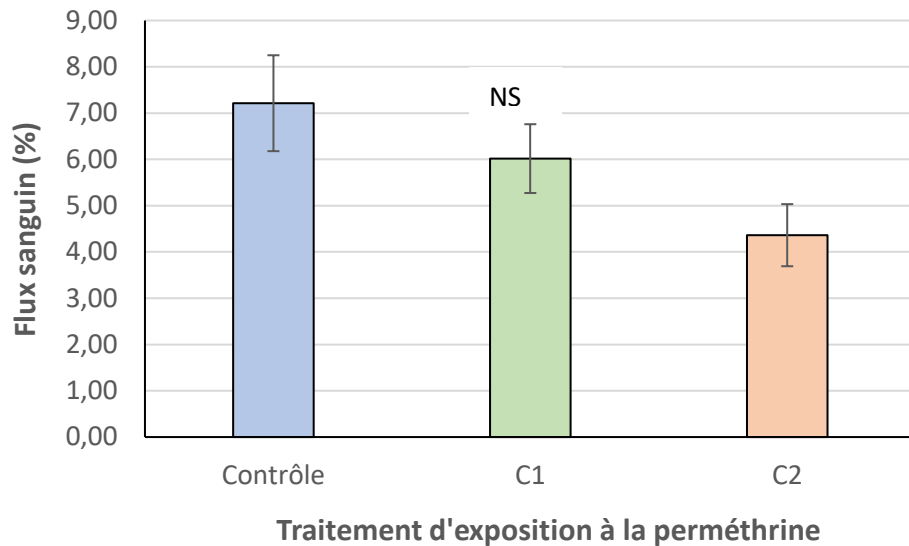


Figure 11 : Moyenne (±SE) du flux sanguin chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif.

III.3. Fréquence cardiaque (battements/min)

Nos analyses n'ont pas montré d'effet significatif de l'exposition à la PM sur la fréquence cardiaque des embryons (test de Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 4.566$; ddl = 2 ; P = 0.102 ; Fig. 12). En effet, les œufs avaient une fréquence cardiaque moyenne (± SE) de 90±5 battements/min, 104±2 battements/min et 89±6 battements/min, respectivement pour les individus contrôles, exposés à une concentration C1 et une concentration C2.

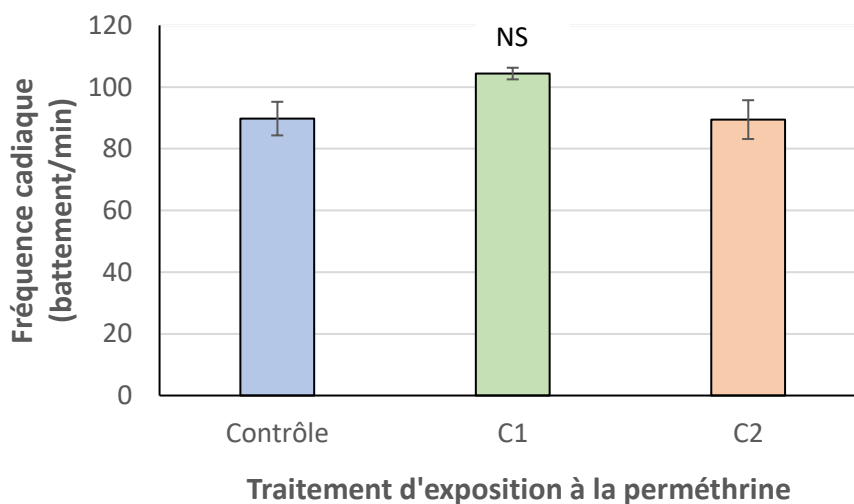


Figure 12 : Fréquence cardiaque moyenne (±SE) chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif.

III.4. Activité

Les analyses réalisées montrent que l'activité des œufs ne variait pas significativement en fonction de l'exposition à la PM (test de Kruskal-Wallis ; $\chi^2 = 1.04$; ddl = 2 ; P = 0.6 ; Fig. 13). Ainsi, les embryons avaient une activité moyenne (\pm SE) sur 5 minutes de 1.74 ± 0.4 , 1.63 ± 0.25 et 1.16 ± 0.18 , respectivement pour les individus contrôles, exposés à une concentration C1 et une concentration C2.

