



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. VINCENT LE FOL

le jeudi 17 décembre 2015

Titre :

APPROCHE IN VIVO / IN VITRO DU METABOLISME DE
PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CHEZ LE POISSON ZEBRE
(DANIO RERIO)

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. DANIEL ZALKO

M. FRANÇOIS BRION

Rapporteurs :

M. ADRIAN COVACI, UNIVERSITE INSTELLING ANTWERPEN

M. JOSE MARIA NAVAS, INIA MADRID

Membre(s) du jury :

M. JEAN-PIERRE CRAVEDI, INRA TOULOUSE, Président

M. CINTA PORTE, CSIC BARCELONE, Membre

M. DANIEL ZALKO, INRA TOULOUSE, Membre

M. FRANÇOIS BRION, INERIS, Membre

Mme ANA SOTO, TUFTS UNIVERSITY, Membre

M. SELIM AIT-AISSA, INERIS, Membre

*« Le petit prince s'assit sur une pierre et leva les yeux vers le ciel:
-Je me demande, dit-il, si les étoiles sont éclairées afin que chacun puisse un jour retrouver la sienne. »*

Le Petit Prince
Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des examinateurs et rapporteurs, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.

Ce travail de thèse a débuté à l'INERIS dans l'unité ECOT pour se poursuivre à l'INRA ToxAlim dans l'équipe MeX. Je remercie Jean-Marc Porcher, responsable de l'unité ECOT, et Daniel Zalko, responsable de l'équipe MeX, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe respective.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Daniel Zalko, pour la direction et l'encadrement de ce travail. Je vous suis profondément reconnaissant pour tous vos conseils précieux et pour toutes les discussions qu'elles aient été scientifiques ou non, au laboratoire et lors de congrès. Merci pour avoir partagé un peu de votre connaissance et de votre expérience ce qui, notamment, m'a permis de mieux apprécier la valeur de mon travail. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos encouragements notamment dans la période particulière qui a été celle de la rédaction du manuscrit. Merci également pour m'avoir transmis à travers ce travail de thèse, des valeurs scientifiques et une vision sur le monde de la recherche. Enfin je tiens à exprimer ma grande satisfaction et gratitude à avoir réalisé ce travail de thèse sous votre direction qui je pense a été caractérisée, certes, par votre professionnalisme, mais aussi par vos qualités humaines et managériales.

Mes remerciements s'adressent également à mes encadrants de l'INERIS, François Brion, codirecteur de ce travail, et Selim Aït-Aïssa. Merci pour l'énergie que vous m'avez transmise dès le début de ce travail. Le temps était en effet déjà compté avant même d'avoir commencé la thèse pour que je puisse me rendre, par la suite, à l'INRA ! Je tiens à vous remercier pour avoir partagé vos compétences notamment sur le poisson zèbre que je découvrais. Merci pour vos conseils et votre soutien. Merci pour avoir répondu à mes doutes et questionnements. Merci aussi pour les discussions enrichissantes qui m'ont été utiles afin de mieux appréhender les contours de ce travail.

Je tiens également à remercier Jean-Pierre Cravedi que j'ai eu l'honneur de côtoyer au cours de ce travail. Merci pour l'ensemble de vos conseils avisés !

J'adresse aussi mes remerciements à Laurent Debrauwer, responsable de la plateforme AXIOM MetaToul, pour toute l'aide apportée et le temps consacré aux analyses de spectrométrie de Masse.

Je remercie également Patrick Balaguer pour avoir participé aux comités de thèse ainsi que pour avoir contribué à ce travail par l'analyse de l'activité œstrogénique de métabolites.

Je tiens également à remercier Marie-Hélène Piquereau, gestionnaire à l'INRA, qui, je le sais, a œuvré administrativement au bon déroulement de ma thèse.

Beaucoup d'autres personnes précieuses m'ont apporté leur aide et leur soutien. Je tiens à remercier chaleureusement Elisabeth Perdu, Anne Hillenweck et Nicolas Cabaton. Un grand merci pour vos conseils, pour l'aide que vous m'avez apportée lors des expérimentations, ainsi que pour avoir été présents lors de mes questionnements techniques (voire plus philosophiques !), mes agacements,

doutes et incompréhensions ! Et vous savez combien ils ont été nombreux ! Je tiens aussi particulièrement à vous remercier pour nos discussions toujours plaisantes et nos échanges amicaux. Je souhaite également adresser mes remerciements à Adeline Cabaton qui a eu la lourde tâche de m'initier aux joies des analyses CLHP à mon arrivée dans l'équipe MeX. Merci pour tes explications, tes conseils et ta patience. Je garde des souvenirs précieux de mes premiers pas en CLHP et colonnes récepteurs... Je remercie Marc Audebert, notamment pour avoir partagé avec les bureaux voisins ses interprétations vocales de chansons cultes ! Laurence Dolo, Sandrine Bruel, Florence Blas-y-Estrada, merci à vous pour l'aide que vous m'avez apportée et pour nos échanges toujours sympathiques ! Je remercie vivement Nathalie Hinfray, Olivier Palluel, Benjamin Piccini, Emmanuelle Maillot-Maréchal et Cyril Turiès. Les premiers temps dans une thèse sont importants et vous m'avez fait découvrir ce monde piscicole qui m'était inconnu et les particularités des cultures cellulaires de poisson. Merci pour avoir partagé avec moi vos compétences ainsi que pour toute votre aide. Je remercie sincèrement chacune des personnes des deux équipes, ECOT pour l'INERIS et MeX pour l'INRA.

J'exprime aussi mes remerciements envers Roselyne Gautier, Marie Tremblay-Franco et Cécile Canlet, d'AXIOM, pour leur aide mais aussi pour tous les bons moments de convivialité ! J'y associe également Nicolas Cabaton car nos déjeuners à l'INRA sont pour moi mémorables ! C'était un moment important de détente qui, il faut bien le dire, était souvent marqué par de nombreux éclats de rire... ! Merci aussi à toutes les personnes qui avaient l'habitude de prendre un café ou un thé dans la salle de pause et qui contribuaient à poursuivre ce moment de détente. Je suis obligé, avec plaisir, de remercier Jean-Philippe Jaeg de l'école vétérinaire pour son humour si singulier !

Nicolas Creusot et Damien Baudiffier, j'ai été ravi d'être votre collègue de bureau à l'INERIS. J'en garde des souvenirs « indélébiles » ! Je vous remercie pour votre aide, vos conseils et votre soutien sans faille ! Nicolas, merci d'avoir eu l'habitude de travailler tard, cela m'a motivé pour en faire autant ! Merci à toi pour avoir pris des nouvelles et m'avoir soutenu même une fois à l'INRA et ensuite à Tours.

Tous mes remerciements vont aussi à mes collègues de bureau de l'INRA, aux collègues d'autres bureaux, aux autres doctorants, et aux derniers arrivés dans l'équipe quand j'étais encore à l'INRA : Laure Khoury, Aurélien Amiel, Marianne Chopard-Lallier, Vanessa Graillet, Clarisse Létondor, Shanu Shameer, Clément Frainay, Benjamin Merlet et Nathalie Poupin. Elodie, nous nous sommes croisés rapidement et je te souhaite un bel avenir dans l'équipe ! Je remercie particulièrement Laure pour m'avoir supporté ! Merci pour ton dynamisme, ta bonne volonté, ta bienveillance, ton écoute, ton soutien et tes encouragements ! Merci pour ton aide avec les poissons quand une baisse de régime se faisait ressentir ! Merci pour avoir pris en charge l'organisation de bons nombres de soirées... ! Merci pour les discussions, les fous rires, les délires... Ah il y en a des petits papiers sur le mur qui font écho à ces bons moments... !

J'exprime aussi mes remerciements à mes enseignants de la faculté de pharmacie et de la faculté des sciences de Nantes qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche et qui m'ont conforté dans mon envie de poursuivre dans cette voie. Un merci particulier à Karina Petit, Delphine Carbonnelle, Agnès Moreau-Aubry, Laurent Lescaudron et François Lang, mon directeur de thèse de pharmacie.

Avant même d'avoir terminé ma thèse et la rédaction du manuscrit, j'ai dû faire un choix professionnel qui m'a éloigné de Toulouse et du monde de la toxicologie, et m'a rapproché d'une nouvelle équipe, celle du Laboratoire d'Ingénierie cellulaire et tissulaire (LICT) de l'Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique (EFS-CA), à Tours. Je tiens à remercier vivement Monsieur

Frédéric Dehaut, directeur général de l'EFS-CA, pour m'avoir proposé de candidater à ce poste. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien à la fois mon travail rédactionnel de thèse et mon travail au sein de votre établissement. J'adresse mes sincères remerciements à Madame Marie Prat-Lepesant, directeur du LICT, pour sa confiance, ses conseils et sa compréhension. Merci pour m'avoir permis de prendre un certain nombre de congés afin de terminer ma thèse, et ce malgré une charge de travail conséquente. Je remercie également tous les membres de l'équipe du LICT pour leur accueil.

Je remercie profondément toutes les personnes (famille, amis, collègues, encadrants...) qui m'ont apporté leur soutien pendant cette période assez difficile.

Mes remerciements vont également à mes ami(e)s de pharmacie : Anne, Coralie, Anna, Aurélie, Jonathan et Altan. Merci pour m'avoir encouragé et soutenu dans mes projets ! Je vous ai fait un peu faux bon pendant cette période de thèse. Le temps me manquait pour tout faire. Je vais maintenant pouvoir répondre présent à vos invitations et vous rendre la pareille !

J'adresse aussi un grand merci à Martine et Guy qui ont suivi mon parcours depuis tout petit ! Merci pour votre soutien et vos encouragements, ainsi que pour tous les moments partagés notamment pendant cette période de thèse.

Pour terminer, j'adresse mes plus profonds remerciements à toute ma famille qui a participé, parfois sans s'en rendre compte, à cette thèse, que ce soit par vos témoignages d'affection, votre soutien et votre aide dans la vie de tous les jours.

...A mon frère et à ma belle sœur, merci pour votre soutien. Il s'en est passé aussi des rebondissements professionnels et de beaux événements pour vous pendant cette période !

...A mes grands parents, merci pour tout ce que vous avez fait ! Je pense particulièrement à mes grand-mères qui auraient aimé me savoir travailler sur une thèse. Je pense aussi à mon grand-père qui a toujours été fier de mon travail et avec qui je ne pourrai partager la fin de cette aventure. Et je remercie chaleureusement mon papi pour son soutien, pour son aide à la maison à Saint Laurent, et pour les bons œufs frais !

...A mes parents, un merci infini pour tout. Vous m'avez toujours encouragé, soutenu, aidé, écouté. Vous m'avez toujours montré le sens de l'effort et du travail, et ce que ces valeurs représentent. Vous m'avez aussi montré que quelques soient les difficultés, elles seront surmontées d'une manière ou d'une autre. Vous m'avez appris à avoir confiance en moi. Je vous suis infiniment reconnaissant pour tout ce que vous m'avez transmis. Merci pour tous vos efforts et je sais combien vous en avez fait notamment pour que tous les à côtés de la thèse soient simples et faciles. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble ; ils sont importants. Merci pour avoir continuellement fait en sorte que tout soit toujours le mieux possible pour moi. Merci. Il faut maintenant prendre soin de vous.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLE DES FIGURES	12
TABLE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION GENERALE	17
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	22
I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	23
I.1. Le système endocrinien.....	23
I.1.1. Nature, organisation et fonctions	23
I.1.2. Les hormones: messagers chimiques du système endocrinien	25
I.1.3. Stéroïdogénèse et biomarqueurs œstrogéniques chez le poisson.....	26
I.1.3.1. La stéroïdogénèse chez le poisson	26
I.1.3.2. Des protéines œstrogéno-régulées, biomarqueurs d'une activité œstrogénique des xénobiotiques chez le poisson zèbre	27
I.1.3.2.1. <i>Les vitellogénines</i>	27
I.1.3.2.2. <i>L'aromatase B</i>	27
I.2. Perturbateurs endocriniens.....	28
I.2.1. Principes généraux	28
I.2.1.1. Définition, nature et origine	28
I.2.1.2. Modes d'action	31
I.2.1.3. Effets faibles doses et relations effet-dose	32
I.2.2. Les xéno-œstrogènes.....	33
I.2.2.1. Effets médiés par les récepteurs des œstrogènes	34
I.2.2.1.1. <i>Les récepteurs nucléaires des œstrogènes</i>	34
I.2.2.1.2. <i>Les récepteurs membranaires des œstrogènes</i>	37
I.2.2.1.3. <i>Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes</i>	38
I.2.2.1.4. <i>Modes d'action des PE impliquant les récepteurs des œstrogènes</i>	38
I.2.2.1.5. <i>Variété des ligands des récepteurs des œstrogènes</i>	40
I.2.2.2. Effets non médiés par les récepteurs des œstrogènes	41
I.2.2.2.1. <i>Perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes</i>	41
I.2.2.2.2. <i>Perturbation du transport des hormones endogènes</i>	41
I.2.2.2.3. <i>Perturbation de la régulation des enzymes de biotransformation des hormones endogènes</i>	42
I.2.2.3. Exemples d'effets biologiques de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes.....	42

II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES.....	45
II.1. Place du métabolisme dans le devenir des xénobiotiques.....	45
II.1.1. Les organes de biotransformation des xénobiotiques	45
II.1.2. Effets de premiers passages	46
II.2. Les enzymes de biotransformation	47
II.2.1. Les enzymes de phase I : réactions de fonctionnalisation.....	48
II.2.1.1. Les cytochromes P450	49
II.2.1.2. Flavine-monooxygénases.....	53
II.2.2. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison	54
II.2.2.1. Les UDP-glucuronyltransférases.....	55
II.2.2.2. Les sulfotransférases.....	57
II.2.2.3. Les N-acétyltransférases	59
II.2.2.4. Les Glutathion-S-transférases	61
II.3. Capacités de biotransformation des xénobiotiques chez les poissons téléostéens	64
II.3.1. Les capacités de biotransformation de phase I	65
II.3.1.1. Les enzymes de phase I chez le poisson zèbre.....	65
<i>II.3.1.1.1. Les monoamines oxydases (MAO).....</i>	<i>65</i>
<i>II.3.1.1.2. Les flavines monoxygénases (FMO).....</i>	<i>65</i>
<i>II.3.1.1.3. Les cytochromes P450 (CYPs)</i>	<i>65</i>
II.3.1.2. Capacités de biotransformation liées aux CYP dans des modèles <i>in vitro</i> issus de poissons et de l'Homme.....	69
II.3.2. Les capacités de biotransformation de phase II.....	71
II.3.2.1. Glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison chez le poisson zèbre.....	71
<i>II.3.2.1.1. Les UGTs.....</i>	<i>71</i>
<i>II.3.2.1.2. Les SULTs</i>	<i>72</i>
II.3.2.2. Capacités de biotransformation liées aux UGTs et aux SULTs dans des modèles <i>in vitro</i> issus de poissons et de l'Homme.	74
II.3.3. Exemples de biotransformation chez le poisson zèbre par les EMX de phase I et II.....	75
II.4. Mécanismes de régulation de l'expression des enzymes de biotransformation.....	78
III.CONTEXTE REGLEMENTAIRE ET OUTILS BIOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	81
III.1. Etude des PE : des modèles intégratifs aux modèles de criblage.....	81
III.2. Cadre et problématique réglementaires relatifs aux perturbateurs endocriniens	83
III.2.1. La question de la définition des perturbateurs endocriniens : un enjeu scientifique et réglementaire ..	84
III.2.2. Le cadre de l'évaluation réglementaire des PE par l'OCDE	87
III.2.3. Les capacités de biotransformation des tests biologiques appliqués aux PE : une priorité scientifique et réglementaire ?.....	88
III.3. Place des modèles issus du poisson zèbre dans l'étude des perturbateurs endocriniens oestrogéniques.....	91

DEMARCHE EXPERIMENTALE ET CHOIX METHODOLOGIQUES	94
I. OBJECTIFS	95
II. DEMARCHE EXPERIMENTALE	96
II.1. Stratégie expérimentale.....	96
II.2. Modèles biologiques	98
II.2.1. Modèles cellulaires.....	98
II.2.1.1. Evaluation du potentiel œstrogénique des PE	98
II.2.1.2. Etude du devenir des PE d'intérêt	99
II.2.2. Modèles animaux.....	100
II.2.2.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE.....	100
II.2.2.2. Etude du devenir des PE d'intérêt.....	101
II.3. Choix des xénobiotiques	102
II.3.1. 17 -œstradiol et éthinyloestradiol	103
II.3.2. Benzophénone 2	103
II.3.3. Bisphénols A, F et S.....	104
II.3.4. Molécules retenues pour les études de biotransformation	106
II.4. Modalités d'exposition des modèles biologiques aux xénobiotiques	107
II.4.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE.....	107
II.4.1.1. Cultures cellulaires.....	107
II.4.1.1.1. Culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre.....	107
II.4.1.1.2. Lignées cellulaires ZELH-zfERs.....	108
II.4.1.2. Larve transgénique <i>cyp19a1b</i> -GFP et larves sauvages de poissons zèbres	109
II.4.1.3. Poisson zèbre adulte.....	109
II.4.2. Etudes de biotransformation	111
II.4.2.1. Cultures cellulaires.....	111
II.4.2.2. Larves sauvages	113
II.4.2.3. Poisson zèbre adulte.....	114
II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité œstrogénique	116
II.5.1. Concentration en vitellogénine dans les milieux de culture et dans le sang.....	116
II.5.2. Activité EROD	118
II.5.3. Taux relatifs de transcrits.....	119
II.5.4. Activité luciférase	120
II.5.5. Induction de l'expression de la GFP	121
II.6. Méthodes d'évaluation de la biotransformation des xénobiotiques.....	122
II.6.1. Synthèse des approches utilisées pour les études de métabolisme	122
II.6.2. Traitement des échantillons liquides et solides en vue de leur profilage métabolique	123
II.6.2.1. Les modèles cellulaires	123
II.6.2.2. Le modèle larve.....	123
II.6.2.3. Le modèle poisson adulte.....	124
II.6.3. Quantification de la radioactivité.....	126
II.6.3.1. Brûlage des échantillons tritiés à l'oxidizer	126
II.6.3.2. Compteur à scintillation liquide.....	127
II.6.4. Profilage métabolique et identification des métabolites	127

II.6.4.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur de radioactivité	127
II.6.4.2. Hydrolyses enzymatiques	129
II.6.4.3. Spectrométrie de masse haute résolution	130
RESULTATS	132
I. EFFETS ŒSTROGENIQUES DE BENZOPHENONES CHEZ LE POISSON ZEBRE	133
I.1. Article 1	133
I.2. Effet œstrogénique de la Benzophénone-2 chez la larve : données complémentaires à l'article 1	156
II. ACTIVITE ŒSTROGENIQUE DES BISPHENOLS A, F ET S CHEZ LE POISSON ZEBRE	158
Article 2	158
III. REPOSE ŒSTROGENIQUE ET EXPRESSION DE L'ACTIVITE CYP1A DANS LES HEPATOCYTES DE POISSON ZEBRE EN CULTURE PRIMAIRE	179
IV. METABOLISME DE LA BP2 ET DU BPS DANS DES MODELES <i>IN VITRO</i> ISSUS DE L'HOMME ET DU POISSON ZEBRE UTILISES DANS L'EVALUATION TOXICOLOGIQUE ET LE CRIBLAGE DES SUBSTANCES A ACTIVITE ŒSTROGENIQUE	185
Article 3	185
V. METABOLISME DE LA BENZOPHENONE-2 ET DU BISPHENOL S CHEZ LE POISSON ZEBRE AUX STADES LARVAIRES ET ADULTES	199
Article 4	199
VI. SYNTHÈSE DES RESULTATS	220
DISCUSSION GENERALE	221
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	237
ANNEXE 1	240
ANNEXE 2	242
BIBLIOGRAPHIE	246

Liste des abréviations

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

ADN : acide désoxyribonucléique

AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

BP2 : benzophénone-2

BPA : bisphénol A

BPF : bisphénol F

BPS : bisphénol S

CLHP : chromatographie liquide haute performance

cpm : coup par minute

CYP : cytochrome P450

dpf : (*day post fertilization*) jour après fécondation

dpm : désintégration par minute

E2 : 17 -œstradiol

EC50 : concentration efficace médiane

EE2 : éthinyléstradiol

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMX : enzymes du métabolisme des xénobiotiques

