

2023-2024

Mention Toxicologie Ecotoxicologie
Spécialité Toxicologie Humaine et
Environnementale

Effets intergénérationnels sur le cerveau lors d'exposition au Cadmium, à l'Ochratoxine A et à l'Acide perfluoroctanoïque

-
Evan Pleininger

Maître de stage : Fatima Smagulova

Superviseurs : Ouzna Dali, Céline Heitz

Equipe 4

Présentation

Ce travail a été réalisé dans l'équipe 4 de l'IRSET (Institut de Recherche en Santé, Environnement et travail) dont Michel Samson est le directeur de recherche INSERM. Les missions de cet institut sont de mieux comprendre les processus biologiques et les facteurs environnementaux qui influencent la santé humaine ainsi que de déchiffrer les pathologies du cancer, des maladies pulmonaires, métaboliques, infectieuses et des troubles de reproduction et du développement.

Remerciement

Je tiens à remercier ma responsable de stage, Fatima Smagulova, chef de l'équipe 4 Chromatine Epigénétique et Environnement, de m'avoir accueilli au sein de l'IRSET pour mon stage pour son encadrement tout au long de l'année. Je la remercie également ainsi que Ouzna Dali et Céline Heitz membre de l'équipe, pour m'avoir guidée tout au long de mon stage, pour leur soutien, leurs explications et leur bonne humeur. Elles m'ont permis de prendre des responsabilités tout en me laissant travailler de manière autonome.

Je remercie également tous les personnels de l'Irset que j'ai pu rencontrer au cours de mon travail, ainsi que tous les personnels d'entretien du laboratoire et des bureaux le personnel d'entretien du laboratoire et des bureaux.

Résumé

Le cadmium, l'ochratoxine A (OTA) et l'acide perfluoroctanoïque (PFOA) sont des composés toxiques retrouvés dans une majorité de la population d'Europe et ont été ici pour leurs effets intergénérationnels chez les mâles. Des souris mâles Swiss ont été exposés à 500 fois la DJA par gavage pendant 35 jours et ont été croisés avec des femelles non exposées et non consanguines. Les embryons âgés de 15 jours (e15) sont disséqués et le cerveau, les ovaires et testicules sont prélevés. Des échantillons de chaque tissu et exposition sont analysés par RT-qPCR en analysant l'expression de gènes régulée par des super-enhancers et impliqués dans la fonction du tissu et développement embryonnaire. Un immunomarquage par fluorescence est réalisé sur le cerveau embryonnaire mâle. Les expressions géniques dans les cerveaux des embryons F1 sont perturbées pour chacune des 3 expositions pour les gènes impliqués dans le développement embryonnaire et la communication neurale. Au niveau des ovaires l'expression des gènes spécifiques issue du développement embryonnaire et spécifique des organes sexuels sont altérés lors d'exposition au Cadmium et à l'OTA, de même pour les testicules lors du traitement au PFOA. L'immunomarquage démontre que l'exposition paternelle au Cadmium induit dans le cerveau embryonnaire mâle une baisse de la prolifération cellulaire tandis que l'exposition provoque une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution de l'enzyme de tyrosine hydroxylase. Donc il semble que l'exposition au PFOA et à l'OTA chez F0 induise une perturbation du développement neurale chez l'embryon F1. En conclusion, notre étude montre que l'exposition paternelle aux polluants entraîne des altérations cérébrales chez les descendants.

Intergénérationnelle, cerveau, Cadmium, Ochratoxine A, Acide perfluoroctanoïque

Abstract

Cadmium, ochratoxin A (OTA) and perfluorooctanoic acid (PFOA) are toxic compounds found in a majority of the population in Europe and it have been shown to induce transgenerational effects in males. Male Swiss mice were exposed to 500 times the daily authorised dose DAD by gavage for 35 days and were mated with unexposed females. Embryos aged 15 days (e15) were dissected and the brain, ovaries and testes were preserved. Samples of each tissue were analysed by RT-qPCR for expression of genes regulated by super-enhancers. The analysed genes were essential for a brain function and embryonic development. Fluorescence immunostaining was performed on male embryonic brains. Gene expression in the brains of F1 embryos was perturbed at all 3 exposures for genes involved in embryonic development and neural communication. In the ovaries, expression of genes specific to embryonic development and sexual organs was altered by exposure to Cadmium and to OTA, and in the testes only by PFOA treatment. Immunostaining showed that paternal exposure to Cadmium induced a decrease in cell proliferation in the male embryonic brain, while exposure to OTA induced an increase in cell proliferation and a decrease in the tyrosine hydroxylase enzyme levels. So, it seems that exposure to PFOA and OTA in F0 induces a disruption of neural development in the F1 embryo and very limited effects were induced by low dose of Cadmium.

Transgenerational, Brain, Cadmium, Ochratoxin A, Perfluorooctanoic acid

Abréviations

BSA : Albumine sérique bovine
Cd : Cadmium
DJA : Dose Journalière Admissible
OCT : Optimal Cutting Temperature
OTA : Ochratoxine A
PBS : Tampon phosphate salin
PFOA : Acide perfluorooctanoïque
RT-qPCR : Quantitative Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
TH : Tyrosine hydroxylase

Les abréviations de l'ensemble des gènes étudiés ici sont toutes rassemblées en Annexe1.

I. Introduction

En 2019, la pollution a causé la mort prématûre de plus de 9 millions de personnes et reste l'un des principaux facteurs ayant un impact sur la santé supérieur à celui de la guerre, du paludisme ,des drogues, de l'alcool...(Fuller et al. 2022)

De plus, il convient de souligner que de récentes recherches ont avancé que les toxiques environnementaux jouent également un rôle essentiel dans l'évolution future de la santé (asthme, obésité et maladies cardiovasculaires) (Predieri, Alves, Iughetti 2022) des personnes exposées mais aussi des générations futures. Toutefois, la transmission des problèmes de fertilité des parents à leurs descendances a été clairement établie chez le modèle animal mais n'a été suggérée que récemment chez l'homme dans quelques articles (Montjean et al. 2022; Gong et al. 2022). La transmission de l'infertilité ou bien d'un effet délétère de santé d'un parent à son enfant peut être transmise par effets intergénérationnels, c'est-à-dire par un possible effacement incomplet des marques épigénétiques des gamètes, pouvant être induit par un polluant. Ces effacements incomplets viennent notamment perturber l'évènement de reprogrammation embryonnaire qui efface et rétablit les marques épigénétiques peut alors perturber le développement de l'embryon (Kohli, Zhang 2013). Ces marques épigénétiques retrouvées dans l'ADN de spermatozoïde sont conservées via la méthylation de l'ADN et via les protamines. En effet en France, plus de 2800 naissances par an sont concernées par des malformations induites par des

polluants tératogènes pourtant la plupart d'entre elles peuvent être évitées, à condition d'être correctement évaluées (Amar 2017).

Les toxiques environnementaux peuvent provenir dans un premier cas d'organisme vivant tel que les champignons et bactéries et pouvant notamment être transmis via l'alimentation. Dans un deuxième cas, ces toxiques peuvent provenir de l'industrialisation humaine notamment via les composés synthétiques et les déchets produits qui se retrouvent par la suite dans la nature. Une fois largement répandus dans l'environnement, ces polluants pénètrent dans l'eau, l'air, le sol et finissent par se bioaccumuler dans des organismes grâce à la chaîne alimentaire. Ainsi dans ce document, les polluants retrouvés en forte quantité chez l'Homme Cadmium, Ochratoxine A, acide perfluorooctanoïque (Cd, OTA, PFOA) et leurs impacts sur l'épigénétique des cellules reproductive mâle et leurs conséquences sur la descendance vont être étudiés sur le modèle murin (souris).

Cadmium (Cd)

Le Cadmium est un métal fortement utilisé dans l'industrialisation pouvant s'accumuler dans les plantes et autres organismes. Sa capacité毒ique est due aux interférences avec plusieurs processus métaboliques régulés par le zinc impliqué dans la fonction de plusieurs enzymes (Waalkes 2003). Selon l'HBM4EU, l'exposition au Cd en Europe et en Amérique du Nord est très élevée avec une exposition journalière de 10-20 µg Cd/jour, et une moyenne dans les urines de 0.5-1.0

$\mu\text{gCd}/\text{jours}$ et dans le sang de 0.5-1.0 $\mu\text{gCd}/\text{L}$ pour les non-fumeurs et 2 fois plus pour les fumeurs (*Handbook on the Toxicology of Metals - 4th Edition / Elsevier Shop*). Ces données sont très proches de la valeur de références déterminée par l'ANSES qui est de 0.35 $\mu\text{g}/\text{jour/kg}$ de poids corporel. Ce métal est considéré comme toxique étant donné qu'il provoque des dommages sur les tubulaires rénaux et est reconnu comme composé cancérogène pour l'Homme (Groupe 2A) par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le cancer. De plus ce métal a également identifié comme ayant des effets épigénétiques tel qu'en perturbant la méthylation de l'ADN ainsi qu'en modifiant les histones de gènes spécifiques au niveau post-traductionnelle (Wang et al. 2012). Au niveau reproductif le cadmium est toxique pour les organes reproducteurs mâle et femelle. En effet chez le mâle, le cadmium perturbe les organes et systèmes reproducteurs, nuit à la spermatogenèse, à la mobilité et à la qualité des spermatozoïdes ainsi que la régulation des hormones sexuelles (Kumar, Sharma 2019). Chez la femelle le cadmium impact également le système reproducteur femelle, notamment en provoquant des dommages à la folliculogénèse qui diminue alors la qualité et le nombre des ovocytes qui augmente alors l'infertilité (Qu et al. 2022). C'est pourquoi L'INRS le considère comme H361fd - Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.