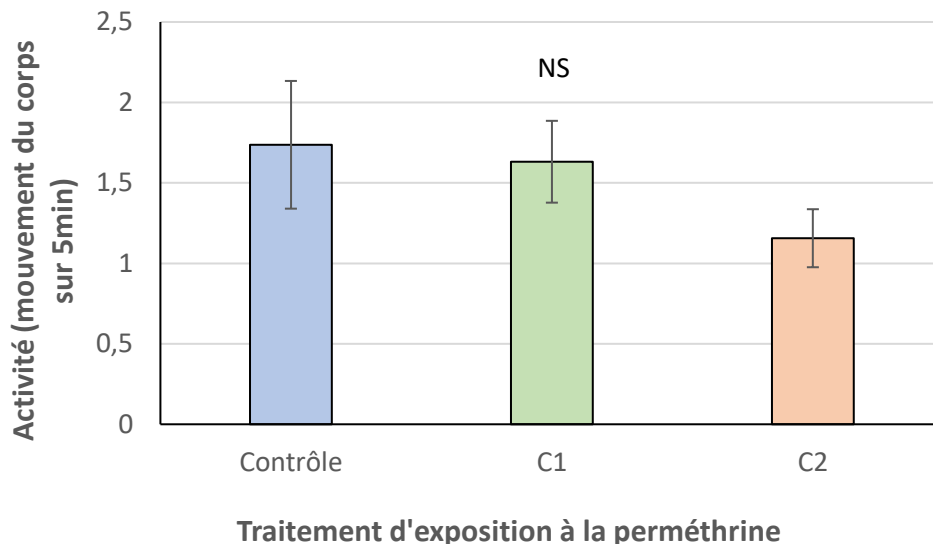


Figure 13 : Activité (mouvement du corps) moyenne (\pm SE) observée pendant 5 min chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N=38, 38, 32 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif.

III.5. Expression génique relative

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives d'expression génique en fonction de la concentration en PM, que ce soit pour le gène *Mecp2* (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 1.83$, ddl = 2, P = 0.40), *DNMT3aa* (ANOVA : F = 1.02 ; ddl = 2 et 11 ; P = 0.39) et *DNMT3ab* (ANOVA : F = 0.04 ; ddl = 2 et 11 ; P = 0.96 ; Fig. 14). En effet, les expressions relatives pour *Mecp2* étaient de 0.86 ± 0.04 , 1.08 ± 0.22 et 0.79 ± 0.05 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2. Les expressions relatives pour *dnmt3aa* étaient de 0.88 ± 0.14 , 1.16 ± 0.15 et 0.91 ± 0.13 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2. Enfin, Les expressions relatives pour *DNMT3ab* étaient de 0.89 ± 0.12 , 0.92 ± 0.06 et 0.89 ± 0.07 respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2.

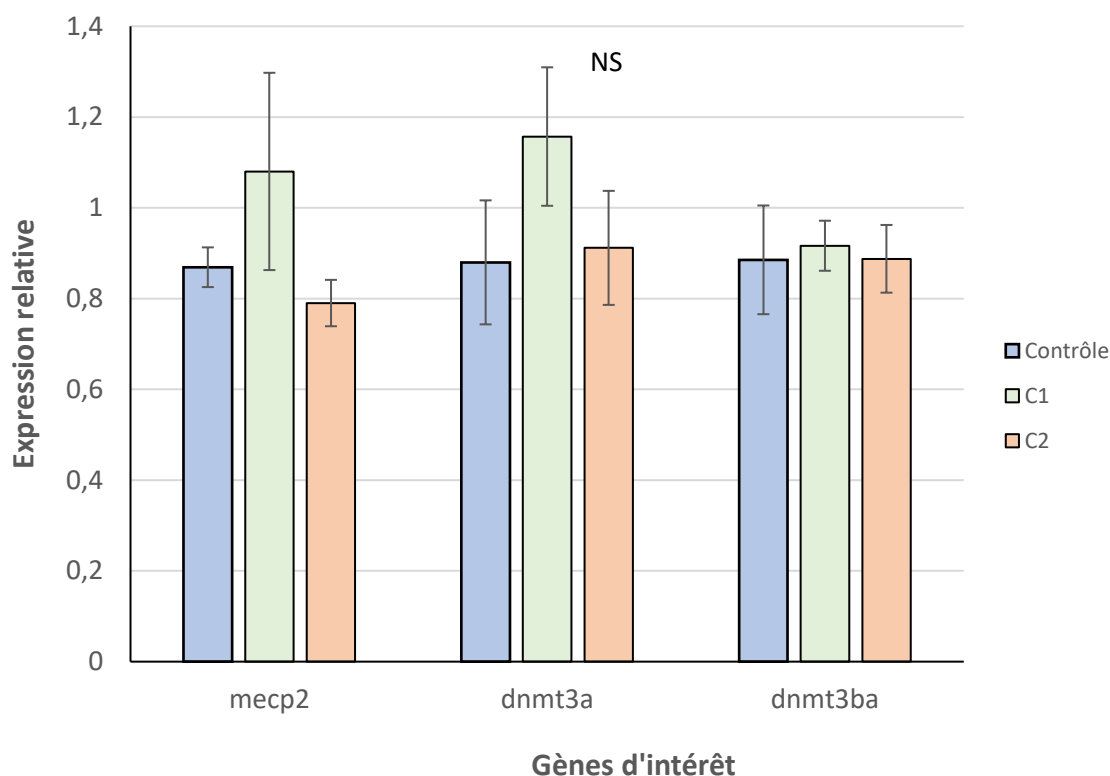


Figure 14 : Expression génique relative moyenne (\pm SE) observée chez des œufs de rivulus des mangroves exposés à 3 concentrations différentes en perméthrine (N = 5, 5 et 4, respectivement pour les individus contrôles, C1 et C2). NS : non significatif.