ER : récepteur des œstrogènes

ERE : *estrogen responsive elements* ou élément de réponse des œstrogènes

EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase

GFP : *Green Fluorescent Protein*

hpf : *hour post fertilization* ou heure après fécondation

HepaRG : lignée cellulaire hépatique humaine, bipotente

HepG2 : lignée cellulaire hépatique humaine

MELN : lignée cellulaire humaine (MCF-7) transfectées (ERE-Luc) issue des glandes mammaires

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : (*Polymerase Chain Reaction*) réaction en chaîne par polymérase

PE : perturbateurs endocriniens

PZFH : culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (*primary culture of zebrafish hepatocytes*)

RN : récepteurs nucléaires

SMHR : spectrométrie de masse haute résolution

SULT : sulfotransférases

T47D-KBLuc : lignée cellulaire humaine (T47D) transfectée (ERE-Luc) issue des glandes mammaires

UE : Union Européenne

UGT : Glucuronyltransférase

Vtg : vitellogénine

ZELH-zfERs : lignées cellulaires hépatiques du poisson zèbre (ZFL) doublement transfectées (zfER , zfER 1 ou zfER 2 + ERE-Luc)

ZFL : lignée cellulaire hépatique du poisson zèbre

Table des figures

Figure 1. Organisation du système endocrinien chez le poisson zèbre.	24
Figure 2. La stéroïdogénèse gonadique chez le poisson adulte	26
Figure 3. Modes d'action des PE sur la dynamique hormonale	32
Figure 4. Effets monotones et non-monotones.	33
Figure 5. Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires	35
Figure 6. Homologie de séquences (%) de la totalité de la région codante des récepteurs des œstrogènes (régions A/B, C, D, E, F).....	37
Figure 7. Altération par des PE de la synthèse, du devenir et de l'action du 17 -œstradiol sur une cellule cible.....	39
Figure 8. Effets de premiers passages après absorption par voie digestive, pulmonaire ou branchiale d'un xénobiotique chez l'Homme et le poisson zèbre.....	47
Figure 9. Biotransformations d'un xénobiotique dans un hépatocyte.	48
Figure 10. Exemple de la prise en charge d'un substrat endogène par un cytochrome P450.....	49
Figure 11. Structure 3D d'un cytochrome P450 et du noyau porphyrrique.....	50
Figure 12. Localisation cellulaire et couplage aux protéines de transfert d'électrons des cytochromes P450 réductases	50
Figure 13. Cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase.....	51
Figure 14. Exemples de réactions chimiques catalysées par les CYPs	52
Figure 15. Exemples de bioactivation métabolique par des CYPs.....	52
Figure 16. Mécanisme général d'oxydation d'un substrat (X) par les FMO.....	53
Figure 17. Réaction de conjugaison d'un substrat nucléophile avec l'UDPGA par l'UGT	55
Figure 18. Fonctionnement général et localisation des UDP-glucuronyltransférases	55
Figure 19. Formation de métabolites glucuronoconjugués réactifs. A. Cas d'acyl glucuronides. B. Cas de l'ion nitrenium issu de la 2-naphthylamine.	57
Figure 20. Formation du PAPS et réaction de sulfoconjugaison.....	58
Figure 21. Voies de bioactivation et de détoxication du tamoxifène.....	59
Figure 22. Réaction de <i>N</i> -acétylation des arylamines par les <i>N</i> -acétyltransférases.....	60
Figure 23. Etape de bioactivation de la benzidine par <i>N</i> -acétylation	61
Figure 24. Réaction de conjugaison du glutathion	61
Figure 25. Activation métabolique de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde et détoxication par hydrolyse et conjugaison au glutathion.....	63
Figure 26. Voies de bioactivation du 1,2-dibromoéthane par les CYP et la GST	64

Figure 27. Principe de la régulation de l'expression des EMX de phase I et II et des protéines d'efflux (phase III) par l'interaction des xénobiotiques avec les récepteurs nucléaires.....	78
Figure 28. Paradigme des analyses en toxicologie	82
Figure 29. Démarche expérimentale générale	97
Figure 30. Principe de la mesure du potentiel œstrogénique d'un xénobiotique dans les modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre doublement transfecté, par l'émission de lumière suite à l'activation des ER.	99
Figure 31. Expression de la GFP dans les cellules gliales radiaires du modèle de larve transgénique <i>cyp19a1b</i> -GFP (EASZY assasy).....	101
Figure 32. Formule chimique développée des molécules utilisées.....	102
Figure 34. Exposition des cellules ZELH-zfERs en vue de la mesure de l'activité luciférase.....	108
Figure 33. Exposition d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire en vue du dosage de la vitellogénine et de la mesure de l'activité EROD	108
Figure 35. Exposition des larves <i>cyp19a1b</i> -GFP et larves sauvages en vue de mesures de fluorescence et d'analyses d'expression de transcrits	109
Figure 36. Exposition de poissons zèbres adultes mâles en vue du dosage de la vitellogénine	110
Figure 37. Exposition des hépatocytes de poisson zèbre mâle en culture primaire pour l'étude du devenir des xénobiotiques	112
Figure 38. Exposition des lignées cellulaires humaines et des lignées de poisson zèbre pour l'étude du devenir des xénobiotiques	112
Figure 39. Exposition des larves pour l'étude du devenir des xénobiotiques.....	114
Figure 40. Exposition des poissons zèbres adultes pour l'étude du devenir des xénobiotiques.....	116
Figure 41. Principe du dosage ELISA compétitif et indirect de la vitellogénine du poisson zèbre ...	117
Figure 42. Dosage ELISA du standard de vitellogénine (zf-Vtg)	118
Figure 43. Courbe dose-réponse de l'activité luciférase du 17 α -œstradiol (E2) et de la benzophénone-2 (BP2) dans les cellules ZELH-zfER	121
Figure 44. Tête d'une larve en vue dorsale exprimant la GFP	121
Figure 45. Vue d'ensemble des étapes mises en œuvre pour l'analyse de la biotransformation de la ³ H-BP2 et du ³ H-BPS dans les différents modèles <i>in vitro</i> et utilisés au cours de ce travail.....	122
Figure 46. Broyeur vibrant (MM400, Retsch) et les pôts à billes dans lesquels sont placés les échantillons à broyer	125
Figure 47. Gradients analytiques développés pour les analyses respectives de la BP2 et du BPS.....	129
Figure 48. Effet de la BP2 sur l'expression des transcrits des gènes <i>vtg1</i> et <i>vtg2</i> chez la larve	156
Figure 49. Effet de la BP2 sur l'expression du gène <i>cyp19a1b</i> chez la larve.....	157
Figure 50. Evolution de la culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre au cours du temps	180
Figure 51. Réponse œstrogénique des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire après une exposition à l'E2.....	181

Figure 52. Effet de la BP2 (A) et du BPF (B) sur la production de vitellogénine par les hépatocytes de poissons zèbres en culture primaire.....	182
Figure 53. Fonctionnalité du crosstalk AhR/ER dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire	183
Figure 54. Activité EROD des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire.....	184

Table des tableaux

Tableau 1. Exemples d'effets biologiques de perturbateurs endocriniens sur des animaux sauvages, des animaux de laboratoire et sur l'Homme.....	29
Tableau 2. Exemples de familles chimiques et de sources de perturbateurs endocriniens.....	30
Tableau 3. Place des récepteurs nucléaires des œstrogènes dans la classification phylogénétique des RNs.....	35
Tableau 4. Classification des RNs basée sur la nature des ligands	36
Tableau 5. Exemples de ligands endogènes et environnementaux des récepteurs des œstrogènes chez les vertébrés.....	40
Tableau 6. Exemples de PE modifiant la stéroïdogenèse chez les mammifères et les poissons téléostéens	41
Tableau 7. Exemples d'effets biologiques de xéno-œstrogènes.....	43
Tableau 8. Familles et fonctions des EMX de phase I	48
Tableau 9. Exemples de substrats des FMO.....	54
Tableau 10. Principales familles des EMX de phase II.....	54
Tableau 11. Caractérisation des activités catalytiques d'enzymes de phase I chez le poisson	68
Tableau 12. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux CYPs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson.....	70
Tableau 13. Taux d'expression des gènes UGTs (ARNm) dans différents tissus issus du poisson zèbre adulte âgé de 6 mois	72
Tableau 14. Exemples de substrats endogènes et exogènes des SULTs du poisson zèbre	73
Tableau 15. Taux d'ARNm des SULTs selon le stade de développement du poisson zèbre.....	74
Tableau 16. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux UGTs et SULTs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson.....	75
Tableau 17. Exemples d'interactions ligand/ récepteur et de leurs effets sur l'expression des enzymes de phase I et II, et des transporteurs, chez l'Homme.....	79
Tableau 18. Exemples de substrats (inducteurs ou répresseurs) des EMX de phase I et II chez les mammifères et le poisson	80
Tableau 19. Avantages et inconvénients des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> dans les analyses toxicologiques	82
Tableau 20. Lignes directrices des tests spécialement développés ou actualisés pour l'identification ou l'évaluation de propriétés endocriniennes de substances chimiques.....	87
Tableau 21. Tests non validés actuellement en cours d'étude pour l'identification des perturbateurs endocriniens.....	88

Tableau 22. Liste non exhaustive de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle biologique destiné à l'étude des perturbations du système endocrinien	91
Tableau 23. Bioessais <i>in vitro</i> basés sur l'expression de gènes naturels ou transfectés pour l'étude des propriétés œstrogéniques des produits chimiques	93
Tableau 24. Modèles cellulaires et animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique de PE et leur devenir	101
Tableau 25. Caractéristiques des molécules utilisées au cours des expositions des modèles biologiques	102
Tableau 26. Caractéristiques des gènes cibles et du gène de référence.....	119
Tableau 27. Ensemble des paramètres des expérimentations menées dans les modèles biologiques <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de poisson zèbre et d'Homme pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques et de leur biotransformation	131
Tableau 28. Bilan des réponses œstrogéniques obtenues après exposition des différents modèles du poisson zèbre à la benzophénone-2 (BP2) et aux bisphénols (BPA, BPS et BPF)	220
Tableau 29. Bilan des biotransformations de la BP2 et du BPS dans les modèles poissons zèbres et humains	220

Introduction générale

Les activités anthropiques conduisent à l'émission dans l'environnement de composés chimiques dont la diversité et la quantité ne cessent d'augmenter. Un nombre croissant de ces composés est identifié comme étant des perturbateurs endocriniens (PE). L'OMS a défini en 2002 un perturbateur endocrinien potentiel comme étant « une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)- populations » (OMS 2002). Ces PE ont également été définis d'après la variété de leurs mécanismes d'action comme étant des composés exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones endogènes responsables du maintien de l'homéostasie et des processus de régulation du développement (Kavlock et al. 1996). Les PE regroupent des substances aux structures chimiques variées appartenant à de très nombreuses classes chimiques dont les stéroïdes de synthèse, les phyto- et myco-œstrogènes, les alkylphénols, les bisphénols, les phtalates, les polybromodiphényléthers (PBDE), des pesticides, des dioxines et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH).

De part leur processus de fabrication et leurs utilisations ces substances sont largement retrouvées dans l'environnement aquatique et peuvent ainsi affecter l'ensemble des chaînes trophiques. De nombreuses espèces animales et en particulier les espèces aquatiques, exposés à des PE, ont développé des pathologies et des altérations telles que des perturbations du développement et de la reproduction (Colborn et al. 1993; Ankley et al. 2009). Chez l'Homme, des études épidémiologiques confortées par des études menées chez les mammifères mettent en avant des données inquiétantes quant aux effets possibles de l'exposition aux PE (Vandenberg et al. 2012). Les préoccupations sanitaires et environnementales qui en découlent concernent notamment des PE œstrogéno-mimétiques qui agissent en mimant l'action d'hormones œstrogéniques endogènes.

Afin de mesurer les dangers que représentent ces PE pour l'Homme et l'environnement, le développement de nouveaux outils biologiques s'est avéré nécessaire. Ce besoin a été renforcé par l'évolution de la réglementation relative aux produits chimiques avec la mise en place, en 2007, de la réglementation REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques). Le défi a donc consisté à développer de nouveaux tests biologiques permettant de détecter les PE et de caractériser leur(s) activité(s) biologique(s). Ce développement s'est également inscrit dans un contexte favorisant la mise en œuvre de méthodes alternatives à celles employant un grand nombre d'animaux (règles des 3R : réduire, remplacer, raffiner). Ces efforts ont conduit à l'évaluation et à la validation par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) de certains de ces tests *in vitro* ou *in vivo* à court terme. Toutefois, alors que certaines lacunes ont été identifiées, des développements complémentaires se doivent d'être entrepris afin d'améliorer notre capacité à mieux cerner et maîtriser les dangers représentés par les PE. Celles-ci concernent en particulier les points suivants:

(1) Spécificité des modèles cellulaires pour la mesure des effets œstrogéniques des PE.

Plusieurs modèles *in vitro* mammaliens en particulier basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs ont été développés. Toutefois, des différences d'affinité de liaison pour des PE entre des récepteurs des œstrogènes humains et de poisson ont été mises en évidence. De fait, l'espèce d'origine, le type cellulaire, le type de récepteur nucléaire et la machinerie moléculaire d'une cellule sont autant de facteurs pouvant moduler la réponse biologique d'un PE (Matthews et al. 2000; Milnes et al. 2008). Des efforts sont ainsi menés afin de mettre à jour les différences d'effets œstrogéniques mesurées de PE entre des modèles *in vitro* issus d'espèces différentes, comme par exemple l'Homme et le poisson. Le développement de modèles cellulaires spécifiquement issus du poisson apparaît dès lors comme pouvant permettre de mieux appréhender les spécificités de ces modèles cellulaires afin d'améliorer l'efficacité et la fiabilité de l'évaluation des activités biologiques des PE parmi les espèces aquatiques.

(2) Des modèles *in vivo* issus du poisson peu adaptés au criblage des PE.

In vivo, deux principaux tests ont été développés chez le poisson. Il s'agit du test de 21 jours (OCDE TG230) et du test du développement sexuel (OCDE TG234). Ces tests sont longs, nécessitent un nombre assez important d'animaux et sont relativement coûteux. Ils sont basés sur la mesure de paramètres révélant une activité œstrogénique comme la concentration plasmatique en vitellogénine ainsi que sur l'analyse histopathologique des gonades. Ces bioessais *in vivo* ne sont que peu adaptés et adaptables au criblage de l'activité d'un nombre important de PE. Pour cette raison, il s'avère nécessaire de développer des tests poissons alternatifs, moins coûteux et plus rapides, notamment au stade embryo-larvaire, et basés sur une mise en évidence simple, efficace et sensible de gènes œstrogéno-régulés. L'utilisation de la transgénèse chez le poisson est l'une des techniques pouvant permettre d'atteindre cet objectif.

(3) Absence de stratégie combinant des tests *in vitro* et *in vivo* court terme

Les méthodes actuelles d'évaluation des PE ne proposent pas de stratégies combinant des tests *in vitro* et *in vivo* à court terme et à partir d'une même espèce. Or, une telle approche basée sur des modèles reflétant différents niveaux de complexité biologique permettrait d'améliorer la fiabilité de l'évaluation de l'activité des PE pour faciliter l'extrapolation des données d'un contexte *in vitro* à un contexte *in vivo*.

(4) Des capacités de biotransformation des modèles biologiques insuffisamment prises en compte pour la mesure des effets des PE.

Bien que pouvant influencer la réponse biologique aux PE, les capacités de biotransformation (métabolisme) des modèles biologiques ne sont que très peu souvent prises en compte. Les processus de détoxification et de bioactivation déterminent en grande partie la fraction de molécules actives atteignant leur(s) cible(s) moléculaire(s). Or l'expression aussi bien qualitative que quantitative des systèmes enzymatiques impliqués dans la biotransformation des composés chimiques diffère selon les niveaux de complexité des modèles biologiques (organisme entier, explants d'organes, culture primaire, lignée cellulaire, stades de développement). Même s'il est bien identifié que la

caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés dans l'objectif d'évaluer l'activité des PE est indispensable pour pouvoir interpréter les réponses biologiques observées (Jacobs et al. 2013), les études prenant en compte la biotransformation des composés testés sont rares.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un modèle biologique qui rassemble les caractéristiques nécessaires afin de répondre aux besoins de développement de tests de criblage *in vitro* et *in vivo* à court terme, rapides et peu coûteux. Le poisson zèbre est un vertébré appartenant à la famille des cyprinidés ayant pour habitat originel les eaux douces et chaudes d'Asie. Ce poisson présente de nombreux avantages : son génome est entièrement séquencé, son coût d'élevage est assez faible par rapport à celui des rongeurs et son élevage est assez facile. Ses autres avantages sont un cycle de vie assez court associé à une maturité sexuelle rapide (75-100 jours), une reproduction continue en laboratoire et un nombre élevé d'œufs par ponte, ainsi qu'un développement embryonnaire externe et facilement observable en raison de la transparence du chorion. Ces avantages ont permis à ce poisson de devenir dans un premier temps un modèle de référence en toxicologie environnementale et en biologie du développement, et par la suite un modèle de plus en plus étudié et utilisé dans le domaine biomédical.

Le poisson zèbre est un modèle très largement utilisé dans l'évaluation de l'activité des PE et dans l'étude de leurs mécanismes d'action (Segner 2009). Afin de caractériser le potentiel œstrogénique de composés chimiques dans une démarche globale intégrant des modèles *in vitro* et *in vivo*, plusieurs modèles expérimentaux de poisson zèbre ont été développés à l'INERIS. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL (ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012) ainsi que de tests *in vivo* basés sur l'expression d'un rapporteur fluorescent, la Green Fluorescent Protein (GFP), qui est sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* régulé par les œstrogènes dans le cerveau (EASZY assay : detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic *cyp19a1b*-GFP Zebrafish embryos) (Brion et al. 2012). Enfin, le poisson zèbre adulte est également utilisé comme modèle permettant la caractérisation de PE œstrogénique par une méthode plus classiquement utilisée, à savoir la détermination de la concentration plasmatique en vitellogénine. Toutefois, pour utiliser ces modèles dans une démarche intégrée, la prise en compte du métabolisme des xénobiotiques dans ces différents systèmes d'essai est nécessaire. En effet, le devenir des PE dans les modèles étudiés peut influencer la réponse biologique observée. C'est pourquoi la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques, qui permet de s'intéresser aux processus de bioactivation et de détoxification, est un des paramètres clés à considérer dans l'évaluation des effets biologiques des xénobiotiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche de caractérisation des modèles biologiques tant sur leur capacité à rendre compte d'un effet œstrogénique que sur leur capacité de biotransformation des xénobiotiques. Plus précisément ce travail a consisté, d'une part, en l'étude du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux émergents à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre et, d'autre part, en l'étude du métabolisme de ces contaminants dans les différents systèmes d'essai *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre, complétée par une étude de métabolisme comparée avec des modèles cellulaires d'origine humaine.

Les objectifs principaux étant :

- (1) l'amélioration de la caractérisation des modèles du poisson zèbre à rendre compte d'une activité œstrogénique de contaminants environnementaux et alimentaires
- (2) la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles de poisson zèbre utilisés en toxicologie
- (3) la compréhension et l'interprétation des réponses biologiques observées dans ces modèles
- (4) l'évaluation de leur intérêt en termes de changement d'échelle

La présentation de ces travaux s'organise dans ce manuscrit en quatre grandes parties :

- Une première partie bibliographique permet de développer les différentes thématiques au carrefour desquelles s'inscrit ce travail de thèse. Après s'être intéressé aux perturbateurs endocriniens et à leurs modes d'action, un état des lieux non exhaustif des capacités métaboliques connues chez le poisson zèbre est présenté. La question scientifique et réglementaire de la place des modèles œstrogéniques du poisson zèbre et celle de l'évaluation des capacités de biotransformation en toxicologie endocrinienne sont ensuite développées.
- Une seconde partie présente la démarche expérimentale mise en œuvre avec une description des choix méthodologiques permettant d'atteindre les objectifs fixés.
- La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats, et ceci majoritairement sous forme d'articles
- Enfin une dernière partie a pour objectif de discuter l'ensemble des données obtenues dans le cadre de ce travail en les replaçant dans la problématique générale de la thèse pour mettre en perspective l'ensemble des travaux réalisés, et pour identifier les points qui pourraient faire l'objet de travaux complémentaires dans la suite de ce travail.

Synthèse bibliographique

I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Afin de mieux appréhender les conséquences de l'exposition des organismes à des perturbateurs endocriniens, il convient dans un premier temps de présenter brièvement le système endocrinien en focalisant notre attention sur les particularités relatives aux poissons.

I.1. Le système endocrinien

Avec le système nerveux et le système immunitaire, le système endocrinien est l'un des systèmes majeurs d'intégration des informations et de régulation de l'organisme. Le système endocrinien est composé de glandes endocrines et de cellules endocrines présentes dans différents organes. Les hormones produites par le système endocrinien jouent un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie en participant à la régulation des grandes fonctions de l'organisme.