Ochratoxine A (OTA)

L'OTA est une molécule faisant partie de la famille des mycotoxines et est produite par plusieurs espèces de la famille des *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) ou bien par le *Penicillium verrucosum*. L'OTA est connu pour être toxique via la production de nombreux ROS, via l'atome de chlore dans le cycle dihydroisocoumarine, qui réagissent et

dégradent les cellules (Ding et al. 2023). De plus ces toxines contamine de nombreuses denrées alimentaires tel que le raisin, le café, le cacao et les aliments pour nourrissons (Zhu et al. 2017). En ce qui concerne l'exposition humaine l'EFSA a déterminé une exposition alimentaire chronique de 0.6 à 17.8 ng/kg de poids corporel par jour chez l'adulte. L'exposition chez le nourrisson est de 1,7 à 2,6 ng/kg de poids corporel par jour, elle était plus importante lorsqu'ils étaient nourris au lait maternel. Cependant ces expositions restent inférieures à la DJA de l'OTA qui est de 17ng/jour/kg de poids corporel. Néanmoins les mycotoxines, tel que l'OTA, représentent un danger grandissant pour la sécurité alimentaire avec l'avènement du réchauffement climatique qui vient favoriser l'apparition, la virulence ainsi que la persistance des champignons producteurs de ces toxines, ce qui va alors augmenter l'apparition et la toxicité de ces molécules (Ramona and all). Toujours selon l'EFSA, l'OTA représente quand même des dangers étant donné que cette molécule est néphrotoxique et peut induire des tumeurs rénales chez plusieurs animaux mais cela reste mal caractérisé chez l'Homme. De plus, il semblerait que la toxicité de l'OTA est notamment due à des modifications épigénétiques dans la foi et le rein, cependant les variations de la méthylation de l'ADN des miRNA et des histones sur les sites cibles de l'OTA reste mal caractérisé (Zhu et al. 2017). Au niveau reproductif, l'OTA affecte les systèmes reproductifs mâle et femelle et est également considéré comme tératogène. De plus, l'OTA a été révélé comme perturbateur endocrinien et toxique pour la reproduction pouvant altérer la qualité des spermatozoïdes et a également été supposé que cette molécule induit un cancer des testicules (Malir et al. 2013). Cependant l'impact sur le système

reproductif femelle est moins bien documenté.

Acide perfluorooctanoïque (PFOA)

Le PFOA est un tensioactif perfluoré synthétique très stable utilisé en tant que tensioactif dans les poêles Teflon, qui persiste dans la nature malgré sa restriction d'utilisation et son entrée en 2019 dans la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants. En effet cette molécule est toxique mais ces mécanismes de toxicité sur l'organisme restent encore mal connus mais il semble que cela soit causé par L'effet agoniste du PFOA sur des récepteurs tel que du récepteur alpha de la prolifération des peroxysomes (PPAR α), de la voir mitochondriale de morts cellulaires ainsi que des récepteurs nucléaires : le récepteur farnésoidé X (FXR) et le récepteur hépatique X (LXR) (Li et al. 2017). Malgré ceci, ce polluant reste très présent chez l'Homme puisque le PFOA y est retrouvé à des concentrations comprises entre 0.3 et 277 ng/mL. Ces concentrations restent inférieures à la DJA de 1.5 μ g/jour/kg de poids corporel déterminé par la Commission allemande de biosurveillance humaine (HBM4EU). En effet cette substance est extrêmement toxique puisqu'elle a été catégorisée comme cancérogène de classe 2 (soupçonnés d'être cancérogènes pour l'homme, tels que les cancers des reins et des testicules), comme reprotoxique de classe 1B (présumé reprotoxique pour l'homme) neurotoxique et immunotoxique. Au niveau épigénétique, il a été démontré dans plusieurs rapports d'étude que cette molécule apporte des modifications notamment au niveau de la méthylation de l'ADN et de l'expression des Histones Déacétylase (Rashid et al. 2020; Wen, Mirji, Irudayaraj 2020; Pierozan, Cattani, Karlsson 2020).

C'est pourquoi ce rapport étudie l'impact des composés toxiques Cadmium, OTA et PFOA sur le développement embryonnaire du cerveau, des testicules et des ovaires suite à une exposition paternelle au polluant. Plus particulièrement ce document se concentre majoritairement sur l'impact au niveau du cerveau embryonnaire puisque précédemment des perturbations du comportement ont été observées chez les souris F1(annexe1). L'expression génique étudiée ici se fait principalement sur des gènes soumis à des enhancer qui sont des régions d'ADN régulateurs qui stimulent l'activité de transcription de gènes cible à partir d'emplacements distant et indépendant de l'orientation (Hamamoto, Fukaya 2022). Plus particulièrement ces gènes sont soumis aux super-enhancers qui concentrent un groupe d'enhancer sur une région de l'ADN permettent notamment de réguler l'identité cellulaire. Cependant ces régions sont très sensibles aux perturbations tels que des modifications de l'ADN ou des expositions aux polluants pouvant alors perturber ou facilité la transition d'état cellulaire (Pott, Lieb 2015), c'est pourquoi dans ce rapport ces régions sont étudiées face à l'exposition des polluants cités.

Finalement, l'hypothèse émit dans ce rapport est que les polluants étudiés induisent des altérations épigénétiques au niveau des super-enhancers dans les spermatozoïdes qui pourraient impacter le développement de nombreux organes comme le cerveau. Pour réaliser cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle de souris sur 35 jours d'exposition. Les différents objectifs de cette étude sont :

- 1) Analyser les effets sur la prolifération dans le cerveau
- 2) Analyser le taux d'enzyme clés dans la biosynthèse de la dopamine

- 3) Révéler l'expression génique dans le cerveau mais aussi dans les testicules et ovaire

II. Matériels & Méthodes

1. Doses, expositions et extraction des tissus

Les animaux exposés sont des souris Swiss mâles âgées de 5 semaines. Elles sont exposées à un des polluants étudiés (Cd, OTA et PFOA) ou bien à la solution contrôle (Sérum physiologique) par voie orale lors de gavage sur 35 jours. Afin d'observer des effets les polluants sont à des concentrations 500 fois plus forte que les DJA recommander par L'ANSES et/ou le Comité Alimentaire de l'Union Européenne indiqué précédemment. Cela donne alors des concentrations d'exposition pour le Cd de 175 μ g/jour/ de poids corporel pour l'OTA de 8.50 μ g/jour/ de poids corporel et pour PFOA de 750 μ g/jour/ de poids corporel. Malgré le haut facteur de multiplication des concentrations, ceux-ci restent néanmoins inférieurs à la dose utilisée dans plusieurs autres études. Au terme de l'exposition les souris seront âgées de 2 mois et seront en âge de procréer, alors 4 souris de chaque groupe d'exposition seront prélevées afin de les croiser à des femelles non exposées et non consanguines. Pour cette étude embryonnaire, les embryons sont disséqués au jour embryonnaire E15.5, lorsque les principaux organes tels que le cerveau, le foie et les testicules sont formés ou/et en cours de développement. Les femelles gestantes seront euthanasiées, les embryons seront disséqués et les organes seront réservés à l'analyse. Au total, 16 souris en gestations ont été sacrifiées (4 de chaque exposition) et 182 embryons ont été prélevés 45 dont la souris père a été exposé au PFOA, 58 à l'OTA, 48 au Cd et 51 au Contrôle.

2. Analyse morphologique des tissus

Les tissus embryonnaires sont ensuite fixés et inclus dans de l'OCT et des coupes sagittales de 8 μ m ont été réalisées pour le moment uniquement sur les cerveaux embryonnaires mâles via un cryostat. Il s'en est suivi un Histo-immunomarquage. Pour cela, les tissus sont fixés par du paraformaldéhyde (incuber 8 minutes à 4°C) afin de fixer les tissus sur la lame, puis cette substance est éliminée grâce à la glycine diluée dans le PBS (incuber 5 minutes à température ambiante). Ensuite les tissus sont lavés plusieurs fois avec du PBS (au moins 3 fois et incuber 5 minutes à 4°C) puis un tampon de blocage est ajouté (4% de BSA dans du PBS) afin de bloquer tous les sites non spécifiques (incuber 30 minutes à température ambiante). Suite à cela, les Anticorps primaires sont ajoutés sur ces tissus et sont incubés à 4°C durant toute une nuit, des lamelles n'ont pas été ajoutées sur les lames afin d'éviter le détachement des tissus lors du retrait de la lamelle. Le lendemain les lames sont lavées de 3 fois avec du PBS et les seconds Anticorps portant la fluorescence et diriger contre un des Anticorps primaire ont été ajoutés (incubation 1 heure à température ambiante). Les lames sont à nouveau nettoyées 3 fois avec du PBS et finalement le colorant DAPI est appliqué sur la lamelle. Le colorant DAPI utilisé est une molécule fluorescente se liant fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN. Le premier Anticorps primaire utilisé est l'Anticorps produit par le lapin et dirigé contre Ki67 (Dilution 1:500, Référence : invitrogen MA5-14520) qui est une protéine nucléaire chez les cellules prolifératrices, cette immunoglobuline est elle-même marquée par un Anticorps secondaire anti-lapin marqué par un fluorochrome à

fluorescence verte. Ainsi les cellules prolifératrices sont marquées par une fluorescence verte. Le second Anticorps primaire utilisé est l'Anticorps produit par la souris dirigée contre TH (Tyrosine hydroxylase, dilution 1:200 Référence : Santa Cruz sc 25269) qui est une enzyme importante dans la production de dopamine à partir de tyrosine, cette immunoglobuline est elle-même marquée par un Anticorps secondaire anti-souris marqué par un fluorochrome à fluorescence rouge. Ainsi les enzymes TH présent dans le cerveau sont marquées par une fluorescence rouge. Ensuite les tissus ont été pris en photo au microscope à fluorescence (Référence : Zeiss Axio et Axio cam, logiciel : Zein) au niveau de la zone du pallium (figure 1, zone précurseur du cortex chez l'embryon e15.5).