IV. Discussion

La PM est l'un des insecticides pyréthrinoïdes domestiques et agricoles les plus répandus dans le monde (Banks et al., 2014) ; DeMars et al., 2021). Elle est considérée comme une alternative plus sûre par rapport à de nombreux autres pesticides, car elle ne s'accumule pas dans l'environnement et est rapidement métabolisée et excrétée par les organismes (Imgrund, 2003 ; Zhu et al., 2020). Cependant son utilisation de plus en plus croissante n'est pas sans risque pour l'environnement, notamment pour les milieux aquatiques qui sont souvent les réceptacles finaux de toute substance toxique et donc les organismes qui y vivent sont de plus en plus menacés.

L'exposition aiguë à la PM induit une suractivation des canaux sodiques voltage dépendants dans le système nerveux, ce qui se traduit par une dépolarisation constante des cellules nerveuses, une augmentation du potentiel excitateur postsynaptique, des tremblements, puis la paralysie et la mort (Vijverberg & vanden Bercken, 1990). Les canaux sodiques des invertébrés et des poissons sont particulièrement sensibles à une exposition aiguë aux

pyréthroïdes par rapport aux mammifères (Bradbury & Coats, 1989), ce qui fait de l'utilisation des pyréthroïdes une menace spécifique pour les communautés aquatiques. De plus, l'exposition à la PM au cours du développement démontre qu'elle induit des déficits neurocomportementaux chez diverses espèces (Nunes et al., 2019 ; Saito et al., 2019). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la neurotoxicité de la PM chez les organismes exposés durant les phases critiques de développement ne sont pas bien connus.

Dans cette étude, nous avons démontré l'influence négative de la PM sur l'exposition des œufs de *Kryptolebias marmoratus*, lors des phases critiques de développement à travers l'étude du taux de mortalité, du comportement (activité), la physiologie (battement cardiaque, circulation sanguine) et l'expression associée des gènes impliqués dans les mécanismes épigénétiques (DNMT3a, DNMT3ba) et le comportement (Mecp2).

En accord avec nos prédictions, la PM utilisée lors de l'exposition des œufs a eu un effet significatif sur la mortalité des œufs à la concentration C2, soit 20% de morts. Ceci serait due au fait que l'exposition à la PM peut causer un stress oxydatif endommageant les protéines, les lipides ou l'ADN entraînant des modifications importantes sur la morphologie, la génétique, l'épigénétique, le comportement et le rythme cardiaque (Wang et al., 2016). La PM utilisée aurait entraîné la réduction de la viabilité des larves exposées, une malformation de certains organes au cours des phases critique de développement ou l'inactivation totale de l'embryon. En effet selon Mourabit et al. (2011) l'acide rétinoïque pourrait supprimer la formation de la tête et le développement normal de la queue chez les embryons de *Kryptolebias marmoratus*. Selon ces mêmes auteurs, les œufs de *Kryptolebias marmoratus* seraient sensibles aux substances chimiques malgré le chorion très épais. De plus, l'exposition à des fortes concentrations d'un composé toxique tel que la PM peut entraîner des anomalies morphologiques conduisant à une bradycardie ou à l'arrêt du fonctionnement du cœur, chez les embryons des poissons (Incardona et al., 2004). L'exposition à ces composés toxiques peut également engendrer la dilatation des deux chambres cardiaques et la formation des parois plus minces, ce phénomène est typiquement suivi d'un effondrement et d'un étirement des chambres entre leurs connexions de part et d'autre du péricarde distendu (Incardona et al., 2004). L'effondrement et la génération de l'apparition de cet aspect filiforme du cœur sont le signe d'une l'incapacité à compléter la boucle cardiaque (Garrity et al., 2002). L'exposition des embryons aux toxiques peut perturber les stades tardifs de la morphogenèse cardiaque par une inhibition persistante de la conduction cardiaque (Incardona et al., 2004).

Contrairement à nos prédictions, nous n'avons pas observé d'effet significatif du traitement à la PM sur les traits physiologiques et le comportement des œufs du rivulus des

mangroves. Concernant la concentration C1, il est possible que la dose d'exposition n'ait pas été assez élevée pour induire des changements significatifs chez les individus. Quant à la concentration C2, soit cette concentration n'était également pas assez importante pour induire un effet significatif sur les embryons, soit il y a eu une sélection des individus les plus résistants à la PM puisque les œufs observés étaient ceux qui avaient survécu à l'exposition.