I.1.1. Nature, organisation et fonctions

Le système endocrinien est impliqué dans le maintien de l'homéostasie à l'échelle de l'organisme en contrôlant et en régulant diverses fonctions, comme par exemple le comportement, la nutrition, la reproduction, la croissance, le métabolisme énergétique, le métabolisme phosphocalcique ou encore l'équilibre hydro-électrique.

Le système endocrinien du poisson téléostéen présente quelques différences avec celui des mammifères. Les glandes endocrines du poisson sont l'hypophyse, la thyroïde, la glande pinéale, les îlots pancréatiques, le corpuscule de Stannieux, l'urophyse, la glande interrénale, l'ovaire et le testicule. Des cellules endocrines sont également retrouvées dans le foie et l'estomac (Figure 1).

Les poissons ne possèdent pas de glandes parathyroïdes ni de glandes surrénales. Toutefois, la glande interrénale du poisson est l'équivalent de la corticosurrénale des mammifères (Hsu et al. 2003). Par ailleurs, chez le poisson téléostéen, un ensemble de neurones situé à l'extrémité caudale de la moelle épinière, projette leurs axones dans un organe richement vascularisé appelé urophyse. L'urophyse sécrète des urotensines (I et II) impliquées dans l'osmorégulation et dans la vasoactivation de

différents organes (intestins, vésicule biliaire, oviducte). Actuellement, des hormones proches de l'urotensine II des poissons, les urotensin II-related peptides (URP), mises en évidence également chez de nombreux mammifères, sont impliquées dans différents effets biologiques dont la régulation des sécrétions hormonales (Vaudry et al. 2010). Les poissons téléostéens possèdent également une glande endocrine appelée le corpuscule de Stannieux, située généralement sur la face ventrale des reins. Cette glande produit une hormone glyco-protéique appelée la stannioalcine, impliquée dans la régulation phosphocalcique. L'expression de transcrits de deux stannioalcines (STC1 et STC2) a également été mise en évidence dans différents organes chez les mammifères (Yeung et al. 2012). Enfin, le corps ultimobranchial, situé entre le plancher de l'œsophage et le sinus veineux du cœur des poissons téléostéens, renferme des cellules productrices de calcitonine participant également à l'homéostasie phosphocalcique (Pang 1971).

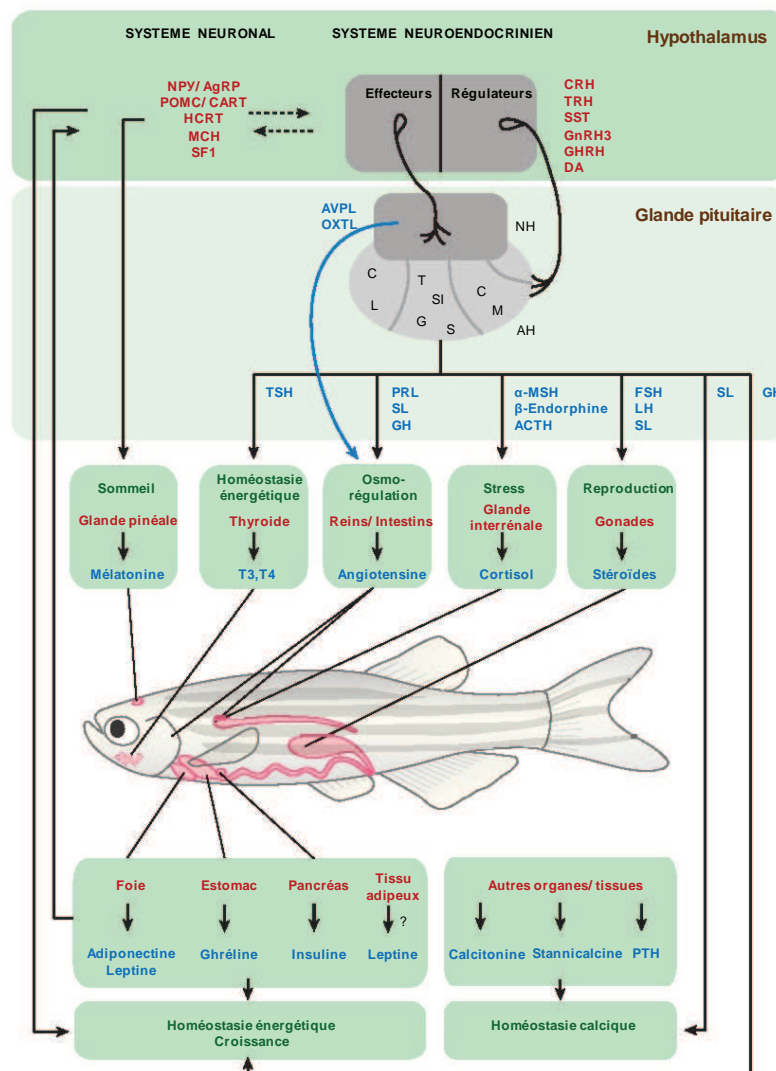


Figure 1. Organisation du système endocrinien chez le poisson zèbre.

ACTH :adrénocorticotrophine, **AgRP** : agouti-related peptide, **AH** : adénohypophyse, **AVPL** : arginine vasopressin like, **CART** : cocaine- and amphetamine-regulated transcript, **CRH** : corticotropin releasing

hormone ou corticolibérine, **DA** : dopamine, **FSH** : Follicle Stimulating Hormone ou hormone folliculo-stimulant, **GH** : growth hormone ou hormone de croissance, **GnRH** : gonadotropin-releasing hormone ou gonadolibérine, **GnRH3** : gonadotropin-releasing hormone 3, **HCRT** : hypocretine, **LH** : luteinizing hormone ou hormone lutéinisante, **MCH** : melanin-concentrating hormone, **α MSH** : α melanocyte-stimulating hormone, **NH** : neurohypophyse, **NPY** : neuropeptide Y, **OXTL** : oxytocin like, **POMC** : pro-opiomélanocortine, **PRL** : prolactine, **PTH** : parathyroïd hormone ou hormone parathyroïdienne, **SF1** : Steroidogenic factor-1, **SL** : somatolactin, **SST** : somatostatine, **TRH** : thyrotropin-releasing hormone ou hormone thyroïdienne, **TSH** : thyroïdostimuline, **T3** : triiodothyronine, **T4** : thyroxine. D'après (Lohr et Hammerschmidt 2011)

I.1.2. Les hormones: messagers chimiques du système endocrinien

La nature chimique des hormones est variée. Certaines hormones sont des composés plutôt hydrosolubles, comme les amines biogènes (catécholamines, tyrosine) et les hormones peptidiques (hormone thyroïdienne). D'autres sont davantage liposolubles. C'est le cas des hormones stéroïdes qui dérivent du cholestérol (œstradiol, progestérone, testostérone, cortisol...), des hormones dérivant de lipides (acide linoléique) et de phospholipides (acide arachidonique) telles que les eicosanoïdes dont les prostaglandines, les leucotriènes ou encore les thromboxanes. Les hormones peuvent agir sur des cellules à distance (après un transport sanguin), sur des cellules voisines (mode d'action paracrine) ou bien sur elles-mêmes (mode d'action autocrine).

La fraction d'hormones circulant sous forme libre est très faible. Les hormones sont transportées par des protéines de transport non spécifiques comme l'albumine, ou spécifiques comme la Sex Binding Globulin (SBG) pour la testostérone, la Cortisone Binding Globulin (CBG) pour le cortisol ou la Thyroid Binding Globulin (TBG) pour la thyroxine.

L'action des hormones sur une cellule cible est déterminée par la présence d'un récepteur spécifique. Certains récepteurs sont localisés dans la cellule cible (récepteur intracellulaire) comme pour les récepteurs d'hormones liposolubles telles que les hormones stéroïdes et thyroïdiennes. En revanche, les récepteurs d'hormones peptidiques et des catécholamines sont situés dans la membrane plasmique de la cellule cible (récepteur membranaire). Une fois fixées à leur récepteur, les hormones entraînent une cascade de réactions intracellulaires conduisant à des modifications de l'activité cellulaire. Les réponses cellulaires peuvent se traduire par exemple par une modification de la perméabilité ou du potentiel de repos de la membrane plasmique, de la synthèse de protéines et d'enzymes, le déclenchement d'une activité sécrétrice ou encore l'activation de la division cellulaire.

I.1.3. Stéroïdogénèse et biomarqueurs œstrogéniques chez le poisson

Afin de mieux comprendre l'intérêt du développement de modèles biologiques ichthyens dont l'objectif est d'évaluer l'activité œstrogénique des perturbateurs endocriniens, certaines particularités de gènes œstrogéno-régulés chez le poisson nécessitent d'être explicitées.

I.1.3.1. La stéroïdogénèse chez le poisson

La stéroïdogénèse est un processus impliquant de nombreuses voies biochimiques permettant la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol. On répertorie chez les vertébrés, parmi les hormones stéroïdes, les stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes et progestagènes) et les corticoïdes tels que les glucocorticoïdes (cortisol) et les minéralocorticoïdes (aldostérone). Chez le poisson téléostéen, les principales hormones œstrogéniques sont l'estrone (E1) et le 17-œstradiol (E2), et les principales hormones androgéniques sont la testostérone et la 11-kétotestostérone (Figure 2). Les principales enzymes mises en jeu dans la stéroïdogénèse sont des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) (Figure 2). Chaque enzyme impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdiennes représente une cible potentielle pour les PE, en plus de la possibilité pour ces PE d'être eux-mêmes des molécules biologiquement actives.

Chez les poissons la stéroïdogénèse se déroule principalement dans les gonades (Figure 2) mais aussi dans le cerveau et les glandes inter-rénales. Les hormones stéroïdiennes sexuelles jouent un rôle majeur dans la régulation de la reproduction (gamétogenèse, caractères sexuels secondaires, comportement ...) mais aussi dans l'homéostasie osseuse et cardio-vasculaire.

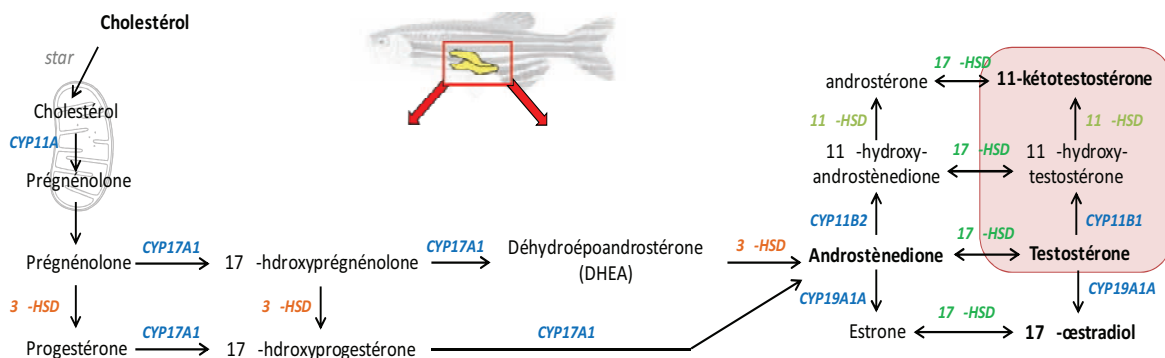


Figure 2. La stéroïdogénèse gonadique chez le poisson adulte

CYP : cytochrome P450, HSD = hydroxystéroïdes déshydrogénase. Cadre orange : Réactions spécifiques au poisson. D'après (Beaudiffier 2012; Villeneuve et al. 2007)

I.1.3.2. Des protéines œstrogéno-régulées, biomarqueurs d'une activité œstrogénique des xénobiotiques chez le poisson zèbre

I.1.3.2.1. Les vitellogénines

Chez les vertébrés ovipares, dont les poissons, l'embryon et la larve puisent pendant leurs premiers jours leur nourriture depuis le sac vitellin. Ce sac est composé de nutriments issus de protéines dont les précurseurs sont des phospholipoprotéines : les vitellogénines (Vtg) (Wang et al. 2005). Les Vtg sont codés par plusieurs gènes (*vgt*) et produites chez la femelle par les cellules hépatiques sous le contrôle hormonal de l'œstradiol (E2). L'expression des Vtg dépend du tissu, du sexe et du stade de développement. La synthèse des Vtg est un processus physiologique normal chez la femelle. Chez le mâle, une très faible quantité de Vtg est synthétisée. Toutefois, cette production de Vtg peut être induite chez le mâle de manière non physiologique sous l'effet de composés dotés de propriétés œstrogéniques. L'interaction de composés exogènes avec les récepteurs des œstrogènes peut par conséquent conduire à l'induction de la production de Vtg chez le mâle. De ce fait, la Vtg constitue un biomarqueur d'effet œstrogénique de composés exogènes pour certains modèles biologiques aquatiques, notamment des poissons (Segner 2009).

I.1.3.2.2. L'aromatase B

Les aromatasés (CYP19) sont les enzymes limitantes de la conversion des androgènes en œstrogènes. Chez l'Homme, il existe un gène de l'aromatase qui s'exprime dans de nombreux tissus tels que les ovaires, les testicules, les glandes surrénales et le placenta mais aussi le muscle, le foie, le cœur, le tissu adipeux et le cerveau. La régulation du gène de l'aromatase est tissu-spécifique, impliquant des épissages alternatifs (Simpson 2004). Contrairement à l'Homme, deux formes d'aromatases ont été identifiées chez la majorité des téléostéens et notamment le poisson zèbre. Il s'agit de deux protéines structurellement différentes dénommées P450 aromatasé A et P450 aromatasé B codées par deux gènes distincts : le gène *cyp19a1a* code pour l'aromatase A qui est principalement exprimée dans les gonades, et le gène *cyp19a1b* code pour l'aromatase B principalement exprimée dans le cerveau (Tchoudakova et Callard 1998). Au niveau cérébral, l'aromatase B est fortement exprimée dans les cellules gliales radiaires, qui sont des cellules progénitrices de neurones, jouant ainsi un rôle clef dans la neurogenèse durant toute la vie des poissons, y compris au stade adulte. De telles cellules sont retrouvées dans le cerveau au stade embryonnaire chez les autres vertébrés, mais disparaissent progressivement à la naissance pour laisser place à des astrocytes (Pinto et Gotz 2007; Kriegstein et Alvarez-Buylla 2009; Malatesta et Gotz 2013). Chez les rongeurs, l'expression et l'activité de l'aromatase au niveau cérébral est maximale durant le développement embryonnaire, puis diminue chez l'adulte (George et Ojeda 1982; Lephart et al. 1992). Cette activité est probablement liée à la période de différenciation sexuelle du cerveau basée sur l'aromatation de l'œstradiol en testostérone.

Chez le poisson zèbre et d'autres espèces de téléostéens, l'activité et l'expression de l'aromatase B débute très tôt pendant la période embryonnaire et augmente durant le développement pour atteindre une expression et une activité très forte à l'âge adulte (Hinfray et al. 2006; Vosges et al. 2010). Chez les espèces présentant des cycles reproducteurs bien définis, des pics d'activités durant la période de maturation sexuelle coïncidant avec des taux circulants élevés d'hormones stéroïdiennes sexuelles sont observés (Borg et al. 1987; Mayer et al. 1991). Chez les embryons, de faibles doses de composés chimiques dotés de propriétés œstrogéniques sont capables de fortement augmenter l'expression de l'aromatase B (Menuet et al. 2005; Tong et al. 2009; Brion et al. 2012). De part sa grande sensibilité aux composés œstrogéniques, le gène *cyp19a1b* constitue un nouveau biomarqueur d'exposition aux perturbateurs endocriniens aux propriétés œstrogéniques.

I.2. Perturbateurs endocriniens

En règle générale, la plupart des hormones agit à de très faibles concentrations. De très faibles variations des concentrations en hormones entraînent une régulation fine des fonctions biologiques. Par conséquent, toute substance chimique exogène pouvant entrer en interaction avec le système endocrinien peut potentiellement entraîner des altérations des processus physiologiques mis en jeu. C'est le cas des perturbateurs endocriniens (PE).

I.2.1. Principes généraux

I.2.1.1. Définition, nature et origine

La problématique scientifique et sociétale que posent les perturbateurs endocriniens est apparue à la fin des années 1980. De nombreuses études ont montrés les effets délétères de substances chimiques, contaminants de l'environnement, sur les écosystèmes, l'Homme et les modèles animaux. Les dangers et les risques que représentent ces contaminants ont été progressivement pris en considération par les institutions réglementaires et politiques de différents Etats. L'enjeu est de pouvoir évaluer les dangers et les risques pour l'environnement et l'Homme, que représentent des substances chimiques déjà sur le marché ou en développement, et ainsi de garantir la sécurité sanitaire.

Plusieurs définitions des perturbateurs endocriniens ont été données. Celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) émise en 2002 est la plus communément admise : « *une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance* ». (OMS 2002). Une autre définit les perturbateurs endocriniens (PE) comme des substances chimiques exogènes d'origine naturelle ou artificielle pouvant altérer le système endocrinien en modifiant la synthèse, le stockage, le transport,

l'action ou l'élimination des hormones naturelles de l'organisme et ainsi, entrainer des effets nocifs sur la santé des organismes exposés et/ou de leurs descendants (Kavlock et al. 1996). Ainsi les PE sont définis d'après leur mode d'action potentiel vis-à-vis du système endocrinien mais aussi d'après la nature des effets biologiques dont ils sont responsables, même s'il convient de constater que la définition de l'OMS reste relativement vague, puisqu'elle mentionne des effets sur la santé pris au sens large tout en soulignant d'éventuels effets trans-générationnels.

Le tableau 1 illustre la diversité des effets biologiques pour les PE, révélant également une problématique à la fois en santé humaine et environnementale.

Tableau 1. Exemples d'effets biologiques de perturbateurs endocriniens sur des animaux sauvages, des animaux de laboratoire et sur l'Homme

4-MBC : 4-méthylbenzylidène camphre, NP : nonylphénol, DEHP : Di-(2-éthylhexyl) phtalate, PCBs : polychlorobiphényles, PCDF : Polychlorodibenzofurane, DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

Organisme	Effets biologiques	Molécules incriminées	Références
Homme	Diminution de la fertilité	Diéthylstilbestrol	(Colborn et al. 1993)
	Comportement Capacités immunitaires	PCB, PCDF	(Guo et al. 1995)
Rat	Perturbation thyroïdienne (mâle : ↓ taux de T4)	Benzophénone 2	(Schmutzler et al. 2007)
	Modification de taux circulants d'hormones (mâle : ↓ taux de testostérone, ↑ LH)	DEHP, NP	(Akingbemi et al. 2004) (Laurenzana et al. 2002)
	Modification de taux de neuromédiateurs (mâle : GABA, aspartate, glutamate) Augmentation du poids utérin	4-MBC	(Carou et al. 2009) (Schlumpf et al. 2001)
	Anomalies du développement (↓ distance ano-génitale, altérations histologiques des testicules)	DEHP	(Andrade et al. 2006)
Oiseau	Perturbations du comportement sexuel mâle	Vinclozoline, Atrazine	(Ottinger et al. 2008)
Alligator	Anomalies du développement	DDT et dérivés	(Guillette et al. 1994)
Dauphin	Diminution des capacités immunitaires (corrélation)	PCBs, DDT	(Lahvis et al. 1995)
Poisson	Masculinisation	Spirolactone	(Raut et al. 2011)
	Intersexe (ovo-testicules)	4-nonylphénol	(El-Sayed Ali et al. 2014)
Gastéropode	Imposex	Tributyltine	(Giraud-Billoud et al. 2013)

Les PE peuvent être d'origine naturelle ou synthétique (Tableau 2). Les PE produits par les plantes et les champignons sont appelés phyto- et myco-œstrogènes, respectivement. Les phyto-œstrogènes peuvent être des isoflavones, des coumestanes, des lignanes ou des stilbènes. Les Fabacées (légumineuses) comme le soja produisent des substances chimiques appartenant à la famille des flavonoïdes (isoflavones telles que la génistéine et la daidzéine), et des coumestanes (telles que le coumestrol). De nombreuses familles de plantes supérieures sont à l'origine de stilbènes et de

lignanes. Tout comme les isoflavones et les coumestanes, les lignanes et les stilbènes semblent être produits notamment en réponse à des infections par des micro-organismes. Ils représentent alors des molécules de défense appelées des phytoalexines. Certaines espèces de champignons du sol, les fusariums, peuvent coloniser des végétaux, notamment les graminées, et sont à l'origine de mycotoxines comme la zéaralénone. Ces substances chimiques d'origine naturelle sont capables de mimer l'action d'hormones œstrogéniques endogènes des animaux. Toutefois, les activités humaines à l'origine de la production de substances chimiques, constituent une source d'exposition majeure des animaux et de l'Homme aux PE.