L'analyse quantitative a été performée grâce au logiciel ImageJ. Les cellules positives à Ki67 ont été décomptées sur le logiciel puis un ratio est déterminé entre le nombre et l'aire du tissu sur la photo. L'expression de TH a été mesurée par quantification de la fluorescence sur l'image. Pour cela l'intensité de la

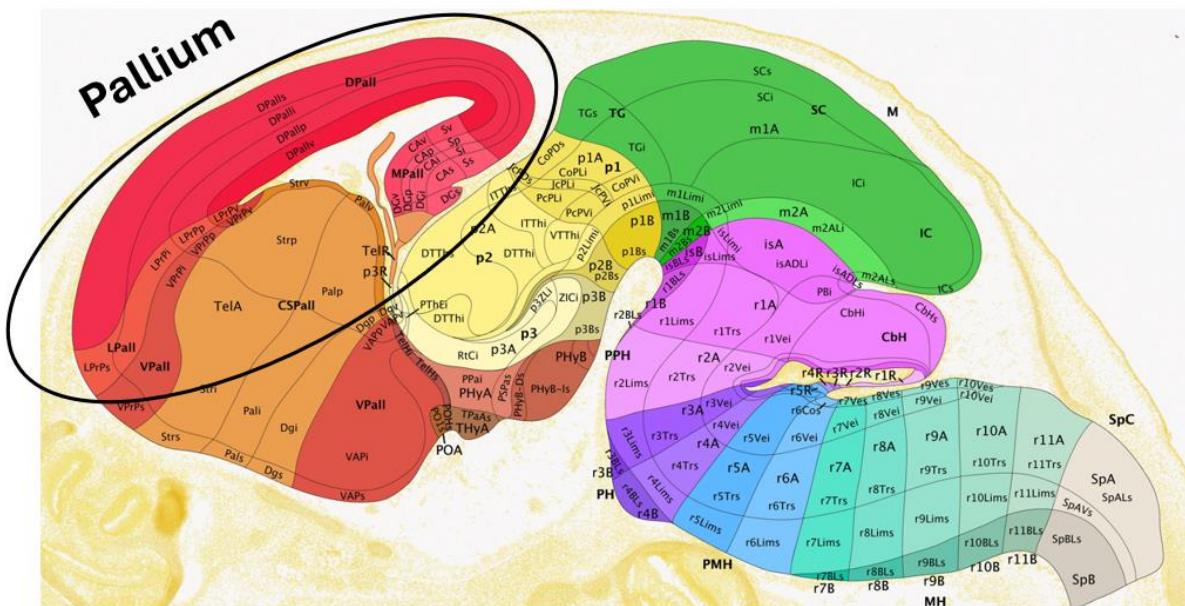
fluorescence de TH est mesurée et est rapportée sur l'aire du tissu sur l'image tout en éliminant le bruit de fond. Puis la même procédure a été réalisée sur la fluorescence DAPI de la même image et ensuite un ratio entre l'intensité de TH et du DAPI est calculé. Pour chaque tissu de cerveau analysé, environ 10 images ont été prises et traité via les tests précédents et une moyenne pour TH et KI67 ont été calculés. Finalement un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé.

3. Extraction d'ARNm et RT-qPCR

Cette étape a été réalisée sur différents tissus embryonnaires e15.5 que sont les testicules, les ovaires, les cerveaux mâles et les cerveaux femelles. Pour cela 6 à 8 tissus de chaque exposition sont conservés à -80°C puis l'extraction a été réalisé grâce au mini-Kit RNeasy Plus (Qiagen). L'entièreté des tissus et ovaires ont été utilisés pour l'extraction tandis que pour le cerveau l'extraction s'est réalisée sur la partie basse du cerveau qui se développera en cervelet par la suite. Les tissus ont été lysés et homogénéisés via un TissueLyser (QIAGEN).

Figure 1 : Coupe sagittale du cerveau embryonnaire e 15 d'une souris, avec positionnement du pallium

Source: *Atlas*



et de billes d'acier inoxydable de 5 mm (69989 ; QIAGEN). Puis la solution est centrifugée avant de transverser le surnageant dans une colonne à éliminations d'ADN. Afin d'obtenir des conditions de liaison optimale, de l'éthanol à 70% a été ajouté au lysat. Puis ce lysat a été positionné sur une membrane en silice RNeasy et a été traité à la DNase sans RNase (79254 ; QIAGEN) directement sur le lysat présent dans la colonne afin d'éliminer les restes d'ADN. À la suite de cela, les impuretés présentes dans l'ARN ont été enlevées grâce à un lavage avec RW1 et RPE du kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN), de l'ARN purifié est finalement obtenu et est ensuite élué dans 50 µl d'eau sans RNase. La quantité d'ARN extrait est quantifiée grâce à l'absorbance des UV dans une machine Nanodrop (Nanodrop 8000, logiciel Nanodrop 8000). Puis la Reverse Transcriptase est effectuée sur 1µg d'ARN total pour chaque échantillon grâce au kit iScript (1708891 ; Bio-Rad). La Reverse Transcriptase a été diluée 10 fois. Suite à cela, une RT-qPCR est réalisée sur une plaque contenant notamment les échantillons obtenus, les amores sens et antisens des gènes et du SYBR green pour l'étude quantitative. La quantification de la RT-qPCR se fait par ΔCq .

Les gènes choisis ici proviennent tout d'abord d'une l'analyse de la méthylation de l'ADN présent dans les spermatozoïdes par séquençage et sont comparés à une base de données de super-enhancers. Finalement 400 super-enhancers ont été relevés dont 200 qui sont préservés dans les cellules reproductrices. Puis, les gènes sélectionnés répondent aux critères : être régulé par les 200 super-enhancers cité précédemment et jouant un rôle dans la fonctionnalité spécifique du tissu, de développement spécification cellulaire et/ou système de réparation (Annexe 2).

Pour mener des études sur ces résultats, un gène de référence est choisi en fonction

de sa faible variation entre les réplicats et permet alors de normaliser l'expression d'ARN des autres gènes.

Les résultats de la RT-qPCR ont tout d'abord été traités sur Excel en rapportant l'expression de chaque échantillon sur la moyenne de l'expression des contrôles afin de réaliser par la suite un test statique multiple T-test individuellement entre le contrôle et un groupe d'exposition sur graphpad. Des valeurs aberrantes ont été supprimées afin d'avoir une meilleure analyse statistique.

III. Résultats

1. Analyse morphologique par immunofluorescence

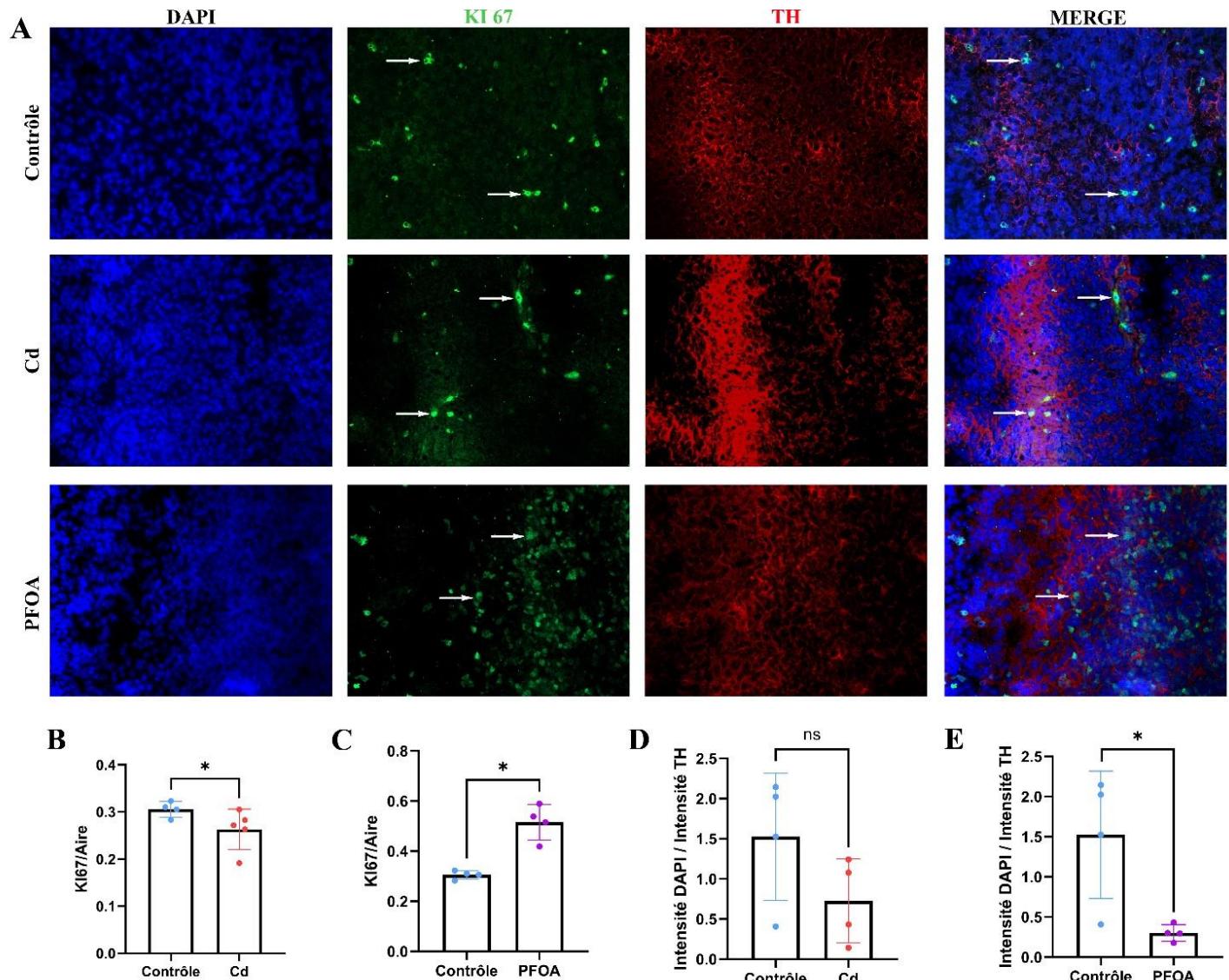


Figure 2 : Immunohistomarquage par fluorescence, de DAPI, KI-67 et de PFOA sur la zone pallium du cerveau embryonnaire e15 pour les groupes contrôle, Cd et PFOA (A). Test statistique de Mann-Whitney de la différence du ratio du nombre de cellules positives aux KI67 sur l'Aire du tissu entre le groupe contrôle et Cd (B) ainsi qu'entre le groupe contrôle et PFOA (C). Test statistique de Mann-Whitney de la différence du ratio entre l'intensité fluorescent du DAPI et celle de TH entre le groupe contrôle et Cd (D) ainsi qu'entre le groupe contrôle et PFOA (E). * P<0.05