Néanmoins, le pourcentage de flux sanguin le plus élevé a été obtenu sur l'échantillon contrôle (moyenne \pm SE = 7.21 ± 0.04 %) tandis que le plus faible flux sanguin a été obtenu sur les œufs exposés à la concentration C2 (moyenne \pm SE = 4.36 ± 0.67 %). Bien que n'étant pas significativement différent, cette forte valeur observée sur les échantillons contrôle par rapport aux échantillons testés pourrait s'expliquer par le fait que plus le débit enregistré dans les vaisseaux sanguins est important plus le pourcentage du sang qui circule dans les vaisseaux sanguins sera élevé. L'utilisation de la PM aurait permis une diminution du flux sanguin dans les vaisseaux sanguins, un faible ravitaillement des organes vitaux, un retard de développement et dans certains cas un arrêt de développement. Ce flux sanguin permet d'estimer avec plus de précision la vitalité d'un embryon. En effet, il est souvent plus facile de localiser une artère d'un embryon de poisson que de mesurer la fréquence cardiaque qui prend en compte une large gamme des mesures physiologiques possibles (Puybureau et al., 2015) ; (Ishigaki et al., 2018).

D'autres part, on constate à la concentration C1 que la fréquence cardiaque augmente légèrement de 90 ± 5 /min (moyenne \pm SE, contrôle) à 104 ± 2 /min (moyenne \pm SE, C1), avant de rechuter au niveau des œufs traités à la concentration C2, 89 ± 6 /min (moyenne \pm SE). Cette légère augmentation de la fréquence cardiaque du contrôle aux concentrations C1 pourrait s'expliquer par le fait que la concentration C1 a pu engendrer un stress au niveau des embryons qui a pu induire une augmentation de leur fréquence cardiaque. Au cours du traitement le rythme cardiaque peut également augmenter quelques heures après l'exposition. En effet pendant l'exposition à faibles doses il y a un phénomène d'hormésis (réponse positive au stress) jusqu'à ce que l'animal ne sache plus répondre au stress, entraînant la diminution de la fréquence cardiaque. Après cette période de stress les fortes doses de PM vont entraîner une réduction des fonctions vitales, notamment au niveau du cœur qui ne pourra plus pomper le sang normalement pour ravitailler les différents organes.

Selon (Puybureau et al., 2015) la plupart des méthodes existantes s'appuie sur des variations cycliques de la luminance. De plus, les variations des conditions environnementales peuvent faire changer significativement la fréquence cardiaque (Puybureau et al., 2015). Cependant, la mesure directe de la fréquence cardiaque peut parfois être difficile, en fonction de la taille du cœur. Nous avons estimé les paramètres de la fonction cardiaque, soit à partir de

la mesure du mouvement du cœur, soit à partir du flux sanguin dans les artères, ainsi que l'activité du corps. Ces mesures sont plus complexes du point de vue de l'analyse d'image, mais elles sont plus précises, plus faciles à utiliser en pratique et à automatiser que la mesure des changements d'illumination. Elles peuvent également être plus informatives (Puybureau et al., 2015).

Enfin, bien que non significative, l'exposition à la PM a induit une réduction de l'activité du corps, puisqu'on observe une légère différence entre l'activité du corps en fonction de l'augmentation de la concentration. Cette diminution de l'activité du corps pourrait s'expliquer par l'action de la PM qui réduirait la vitalité de l'embryon. Des résultats qui sont en accord avec une étude récente réalisée chez le poisson zèbre et qui a démontré une réduction de l'activité de nage globale (Blanc et al., 2010). En effet, l'exposition des embryons ou des larves à la PM pendant la phase de développement peut altérer les fonctions neuronales, inhiber l'activité locomotrice et engendrer une dégénérescence neuronale (Carion et al., 2018).

L'étude de l'expression de certains gènes d'intérêts durant l'exposition pendant les phases critiques de développement de *Kryptolebias marmoratus* a démontré que l'expression des gènes ciblés n'était pas significativement différente entre le contrôle et les échantillons exposés aux concentrations C1 et C2. Le rôle de la famille de gènes DNMT-3 est la méthylation de novo de l'ADN (Okano et al., 1999 ; Smith et al., 2011). Par conséquent, la DNMT3 a été associée à l'aspect épigénétique en raison de sa capacité à moduler le niveau de méthylation de l'ADN global/spécifique au gène (Basu et al., 2013). Les résultats de la qPCR n'ont montré aucun changement dans l'expression de DNMT-3a, DNMT-3ba et Mecp2 de la méthylation entre les traitements à la PM. Des résultats similaires ont été obtenus par Isabelle Chevalme 2022 (UNamur) sur l'expression de certains gènes d'intérêt sur les larves de *Kryptolebias marmoratus* après une exposition de 7 jours à la PM.