Tableau 2. Exemples de familles chimiques et de sources de perturbateurs endocriniens

Origine	Substance chimique	Famille chimique	Source
Naturelle	Génistéine Daidzéine Coumestrol	Phyto-œstrogène	Végétaux
	Zéaralénone	Mycotoxine	Champignons
	17 -œstradiol Estrone	Stéroïdes sexuels	Hormones animales naturelles
Synthétique	17 α -éthinyloestradiol, Diéthylstilbestrol, Tamoxifène	Hormones de synthèse	Industrie pharmaceutique
	Benzophénones 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC) 3-benzylidène camphre	Filtres ultraviolets	Industries cosmétique, plastique et alimentaire
	Bisphénol A, F, S	Bisphénols	Industrie plastique
	Propylparabène Butylparabène Tert-butylhydroxyanisole (BHA)	Conservateurs et/ou anti- oxydants	Industries cosmétique et alimentaire
	Atrazine Lindane Endosulfan Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) Thirame Zinèbe	Biocides (phytosanitaires et pesticides)	Industries de la chimie et de l'agriculture
	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) Phtalate de dibutyle (DBP) Phtalate de diéthyle (DEP) Phtalate de dicyclohexyle, (DCHP)	Phtalates	Industries plastique, de la chimie et cosmétique
	Nonylphénol Octylphénol	Alkylphénols	Industries de la chimie (biocide), du textile, et de la cosmétique
	2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PeCDD	Dioxines	Sous-produit industriel
	Polybromodiphényléthers (PBDE) Tétrabromobisphénol A (TBBPA) Polybromobiphényles (PBB)	Retardateurs de flamme	Industries du textile, du plastique, de l'informatique et de l'électroménager

Les sources d'exposition des animaux et de l'Homme sont étroitement liées à la nature des contaminations environnementales et des usages de ces PE. Ces contaminants se retrouvent aussi bien dans les sols, sous-sols, rivières, lacs, nappes phréatiques mais aussi dans l'air intérieur (meublé, matériel informatique, literie, revêtements) et extérieur (pesticides), ainsi que dans les aliments. Par conséquent, l'ensemble des chaînes trophiques peut être touché après une exposition des organismes par voie digestive, respiratoire ou cutanée.

I.2.1.2. Modes d'action

Les modes d'action des PE sont complexes. De nombreuses communications croisées existent entre les différentes composantes du système endocrinien (axe hypothalamo-hypophyséogonadique, axe thyroïdien, métabolisme énergétique, régulation de la synthèse des stéroïdes, métabolisme phosphocalcique...). Chaque axe endocrinien interagit à différents niveaux avec d'autres axes, permettant une intégration et une régulation de l'ensemble des fonctions de l'organisme. Par conséquent, l'impact d'un PE sur l'une de ces composantes peut entraîner une dérégulation plus globale du système endocrinien. La connaissance et la compréhension partielle de ces communications croisées et des systèmes de régulation en jeu rend la prédiction des effets des PE plus difficile.

En agissant sur des cibles moléculaires, les PE vont altérer la communication assurée par les hormones au sein du système endocrinien. Les PE peuvent ainsi avoir un impact sur la synthèse des hormones au sein des cellules productrices, sur leur transport, sur leur action au niveau de la cellule cible, ou encore sur leur élimination/bioactivation par l'interaction avec le système de biotransformation des xénobiotiques (Figure 3). L'effet d'un PE sur une cellule cible peut résulter de plusieurs mécanismes d'action. Le mieux décrit et le plus connu consiste en l'interaction des PE avec des récepteurs nucléaires. L'interaction des PE avec des récepteurs nucléaires (voie génomique) tels que les récepteurs des œstrogènes (ER), les récepteurs des androgènes (AR), les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), les récepteurs de la progestérone (PR), les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR), entraîne une modification de la transcription des gènes régulés par ces récepteurs nucléaires. Les PE peuvent également interagir avec des récepteurs membranaires (voie non génomique) entraînant une modification rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, du taux de protéines. La variation des taux de protéines codées par les gènes dont l'expression a été modifiée, peut alors aboutir à une dérégulation des fonctions biologiques qui sont sous la dépendance de ces protéines.

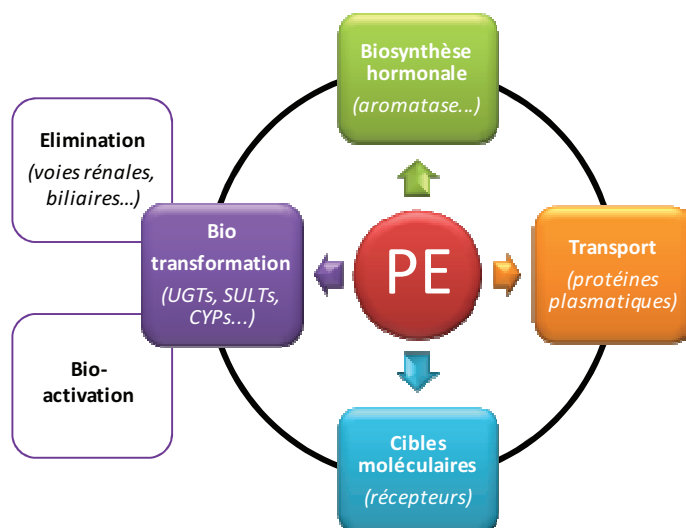


Figure 3. Modes d'action des PE sur la dynamique hormonale

I.2.1.3. Effets faibles doses et relations effet-dose

Les hormones endogènes sont actives à des doses très faibles, de l'ordre du picomolaire ou du nanomolaire. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les PE pouvaient agir à des doses qualifiées de faibles, à savoir de l'ordre du nanomolaire et du micromolaire (Vandenberg et al. 2012). Cette notion de faible dose peut recouvrir différents aspects, et différentes définitions de cette notion existent actuellement. Un effet peut être qualifié d'« effet à faible dose » lorsque (1) la dose se situe dans la gamme de doses d'exposition que l'on retrouve chez l'Homme, ou (2) la dose est inférieure à celle habituellement testée dans les études toxicologiques traditionnelles, ou (3) la dose est inférieure à la DMENO (Dose Minimale pour laquelle un Effet Nocif a été Observé), ou (4) la dose administrée à un animal qui conduit à une concentration plasmatique se situant dans la gamme de concentrations généralement mesurées dans la population humaine ou de l'organisme considéré (également appelée dose environnementale) (Brucker-Davis et al. 2001; Vandenberg et al. 2007). Cette dernière définition du concept à l'avantage de tenir compte des paramètres pharmacocinétiques (ADME : absorption, distribution, métabolisme, excrétion). La comparaison et l'interprétation des résultats peuvent s'avérer d'autant plus complexes que les études expérimentales ne se basent pas nécessairement sur la même définition de ces faibles doses. Outre les études toxicologiques à faibles doses des PE, des études récentes de métabolomique ont montré que des faibles doses de PE peuvent engendrer des modifications des réseaux métaboliques endogènes et donc des paramètres physiologiques des organismes exposés (Cabaton et al. 2013; Teng et al. 2013). L'enjeu est notamment de savoir si la modification de ces réseaux métaboliques peut être la conséquence d'un

simple phénomène adaptatif non délétère, ou bien si elle est le reflet d'une perturbation néfaste occasionnant une toxicité avérée.

La toxicologie étudie de manière classique les effets délétères des xénobiotiques selon leur dose. Plus la dose (ou concentration) est élevée, plus l'effet mesuré est important. On parle d'une relation monotone (sans changement de signe de la pente) linéaire ou non linéaire entre la dose (ou concentration) et le paramètre biologique mesuré (Figure 4). Toutefois, les PE peuvent être à l'origine d'effets biologiques non-monotones (NMDRC : non monotonic dose response curve) pour lesquels on observe un changement de signe de la pente de la courbe dans le domaine de doses (ou concentrations) testées. La plupart des NMDRC ont une forme en U (effet maximal à la dose la plus faible et la plus forte) ou en U inversé (effet maximal pour des doses intermédiaires). Ces effets non-monotones représentent un défi important pour l'évaluation du risque et la toxicologie réglementaire. En effet, jusqu'à présent, l'établissement de doses acceptables sans effet néfaste pour les populations se basait sur des relations effet-doses monotones. Dans le cas des effet-doses non-monotones l'utilisation de fortes doses afin d'évaluer les doses plus faibles pour lesquels l'effet disparaît n'est alors plus suffisante (Vandenberg et al. 2012).

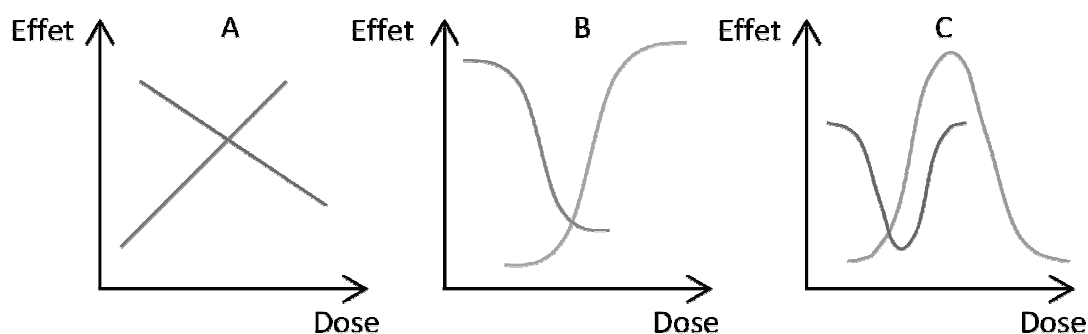


Figure 4. Effets monotones et non-monotones.

Effets monotones : A (effet-dose linéaire), B (effet-dose de type sigmoïdal). Effets non-monotones : C (effet-dose en U ou U inversé). D'après (Vandenberg et al. 2012).

I.2.2. Les xéno-œstrogènes

Les xéno-œstrogènes ou composé œstrogéno-mimétiques sont des PE qui peuvent mimer l'action d'hormones œstrogéniques endogènes. Cette classe de PE est de loin la plus étudiée jusqu'à aujourd'hui. Il a été démontré que ces xéno-œstrogènes ont été responsables d'effets biologiques chez l'Homme et les animaux, conséquence de leur interaction avec des récepteurs (nucléaires ou membranaires) ou de leur interaction avec des systèmes impliqués dans la synthèse, le transport et la biotransformation des hormones stéroïdes.

I.2.2.1. Effets médiés par les récepteurs des œstrogènes

Il existe deux grands types de récepteurs des œstrogènes : les récepteurs nucléaires et les récepteurs membranaires.

I.2.2.1.1. Les récepteurs nucléaires des œstrogènes

- *Organisation des récepteurs nucléaires*

Les récepteurs nucléaires des œstrogènes (ER) de type nucléaire appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RNs). Ils jouent le rôle de facteurs de transcription modulant l'expression de gènes cibles en recrutant des complexes de régulation sur des sites spécifiques de l'ADN. Ces protéines assurent un contrôle de l'expression de gènes cibles en réponse à des signaux cellulaires. Les RN sont impliqués dans la régulation de la croissance, du développement, de la reproduction, du métabolisme endogène et exogène. Au niveau cellulaire, ces RNs participent à différents processus comme la prolifération, l'apoptose, ou la différenciation.

La structure générale des RNs inclut six régions ou domaines nommés de A à F (Nilsson et al. 2001 ; Figure 5). La région N-terminale (**régions A/B**) est celle qui présente la plus grande variabilité inter-espèce. Cette région contient le domaine d'activation indépendant de la fixation du ligand (domaine AF-1) avec lequel vont interagir des cofacteurs. La région de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain ; **région C**) est caractérisée par la présence de deux doigts de zinc qui forment une structure tridimensionnelle compacte permettant au récepteur de se lier aux éléments de réponse de l'ADN. La reconnaissance de l'ADN est notamment assurée par un motif appelé boîte P présent dans le premier doigt de zinc. La boîte D, présente dans le second doigt de zinc, est impliquée dans la dimérisation du récepteur. Cette région contient également la séquence de localisation nucléaire (SLN) impliquée dans la translocation du récepteur. La région charnière (**région D**), variable selon les RNs, peut également contenir des séquences de localisation nucléaire. Cette région serait également le site d'interaction avec des co-represseurs. Le domaine de liaison au ligand (**région E**) est composé d'un ensemble d'hélices alpha reliées par un feuillet beta formant une poche hydrophobe dans laquelle vient se loger le ligand. Outre les séquences essentielles à l'interaction du ligand, la région E contient le domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand (domaine AF-2), mais aussi des séquences d'interaction avec les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins) et des co-régulateurs, ainsi que le domaine de dimérisation. Aucune fonction n'a, à ce jour, été mise en évidence pour la région (**F**) à l'extrémité C-terminale.

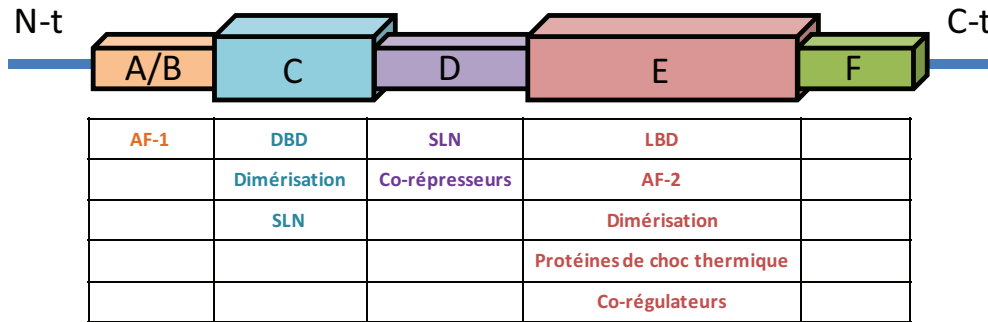


Figure 5. Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

- *Classification des récepteurs nucléaires des œstrogènes*

La nomenclature internationale des RNs provient d'une classification en 6 groupes basée sur des critères phylogénétiques (Tableau 3) (Laudet 1997). Une seconde classification a été fondée sur la nature des ligands respectifs des RN donnant lieu à 3 sous classes de récepteurs (Tableau 4) (Janosek et al. 2006). Dans cette dernière classification, l'une des sous-classes correspond aux RNs orphelins pour lesquels leurs ligands n'ont, à ce jour, pas été identifiés.

Tableau 3. Place des récepteurs nucléaires des œstrogènes dans la classification phylogénétique des RNs

M : monodimère, D : homodimère, H : hétérodimère. (Laudet 1997; Aranda et Pascual 2001; Gronemeyer et al. 2004; Germain et al. 2006; Maltais 2006)

Sous-famille	Groupe	Nom (isotype)	Code	Dimérisation
1	A (récepteurs des hormones thyroïdiennes)	TR (,)	NR1A1, A2	H
	B (récepteurs de l'acide rétinoïque)	RAR (, ,)	NRB1, B2, B3	H
	C (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes)	PPAR (, / ,)	NR1C1, C2, C3	H
	D	Rev-ErbA (,)	NR1D1, D2	M, D
	F (récepteurs apparentés aux récepteurs des rétinoïdes)	ROR (, ,)	NRAF1, F2, F3	M
	H (récepteurs des oxystérols)	LXR (,) / FXR	NRH1, H2, H3, H4, H5	H
	I (récepteurs orphelins)	VDR/PXR/CAR	NR1I1/ I2/ I3	H
X	RN avec 2DBD (, ,)		H	
2	A (Facteur nucléaire hépatocytaire)	HNF-4 (,)	NR2A1, A2	D
	B (récepteurs de l'acide rétinoïque)	RXR (, ,)	NR2B1, B2, B3	D
	C (récepteurs testiculaires)	TR (2, 4)	NR2C1, C2	D, H
	E	TLX/PNR	NR2E1, E2	M, D
	F	COUP-TF (I, II)/EAR-2	NR2F1, F2, F6	D,H /M
3	A (récepteurs des œstrogènes)	ER (,)	NR3A1, A2	D
	B (récepteurs apparentés aux récepteurs des œstrogènes)	ERR (, ,)	NR3B1, B2, B3	M, D
	C (récepteurs des 3-cétostéroïdes)	GR/MR/PR/AR	NR3C1, C2, C3, C4	D
4	A	NGFIB/NURR1/NOR1	NR4A1, A2, A3	M,D,H /M,H/M
5	A	SF1/LRH1	NR5A1, A2	M
6	A	GCNF	NR6A1	D
0	A	DAX/SHP	NR0B1, B2	H

Tableau 4. Classification des RNs basée sur la nature des ligands

D'après (Janosek et al. 2006).

Sous classes de récepteurs	Dénomination des récepteurs	Nature des ligands
I	PR ER AR GR MR	Hormones stéroïdes, dont - Progestatifs - Œstrogènes - Androgènes - Glucocorticoïdes - Minéralocorticoïdes
II	TR AhR VDR RXR (récepteurs de l'acide rétinoïque) RAR PPAR (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes)	Hormones thyroïdiennes Hydrocarbures aromatiques Vitamine D Acides rétinoïques (en général) Acides rétinoïques <i>trans</i> Proliférateurs de peroxyosomes
III	Récepteurs orphelins	Sans ligands connus à ce jour

- *Les sous-types de récepteurs nucléaires des œstrogènes*

Chez les mammifères, deux formes de récepteurs nucléaires des œstrogènes ER (NR3A1) et ER (NR3A2) ont été identifiées. Contrairement aux mammifères, les poissons actinoptérygiens (dont le poisson zèbre) expriment trois isoformes des ERs : ER , ER 1 (aussi appelé ER) et ER 2 (Tchoudakova et al. 1999; Hawkins et al. 2000; Menuet et al. 2002). ER présente une grande homologie de séquence chez tous les vertébrés. Le récepteur ER 2 des poissons partage une grande grande homologie avec le récepteur ER des mammifères, contrairement à ER 1 qui n'a pas d'homologue mammalien (Hawkins et al. 2000; Hawkins et Thomas 2004) (Figure 6). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une seconde forme d'ER a été décrite (ER 2). Il est probable que cette seconde forme d'ER existe également chez d'autres espèces de téléostéens tétrapodes (Nagler et al. 2007).

	zfER			
zfER	100	zfER 1		
zfER 1	40,5	100	zfER 2	
zfER 2	39,4	51,5	100	hER
hER	47,1	39,0	37,8	100
hER	40,9	44,4	46,8	37,6

Figure 6. Homologie de séquences (%) de la totalité de la région codante des récepteurs des œstrogènes (régions A/B, C, D, E, F)

h : human, zf : poisson zèbre (zebrafish). D'après (Menuet et al. 2002).

I.2.2.1.2. Les récepteurs membranaires des œstrogènes

Des formes membranaires de récepteurs des œstrogènes ont été pendant longtemps suspectés d'être impliqués dans des effets hormonaux survenant plus rapidement (de l'ordre de la minute) que ceux nécessitant des étapes de transcription et de traduction après l'activation de gènes cibles (de l'ordre de quelques heures). C'est à la suite de l'observation d'une augmentation du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans des cellules utérines de rat 15 secondes après une exposition au 17 -œstradiol que l'hypothèse de récepteurs des stéroïdes à localisation membranaire a été posée (Szego et Davis 1967). Alors que la preuve directe de l'existence de récepteurs des œstrogènes membranaires (mER) a été établie en 1977 par Pietras et Szego (Pietras et Szego 1977), l'implication de telles voies d'action non génomiques des stéroïdes fut globalement peu prise en compte pendant la décennie suivante. Il semble que les mER possèdent une structure identique à celles de ER nucléaires. Il a été montré que la masse, la mobilité électrophorétique et l'affinité à l'œstradiol étaient identiques entre les ER membranaires et nucléaires (Razandi et al. 1999; Razandi et al. 2003). Des expérimentations ont montré que les affinités d'anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre les ERs nucléaires et les ER membranaires sont du même ordre (Pappas et al. 1995). Comme pour les ER nucléaires, la dimérisation des mER en présence du ligand hormonal est nécessaire à leur fonctionnalité. Il a été montré que le récepteur couplé à la protéine G, GPR30, pouvait se lier à l'œstradiol et entraîner une cascade d'activations (Thomas et al. 2010). Ce récepteur GPR30 ou GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) serait donc un mER. Actuellement, de tels mER ont également été mise en évidence au niveau des gonades chez le poisson (Thomas 2012).