Les cerveaux mâles embryonnaires des expositions au Contrôle, au Cd et au PFOA ont pu être étudiés, mais le nombre d'échantillons d'OTA est insuffisant (inférieur à n=4) pour passer un test, donc ce groupe a été éliminé de cette analyse statistique. Le comptage cellulaire par Ki67

a démontré que les embryons résultants de l'exposition au Cd ont une diminution du ratio Ki67/Aire (figure 2B) et donc une baisse de la prolifération cellulaire dans leur Pallium. Au contraire les embryons issus du traitement au PFOA ont vu leur ratio Ki67/Aire (figure 2C) augmenter au

niveau du pallium indiquant alors une augmentation de la prolifération cellulaire. Ces résultats peuvent être rapportés aux données obtenues par RT-qPCR sur les mêmes types de tissus et plus particulièrement sur les gènes jouant un rôle dans le développement des tissus et la prolifération cellulaire. Ainsi le groupe Cd voit leur baisse de prolifération associée avec une tendance de surexpression de Ephb3 et Notch tandis que le groupe PFOA a une augmentation de la prolifération associée avec une de surexpression de Sox2 et Src ainsi qu'une sous-expression de Calm3. Le ratio d'intensité TH/DAPI dans le groupe Cd ne montre pas de différence significative (figure 2D) entre le groupe Cd et Contrôle, ce qui signifie que l'enzyme TH est exprimé de la même manière entre les 2 groupes et donc que le Cd n'impacte pas l'expression de TH pour la génération F1. Au contraire les embryons issus du traitement au PFOA ont un ratio d'intensité TH/DAPI qui diminue significativement (figure 2E) comparé au groupe contrôle donc TH est sous-exprimé et que le PFOA impacte l'expression de TH de la génération F1. En comparant ces résultats aux données obtenus par RT-qPCR sur les cerveaux embryonnaires mâles, l'expression génique de TH ne varie pas pour les groupes Cd et PFOA, ce qui correspond au résultat obtenu pour le Cd mais pas pour le PFOA. Cette différence peut être causée par d'autres mécanismes post-traductionnelle.

2. Étude de l'impact des différents polluants sur l'expression génétique des différents tissus par RT-qPCR.

A. Le cerveau mâle et femelle

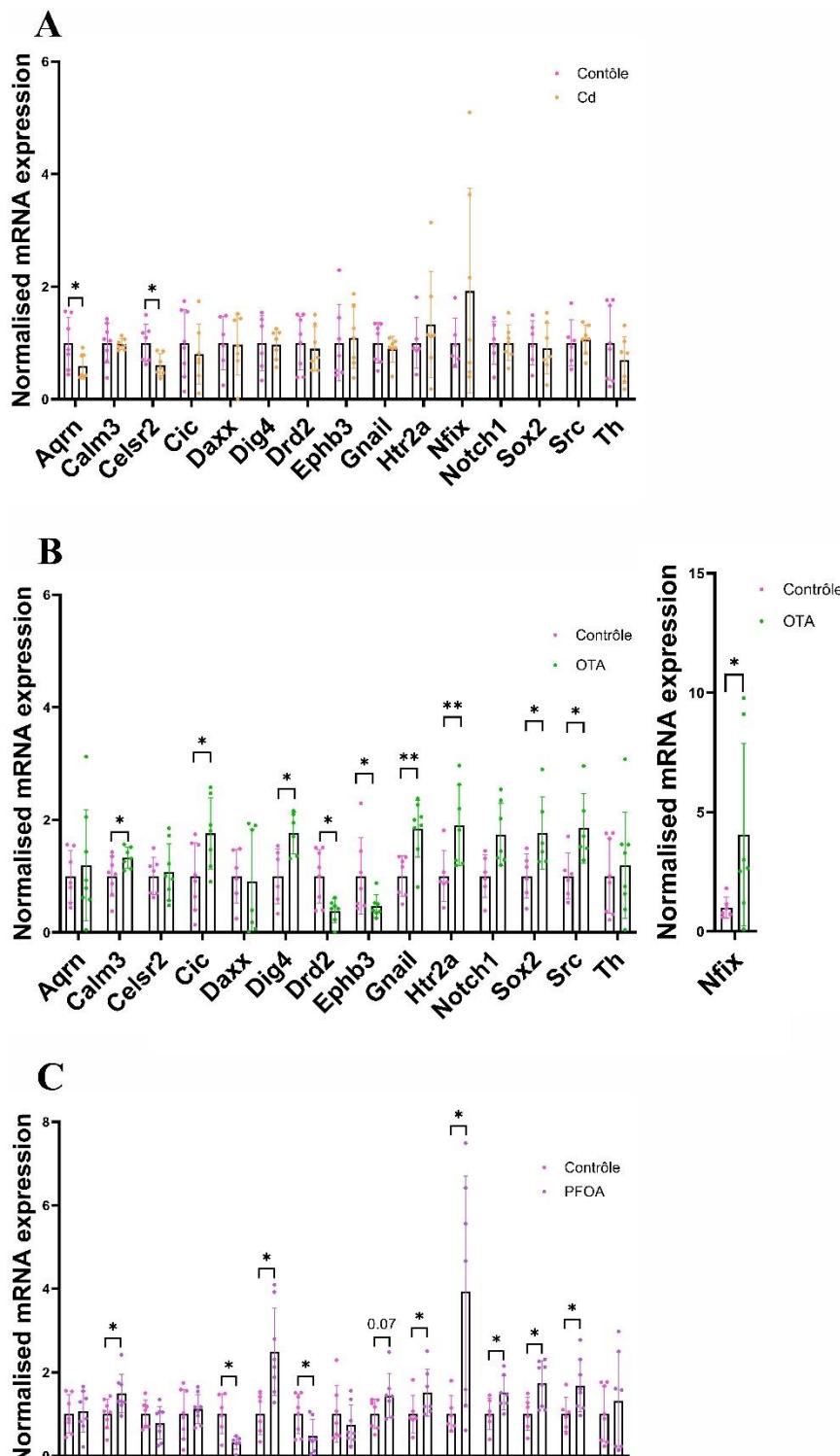


Figure 3: RT-qPCR des cerveaux femelles embryonnaires F1 e15, dont le père a été au Cd (A), à l'OTA (B) ou au PFOA (C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Suite à la RT-qPCR mené sur les cerveaux embryonnaires femelles e15 F1, le gène Rp137a (protéine ribosomale) a été déterminé comme gène de référence et des variations du taux d'expression génique ont été observées suite à l'exposition d'un des

3 polluants. Dans un premier temps, le cadmium perturbe seulement l'expression de 2 gènes étudiés (figure 3A: *Aqrn* et *Celsr2* qui sont respectivement impliqués dans la formation d'aquaporine et dans la communication entre cellules. Lors de l'exposition à l'OTA (figure 3B) ou au PFOA (figure 3C), l'expression des gènes est plus perturbée que l'expression au cadmium. De nombreux gènes sont surexprimés lors des 2 expositions notamment ceux impliqués dans la communication neurale via les neurotransmetteurs de la dopamine et de la sérotonine (incluant les gènes *Htr2a*, *Gnai2*, *Dlg4*). Au contraire l'expression de *Drd2* impliqué dans les récepteurs dopaminergiques diminue. De la même manière des gènes engagés dans le développement embryonnaire, division et spécification cellulaire sont surexprimés (incluant les gènes *Calm3*, *Sox2* et *Src*) dans les 2 groupes. Le gène *Nfix*, facteur de transcription, est également surexprimé dans les 2 cas. Dans une approche plus spécifique, l'exposition à l'OTA (figure 3B) induit une augmentation de l'expression du gène *Cic* impliqué comme facteur de transcription ainsi qu'une diminution de l'expression du gène *Ephb3* jouant

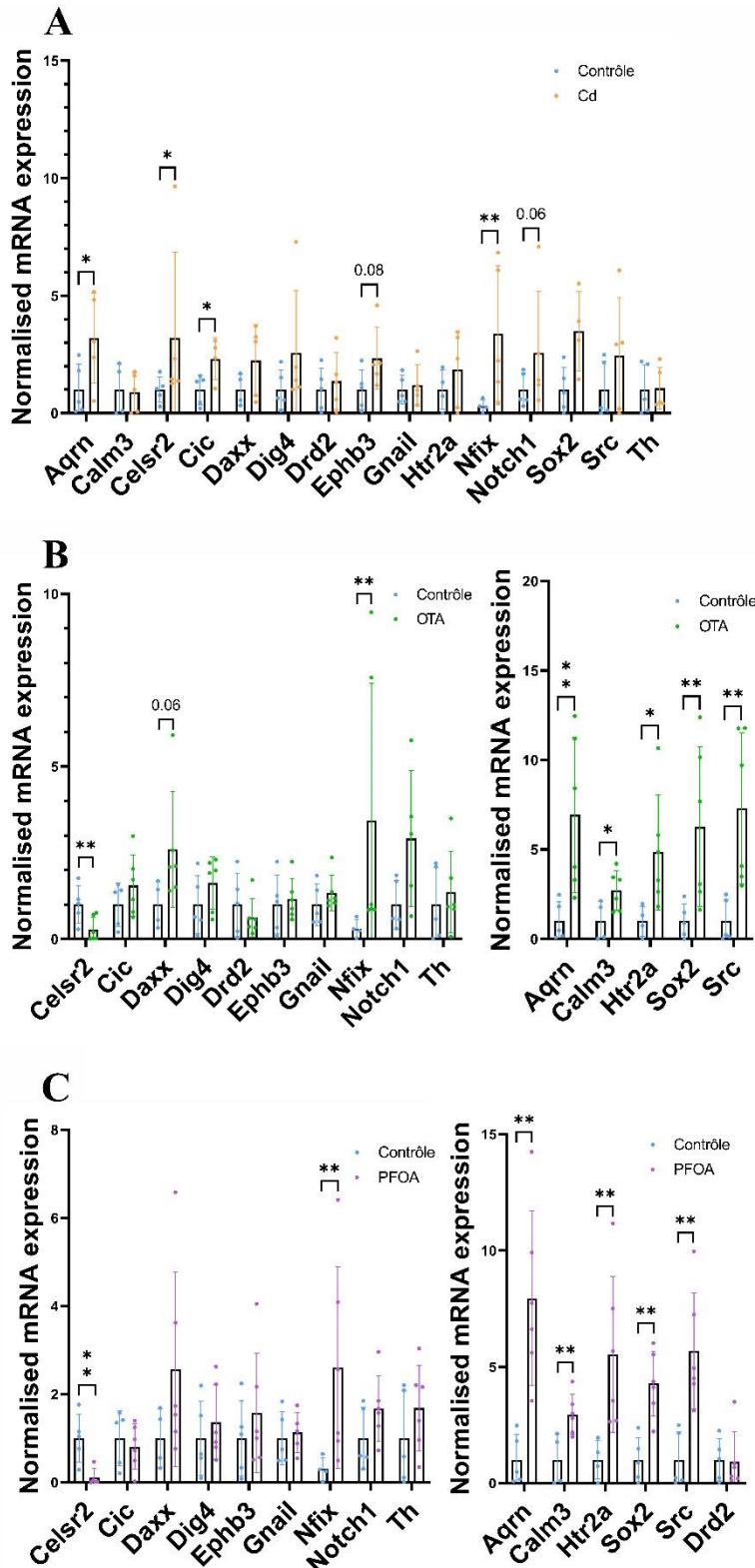


Figure 4 : RT-qPCR des cerveaux mâles embryonnaires F1 e15, dont le père a été au Cd (A), à l'OTA (B) ou au PFOA (C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

un rôle dans le développement du système nerveux. Concernant l'exposition au PFOA, celui-ci induit une sous-expression du gène