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude montrent que la PM a des fortes doses pourraient influencer le développement embryonnaire du rivulus des mangroves durant les phases critiques de développement. La PM utilisée a induit un effet significatif sur la mortalité des œufs exposés à la concentration C2 (20 %). Elle a entraîné également une légère baisse des paramètres vitaux évalués (fréquence cardiaque, flux sanguin et l'activité de la larve). L'entrée de cette molécule dans l'œuf pourrait influencer également le processus de reprogrammation épigénétique de l'ADN chez ces individus. L'absence d'effets significatifs de la PM sur les paramètres vitaux

des œufs exposés au cours des phases critiques de développement ne signifie pas que cette substance n'a pas d'effet sur la mise en place de certains organes. Il serait donc nécessaire d'approfondir ces travaux à travers l'étude des mécanismes épigénétiques et également de suivre le développement des organismes exposés jusqu'à la formation de la larve pour déceler d'éventuelles anomalies génétiques au cours du développement larvaire chez des œufs précédemment exposés.

Références Bibliographiques

- Avise, J. C., & Tatarenkov, A. (2015). Population genetics and evolution of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*, the world's only self-fertilizing hermaphroditic vertebrate : Genetics and evolution of a selfing killifish. *Journal of Fish Biology*, 87(3), 519-538. <https://doi.org/10.1111/jfb.12741>
- Aznar-Alemany, Ò., & Eljarrat, E. (2020). Introduction to Pyrethroid Insecticides : Chemical Structures, Properties, Mode of Action and Use. In E. Eljarrat (Éd.), *Pyrethroid Insecticides* (Vol. 92, p. 1-16). *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/698_2019_435
- Banks, S. D., Murray, N., Wilder-Smith, A., & Logan, J. G. (2014). Insecticide-treated clothes for the control of vector-borne diseases : A review on effectiveness and safety. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(S1), 14-25. <https://doi.org/10.1111/mve.12068>
- Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., & Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Metabolites of Pyrethroid Insecticides in the General U.S. Population : National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 742-748. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901275>
- Basu, N., Head, J., Nam, D.-H., Pilsner, J. R., Carvan, M. J., Chan, H. M., Goetz, F. W., Murphy, C. A., Rouvinen-Watt, K., & Scheuhammer, A. M. (2013). Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species : Mink, chicken and yellow perch. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(3), 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.02.004>
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395-2402. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>

- Blanc, M., Antczak, P., Cousin, X., Grunau, C., Scherbak, N., Rüegg, J., & Keiter, S. H. (2010). The insecticide permethrin induces transgenerational behavioral changes linked to transcriptomic and epigenetic alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Science of The Total Environment*, 779(6), 932-949. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146404>
- Bradbury, S. P., & Coats, J. R. (1989). Comparative Toxicology of the Pyrethroid Insecticides. In G. W. Ware (Éd.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 108, p. 133-177). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8850-0_4
- Brander, S. M., Biales, A. D., & Connon, R. E. (2017). The Role of Epigenomics in Aquatic Toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2565-2573. <https://doi.org/10.1002/etc.3930>
- Budd, R., Wang, D., Ensminger, M., & Phillips, B. (2020). An evaluation of temporal and spatial trends of pyrethroid concentrations in California surface waters. *Science of The Total Environment*, 718, 137402. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137402>
- Cadet, J., & Wagner, J. R. (2014). TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764-765, 18-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.001>
- Carion, A., Hétru, J., Markey, A., Suarez-Ulloa, V., & Frédéric, S. (2018). Behavioral effects of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine on the mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*) larvae. *Journal of Xenobiotics*. <https://doi.org/10.4081/xeno.2018.7820>
- Champagne, F. A. (2013). Epigenetics and developmental plasticity across species. *Developmental Psychobiology*, 55(1), 33-41. <https://doi.org/10.1002/dev.21036>
- Chu, C., Qu, K., Zhong, F. L., Artandi, S. E., & Chang, H. Y. (2011). Genomic Maps of Long Noncoding RNA Occupancy Reveal Principles of RNA-Chromatin Interactions. *Molecular Cell*, 44(4), 667-678. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.027>
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), 887-896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- DeMars, C., Wang, R., Grieneisen, M. L., Steggall, J., & Zhang, M. (2021). Assessment of pyrethroid contamination and potential mitigation strategies in California Central Coast surface waters. *Journal of Environmental Management*, 278, 111507. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111507>
- Deziel, N. C., Colt, J. S., Kent, E. E., Gunier, R. B., Reynolds, P., Booth, B., Metayer, C., & Ward, M. H. (2015). Associations between self-reported pest treatments and pesticide