En 2002, Torran-Allerand et al. ont mis en évidence un nouveau récepteur œstrogénique membranaire dans le néocortex et l'utérus, nommé ER-X (Toran-Allerand et al. 2002). Alors que les ER présentent une grande affinité pour le 17 -œstradiol, l'ER-X serait affiné pour le 17 -œstradiol. Cet ER-X serait un variant obtenu par épissage alternatif d'ER. La structure et les rôles physiologiques de cet ER-X sont encore peu connus.

I.2.2.1.3. *Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes*

Chez les mammifères adultes, les ER sont exprimés dans l'ensemble des cellules des différents organes et tissus, alors que les ER sont davantage exprimés dans les ovaires, les poumons et la prostate (Couse et al. 1997). Chez le poisson zèbre adulte le nombre de transcrits des zfER semble être plus important dans le foie et la glande pituitaire (notamment par rapport au reste du cerveau) et les testicules. Les zfER 1 semblent être davantage réparti de manière homogène entre le cerveau, le foie, les intestins, les testicules et les ovaires. Concernant les transcrits du zfER 2, leur nombre est plus important dans le cerveau (excepté la glande pituitaire), le foie, les intestins, les testicules et les ovaires (Menuet et al. 2002). La répartition tissulaire peut varier selon le sexe. Par exemple, chez le carassin (*Carassius auratus*), l'expression du récepteur ER est plus importante dans le foie des femelles que des mâles, alors que l'expression des récepteurs ER 1 et 2 est similaire entre mâles et femelles (Nelson et Habibi 2010).

Chez le poisson zèbre, il a été montré que le gène *esr2b*, codant pour le zfER 1 était déjà exprimé dans le foie aux stades embryonnaires et larvaires (Bertrand et al. 2007; Gorelick et Halpern 2011). L'expression de *esr1* codant pour le zfER a été retrouvée de manière spécifique au niveau des valves cardiaques chez la larve âgée de 3 à 5 jours après fécondation. A ce même stade de développement larvaire, l'expression de *esr2a* codant pour le zfER 2 n'a été retrouvée ni dans le foie ni dans le cœur (Gorelick et al. 2014).

I.2.2.1.4. *Modes d'action des PE impliquant les récepteurs des œstrogènes*

En l'absence de ligand, les ER sont présents dans le noyau et sont liés à des protéines chaperonnes (hsp). En présence d'un ligand (17 β -œstradiol ou xéno-œstrogène), le complexe hsp est libéré et des homodimères ou hétérodimères d'ER ou ER se forment. Après une translocation nucléaire, deux voies d'action génomique sont possibles (Figure 7): (1) une voie dite classique correspondant à la liaison du complexe E2-ER dimérisé sur l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE), (2) et une voie indépendante de l'ERE dans laquelle le complexe E2-ER dimérisé entraîne l'activation de gènes sous le contrôle de promoteurs différents de l'ERE tels que AP1, NF-kB, Sp1 (Bjornstrom et Sjoberg 2005). Il existe une troisième voie génomique indépendante de l'E2 dans laquelle l'expression de gènes sous le contrôle de l'ERE est modifiée après l'interaction de facteurs de croissance ou de PE (EGF : epidermal growth factor, IGF-1 : insulin-like growth factor-1 par exemple) avec leur récepteur membranaire (Figure 7). Actuellement jusqu'à 300 cofacteurs ont été identifiés comme pouvant participer à l'activation de la transcription de gènes. La nature des cofacteurs exprimés selon les types cellulaires conditionne pour partie l'effet du ligand sur l'ER (Lonard et O'Malley 2012). Enfin, après interaction avec son récepteur membranaire, l'E2 peut entraîner l'activation d'une voie non

génomique conduisant à une réponse cellulaire plus rapide que celle résultante des voies génomiques (Figure 7).

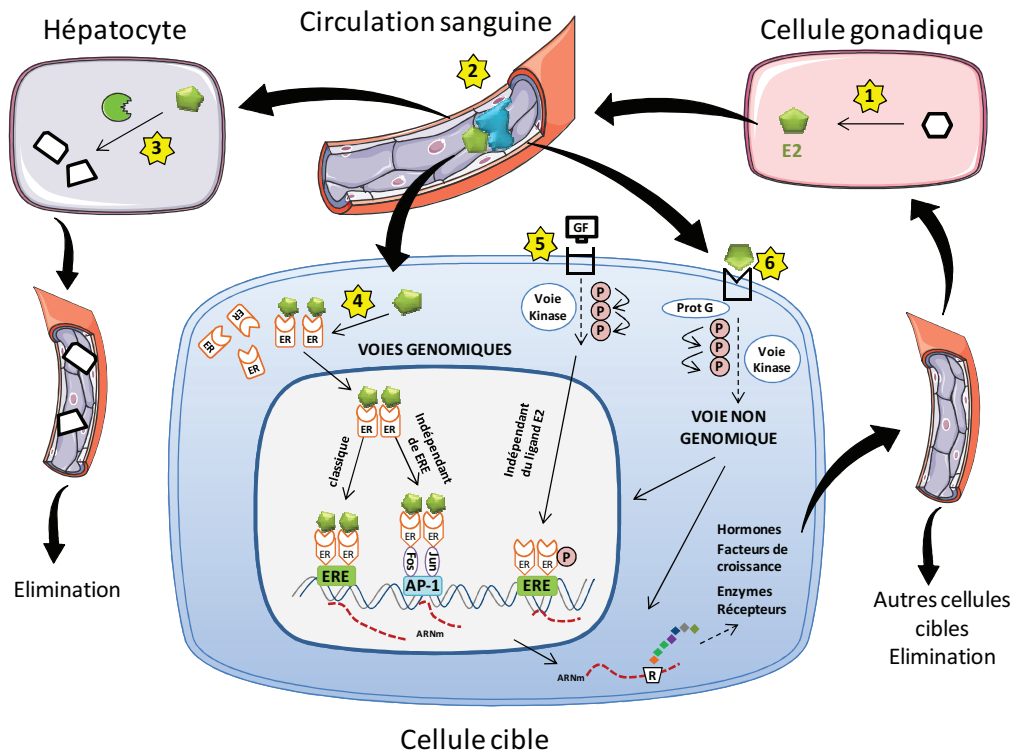


Figure 7. Altération par des PE de la synthèse, du devenir et de l'action du 17 β -œstradiol sur une cellule cible

Les étoiles jaunes représentent les principaux sites d'action des PE. **1** : synthèse de l'hormone stéroïdienne. **2** : transport de l'hormone dans la circulation sanguine, liaison avec une protéine de transport. **3** : biotransformation de l'hormone dans les cellules hépatiques. **4** : interaction avec le récepteur nucléaire des œstrogènes. **5** : interaction avec des récepteurs de facteurs de croissance. **6** : interaction avec le récepteur membranaire des œstrogènes. **AP-1** : protéine activatrice 1, **ER** : récepteurs des œstrogènes, **ERE** : élément de réponse des œstrogènes, **E2** : 17 β -œstradiol, **GF** : facteur de croissance, **HS** : hormone stéroïdienne, **Prot G** : protéine G, **P** : phosphorylation, **R** : complexe ribosomal. D'après (Hall et al. 2001; OMS 2002; Lee et al. 2013). Des éléments iconographiques proviennent de la banque d'images Servier MedicalArt.

Plusieurs facteurs conditionnent l'effet biologique d'un xéno-œstrogène : l'organisme lui-même, la période de vie durant laquelle intervient l'exposition, les paramètres pharmacocinétiques, la susceptibilité génomique, la dose et la nature du ligand (Tableau 5). Pour un même ligand, l'effet résultant de son interaction avec un ER peut aussi varier selon le contexte cellulaire. En effet, les fonctions de transactivation des domaines AF-1 et AF-2 des ER sont dépendants du type cellulaire et du contexte moléculaire du promoteur (Berry et al. 1990). Cette importance du contexte cellulaire a notamment été montrée au travers d'études portant sur la nature agoniste ou antagoniste du tamoxifène vis-à-vis des ER selon la nature de la cellule. De telles xéno-œstrogènes sont appelés des SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator). Ces changements de comportements des xénobiotiques sont

liés aux différences de nature et d'abondance des cofacteurs exprimés par les différents types cellulaires (Hall et McDonnell 2005; McDonnell et Wardell 2010). Par exemple, le changement d'un seul cofacteur est suffisant pour modifier totalement l'activité du tamoxifène (Onate et al. 1995; Smith et al. 1997). Par conséquent, l'interprétation des résultats obtenus peut dépendre du modèle et du contexte dans lequel l'activité du xénobiotique est évaluée. Il est donc essentiel de porter une attention particulière au choix du modèle biologique.

I.2.2.1.5. *Variété des ligands des récepteurs des œstrogènes*

De nombreuses études ont mis en évidence qu'un nombre important de composés chimiques (xéno-œstrogènes) étaient susceptibles de jouer le rôle de ligands des récepteurs des œstrogènes (Tableau 5).

Tableau 5. Exemples de ligands endogènes et environnementaux des récepteurs des œstrogènes chez les vertébrés

Classes	Composés	Références
Stéroïdes endogènes	E1, E2, E3	(Schreurs et al. 2005) (Lange et al. 2012)
Phyto- et myco-œstrogènes	Zéaralénone -zéaralanol et -zéaralénol Génistéine Coumestrol	(Sanseverino et al. 2009) (Cosnefroy et al. 2009)
Composés pharmaceutiques	DES, EE2, Tamoxifène	(Berry et al. 1990) (Lange et al. 2012)
Filtres ultraviolets	Benzophénone 1 (BP1) Benzophénone 2 (BP2) Benzophénone 3 (BP3) Benzophénone 4 (BP4) 4'-hydroxybenzophénone (4-HB) Trihydroxybenzophenone (THB) 4,4'-dihydroxybenzophéone (4-DHB) Benzylsalicylate (BS) Phenylsalicylate (PS) Octylsalicylate (OS) 3-benzylidène camphre (3-BC) 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC) Acide octyl-diméthyl- <i>p</i> -aminobenzoïque (OD-PABA) Homosalate (HMS)	(Schreurs et al. 2005) (Kunz et al. 2006) (Molina-Molina et al. 2008) (Cosnefroy et al. 2009)
Plastifiants	Bisphénol A (BPA) Bisphénol S (BPS) Bisphénol F (BPF)	(Chen et al. 2002) (Kuruto-Niwa et al. 2005) (Cosnefroy et al. 2009) (Molina-Molina et al. 2013)
Pesticides	Endosulfan Methoxychlore Heptachlore Nonachlore Fenarimol Fenitrothion o,p'DDT, p,p'DDE Dicofol	(McKinlay et al. 2008) (Sanseverino et al. 2009)
Surfactants	Nonylphénols, Octylphénols 2-chloro-4-nonylphénol 2,6-dichloro-4-nonylphénol	(Kuruto-Niwa et al. 2005)

I.2.2.2. Effets non médiés par les récepteurs des œstrogènes

Le système hormonal œstrogénique peut être modulé par des composés exogènes sans pour autant interagir avec les ER. En effet, les PE peuvent perturber la biosynthèse hormonale stéroïdienne, le transport des hormones endogènes et leur biotransformation.

I.2.2.2.1. Perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes

La perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes est le résultat d'une modification de l'expression et/ou de l'activité des enzymes impliquées dans ces voies de biosynthèse (Tableau 6).

Tableau 6. Exemples de PE modifiant la stéroïdogénèse chez les mammifères et les poissons téléostéens (↑:augmentation, ↓: diminution).

Enzymes	PE (effet)	Espèces/Modèles	Références
17 -hydroxylase 17,20-lyase	Clotrimazole	Poisson zèbre	(Hinfray et al. 2011)
StAR	Methoxychlor (↓ expression) Benzophénone-2 (↑ expression)	Achigan à grande bouche ; Cellules de Leydig humaines MA-10	(Blum et al. 2008) (Kim et al. 2011)
Aromatase(s)	TCDD (↓ expression) Aminogluthétimide (inhibition activité) Imidazoles (inhibition activité) Triazoles (inhibition activité) Fenarimol (inhibition activité) Méthylmercure (inhibition activité) Toxaphène (inhibition activité) Heptachlore (inhibition activité) Aldrine (↑ activité et expression) Chlordane (↑ activité et expression) Cyperméthrine (↑ activité) Méthylparathion (↑ activité) Endosulfan (↑ activité) Methoxychlore (↑ activité et expression) Oxadiazon (↑ activité) Metolachlore (↑ activité) Atrazine (↑ activité) Tributyltine (↑ activité et expression)	Poisson zèbre ; Truite arc-en-ciel ; Cellules de choriocarcinomes humains JEG-3	(Hinfray et al. 2006) (Laville et al. 2006) (Arukwe et al. 2008)
P450scc, P540c17	Benzophénone-2 (diminution expression)	Cellules de Leydig humaines MA-10	(Kim et al. 2011)

I.2.2.2.2. Perturbation du transport des hormones endogènes

Les perturbations hormonales notamment de type œstrogénique peuvent aussi résulter de l'interaction des PE avec les protéines plasmatiques de transport des hormones endogènes. Chez les vertébrés, les hormones endogènes sont majoritairement liées à des protéines plasmatiques de haute affinité appelées sex-steroid-binding protein (SBP) ou sex-hormone-binding globulin (SHBP), et de plus faible affinité telles que l'albumine sérique (serum albumin, SA) et les cortico-steroid-binding protein (CSBP) (Siiteri et al. 1982). Dans le sang, 97 à 99% des œstrogènes (et des androgènes) sont transportés sous forme liée. Les liaisons à la SBP représentent entre 40 et 70% de la totalité des liaisons aux protéines

de transport plasmatique (Dunn et al. 1981). En plus du rôle de transport, ces protéines protègent les hormones de la dégradation enzymatique et d'une élimination trop rapide, modulant ainsi leur distribution tissulaire et leur biodisponibilité cellulaire (Westphal 1986). Par conséquent, des phénomènes de compétition pour la liaison à ces protéines de transport entre des PE et les hormones endogènes peuvent conduire à une élévation anormale du taux d'hormones libres dans le sang. Les travaux de Tollefsen et al. ont montré que des PE connues pour interagir avec les ER, se liaient avec les SBP du saumon atlantique (*Salmo solar*), de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) ou de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'éthinylestradiol (EE2), le diéthylstilbestrol (DES), le 4-hydroxytamoxifen, la génistéine, la zéaralénone, le 4-t-octylphénol, le bisphénol A et l'o,p'-DDT sont capables de déplacer la liaison de l'œstradiol avec les SBP de manière compétitive et dose-dépendante. De plus, ces auteurs ont montré que le di-n-butyl-phtalate et l'éthinylestradiol (EE2) pouvaient induire une régulation positive du taux circulant de SBP *in vivo* (Tollefsen 2002; Tollefsen et al. 2002; Tollefsen et al. 2004).

I.2.2.2.3. Perturbation de la régulation des enzymes de biotransformation des hormones endogènes

L'homéostasie des hormones stéroïdiennes est particulièrement dépendante de l'activité et donc de l'expression des enzymes impliquées dans les voies biochimiques de la stéroïdogénèse. Une augmentation ou une diminution de l'expression ou de l'activité des enzymes (CYPs, UGTs, SULTs,...) impliquées dans la biotransformation des hormones stéroïdiennes, sous l'effet de l'action de PE, peut altérer l'homéostasie des hormones endogènes et par conséquent perturber les fonctions physiologiques qui en dépendent. Ces perturbations seront traitées dans le chapitre consacré à la perturbation de la régulation de l'expression des enzymes de biotransformation.

I.2.2.3. Exemples d'effets biologiques de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes

L'une des premières espèces chez laquelle une altération du système reproducteur par des composés œstrogéniques a été observée fut l'alligator (Guillette et al. 1994). Il est aujourd'hui démontré qu'une grande diversité d'espèces animales est affectée par la présence environnementale des xéno-œstrogènes (Tableau 7). La contamination des espèces animales par des xéno-œstrogènes conduit à une altération du système hormonal œstrogénique et par conséquent affecte la fonction de reproduction aussi bien que le développement des juvéniles. On peut citer par exemple des cas de cryptorchidie, d'altération de la motilité des spermatozoïdes, d'une diminution des capacités de synthèse hormonale des testicules, une diminution de la production d'œufs chez les poissons, qui conduit *in fine* à une diminution de la fécondité et de la fertilité. Bien qu'identifiés comme xéno-

œstrogènes, certains contaminants chimiques perturbent, directement ou indirectement, d'autres voies hormonales ne dépendant pas exclusivement et nécessairement des ER. Ainsi, ces xéno-œstrogènes peuvent également être responsables de troubles du métabolisme énergétique, du système immunitaire ou du système neuroendocrinien (Tableau 7). Les PE sont en effet capables d'interagir avec des cibles moléculaires de nature variée (ER, AR, TR, PPAR, PXR, CAR, transporteurs plasmatiques, pompes d'efflux...) conduisant à des conséquences physiologiques multiples.

Tableau 7. Exemples d'effets biologiques de xéno-œstrogènes

D'après (Casals-Casas et Desvergne 2011; Chighizola et Meroni 2012; Frye et al. 2012; Meeker 2012; Jeng 2014).

Classe d'effets biologiques	Molécule incriminée	Effet	Organisme	Mécanisme d'action	Etude épidémiologique	Références
Altération de la reproduction	PCB	hermaphroditisme	Beluga	-	-	(De Guise et al. 1994)
	Organochlorines PCB	↓ taux de testostérone	Ours polaire	-	-	(Oskam et al. 2003)
	p,p'DDE PCB	- Cryptorchidie - ↓ motilité des spermatozoïdes	Panthère	-	-	(Facemire et al. 1995) (Mansfield et Land 2002)
	Atrazine	- Dysgénésie gonadique - Hermaphroditisme	Grenouille léopard	-	-	(Hayes et al. 2003)
	p-nonylphénol	Intersexe	Poisson chat	-	-	(Barnhoorn et al. 2004)
	DES	↓ production de testostérone par des explants de testicules en culture	Rat	-	-	(Lassarguere et al. 2003)
	BPA	- ↓ poids de la vésicule séminale et des testicules - ↓ production de testostérone par les cellules de Leydig - ↓ taux plasmatique de testostérone et de LH - ↑ expression des ER dans la glande pituitaire	Rat	-	-	(Akingbemi et al. 2004)
			Souris	-	-	(vom Saal et al. 1998) (Cabaton et al. 2011)
	BPS	- ↓ production d'œufs - ↓ indice gonadosomatique - ↑ taux de malformation (génération F1)	Poisson zèbre	-	-	(Ji et al. 2013)
BP2	- ↑ taux de vitellogénine (mâle) - inhibition du développement des spermatozoïdes et oocytes - ↓ production d'œufs	Poisson tête de boule	-	-	(Weisbrod et al. 2007)	
Troubles métaboliques	Organochlorines (DDT)	-	-	ER AR	- Diabète - Surpoids	(Smink et al. 2008) (Turyk et al. 2009) (Park et al. 2010)
	BPA	- ↑ adipogénèse - ↑ taux insuline - ↑ poids corporel (souris et rat, étude développementale)	Souris Rat	ER AR TR GR	- Diabète - Anormalités tissulaires hépatiques	(Rubin 2007) (Alonso-Magdalena et al. 2008) (Hugo et al. 2008) (Lang et al. 2008)
	PFOA, PFOS	- Perte de poids, effet anorexigène - Gain de poids, ↑ insulïnémie et leptinémie (étude développementale)	Souris	ER AR PPARs	↑ taux cholestérol	(Xie et al. 2003) (Apelberg et al. 2007) (Nelson et Habibi 2010) (Asakawa et al. 2008) (Hines et al. 2009)
	PBDE	↑ lipolyse ↓ Oxydation glucose		PXR ER	Diabète	(Lin et al. 2002) (Hoppe et Carey)

				AR		2007) (Swedenborg et al. 2009)
Perturbation des réponses immunitaires	BPA	Altération du phénotype de cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T CD4+, T reg, B)	Rat Souris Poisson rouge Homme	ERs AhR PPARs	-	(Rogers et al. 2013)
	DDT	-	-	-	- ↑ taux d'asthme (enfant) - ↓ des fonctions des PNN	(Vine et al. 2000) (Sunyer et al. 2006)
	Methoxychlore	- ↑ du poids de la rate - ↓ du taux de CFU-GM, CFU-M et IL3	Rat	-	-	(Blyler et al. 1994) (Ahmed 2000)
	Hexa chlorobenzène	↓ des fonctions des lymphocytes T et B	Souris	-	- ↓ des fonctions des PNN - ↑ taux d'IgG et d'IgM	(Michielsen et al. 1997) (Queiroz et al. 1997) (Queiroz et al. 1998)
Troubles du comportement et perturbations des systèmes neuroendocriniens	Phtalates	-	-	-	- Déficit d'attention et hyperactivité - Troubles de type autistique	(Engel et al. 2010) (Miodovnik et al. 2011)
	BPA	- ↑ tremblements de souriceaux issus de mères exposées - ↑ troubles du comportement	Souris	-	Anxiété, hyperactivité, et perturbation du control émotionnel	(Braun et al. 2011) (Viberg et al. 2011) (Nagao et al. 2014)
	PBDE 209	↑ anxiété, hyperactivité	Souris	Système cholinergique	-	(Johansson et al. 2008)
	Octyl Methoxycinnamate (OMC)	↓ activité motrice des jeunes femelles issues de mères exposées	Rat			(Axelstad et al. 2011)

En conclusion, il existe aujourd'hui beaucoup de preuves que l'hémostasie des organismes peut être impactée par une grande variété de substances interférant avec le système endocrinien. De nombreuses espèces, dont l'Homme, sont affectées par leur environnement chimique (eau, air, nourriture). La variété des mécanismes moléculaires en jeu rend complexe la caractérisation de leurs effets biologiques. Toutefois, l'effet biologique des xénobiotiques n'est pas seulement lié à une interaction directe avec des cibles moléculaires. Le devenir des xénobiotiques dans l'organisme, et notamment ses biotransformations, conditionnent également la nature, la durée et l'intensité des effets biologiques.