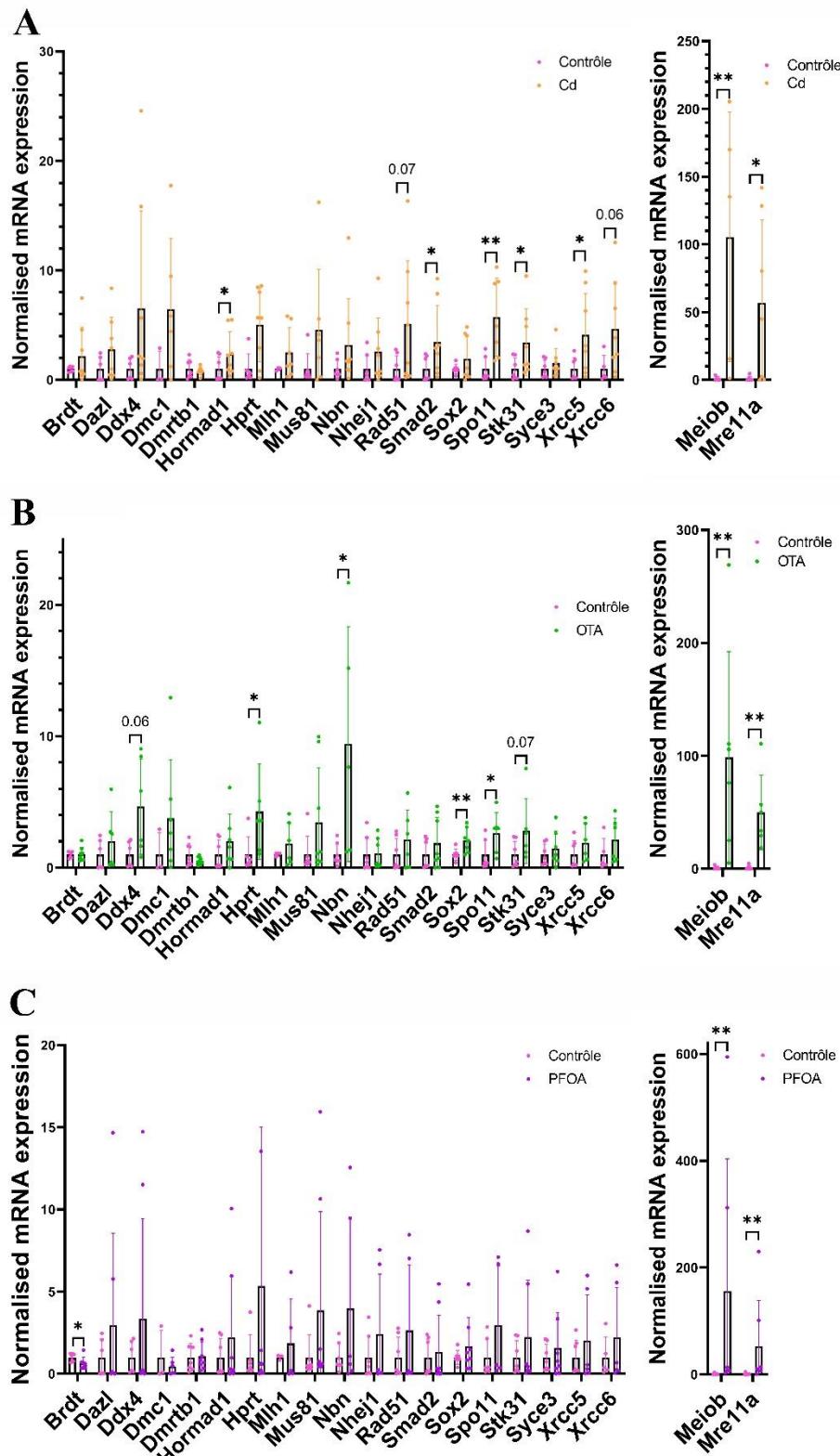
Daxx régulant l'apoptose ainsi qu'une augmentation de l'expression de Notch1 impliqué dans la différenciation au niveau du système nerveux.

La même expérimentation a été réalisée sur les cerveaux embryonnaires mâles e15 F1. Lors de l'exposition au Cd (figure 4A), les mêmes gènes que dans le cerveau femelle sont surexprimés (Aqrn et Celsr2) dans le cerveau mâle. Cependant d'autres expressions de gènes sont également surexprimées chez le mâle pour les gènes Ephb3 et Notch 1 impliqués dans le développement cérébral mais aussi pour les gènes Nfix et Cic qui jouent un rôle en tant que facteur de transcription. En ce qui concerne l'exposition à l'OTA (figure 4B) et au PFOA (figure 4C), ils induisent une surexpression chez les mêmes gènes impliqués dans le développement embryonnaire, division et spécification cellulaire sont surexprimés (gènes Calm3, Sox2 et Src) ainsi que pour le gène Aqrn d'Aquaporine et pour le gène du facteur de transcription de Nfix. Une diminution du même gène Celsr2 (jouant un rôle dans les communications intercellulaires) est également observée pour les 2 expositions. Pour PFOA, le gène régulant l'apoptose, Daxx, montre aussi une tendance de surexpression.

Pour les expositions à l'OTA et au PFOA certaines différences d'expression génique se retrouvent seulement dans les cerveaux d'un des 2 sexes tel que la différence d'expression des gènes Aqrn et Celsr présents uniquement chez les mâles et des gènes Dig4, DRD2 et Gnail seulement chez la femelle. Pour le traitement à l'OTA les différences d'expression génique de Cic et de Ephb sont retrouvées seulement dans les cerveaux embryonnaires femelles, il en

de même pour les gènes Notch1 et Daxx pour le traitement au PFOA.

B. Les ovaires



En ce qui concerne l'étude des expressions géniques des ovaires, le choix s'est porté sur des gènes de développement de l'embryon, des cellules germinales, de spécification ainsi que des systèmes de réparation de l'ADN. Le gène de référence choisi est le gène Tdrd1 qui est impliqué dans la suppression des éléments transposable au cours de la spermatogenèse. Sur la figure 5 il est remarqué que les 3 expositions induisent une augmentation de l'expression des mêmes gènes de réparation de l'ADN (Meiob et Mre11a). De manière plus spécifique le Cd (figure 5A) induit une augmentation de l'expression de plusieurs gènes jouant un rôle dans la réparation de l'ADN (Rad51, Xrcc5, Xrcc6, Meiob et Mre11a) mais aussi des gènes de cycles cellulaires, prolifération, spécification et d'apoptose (Hormad1 et Smad2). Des gènes ayant un rôle dans les organes reproducteurs sont surexprimés lors d'exposition au Cd mais aussi à l'OTA (figure 5B) tel que STK31 exprimé dans les testicules ainsi que Spo11 engagé dans la recombinaison méiotique et la ségrégation des chromosomes. Le traitement à l'OTA induit également une surexpression génique d'un autre gène de réparation de l'ADN (Ndn) mais aussi d'un second impliqué dans le développement des cellules germinales (Ddx4 mais aussi d'un

Figure 5 : RT-qPCR des ovaires des embryons F1 e15, dont le père a été au Cd (A), à l'OTA (B) ou au PFOA (C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

troisième engagé dans le développement embryonnaire et le destin cellulaire. L'exposition au PFOA (figure 5C) induit moins de surexpression génique que les 2 autres traitements. En effet seuls les gènes cités précédemment (*Meiob* et *Mre11a*) ainsi que *Brdt* qui est un bromodomaine associé aux testicules sont impactés.

C. Les testicules

Les gènes sélectionnés pour étudier leurs expressions dans les testicules embryonnaires e.15 codent pour des protéines se retrouvant dans les testicules, impliqués dans la spermatogenèse ou bien dans le développement embryonnaire, la formation de l'appareil reproducteur ainsi que la division et la spéciation des cellules. Le gène de référence utilisé ici est *Rp137a* qui code pour une protéine ribosomale. Les traitements au Cd (figure 6A) et à l'OTA (figure 6B) ne perturbent pas l'expression génique sur la gamme étudiée. Cependant certaines perturbations sont observables pour l'exposition au PFOA (figure 6C). En effet, *Hormad1*, qui permet la régulation du cycle cellulaire, est surexprimé ainsi que *Ntn 5*, jouant un rôle dans la morphogenèse, développement des tissus et projections neurales, suit une tendance de surexpression. A l'inverse lors de cette exposition, *Stk31* exprimant une

enzyme spécifiquement dans les testicules est sous-exprimé.