- concentrations in carpet dust. *Environmental Health*, 14(1), 27.
<https://doi.org/10.1186/s12940-015-0015-x>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380.
<https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Edwards, J. R., Yarychivska, O., Boulard, M., & Bestor, T. H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 23.
<https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>
- Faheem, M., Jahan, N., Khaliq, S., & Lone, K. P. (2018). Validation of reference genes for expression analysis in a teleost fish (Catla catla Hamilton) exposed to an endocrine-disrupting chemical, bisphenol-A. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 29(1), 13-22. <https://doi.org/10.1007/s12210-017-0653-8>
- Farmer, J. L., & Orlando, E. F. (2012). Creating Females? Developmental Effects of 17 - Ethynylestradiol on the Mangrove Rivulus' Ovary. *Integrative and Comparative Biology*, 52(6), 769-780. <https://doi.org/10.1093/icb/ics110>
- Fellous, A., Labeed-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A.-S., Earley, R. L., & Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecology and Evolution*, 8(12), 6016-6033.
<https://doi.org/10.1002/ece3.4141>
- Felsenfeld, G. (2014). A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a018200-a018200. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018200>
- Garrity, D. M., Childs, S., & Fishman, M. C. (2002). The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development and Disease*, 11.
- Grageda, M. V. C., Kotani, T., Sakakura, Y., & Hagiwara, A. (2004). Effects of feeding copepod and Artemia on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, Rivulus marmoratus, under laboratory conditions. *Aquaculture*, 281(1-4), 100-105.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.001>
- Harrington, R. W. (1961). Oviparous Hermaphroditic Fish with Internal Self-Fertilization. *Science*, 134(3492), 1749-1750. <https://doi.org/10.1126/science.134.3492.1749>
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, 1(2), 76-80.
<https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>
- Hubert, B. (2010). La régulation épigénétique des éléments transposables dans les populations naturelles de Drosophila simulans. *Thèse de Doctorat Université de Lyon*, 259.

- Imgrund, H. (2003). Environmental Fate of Permethrin. *Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation*, 12.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2), 191-205. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.026>
- Ishigaki, M., Puangchit, P., Yasui, Y., Ishida, A., Hayashi, H., Nakayama, Y., Taniguchi, H., Ishimaru, I., & Ozaki, Y. (2018). Nonstaining Blood Flow Imaging Using Optical Interference Due to Doppler Shift and Near-Infrared Imaging of Molecular Distribution in Developing Fish Egg Embryos. *Analytical Chemistry*, 90(8), 5217-5223. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05464>
- Kanamori, A., Yamamura, A., Koshiha, S., Lee, J.-S., Orlando, E. F., & Hori, H. (2006). Methyltestosterone efficiently induces male development in the self-fertilizing hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Genesis*, 44(10), 495-503. <https://doi.org/10.1002/dvg.20240>
- Kiani, J., Grandjean, V., Liebers, R., Tuorto, F., Ghanbarian, H., Lyko, F., Cuzin, F., & Rassoulzadegan, M. (2013). RNA-Mediated Epigenetic Heredity Requires the Cytosine Methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genetics*, 9(5), e1003498. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003498>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- LeBlanc, D. M., Wood, C. M., Fudge, D. S., & Wright, P. A. (2010). A Fish Out of Water : Gill and Skin Remodeling Promotes Osmo- and Ionoregulation in the Mangrove Killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(6), 932-949. <https://doi.org/10.1086/656307>
- Lee, J.-S., Raisuddin, S., & Schlenk, D. (2008). *Kryptolebias marmoratus* (Poey, 1880) : A potential model species for molecular carcinogenesis and ecotoxicogenomics. *Journal of Fish Biology*, 72(8), 1871-1889. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01818.x>
- Moore G. L., J. M. Newsome, Ard, M. E., Bernhardt, L., Bland, M. J., & Ring, B. C. (2012). Establishing Developmental Genetics in a Self-fertilizing Fish (*Kryptolebias marmoratus*). *Integrative and Comparative Biology*, 52(6), 781-791. <https://doi.org/10.1093/icb/ics052>