II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES

Le métabolisme des xénobiotiques se définit comme la modification chimique d'un xénobiotique par une enzyme en un produit. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) sont quantitativement retrouvées en majorité dans le foie mais peuvent également l'être dans d'autres tissus et organes. Certaines de ces enzymes interviennent spécifiquement dans la transformation chimique des xénobiotiques alors que d'autres peuvent également être impliquées dans les voies biochimiques du métabolisme endogène.

Ces EMX constituent dans la majorité des cas un système de défense de l'organisme face à des composés étrangers. La transformation chimique d'un xénobiotique conduit généralement à des molécules (métabolites) plus hydrophiles et donc plus facilement éliminables par l'organisme. Le plus souvent les métabolites ont perdu l'activité pharmacologique ou toxique que pouvaient posséder la molécule mère. A l'inverse de ce processus de détoxification, certaines réactions de bioactivation conduisent à la formation de métabolites biologiquement actifs dont l'effet peut être recherché (effet pharmacologique dans le cas d'une prodrogue) ou délétère (effet toxique). C'est par exemple le cas de la codéine transformée *in vivo* en morphine ou d'amines aromatiques transformées en ion nitrénium très réactif. Selon les espèces, il peut exister un devenir différent pour un même xénobiotique selon la nature et la quantité d'enzymes exprimées par les différents types cellulaires impliqués dans ces réactions.

II.1. Place du métabolisme dans le devenir des xénobiotiques

Le devenir d'un xénobiotique dans un organisme dépend non seulement de sa biotransformation (Métabolisme) mais également d'autres phénomènes tels que son Absorption, sa Distribution et son Excrétion. Ces quatre processus (ADME) conditionnent le comportement pharmacocinétique des xénobiotiques. Certains paramètres développés ci-après comme la capacité métabolique des organes et les effets de premier passage influencent notablement le degré de biotransformation des xénobiotiques.

II.1.1. Les organes de biotransformation des xénobiotiques

Tous les organes ne sont pas équivalents en termes de capacité de biotransformation. Le foie (hépatocytes), la paroi intestinale (entérocytes) et la flore bactérienne sont les trois principales sources de biotransformation des xénobiotiques. A celles-ci, il faut rajouter les branchies pour les poissons. Ces organes possèdent des types cellulaires exprimant un grand nombre (qualitativement et

quantitativement) d'EMX. Il ne faut pas écarter la possibilité d'une biotransformation, parfois plus spécifique, par d'autres types cellulaires comme les pneumocytes de type II de l'épithélium des alvéoles pulmonaires, les cellules de Sertoli des tubes séminifères, ou encore les neurones et les cellules gliales au sein du cerveau, et les cellules du derme. Selon la voie d'entrée des xénobiotiques dans l'organisme, les xénobiotiques seront plus ou moins exposés à des organes à fortes capacités de biotransformation.

II.1.2. Effets de premiers passages

Les effets de premier passage correspondent aux biotransformations d'un xénobiotique au premier contact d'un organe. Par conséquent, la fraction inchangée du xénobiotique dans la circulation en aval de cet organe s'en trouve diminuée. La voie d'exposition d'un organisme à un xénobiotique conditionne, de par le type de premier passage, son degré de biotransformation. Par exemple, un xénobiotique entrant dans l'organisme par voie digestive subira nécessairement un premier passage digestif par les entérocytes et la flore bactérienne digestive, et un premier passage hépatique (Figure 8). Un xénobiotique inhalé sera en contact en premier lieu avec les poumons puis se retrouvera dans la circulation générale et sera donc distribué dans l'ensemble des organes. Pour le poisson, un xénobiotique contenu dans la nourriture subira un premier passage digestif et hépatique, alors qu'un xénobiotique présent dans l'eau subira un premier passage branchial (Figure 8).

Après excrétion dans la bile, les xénobiotiques et leurs métabolites peuvent être hydrolysés par la flore bactérienne du tube digestif et à nouveau être absorbés pour subir un nouveau passage hépatique. Ce cycle entéro-hépatique est absent chez le poisson.

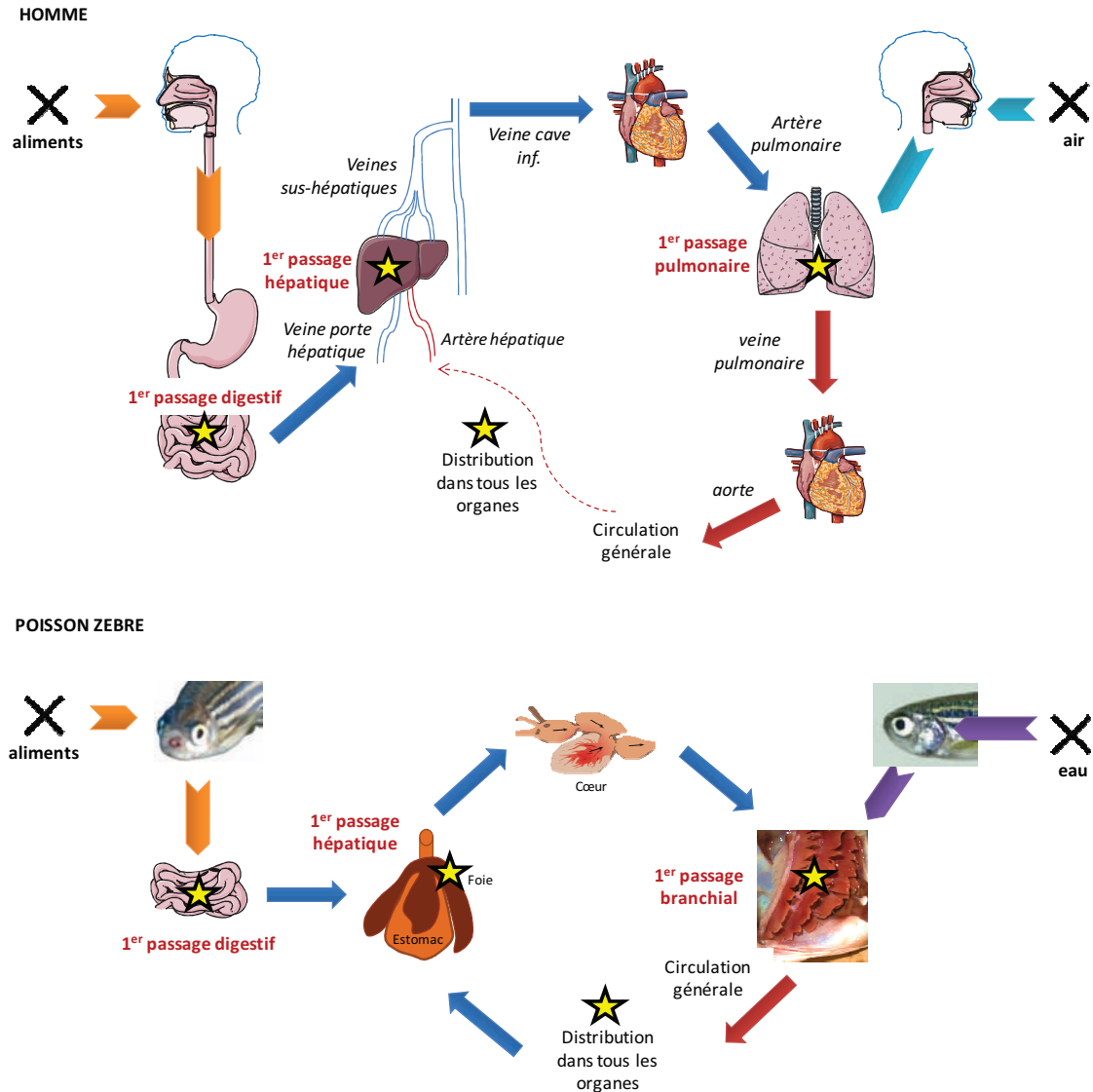


Figure 8. Effets de premiers passages après absorption par voie digestive, pulmonaire ou branchiale d'un xénobiotique chez l'Homme et le poisson zèbre

Les étoiles représentent les organes clefs dotés de capacité de biotransformation; X : xénobiotique.

II.2. Les enzymes de biotransformation

Les EMX sont classiquement répertoriées en deux catégories selon le type de transformation chimique réalisé sur les xénobiotiques : les enzymes de phase I (de « fonctionnalisation ») et les enzymes de phase II (de « conjugaison »). A noter que la phase III du métabolisme est classiquement associée à des protéines de phase III qui sont des protéines de transport prenant en charge certains flux entre le milieu intra- et extracellulaire (Figure 9).

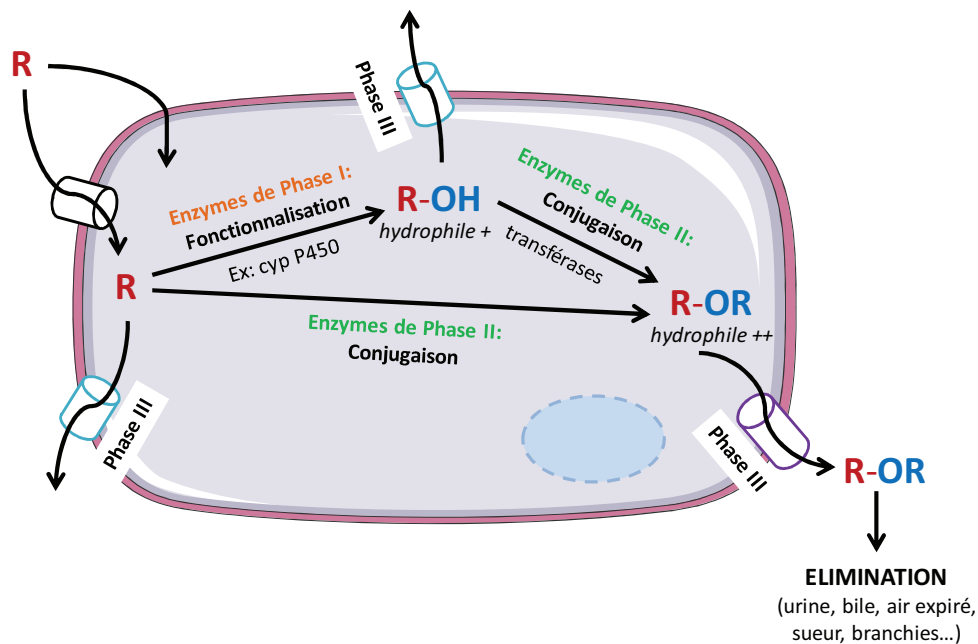


Figure 9. Biotransformations d'un xénobiotique dans un hépatocyte.
Un xénobiotique (R) portant des groupes chimiques O, N, ou S libres peut subir des réactions d'oxydation, de réduction et de conjugaison

II.2.1. Les enzymes de phase I : réactions de fonctionnalisation

Les réactions de fonctionnalisation conduisent à la formation de groupes chimiques fonctionnels et/ou au clivage de la molécule de départ. Les principales familles d'EMX de phase I et leurs fonctions sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8. Familles et fonctions des EMX de phase I

Familles d'EMX de phase I	Fonctions
Cytochromes P450 (CYP)	- Hydroxylation aliphatique ou aromatique - Epoxydation - N-, O-, S-déalkylation - N-hydroxylation - Sulfoxydation - Désulfuration - Déshalogénéation oxydative
Flavines monooxygénases (FMO)	N- et S-oxydation
Péroxidases (Px)	Réduction des hydroperoxydes en alcool
Carboxylestérase, amidase	Hydrolyse des esters
Alcool déshydrogénase (ADH)	Oxydation des alcools en aldéhydes
Epoxyde hydrolase (EH)	Hydrolyse des époxydes en dihydrodiols
Monoamine oxydase (MAO)	Désamination oxydative

II.2.1.1. Les cytochromes P450

C'est en 1958 que Garfinkel et Klingenberg ont identifié un pigment hépatique ayant une absorbance maximum à 450 nm et la capacité à fixer du monoxyde de carbone (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Ce pigment a ensuite été caractérisé comme étant un cytochrome par Omura et Sato en 1962 (Omura et Sato 1962). La fonction de ce cytochrome a été mise en évidence en 1963 en étudiant le rôle de microsomes provenant de glandes surrénales dans l'hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone en déoxycorticostérone (Estabrook et al. 1963).

Les cytochromes P450 (CYPs) sont des enzymes hémiques (hémoprotéines). Ils appartiennent à une superfamille d'enzymes que l'on retrouve aussi bien dans le règne végétal qu'animal (Anzenbacher et Anzenbacherova 2001). Les CYPs sont impliquées dans un grand nombre de réactions chimiques de biosynthèse ou de biodégradation de molécules endogènes (hormones stéroïdes, acides biliaires, acides gras ou encore prostaglandines, Figure 10). Ils jouent également un rôle prépondérant dans des réactions de biotransformation de composés exogènes (médicaments, contaminants chimiques). Ces enzymes microsomales (ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique) ou mitochondriales sont classées selon le degré de similarité de leur séquence en acides aminés. Ainsi, une famille de CYPs (par exemple CYP1 et les CYP2) partage plus de 40% d'homologie. Une sous-famille (par exemple CYP1A ou CYP1B) est définie par une homologie de plus de 55%. Pour identifier chacune des iso-enzymes un chiffre arabe est ajouté à la suite comme par exemple, le CYP3A4. Ces enzymes sont majoritairement (qualitativement et quantitativement) exprimées dans le foie, le tractus gastrointestinal, les poumons et les reins. Toutefois, des CYPs sont également présentes dans d'autres organes comme le cerveau, la peau, le cœur, la moelle osseuse, le placenta, la rate ou encore les glandes surrénales.

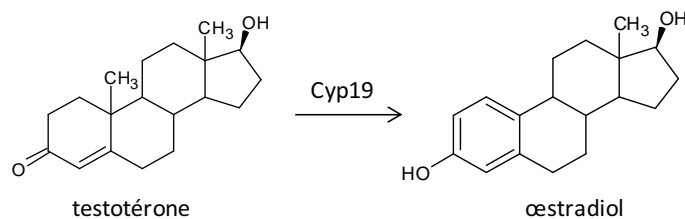


Figure 10. Exemple de la prise en charge d'un substrat endogène par un cytochrome P450

Différents types de réactions chimiques catalysées par les CYP

Les réactions chimiques réalisées par les CYPs sont liées à la capacité du Fe^{2+} contenu dans le noyau porphyrinique à fixer de l'oxygène (O_2 , Figure 11). Différents types de réactions chimiques peuvent être réalisées par les CYPs (Mansuy 1998). La réaction la plus courante des CYPs correspond à une activité monooxygénase, à savoir le transfert d'un atome d'oxygène provenant d'une molécule de dioxygène sur un substrat organique. Pour cette activité monooxygénase, les CYPs reçoivent des

électrons depuis le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) ou NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) via des protéines de transfert d'électrons (FAD : Flavine adénine dinucléotide, FMN : flavine mononucléotide) très fréquemment couplées à l'enzyme et ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 12). Toutefois, selon les organismes (bactéries, champignons, cellules eucaryotes) et selon la localisation des CYPs, (réticulum endoplasmique ou mitochondrie) les protéines rédox associées à l'enzyme peuvent être de nature différente (FMN, FAD, FeS, Zn) (Guengerich et Munro 2013). Ces réactions de cytochromes P450 monooxygénases peuvent s'écrire suivant la formule $RH + O_2 + 2e^- + 2H^+ (NADPH \text{ ou } NADH) \rightarrow ROH + H_2O$ (Mansuy 1998). Une série de réactions moléculaires s'opèrent entre le substrat (RH), l'oxygène (O_2), les électrons, le pouvoir réducteur (NADPH ou NADH) et l'atome de fer au centre du noyau porphyrinique du cytochrome P450 (Figure 13).

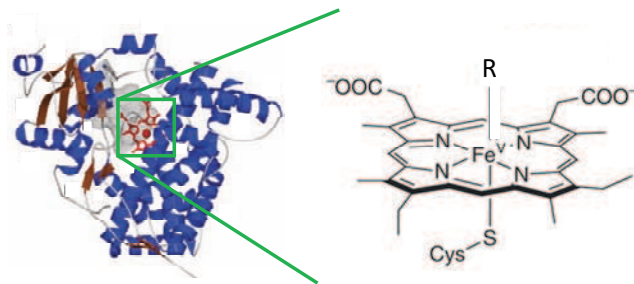


Figure 11. Structure 3D d'un cytochrome P450 et du noyau porphyrinique

Liaison du xénobiotique R à l'atome de fer.
D'après (Yano et al. 2004; Hohenberger et al. 2012).

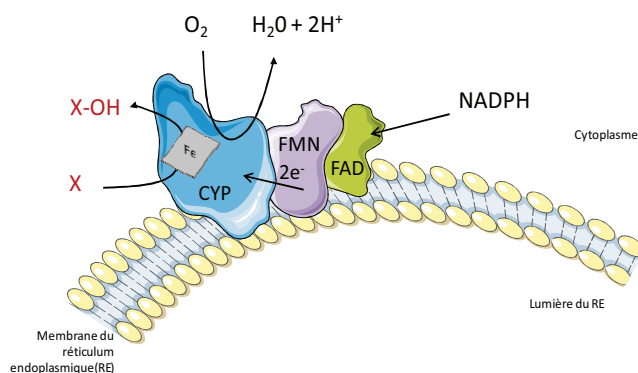


Figure 12. Localisation cellulaire et couplage aux protéines de transfert d'électrons des cytochromes P450 réductases

D'après (Boelsterli 2003)

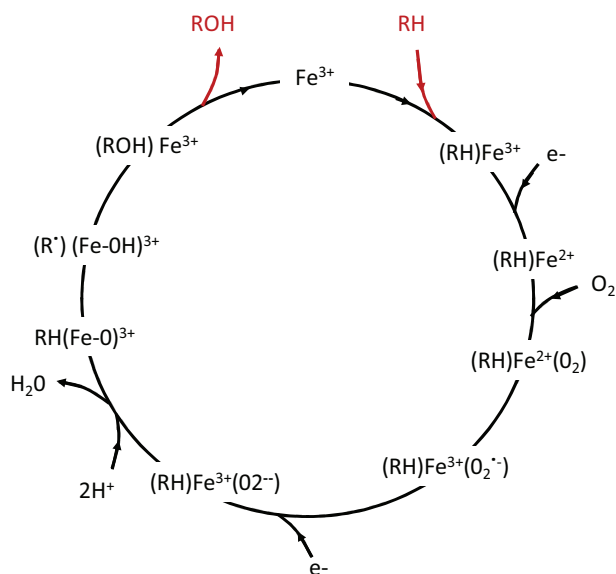


Figure 13. Cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase

RH : substrat de l'enzyme (xénobiotique par exemple), ROH : produit de la réaction. L'atome de fer au centre de l'hème du cytochrome P450 est désigné par Fe. D'après (Anzenbacher et Anzenbacherova 2001).