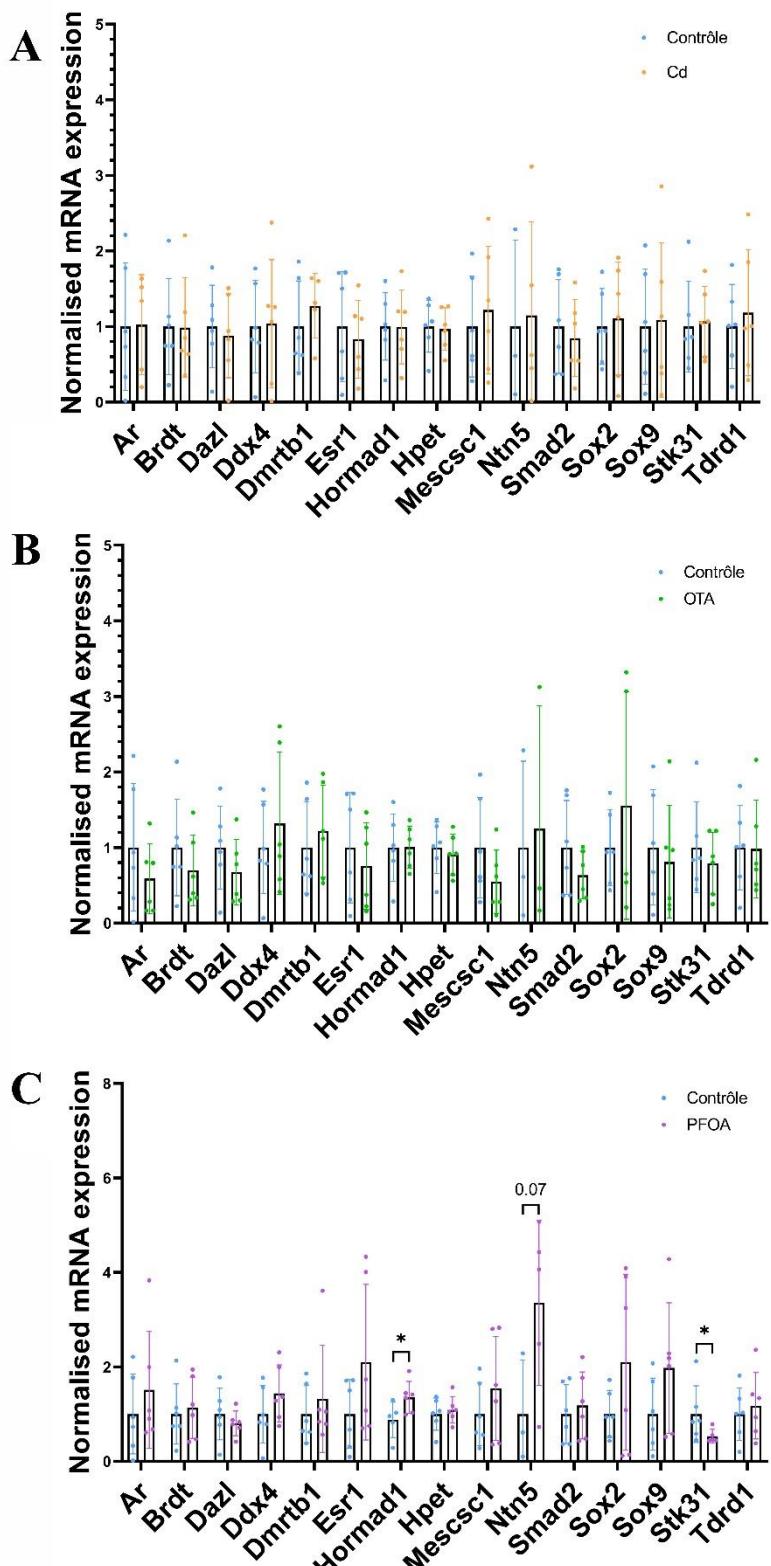


Figure 6 : RT-qPCR des testicules des embryons F1 e15, dont le père a été au Cd (A), à l'OTA (B) ou au PFOA (C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

IV. Conclusion & Discussion

Les expositions paternelles au Cd, à l'OTA et au PFOA induisent tous des variations de l'expression des gènes présents dans le cerveau, ceux-ci ont des fonctions dans le développement de l'embryon, du tissu et des cellules, comme facteur de transcription mais aussi des gènes impliqués dans la communication neurale tels que les communications dopaminergiques ainsi que dans la communication sérotoninergiques (excepté pour l'exposition au Cd). Ces variations de gènes dus à l'exposition paternelle ont également été retrouvées sur les mêmes gènes lors d'une RT-qPCR réalisée précédemment par un collègue sur des souris F1 âgées de 2 mois, cependant certains gènes vont être surexprimé au stade embryonnaire et normalement ou sous-exprimé à l'âge et inversement. Cette différence peut-être due qu'il est plus difficile de sélectionner une zone spécifique pour la RT-qPCR chez l'embryon étant donné que le cerveau n'est pas complètement formé. Néanmoins les résultats obtenus sont en corrélation avec l'immunohistomarquage par fluorescence qui montre une augmentation de la prolifération cellulaire et diminution de l'expression de TH au niveau du pallium pour le groupe d'exposition paternelle au PFOA et une diminution de la prolifération cellulaire pour le groupe Cd. Ces effets seront également étudiés sur les cerveaux femelles embryonnaires e15 F1 afin de confirmer les résultats ou d'observer des différences selon les sexes ainsi que d'avoir des résultats pour l'exposition à l'OTA. Ces perturbations apportées par les polluants peuvent également être à l'origine des déséquilibres comportementaux observés

également précédemment par l'équipe sur les souris F1 de 2 mois. Des études ont également obtenu des résultats et leurs conséquences en accord avec ceux présentés et sur d'autres modèles animaux tel que la démonstration que le cadmium induit un trouble du comportement et de transmission neurale chez les poissons-zèbres F1(Tian et al. 2021) ainsi qu'une perturbation du développement chez les drosophiles F1, F2 et F3(Mu et al. 2021). De la même manière des études ont démontré que le PFOA induit une perturbation morphologique, comportemental, de l'expression génique ainsi que de la fécondité chez les poisson zèbre adultes F0 et F1(Haimbaugh et al. 2022). Finalement, il a également été démontré que l'exposition parentale à l'OTA induit une perturbation des follicules dans les ovaires, une baisse de la qualité du sperme ainsi qu'une toxicité rénale chez les rats Fischer F1 (Bondy et al. 2021; Song et al. 2022), cependant des études démontrant un dérèglement comportemental et/ou du système nerveux chez F1 n'ont pas encore été démontré.

L'étude des gonades sexuelles des embryons e 15 F1 par Rt-qPCR ont démontré, pour les ovaires, une variation de l'expression de gènes de prolifération cellulaire et de protéine spécifique des gonades sexuelles pour les groupes Cd et OTA. Il est aussi observé une surexpression des gènes de réparation de l'ADN pour tous les groupes d'expositions, ce qui permet de supposer une surexpression de ces systèmes de réparation afin de maintenir l'ADN dans un bon état qui peut être confirmé par la mise en place d'une nouvelle étude sur les ovaires et il serait également intéressant de le réaliser sur le cerveau. Les résultats pour l'analyse sur les

testicules ont en revanche donné aucune variation pour les groupes Cd et OTA mais quelques surexpressions sont observées pour le PFOA sur certains gènes de prolifération ou de différenciation cellulaire ainsi qu'une sous expression d'une protéine présente dans les testicules. En revanche, une personne de l'équipe observe des variations, pour toutes les expositions, dans l'expressions des gènes des testicules des souris F1 adultes

impliqués dans les hormones sexuelles, les populations cellulaires mais aussi au niveau de super-enhancer. Les testicules des souris exposés et père ont également été analysés pour comprendre cet impact sur la progéniture et des retards ainsi que des suppressions de méiose ont été observés ainsi qu'accompagné de recombinaison homologue d'une augmentation des expressions des systèmes de réparations de l'ADN.

Annexe

Annexe 1

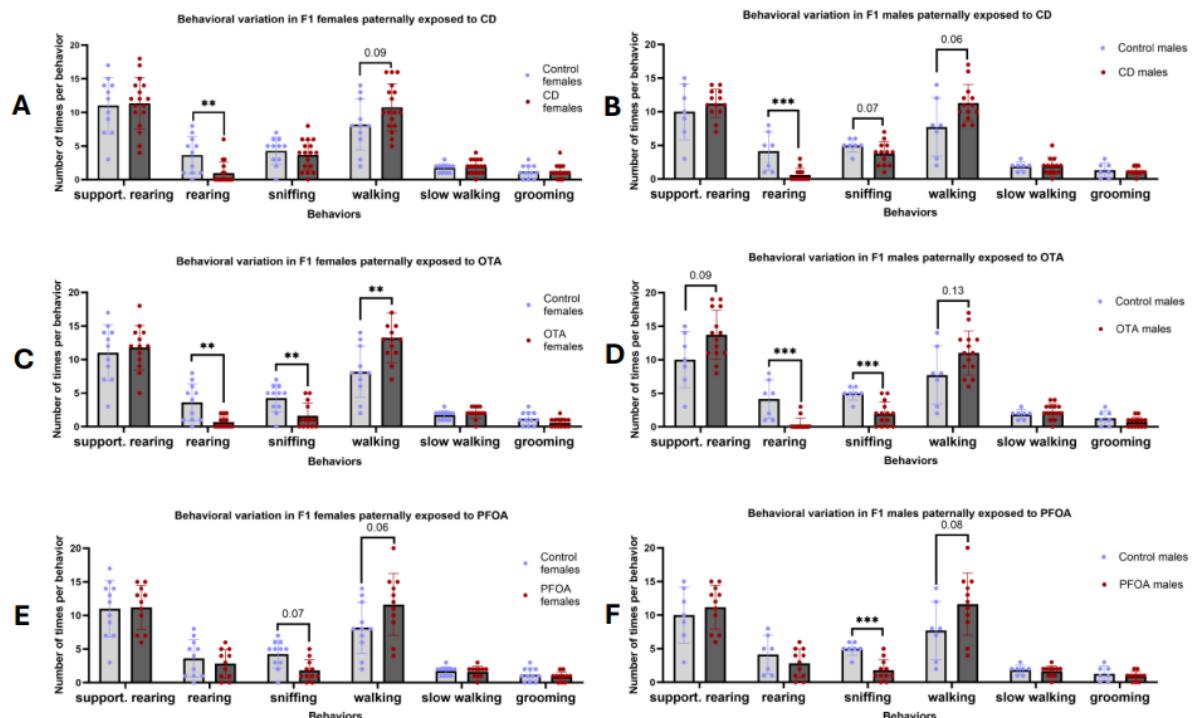


Figure 7 Variations comportementales selon 6 critères : redressement avec appui, redressement sur pattes arrières, reniflements, marche, marche étirée et la toilette. Chez la génération F1 paternellement exposée au Cadmium (Cd), chez la femelle (A) et le mâle (B); chez la génération F1 paternellement exposée à l'Ochratoxine A (OTA), chez la femelle (C) et le mâle (D); chez la génération paternellement exposée au PFOA, chez la femelle (E) et le mâle (F).