- Mourabit, S., Edenbrow, M., Croft, D. P., & Kudoh, T. (2011). Embryonic development of the self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1694-1704. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22668>
- Münzel, M., Globisch, D., & Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(29), 6460-6468. <https://doi.org/10.1002/anie.201101547>
- Nunes, M. E. M., Schimith, L. E., Costa-Silva, D. G., Leandro, L. P., Martins, I. K., De Mello, R. S., Nunes, F. V. M., Santer, M., Vieira, P. B., Posser, T., & Franco, J. L. (2020). Acute embryonic exposure of zebrafish to permethrin induces behavioral changes related to anxiety and aggressiveness in adulthood. *Journal of Psychiatric Research*, 121, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.11.006>
- Nunes, M. E. M., Schimith, L. E., da Costa-Silva, D. G., Lopes, A. R., Leandro, L. P., Martins, I. K., de Mello, R. S., Hartmann, D. D., de Carvalho, N. R., da Rosa, P. C., Trevisan, R., Di Giulio, R. T., Posser, T., & Franco, J. L. (2019). Acute Exposure to Permethrin Modulates Behavioral Functions, Redox, and Bioenergetics Parameters and Induces DNA Damage and Cell Death in Larval Zebrafish. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-19. <https://doi.org/10.1155/2019/9149203>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247-257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Pietri, T., Roman, A.-C., Guyon, N., Romano, S. A., Washbourne, P., Moens, C. B., de Polavieja, G. G., & Sumbre, G. (2013). The first mecp2-null zebrafish model shows altered motor behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00118>
- Puumala, S. E., & Hoyme, H. E. (2015). Epigenetics in Pediatrics. *Pediatrics in Review*, 36(1), 10.
- Puybareau, E., Talbot, H., & Leonard, M. (2015). Automated heart rate estimation in fish embryo. *2015 International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)*, 379-384. <https://doi.org/10.1109/IPTA.2015.7367171>
- Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*, 293(5532), 1089-1093. <https://doi.org/10.1126/science.1063443>
- Robinson, H. A., & Pozzo-Miller, L. (2019). The role of MeCP2 in learning and memory. *Learning & Memory*, 26(9), 343-350. <https://doi.org/10.1101/lm.048876.118>

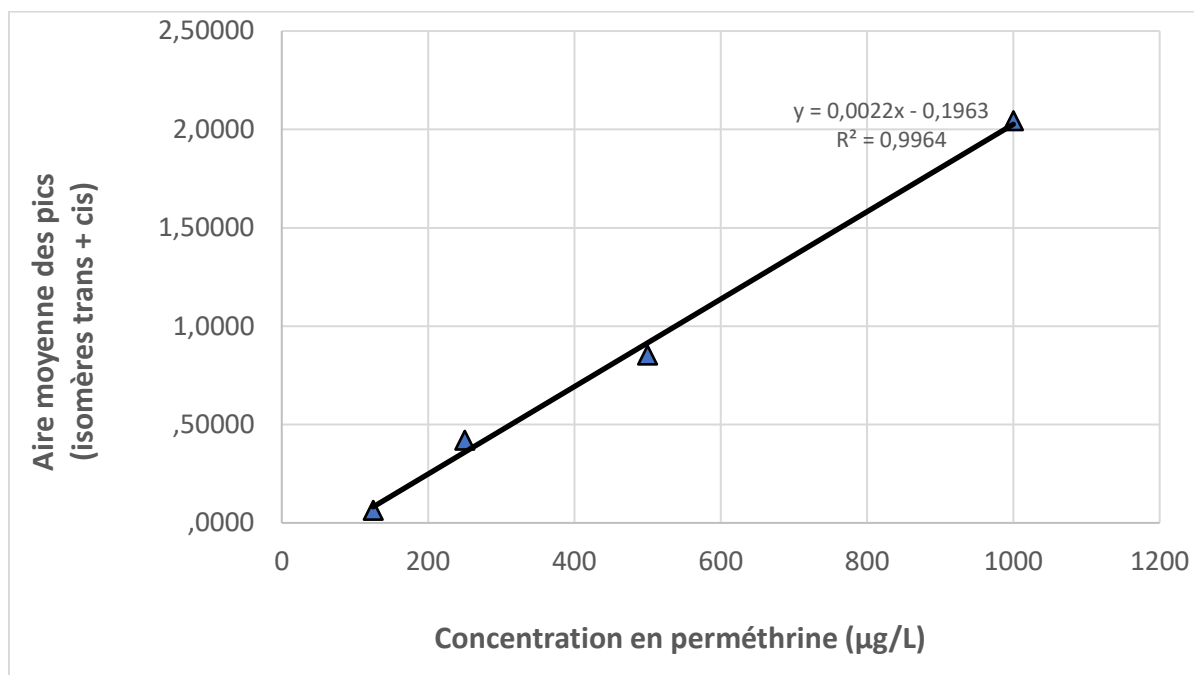
- Saillenfait, A.-M., Ndiaye, D., & Sabaté, J.-P. (2015). Pyrethroids : Exposure and health effects – An update. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(3), 281-292. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.01.002>
- Saito, H., Hara, K., Tominaga, T., Nakashima, K., & Tanemura, K. (2019). Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *Journal of Applied Toxicology*, 39(12), 1651-1662. <https://doi.org/10.1002/jat.3882>
- Sakakura, Y., Soyano, K., Noakes, D. L. G., & Hagiwara, A. (2006). Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Ichthyological Research*, 53(4), 427-430. <https://doi.org/10.1007/s10228-006-0362-2>
- Seisenberger, S., Peat, J. R., Hore, T. A., Santos, F., Dean, W., & Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle : Building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1609), 20110330. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>
- Smith, T. H. L., Collins, T. M., & McGowan, R. A. (2011). Expression of the dnmt3 genes in zebrafish development : Similarity to Dnmt3a and Dnmt3b. *Development Genes and Evolution*, 220(11-12), 347-353. <https://doi.org/10.1007/s00427-010-0347-z>
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity : Recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165-181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., & Weiner, M. L. (2002). *Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity : Implications for cumulative risk assessment*. 57.
- Srinageshwar, B., Maiti, P., Dunbar, G., & Rossignol, J. (2016). Role of Epigenetics in Stem Cell Proliferation and Differentiation : Implications for Treating Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 199. <https://doi.org/10.3390/ijms17020199>
- Stel, J., & Legler, J. (2015). The Role of Epigenetics in the Latent Effects of Early Life Exposure to Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrinology*, 156(10), 3466-3472. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1434>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>

- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S., & Yan, D. (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>
- Tatarenkov, A., Lima, S. M. Q., & Avise, J. C. (2011). Extreme homogeneity and low genetic diversity in *Kryptolebias ocellatus* from south-eastern Brazil suggest a recent foundation for this androdioecious fish population. *Journal of Fish Biology*, 79(7), 2095-2105. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03155.x>
- Taylor, D. S. (1992). Diet of the killifish *Rivulus marmoratus* collected from land crab burrows, with further ecological notes. *Environmental Biology of Fishes*, 33, 389-393.
- Taylor, D. S. (2000). Biology and ecology of *rivulus marmoratus*: new insights and a review. *Florida Academy of Sciences*, 63(4), 15. <https://www.jstor.org/stable/24321270>
- Taylor, D. S. (2012). Twenty-Four Years in the Mud : What Have We Learned About the Natural History and Ecology of the Mangrove *Rivulus*, *Kryptolebias marmoratus*? *Integrative and Comparative Biology*, 52(6), 724-736. <https://doi.org/10.1093/icb/ics062>
- Taylor, D. S., Davis, W. P., & Turner, B. (1995). *Rivulus marmoratus*: ecology of distributional patterns in florida and the central indian river lagoon. *Bulletin of Marine Science.*, 57(1), 6.
- Trelle, M. B., & Jensen, O. N. (2007). Functional proteomics in histone research and epigenetics. *Expert Review of Proteomics*, 4(4), 491-503. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.491>
- Turko, A. J., & Wright, P. A. (2015). Evolution, ecology and physiology of amphibious killifishes (Cyprinodontiformes): Amphibious cyprinodontiforms. *Journal of Fish Biology*, 87(4), 815-835. <https://doi.org/10.1111/jfb.12758>
- Varriale, A. (2014). DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates : Facts and Challenges. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/475981>
- Vijverberg, H. P. M., & vanden Bercken, J. (1990). Neurotoxicological Effects and the Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. *Critical Reviews in Toxicology*, 21(2), 105-126. <https://doi.org/10.3109/10408449009089875>
- Wang, X., Martínez, M.-A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A Review. *Environmental Research*, 149, 86-104. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>

- Weston, D. P., Holmes, R. W., & Lydy, M. J. (2009). Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, 157(1), 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.037>
- Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environmental Science & Technology*, 44(5), 1833-1840. <https://doi.org/10.1021/es9035573>
- Zhang, Q., Zhang, Y., Du, J., & Zhao, M. (2017). Environmentally relevant levels of λ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Chemosphere*, 185, 1173-1180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.091>
- Zhu, Q., Yang, Y., Lao, Z., Zhong, Y., Zhang, K., & Zhao, S. (2020). Photodegradation kinetics, mechanism and aquatic toxicity of deltamethrin, permethrin and dihaloacetylated heterocyclic pyrethroids. *Science of The Total Environment*, 749, 142106. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142106>

Liste des Annexes

Annexe 1 : Droite de calibration permettant la quantification des concentrations réelles en perméthrine dans les solutions de travail utilisés lors des expositions. Les standards utilisés ont été préparés à partir de solutions mères de perméthrine (100% de DMSO) diluées dans de l'eau salée (12ppt) pour une concentration finale en DMSO de 0,1%.



Annexe 2 : Liste des différentes séquences de primers utilisées pour la qPCR. Blue lines are the housekeeping genes.

Gènes	Primers (Forward/Reverse)	Séquences 5'→3'
Dnmt3aa	F	TACACGAGATCAAAAAGAAGACCAGGA
	R	CATCGCTCCTACGAAGAGAGGAT
Mecp2	F	TAAGATGCCCTTTGGCAAGACA
	R	GGACTTGGCAGGTGGAGTAG
Dnmt3ab	F	TCTTTATGTGGTGTCTGTTCAAC
	R	TGTGCATCAAACCTCACTTTGGA
Eef1-α	F	CAGGAAGGATGGTAGTGCG
	R	GCTTCAGTATGCCCGTTCC
β-actine	F	CTTGC GGAATCCACGAGACC
	R	CCAGGGCTGTGATCTCCTTCTG