Ces réactions de type monooxygénase correspondent par exemple à l'hydroxylation d'une liaison C-C en C-OH, à la formation d'époxydes, à la *N*-, *S*- ou *O*-déalkylation oxydative (insertion d'un atome d'oxygène sur une liaison C-H proche d'un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote ou le soufre entraînant le clivage de l'hétéroatome), à une *S*-oxydation (passage de R-S-R' à RR'S⁺-O⁻) ou à une *N*-hydroxylation (Figure 14). D'autres types de réactions d'oxydation moins fréquentes et différentes des réactions de type monooxygénase, peuvent être réalisées par les CYPs. Ces réactions peuvent correspondre à des activités de type oxydase (formation de l'ion radicalaire fortement réactif O₂⁻), à une déshydrogénation (formation d'une double liaison carbone carbone à partir d'une simple liaison), à une peroxydation ou encore à une déformylation oxydative (Figure 14). Les CYPs peuvent également avoir une activité de type réductase. De nombreux exemples démontrent la capacité des CYPs à pouvoir catalyser la réduction de composés polyhalogénés, de composés nitroaromatiques, d'amines tertiaires ou d'arènes oxydes. Enfin, deux CYPs particuliers, des isomérases, à savoir la prostacycline synthase et la thromboxane synthase, catalysent la formation de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane (TXA₂) à partir de la prostaglandine H₂ (PGH₂) sans consommation de NADPH ou NADH (Mansuy 1998).

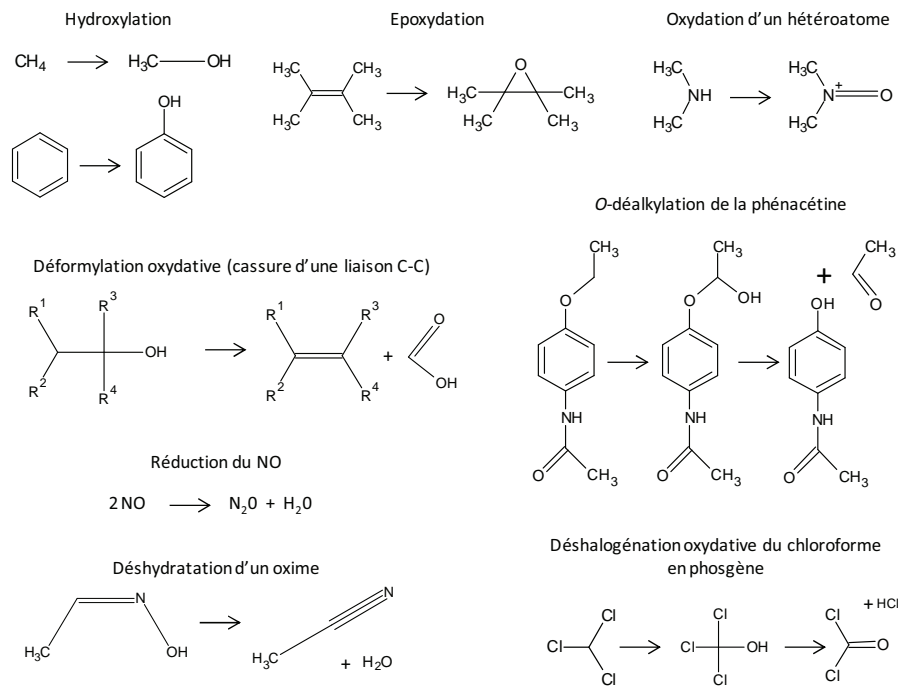


Figure 14. Exemples de réactions chimiques catalysées par les CYPs
D'après (Mansuy 1998).

Les CYPs peuvent être responsables de bioactivation comme celle du paracétamol, de la flutamide et du tégafur (**Figure 15**).

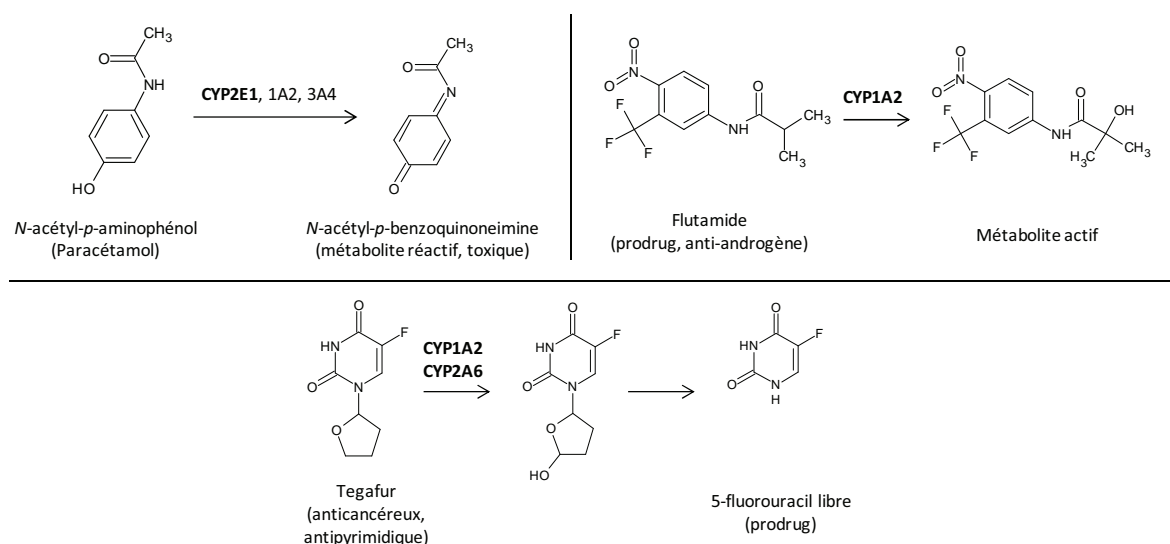


Figure 15. Exemples de bioactivation métabolique par des CYPs
D'après (Ortiz de Montellano 2013).

II.2.1.2. Flavine-monooxygénases

Les monooxygénases dépendantes des flavines (FMO) sont en importance la deuxième famille d'enzymes impliquées dans les réactions de phase I. Elles participent à une grande variété de processus biologiques. Beaucoup de ces enzymes contribuent au catabolisme de composés endogènes et exogènes, mais d'autres participent à l'anabolisme d'hormones et de vitamines. Les FMO incorporent un atome d'oxygène du dioxygène dans un substrat en réduisant l'autre atome d'oxygène en eau (Figure 16) (Huijbers et al. 2014). Comme pour les CYPs, les FMO sont abondamment présentes dans le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal et les poumons. Certaines FMO ont été mises en évidence dans la peau et le cerveau. Ces enzymes ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique sont responsables d'hydroxylations, de sulfoxydations, d'époxydations et d'halogénations. La grande sélectivité de ces enzymes permet des réactions régio- et énantio-sélectives. Les substrats des FMO peuvent être des amines (primaires, secondaires, tertiaires), des hydroxylamines, des hydrazines, des thiols, des sulfures et disulfures, des thiocarbamates, des mercaptoimidazoles, des dérivés phosphorés, séléniques ou encore boriques (Tableau 9). Actuellement, les FMO sont classées selon leur structure et leurs propriétés fonctionnelles (cofacteur, donneur d'électrons, type de réaction) en 8 groupes dénommés A à H (Huijbers et al. 2014).

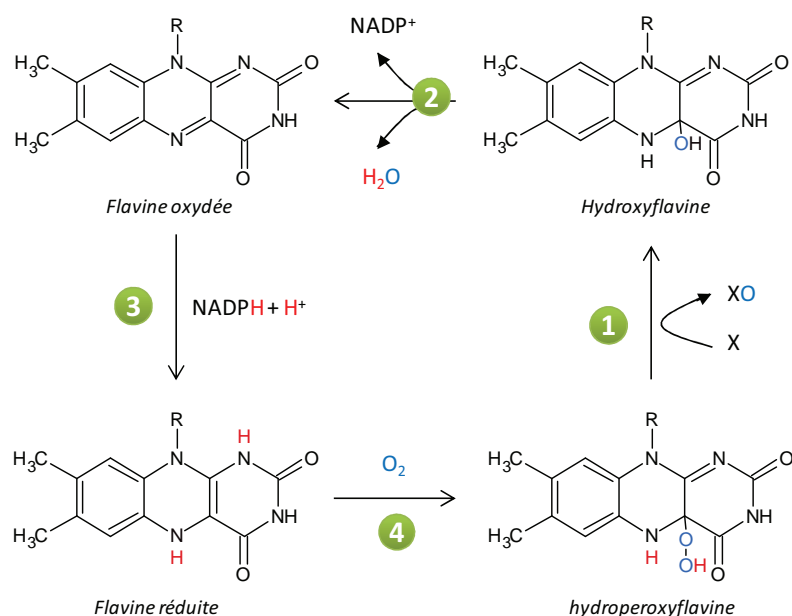


Figure 16. Mécanisme général d'oxydation d'un substrat (X) par les FMO
D'après (Huijbers et al. 2014).

Tableau 9. Exemples de substrats des FMO

Médicaments Sulindac (<i>anti-inflammatoire soufré</i>) Cimétidine, Ranitidine (<i>anti-histaminiques</i>) Méthimazole (<i>anti-thyroïdien</i>) Albendazole (<i>antiparasitaire</i>) Dérivés des phénothiazines (<i>neurotropes</i>)
Pesticides Aldicarbe, Méthiocarbe
Substrats endogènes Triméthylamine Phénéthylamine, Tyramine, Cystéamine... (<i>amines biogènes</i>)

II.2.2. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison

Les réactions de conjugaison, réalisées par les EMX de phase II, conduisent au couplage du xénobiotique à un substrat endogène, consécutivement ou pas à une fonctionnalisation préalable par les enzymes de phase I selon le xénobiotique. Une réaction de phase II peut avoir lieu directement pour de nombreux composés. Différents types de conjugaison existent incluant la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation, l'acétylation ou encore l'ajout d'une molécule de glutathion ou d'un acide aminé (Tableau 10). Ces réactions de conjugaison permettent d'augmenter l'excrétion de la molécule initiale et, conduisent dans la grande majorité des cas à la formation de métabolite dépourvue d'activité biologique. Chez l'Homme, les UDP-glucuronyltransférases (UGTs) et les sulfotransférases (SULTs) sont responsables de plus de 50% des biotransformations de type II des médicaments (Jancova et al. 2010).

Tableau 10. Principales familles des EMX de phase II

Familles d'EMX de phase II	Fonction
UDP-glucuronyltransférases (UGT)	Conjugaison d'un acide glucuronique depuis l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) sur le xénobiotique
Sulfotransférases (SULT)	Conjugaison d'un sulfate depuis le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur le xénobiotique
N-acétyltransférases (NAT)	Conjugaison d'un acétate depuis l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) sur le xénobiotique
Méthyl-transférases (MT)	Conjugaison d'un méthyle depuis la S-adénylméthionine (SAM) sur le xénobiotique
Glutathion-S-transférases (GST)	Conjugaison d'un glutathion sur le xénobiotique

II.2.2.1. Les UDP-glucuronyltransférases

Les UDP-glucuronyltransférases (UGTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un sucre provenant de l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) sur un substrat nucléophile (O-, N-, S- ou C- ; Figure 17). La formation de la liaison avec l'UDPGA est possible pour de nombreux types de substrats comme des alcools aliphatiques, des phénols, des acides carboxyliques, des thiols ou des amines (primaires, secondaires, tertiaires). Les enzymes de chaque famille d'UGTs (exemple : UGT1, UGT2) partagent au moins 40% d'homologie dans leur séquence ADN, et les enzymes d'une même sous-famille en partagent 60% (exemple UGT1A, UGT1B). Les UGTs sont exprimées dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, les intestins, les poumons, les glandes surrénales, la rate, la peau, les gonades et le cerveau. Au niveau cellulaire, les UGTs sont ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 18) (Jancova et al. 2010).

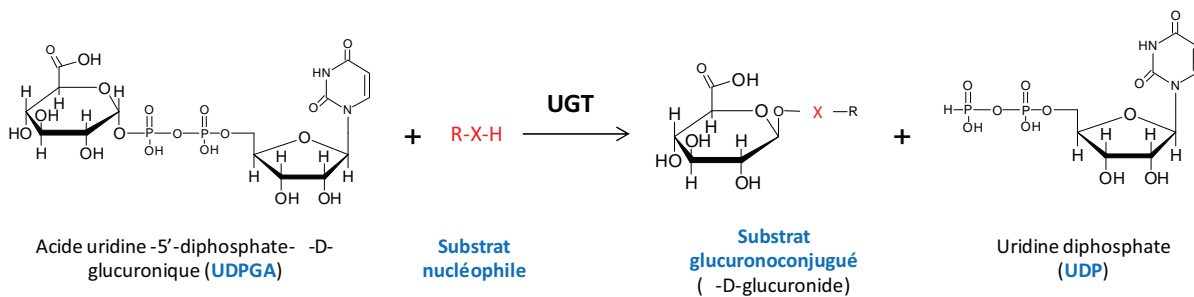


Figure 17. Réaction de conjugaison d'un substrat nucléophile avec l'UDPGA par l'UGT
D'après (Jancova et al. 2010).

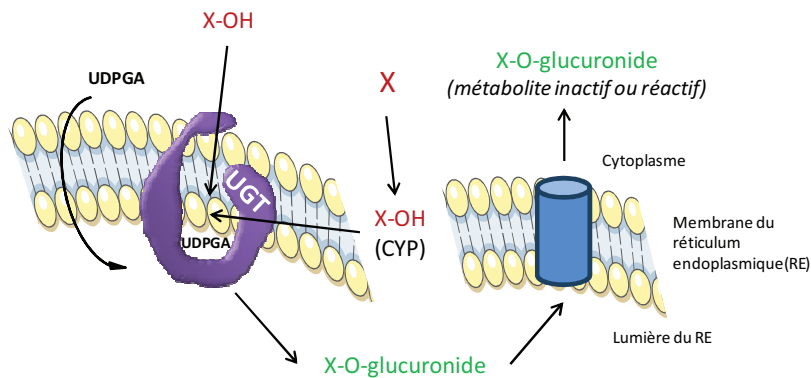


Figure 18. Fonctionnement général et localisation des UDP-glucuronyltransférases
D'après (Boelsterli 2003).

La glucuronidation entraîne le plus souvent une modification du pKa des xénobiotiques ayant pour conséquence une meilleure solubilité aqueuse qui facilite alors leur élimination par voie biliaire ou rénale. Par exemple alors que le pKa du phénol, peu soluble dans un milieu aqueux, est de 10, celui de son conjugué glucuronide est de 3,4 environ. Les UGTs participent aussi à l'élimination de composés endogènes tels que la bilirubine, les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes, les acides rétinoïques et les amines biogènes comme la sérotonine (Pearson et Wienkers 2009). Dans la majorité des cas, la glucuronidation d'un xénobiotique entraîne la formation d'un métabolite dépourvu d'activité biologique, et donc, non toxique. Toutefois il existe des exemples de xénobiotiques portant certaines fonctions chimiques susceptibles de devenir réactives après glucuronidation. C'est le cas des xénobiotiques portant une fonction acide carboxylique ou une amine. Par exemple, les médicaments contenant une fonction acide carboxylique comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou les lipidémians de type clofibrate peuvent être métabolisés en acyl glucuronides. Ces conjugaisons sont réalisées par l'UGT2B7 (Homme) et l'UGT2B1 (rat). Contrairement aux ether-glucuronides formés depuis un phénol par exemple, les acyl glucuronides (ou esters glucuronides) sont moins stables et sujets à des hydrolyses, des réarrangements moléculaires, et à l'établissement de liaison covalente avec des cibles moléculaires (protéines, acides nucléiques). En effet, la fonction ester résultant de la conjugaison d'un acide carboxylique avec l'UDPGA représente un site réactif pouvant être la source de l'établissement d'une liaison covalente avec des protéines présentant des atomes d'azote (NH), d'oxygène ou de soufre (Figure 19). Des phénomènes d'isomérisations (réarrangements moléculaires) d'un tel acyl glucuronide peut entraîner l'ouverture du cycle glucuronide et l'apparition d'un site réactif (Figure 19) (Boelsterli 2003). La *N*-glucuronconjugaison d'amines aromatiques peut également former des métabolites réactifs. C'est le cas de l'intermédiaire de fabrication de l'aniline (utilisée auparavant comme produit de teinture), la 2-naphthylamine. Après avoir été *N*-hydroxylée par un CYP, la *N*-glucuronidation de la 2-naphthylamine dans le foie conduit à la formation d'un métabolite stable à pH physiologique dans le sang. Lors de son arrivée dans les urines après une excrétion rénale, ce métabolite *N*-glucuronconjugué va être hydrolysé sous l'effet du pH légèrement acide de l'urine. L'ion nitrenium alors formé présente une telle réactivité pour l'ADN qu'il est à l'origine de cancers de la vessie (Case et Pearson 1954). Les xénobiotiques présentant des amines aromatiques *N*-hydroxylées sont alors potentiellement à risque de cancer de la vessie. Toutefois, selon l'espèce, la 2-naphthylamine peut ne pas présenter de toxicité par formation de l'ion nitrenium. Chez les rongeurs, le composé *N*-hydroxylé est rapidement pris en charge dans le foie par une *N*-acétyltransférase, contrairement au chien chez qui cette dernière enzyme n'est pas exprimée au niveau hépatique (Boelsterli 2003). Enfin, il est à noter qu'il existe de rares cas de conjugués glucuronides actifs comme la morphine-6-glucuronide active sur les récepteurs opiacés μ (Sverrisdottir et al. 2015).

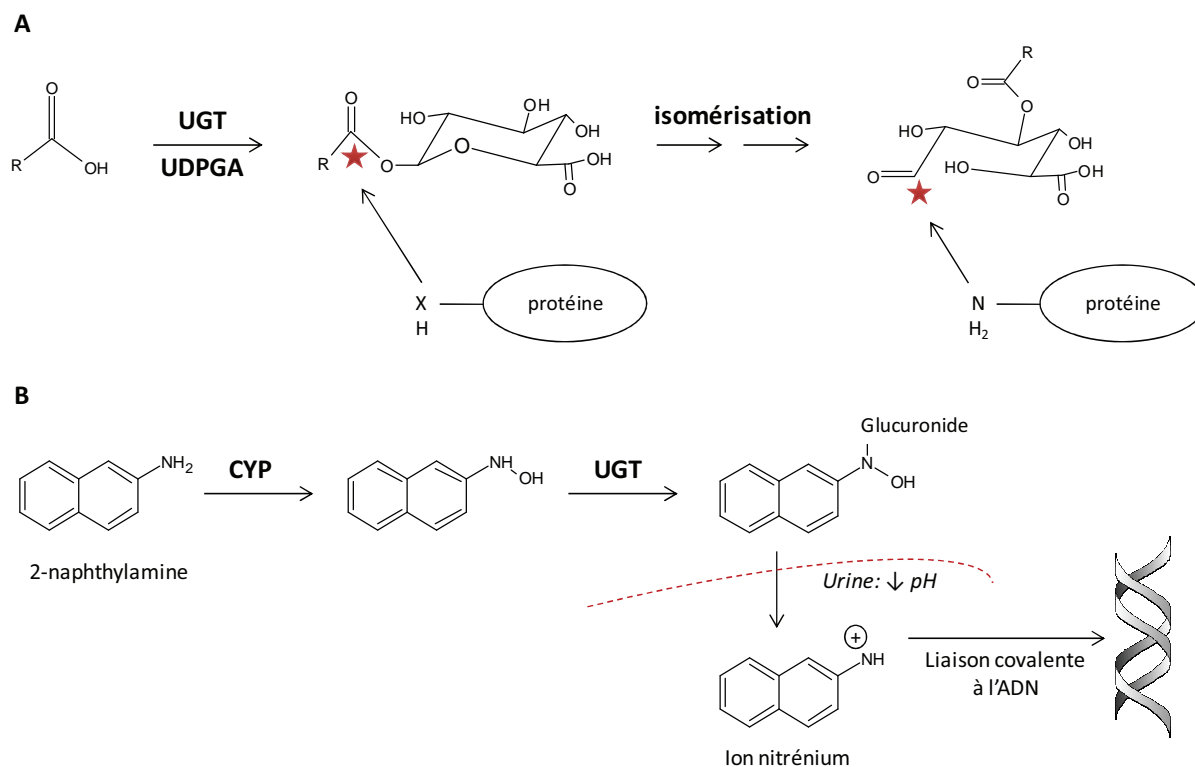


Figure 19. Formation de métabolites glucuronoconjugués réactifs. A. Cas d'acyl glucuronides. B. Cas de l'ion nitrenium issu de la 2-naphthylamine.

D'après (Boelsterli 2003).