Annexe 2 Tableau 1 : Noms et descriptions des gènes étudiés lors des différentes RT-qPCR réalisées.

Nom	Abréviation	Rôle :	Tissus analysé
Aquaporin 1	Aqp1/Aqrn	Protéine d'aquaporine (canal d'eau)	Cerveau
Calmodulin 3	Calm3	Régule le cycle cellulaire et de la cytokinèse	
Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 2	Celsr2	Récepteurs impliqués dans la communication par contact	
Capicua Transcriptional Repressor	Cic	Facteur de transcription liant l'ADN, spécifique de l'ARN polymérase II	
Death Domain Associated Protein	Daxx	Régule l'apoptose	
Discs Large MAGUK Scaffold Protein 4	Dlg4/Dig	Récepteurs de neurotransmetteurs	
Dopamine Receptor D2	Drd2	Récepteur à la dopamine	
EPH Receptor B3	Ephb3	Développe le système nerveux	
G Protein Subunit Alpha I2	Gnai2/Gnail	Rôle dans les synapses dopaminergiques	
Ribosomal Protein L37a	Rpl37a	Protéine ribosomale	

5-Hydroxytryptamine Receptor 2A	Htr2a	Composant des récepteurs à la sérotonine	
Nuclear Factor I X	Nfix	Facteur de transcription	
Notch Receptor 1	Notch1	Impliqué dans la différenciation cellulaire au niveau du système nerveux, développement du cerveau antérieur	
SRY-Box Transcription Factor 2	Sox2	Régule le développement embryonnaire et la détermination du destin cellulaire	
SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase	Src	Régule le développement embryonnaire et la croissance cellulaire	
Tyrosine Hydroxylase	Th	Convertit la tyrosine en dopamine	
Androgen Receptor	Ar	Facteur de transcription activé par les hormones stéroïdiennes	
Bromodomain Testis Associated	Brdt	Bromodomaine associé aux testicules (régule la transcription)	
Deleted In Azoospermia 1	Dazl	Lie l'ARN dans les cellules germinales pré et post-natales	
DEAD-Box Helicase 4	Ddx4	Développe des cellules germinales	
Doublesex- And Mab-3-Related Transcription Factor B1	Dmrtb1	Développe les cellules germinales, la différenciation sexuelle	
Estrogen Receptor 1	Esr1	Régule la transcription de nombreux gènes inductibles par les œstrogènes	
HORMA Domain Containing 1	Hormad1	Régule le cycle cellulaire	
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hpet	Production de nucléotides puriques	
Mesoderm Development LRP Chaperone	Mescdc1	Impliqué dans l'ostéogenèse imparfaite de type 20	
Netrin 5	Ntn5	Développe des tissus et des projections neurales, dans la morphogenèse	
Ribosomal Protein L37a	Rpl37a	Protéine ribosomale	
SMAD Family Member 2	Smad2	Médiateur du signal du facteur de croissance transformant (TGF)-bêta et ainsi régule de la prolifération, de l'apoptose et de la différenciation cellulaire.	
SRY-Box Transcription Factor 2	Sox2	Régule le développement embryonnaire et la détermination du destin cellulaire	
SRY-Box Transcription Factor 9	Sox9	Régule la transcription du gène de l'hormone anti-muellerienne (AMH) permettant la formation de l'appareil reproducteur masculin au niveau fœtal	
Serine/Threonine Kinase 31	Stk31	Exprimé spécifiquement dans les testicules	
Tudor Domain Containing 1	Tdrd1	Supprime les éléments transposables au cours de la spermatogenèse	
Bromodomain Testis Associated	Brdt	Bromodomaine associé aux testicules (régule la transcription)	Ovaire

Deleted In Azoospermia 1	Dazl	Lie à l'ARN dans les cellules germinales pré- et post-natales	
DEAD-Box Helicase 4	Ddx4	Développe les cellules germinales	
DNA Meiotic Recombinase 1	Dmc1	Recombinase	
Doublesex- And Mab-3- Related Transcription Factor B1	Dmrtb1	Développe les cellules germinales, la différenciation sexuelle	
DNA Ligase 4	Lig4	ADN ligase	
HORMA Domain Containing 1	Hormad1	Régule le cycle cellulaire	
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hprt	Production de nucléotides puriques	
Meiosis Specific With OB-Fold	Meiob	Système de réparation des cassures doubles brin par recombinaison homologue	
MutL Homolog 1	Mlh1	Système de réparation des mésappariements de l'ADN	
MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease	Mre11a	Système de réparation de la recombinaison homologue	
MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit	Mus81	Endonucléase impliquée dans la réparation de l'ADN	
Nibrin	Nbn	Complexe de réparation des cassures double brin	
Non-Homologous End Joining Factor 1	Nhej1	Facteur de réparation de l'ADN essentiel pour la voie de jonction non homologue	
RAD51 Recombinase	Rad51	Système de réparation de l'ADN	
SMAD Family Member 2	Smad2	Médiateur du signal du facteur de croissance transformant (TGF)-bêta et ainsi régule la prolifération, de l'apoptose et de la différenciation cellulaire.	
SRY-Box Transcription Factor 2	Sox2	Régule le développement embryonnaire et de la détermination du destin cellulaire	
SPO11 Initiator Of Meiotic Double Strand Breaks	Spo11	Recombine la méiose et la ségrégation des chromosomes	
Serine/Threonine Kinase 31	Stk31	Exprimé spécifiquement dans les testicules	
Synaptonemal Complex Central Element Protein 3	Syce3	Recombine la méiotique réciproque, la spermatogenèse et l'assemblage du complexe synaptonémal, régule positivement le processus apoptotique	
Tudor Domain Containing 1	Tdrd1	Supprime les éléments transposables au cours de la spermatogenèse	
X-Ray Repair Cross Complementing 5	Xrcc5	ADN hélicase, répare les cassures doubles brin de l'ADN par jonction non homologue	
X-Ray Repair Cross Complementing 6	Xrcc6	ADN hélicase, répare les cassures doubles brin de l'ADN par jonction non homologue	

Source: GeneCards®: The Human Gene Database, Disponible à l'adresse :

<https://www.genecards.org/>

Bibliographie

Allen Brain Atlas: Mouse Brain Disponible à l'adresse suivante: <https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=181276151#atlas=181276151&plate=100873488&structure=16382&x=5403.9989013671875&y=2572.000012397766&zoom=-2&resolution=7.92&z=6>

AMAR, E., 2017. Malformations et facteurs environnementaux. *Revue de Médecine Périnatale* [en ligne]. 2017. Vol. 9, n° 2, pp. 73-80. [Consulté le 31 mai 2024]. DOI 10.1007/s12611-017-0415-y. Disponible à l'adresse : <https://www.cairn.info/revue-de-medecine-perinatale-2017-2-page-73.htm>

BASSO, Carla Giovana, DE ARAÚJO-RAMOS, Anderson Tadeu et MARTINO-ANDRADE, Anderson Joel, 2022. Exposure to phthalates and female reproductive health: A literature review. *Reproductive Toxicology* [en ligne]. 1 avril 2022. Vol. 109, pp. 61-79. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.1016/j.reprotox.2022.02.006. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623822000260>

BONDY, G. S., CURRAN, I. H. C., COADY, L. C., ARMSTRONG, C., BOURQUE, C., BUGIEL, S., CALDWELL, D., KWONG, K., LEFEBVRE, D. E., MAURICE, C., MARCETTI, F., PANTAZOPOULOS, P. P., ROSS, N. et GANNON, A. M., 2021. A one-generation reproductive toxicity study of the mycotoxin ochratoxin A in Fischer rats. *Food and Chemical Toxicology* [en ligne]. 1 juillet 2021. Vol. 153, pp. 112247. [Consulté le 30 mai 2024]. DOI 10.1016/j.fct.2021.112247. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691521002805>

DING, Lijuan, HAN, Meihua, WANG, Xiangtao et GUO, Yifei, 2023. Ochratoxin A: Overview of Prevention, Removal, and Detoxification Methods. *Toxins* [en ligne]. 8 septembre 2023. Vol. 15, n° 9, pp. 565. [Consulté le 30 mai 2024]. DOI 10.3390/toxins15090565. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10534725/>

DING, Ting, YAN, Wei, ZHOU, Ting, SHEN, Wei, WANG, Tian, LI, Milu, ZHOU, Su, WU, Meng, DAI, Jun, HUANG, Kecheng, ZHANG, Jinjin, CHANG, Jiang et WANG, Shixuan, 2022. Endocrine disrupting chemicals impact on ovarian aging: Evidence from epidemiological and experimental evidence. *Environmental Pollution* [en ligne]. 15 juillet 2022. Vol. 305, pp. 119269. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.1016/j.envpol.2022.119269. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749122004833>

FULLER, Richard, LANDRIGAN, Philip J., BALAKRISHNAN, Kalpana, BATHAN, Glynda, BOSE-O'REILLY, Stephan, BRAUER, Michael, CARAVANOS, Jack, CHILES, Tom, COHEN, Aaron, CORRA, Lilian, CROPPER, Maureen, FERRARO, Greg, HANNA, Jill, HANRAHAN, David, HU, Howard, HUNTER, David, JANATA, Gloria, KUPKA, Rachael, LANPHEAR, Bruce, LICHTVELD, Maureen, MARTIN, Keith, MUSTAPHA, Adetoun, SANCHEZ-TRIANA, Ernesto, SANDILYA, Karti, SCHAEFLI, Laura, SHAW, Joseph, SEDDON, Jessica, SUK, William, TÉLLEZ-ROJO, Martha María et YAN, Chonghuai, 2022. Pollution and health: a progress update. *The Lancet Planetary Health* [en ligne]. 1 juin 2022. Vol. 6, n° 6, pp. e535-e547. [Consulté le 31 mai 2024]. DOI 10.1016/S2542-5196(22)00090-0. Disponible à l'adresse : [https://www.thelancet.com/journals/lanplh/article/PIIS2542-5196\(22\)00090-0/fulltext#seccestitel170](https://www.thelancet.com/journals/lanplh/article/PIIS2542-5196(22)00090-0/fulltext#seccestitel170)

GONG, Miao, SONG, Han, DONG, Yan, HUAI, Ziqing, FU, Yaling, YU, Panpan, HUANG, Boya, YANG, Rui, GUO, Yi, MENG, Qian, GAO, Yuan, SONG, Li, GUO, Qingjun, GAO, Qiang, YIN, Xi, WANG, Sheng, SHI, Yun et SHI, Haishui, 2022. Sex-dependent and long-lasting effects of

bisphenol AF exposure on emotional behaviors in mice. *Physiology & Behavior* [en ligne]. 15 mai 2022. Vol. 249, pp. 113747. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.1016/j.physbeh.2022.113747.
Disponible à l'adresse :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938422000543>

HAIMBAUGH, Alex, WU, Chia-Chen, AKEMANN, Camille, MEYER, Danielle N., CONNELL, Mackenzie, ABDI, Mohammad, KHALAF, Aicha, JOHNSON, Destiny et BAKER, Tracie R., 2022. Multi- and Transgenerational Effects of Developmental Exposure to Environmental Levels of PFAS and PFAS Mixture in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics* [en ligne]. juin 2022. Vol. 10, n° 6, pp. 334. [Consulté le 29 mai 2024]. DOI 10.3390/toxics10060334. Disponible à l'adresse :
<https://www.mdpi.com/2305-6304/10/6/334>

HAMAMOTO, Kota et FUKAYA, Takashi, 2022. Molecular architecture of enhancer–promoter interaction. *Current Opinion in Cell Biology* [en ligne]. 1 février 2022. Vol. 74, pp. 62-70. [Consulté le 31 mai 2024]. DOI 10.1016/j.ceb.2022.01.003. Disponible à l'adresse :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067422000047>

Handbook on the Toxicology of Metals - 4th Edition | Elsevier Shop, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 13 mai 2024]. Disponible à l'adresse : <https://shop.elsevier.com/books/handbook-on-the-toxicology-of-metals/nordberg/978-0-444-59453-2>

KOHLI, Rahul M. et ZHANG, Yi, 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 24 octobre 2013. Vol. 502, n° 7472, pp. 472-479. DOI 10.1038/nature12750.

KUMAR, Sunil et SHARMA, Anupama, 2019. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on Environmental Health*. 18 décembre 2019. Vol. 34, n° 4, pp. 327-338. DOI 10.1515/reveh-2019-0016.

LI, Kan, GAO, Peng, XIANG, Ping, ZHANG, Xuxiang, CUI, Xinyi et MA, Lena Q., 2017. Molecular mechanisms of PFOA-induced toxicity in animals and humans: Implications for health risks. *Environment International* [en ligne]. 1 février 2017. Vol. 99, pp. 43-54. [Consulté le 30 mai 2024]. DOI 10.1016/j.envint.2016.11.014. Disponible à l'adresse :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412016308030>

MALIR, Frantisek, OSTRÝ, Vladimir, PFOHL-LESZKOWICZ, Annie et NOVOTNA, Eva, 2013. Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity—an overview. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*. décembre 2013. Vol. 98, n° 6, pp. 493-502. DOI 10.1002/bdrb.21091.

MARIĆ, Tihana, FUČIĆ, Aleksandra et AGHAYANIAN, Anna, 2021. Environmental and occupational exposures associated with male infertility. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [en ligne]. 1 juin 2021. Vol. 72, n° 2, pp. 101-113. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.2478/aiht-2021-72-3510. Disponible à l'adresse :
<https://sciendo.com/article/10.2478/aiht-2021-72-3510>

MONTJEAN, Debbie, NEYROUD, Anne-Sophie, YEFIMOVA, Marina G., BENKHALIFA, Moncef, CABRY, Rosalie et RAVEL, Célia, 2022. Impact of Endocrine Disruptors upon Non-Genetic Inheritance. *International Journal of Molecular Sciences* [en ligne]. janvier 2022. Vol. 23, n° 6, pp. 3350. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.3390/ijms23063350. Disponible à l'adresse :
<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/6/3350>

MU, Yun, HU, Xiaoyu, YANG, Pingping, SUN, Liran, GU, Wei et ZHANG, Min, 2021. The effects of cadmium on the development of Drosophila and its transgenerational inheritance effects. *Toxicology*. octobre 2021. Vol. 462, pp. 152931. DOI 10.1016/j.tox.2021.152931.

PIEROZAN, Paula, CATTANI, Daiane et KARLSSON, Oskar, 2020. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) induce epigenetic alterations and promote human breast cell carcinogenesis in vitro. *Archives of Toxicology*. novembre 2020. Vol. 94, n° 11, pp. 3893-3906. DOI 10.1007/s00204-020-02848-6.

POTT, Sebastian et LIEB, Jason D., 2015. What are super-enhancers? *Nature Genetics* [en ligne]. janvier 2015. Vol. 47, n° 1, pp. 8-12. [Consulté le 10 mai 2024]. DOI 10.1038/ng.3167. Disponible à l'adresse : <https://www.nature.com/articles/ng.3167>

PREDIERI, Barbara, ALVES, Crésio A. D. et IUGHETTI, Lorenzo, 2022. New insights on the effects of endocrine-disrupting chemicals on children. *Jornal de Pediatria* [en ligne]. 20 avril 2022. Vol. 98, pp. 73-85. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.1016/j.jped.2021.11.003. Disponible à l'adresse : <https://www.scielo.br/j/jped/a/4xTnb3MRjQ6SRgQfqwhthvL/?lang=en>

QU, Jingwen, WANG, Qiang, SUN, Xiaomei et LI, Yongjun, 2022. The environment and female reproduction: Potential mechanism of cadmium poisoning to the growth and development of ovarian follicle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 octobre 2022. Vol. 244, pp. 114029. DOI 10.1016/j.ecoenv.2022.114029.

RASHID, Faizan, RAMAKRISHNAN, Anujaianthi, FIELDS, Christopher et IRUDAYARAJ, Joseph, 2020. Acute PFOA exposure promotes epigenomic alterations in mouse kidney tissues. *Toxicology Reports*. 2020. Vol. 7, pp. 125-132. DOI 10.1016/j.toxrep.2019.12.010.

REBUZZINI, Paola, FABOZZI, Gemma, CIMADOMO, Danilo, UBALDI, Filippo Maria, RIENZI, Laura, ZUCCOTTI, Maurizio et GARAGNA, Silvia, 2022. Multi- and Transgenerational Effects of Environmental Toxicants on Mammalian Reproduction. *Cells* [en ligne]. 9 octobre 2022. Vol. 11, n° 19, pp. 3163. [Consulté le 30 avril 2024]. DOI 10.3390/cells11193163. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9563050/>

SONG, Yue, ZHAO, Jinxin, QIAO, Tian, LI, Lan, SHI, Dachuan, SUN, Yonghong, SHEN, Wei et SUN, Xiaofeng, 2022. Maternal ochratoxin A exposure impairs meiosis progression and primordial follicle formation of F1 offspring. *Food and Chemical Toxicology* [en ligne]. 1 octobre 2022. Vol. 168, pp. 113386. [Consulté le 30 mai 2024]. DOI 10.1016/j.fct.2022.113386. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691522005841>

SUN, Hui, GONG, Ting-Ting, JIANG, Yu-Ting, ZHANG, Shuang, ZHAO, Yu-Hong et WU, Qi-Jun, 2019. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)* [en ligne]. 12 décembre 2019. Vol. 11, n° 23, pp. 10952. [Consulté le 13 mai 2024]. DOI 10.18632/aging.102497. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6932903/>

TIAN, Jingjing, HU, Jia, LIU, Di, YIN, Jian, CHEN, Mingli, ZHOU, Lianqun et YIN, Huancai, 2021. Cadmium chloride-induced transgenerational neurotoxicity in zebrafish development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. janvier 2021. Vol. 81, pp. 103545. DOI 10.1016/j.etap.2020.103545.

WAALKES, Michael P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [en ligne]. 10 décembre 2003. Vol. 533, n° 1,

pp. 107-120. [Consulté le 30 mai 2024]. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510703002112>

WANG, B., LI, Y., SHAO, C., TAN, Y. et CAI, L., 2012. Cadmium and Its Epigenetic Effects. *Current Medicinal Chemistry* [en ligne]. 2012. Vol. 19, n° 16, pp. 2611-2620.
DOI 10.2174/092986712800492913. Disponible à l'adresse :
<http://www.eurekaselect.com/article/42299>

WEN, Yi, MIRJI, Niharika et IRUDAYARAJ, Joseph, 2020. Epigenetic toxicity of PFOA and GenX in HepG2 cells and their role in lipid metabolism. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. juin 2020. Vol. 65, pp. 104797.
DOI 10.1016/j.tiv.2020.104797.

ZHU, Liye, ZHANG, Boyang, DAI, Yaqi, LI, Hongyu et XU, Wentao, 2017. A Review: Epigenetic Mechanism in Ochratoxin A Toxicity Studies. *Toxins* [en ligne]. 23 mars 2017. Vol. 9, n° 4, pp. 113. [Consulté le 26 avril 2024]. DOI 10.3390/toxins9040113. Disponible à l'adresse :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408187/>

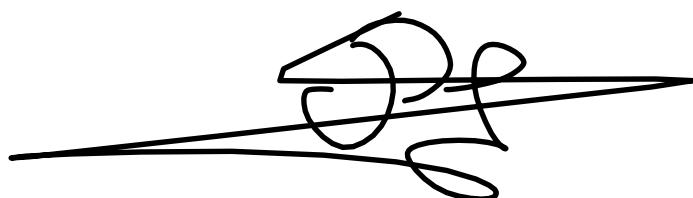
Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e), **Evan Pleininger**,.....

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Nom-Prénom : **Pleininger Evan**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Evan Pleininger". The signature is fluid and includes a stylized 'E' at the beginning.