II.2.2.2. Les sulfotransférases

Les sulfotransférases (SULTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe sulfate à partir du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur un groupe accepteur (*O*, *N*- ou *S*-) d'un substrat (Figure 20). De manière générale, la sulfatation est impliquée dans le métabolisme de substrats endogènes (stéroïdes, catécholamines, sérotonine, iodothyronines, eicosanoïdes, rétinol, 6-hydroxymélatonine, acide ascorbique, vitamine D) aussi bien qu'exogènes. Bien que les *O*-sulfatations soient majoritaires, les *N*-sulfatations jouent un rôle clef dans la modification des chaînes carbohydrates des macromolécules comme l'héparine et l'héparane sulfate, constituant principal des protéoglycanes. La *N*-sulfatation est également impliquée dans la biotransformation de xénobiotiques comme par exemple les quinolones. Les SULTs peuvent être localisées dans le cytoplasme ou attachées à la membrane de l'appareil de Golgi. Ces dernières sont responsables de la sulfoconjugaison de peptides, de protéines, de lipides et de glycosaminoglycanes, alors que les SULTs cytosoliques prennent en charge les xénobiotiques et les petites molécules endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires et les neurotransmetteurs. Les SULTs sont exprimées dans de nombreux organes et tissus : foie, cerveau, glandes mammaires, intestins, poumons, glandes surrénales, endomètre, placenta et rein (Jancova et al. 2010).

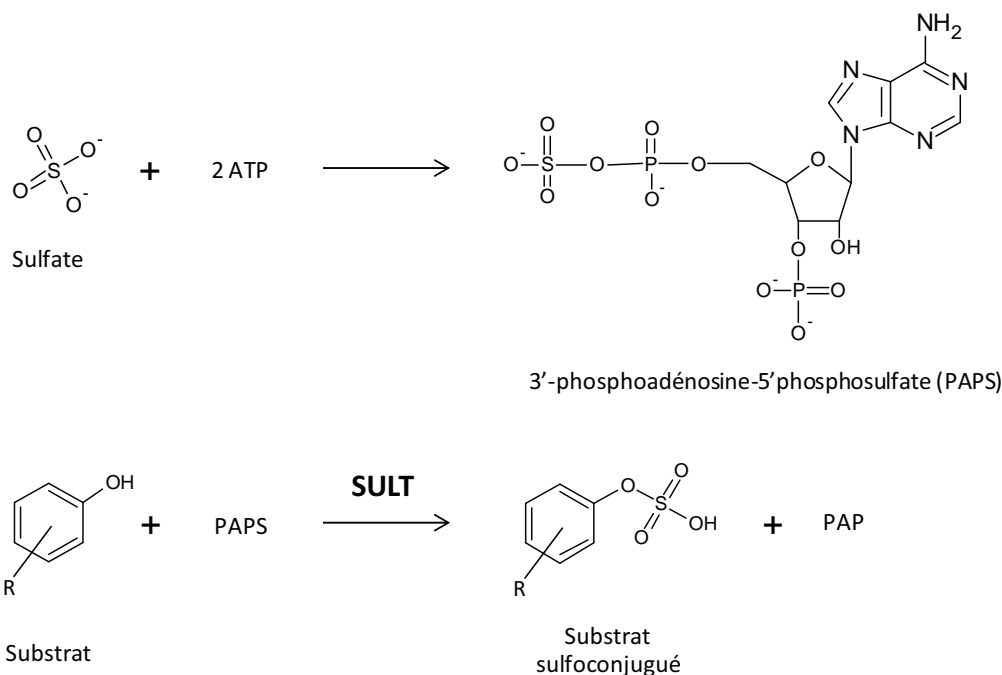


Figure 20. Formation du PAPS et réaction de sulfoconjugaion
D'après (Jancova et al. 2010).

Dans la très grande majorité des cas, la sulfatation des xénobiotiques conduit à la formation de métabolites non toxiques. Pour autant, la sulfatation de certains composés chimiques (procancérogènes) donne lieu à la formation d'intermédiaires hautement réactifs qui peuvent établir des liaisons covalentes délétères avec l'ADN. La réactivité des métabolites sulfoconjugués peut être expliquée par le caractère attracteur d'électrons du groupe sulfate conjugué au substrat. La cassure hétérolytique de la liaison de conjugaison entraîne l'apparition d'un carbocation et confère, par conséquent, à la molécule, une forte réactivité électrophile pouvant aboutir à l'établissement de liaisons covalentes avec des macromolécules endogènes. C'est le cas du saffrol, un constituant d'épices, qui est responsable, à fortes doses, d'un processus de cancérogénèse par ce mécanisme chez le rat. C'est également le cas du tamoxifène. Le tamoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes, utilisé comme anti-œstrogène dans les cancers du sein hormonodépendants. Outre ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques, le tamoxifène présente des propriétés génotoxiques chez la souris et le rat avec développement de cancers hépatiques chez cette dernière espèce. Bien que le risque de développement de cancers de l'endomètre soit légèrement augmenté chez la femme ayant pris un traitement au tamoxifène, aucune toxicité hépatique n'a été révélée par ce médicament chez l'Homme. L'explication réside dans la différence de capacité de biotransformation entre l'Homme et les rongeurs. Après une première étape d'hydroxylation du tamoxifène, la deuxième étape est majoritairement une glucuroconjugaison chez l'Homme et une sulfoconjugaison chez le rat. En effet, les activités des UGTs chez l'Homme sont plus importantes que celles observées chez le rat, et

inversement pour les activités des SULTs. Or le métabolite majoritairement formé chez le rat, à savoir le *O*-sulfoconjugué, va donner lieu à un carbocation par le mécanisme décrit auparavant et conférer le caractère génotoxique du tamoxifène. Chez l'Homme, le tamoxifène *O*-glucuronide, majoritairement formé, est stable et éliminé (Figure 21) (Boelsterli 2003; Dezentje et al. 2009; Kiyotani et al. 2012). Cet exemple illustre l'importance de la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques dans l'étude toxicologique des xénobiotiques. Enfin, il existe de rares cas de métabolites sulfatés biologiquement actifs comme le tétrabromobisphénol A (TBBPA) sulfate (Riu et al. 2011).

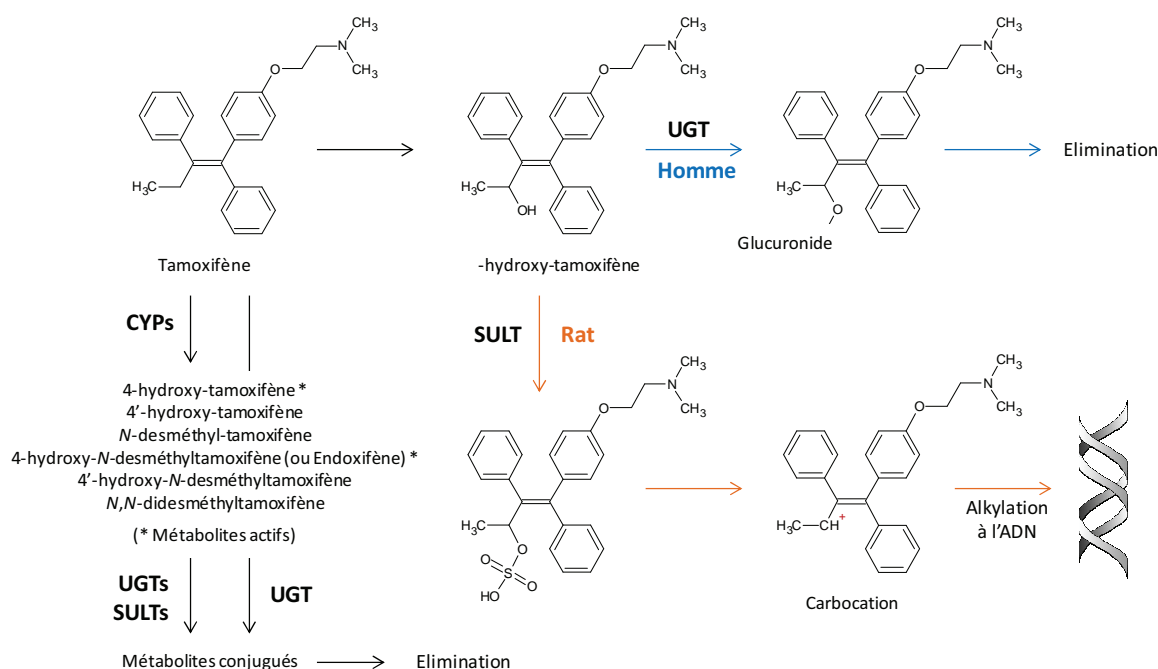


Figure 21. Voies de bioactivation et de détoxication du tamoxifène

La *O*-sulfoconjugaison (majoritaire chez le rat) de l' -hydroxy-tamoxifène entraîne la formation d'un carbocation réactif, tandis que la *O*-glucuronoconjugaison (majoritaire chez l'Homme) donne un métabolite stable et éliminé. D'après (Boelsterli 2003; Dezentje et al. 2009; Kiyotani et al. 2012).

II.2.2.3. Les N-acétyltransférases

Les *N*-acétyltransférases (NATs) catalysent le transfert d'un groupe acétyl depuis l'acétyl-coenzyme A (AcCoA) vers des amines aromatiques ou l'azote terminal d'hydrazines (Figure 22). Elles sont responsables de *O*- et de *N*-acétylation. Chez l'Homme, les NATs sont codés par deux gènes (NAT1 et NAT2). Les NATs sont des enzymes cytosoliques également présentes dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ces EMX présentent une distribution tissulaire assez distincte et une relative spécificité de substrat. Chez l'Homme les NAT1 sont exprimées dans l'ensemble des organes alors que l'activité des NAT2 a été retrouvée dans le foie, l'épithélium intestinal et le colon.

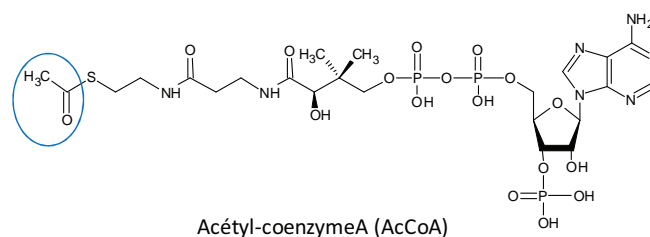
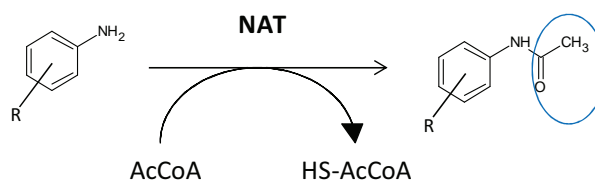


Figure 22. Réaction de *N*-acétylation des arylamines par les *N*-acétyltransférases

D'après (Jancova et al. 2010).



Les NATs sont impliquées dans des processus de bioactivation et de détoxification des xénobiotiques. Contrairement aux autres réactions de conjugaison, le transfert d'un groupe acétyl n'entraîne pas une augmentation de la solubilité aqueuse du métabolite. L'exemple le plus courant est celui des sulfonamides *N*-acétylés qui sont susceptibles de précipiter dans les urines (Hein et al. 2000; Jancova et al. 2010). Les *N*-acétylations peuvent représenter une étape de bioactivation de xénobiotiques impliqués dans des processus de cancérogénèse. C'est le cas des amines aromatiques comme la benzidine, cancérigène reconnu chez l'Homme. Cette substance était auparavant utilisée pour la production de colorants azoïques. Bien que la benzidine ne soit plus produite ni utilisée, elle demeure présente dans l'environnement notamment par la transformation bactérienne d'autres produits chimiques. La bioactivation de la benzidine fait suite à des étapes de *N*-hydroxylation et de *N*-acétylation (Figure 23). Le métabolite ainsi formé peut alors subir un réarrangement moléculaire pour donner un acétoxyarylamine. Ce composé peu stable peut se dégrader en ion nitrénium fortement réactif. Parallèlement, le métabolite *N*-hydroxylamine acétylé peut à nouveau donner la *N*-hydroxylamine par dé-acétylation. Dans un milieu légèrement acide, comme les urines, la *N*-hydroxylamine peut se dégrader pour donner le même ion nitrénium (Boelsterli 2003).

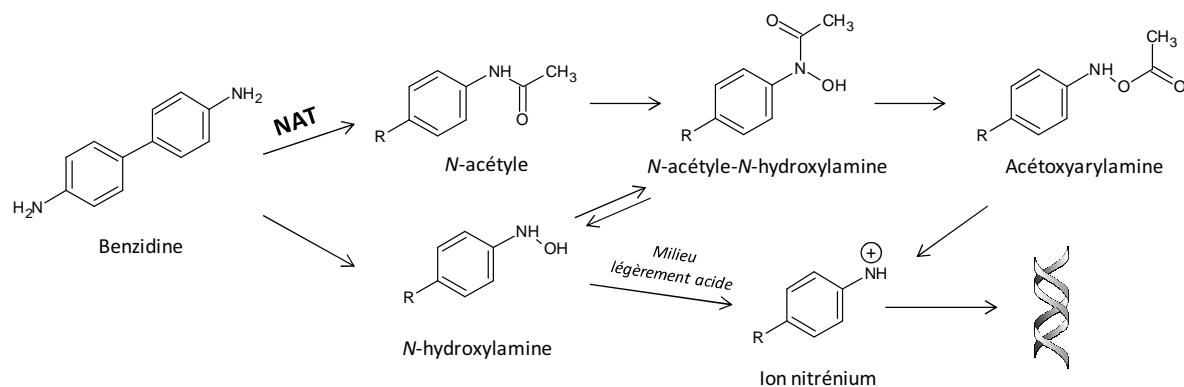


Figure 23. Etape de bioactivation de la benzidine par *N*-acétylation
D'après (Boelsterli 2003).

II.2.2.4. Les Glutathion-S-transférases

Les Glutathion-S-transférases (GSTs) catalysent le transfert d'un glutathion (GSH, tripeptide endogène) via la fonction thiol (formation d'une liaison thioéther) sur un substrat (Figure 24). Les GSTs sont responsables d'une grande variété de réactions comprenant par exemple des substitutions aromatiques nucléophiles, des isomérisations, des réductions d'hydroperoxydes ou encore des conjugaisons de composés hydrophobes et électrophiles. Les substrats pris en charge par les GSTs sont les composés capables de réagir avec une fonction thiol. Ce sont, en règle générale, des substrats électrophiles comme les époxydes, les cétones α, β -insaturées, les quinones, les sulfoxydes, les esters, les peroxydes et les ozonides. La conjugaison au glutathion est notamment essentielle dans la détoxification d'époxydes dérivés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et des cétones α, β -insaturées. Les GSTs sont également impliquées dans la prise en charge de composés endogènes comme les stéroïdes et les prostaglandines (Jancova et al. 2010).

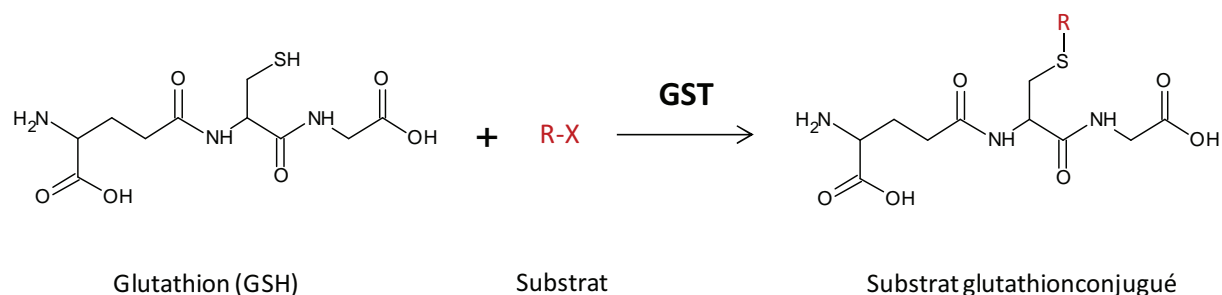


Figure 24. Réaction de conjugaison du glutathion
D'après (Boelsterli 2003).

Deux principales superfamilles de GSTs ont été décrites. La première correspond à des GSTs dimériques solubles, divisées en huit classes (Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta et Omega) et impliquées dans les processus de biotransformations de xénobiotiques et d'endobiotiques. Ces GSTs ont été retrouvées principalement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, les mitochondries et les peroxysomes. L'autre famille de GST, désignée par le sigle MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism) est impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Les GSTs solubles et les MAPEG sont largement exprimées dans l'ensemble de l'organisme (foie, rein, cerveau, pancréas, testicules, cœur, poumons, intestins, muscles squelettiques, prostate et rate) (Jancova et al. 2010; Board et Menon 2013).

Les GSTs jouent un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques et dans la protection cellulaire au stress oxydatif. Les GSTs vont notamment permettre de diminuer le stress oxydant notamment représenté par les espèces réactives de l'oxygène (radical superoxide et peroxide d'hydrogène) naturellement formé lors des réactions chimiques catalysées par des CYPs et autres oxydases. Dans beaucoup de cas, la conjugaison d'un GSH permet de neutraliser et d'inactiver un composé réactif et de favoriser son excrétion rénale (Jancova et al. 2010; Board et Menon 2013). C'est le cas des métabolites de certaines aflatoxines. Les aflatoxines sont produites par des micromycètes tels que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* qui se développent dans le sol, sur des matières organiques en décomposition, des graines d'oléagineux et des céréales dans des conditions de température et d'humidité favorables. L'aflatoxine B1 est l'une des aflatoxines les plus cancérigènes. L'oxydation de l'aflatoxine B1 par des CYPs conduit à la formation du métabolite 8,9- époxyde hautement électrophile pouvant alors établir des liaisons covalentes avec l'ADN. Toutefois, cet époxyde peut donner par hydrolyse un dihydrodiol ou bien être neutralisé par les GSTs (Figure 25). Contrairement au rat et à l'Homme, la souris est résistante à l'exposition aux aflatoxines et ne développe pas de cancers hépatiques. Une nouvelle fois, l'explication la plus probable réside en des différences de capacités de biotransformation entre espèces. En effet, l'activité des GST-A est environ 100 fois supérieure chez la souris que chez le rat et l'Homme, permettant une forte détoxification des métabolites réactifs (Eaton et Gallagher 1994; Boelsterli 2003).

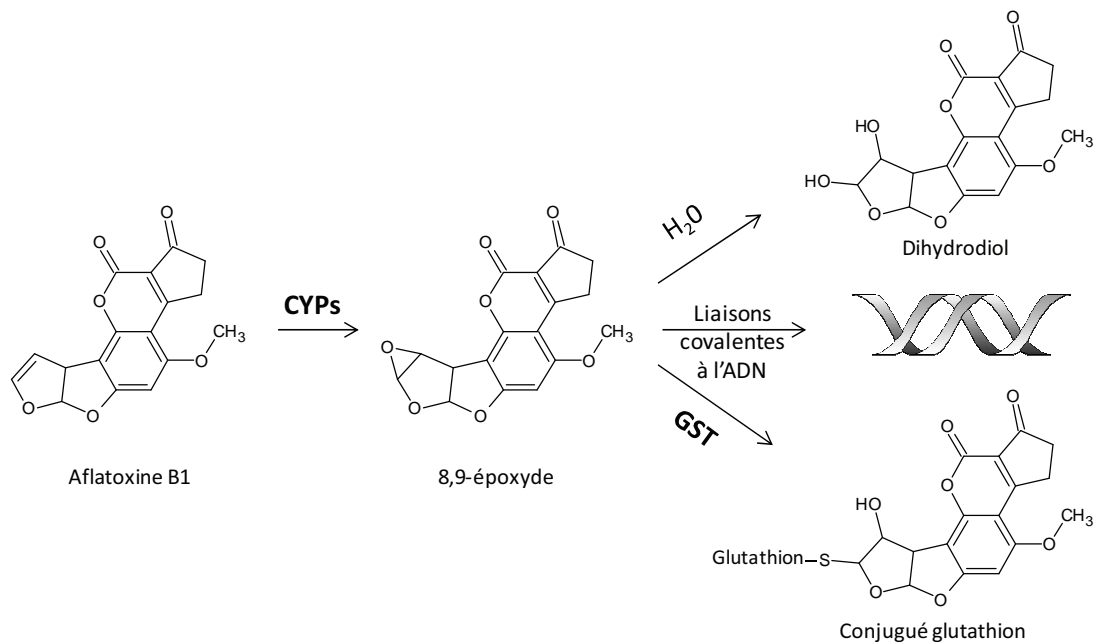


Figure 25. Activation métabolique de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde et détoxication par hydrolyse et conjugaison au glutathion

D'après (Boelsterli 2003).

La conjugaison d'un GSH peut aussi constituer une étape de bioactivation de xénobiotiques conduisant à la formation d'intermédiaires réactionnels réactifs. Les conjugués glutathions des haloalcanes sont, par exemple, réactifs. C'est le cas du 1,2-dibromoéthane (ou éthylène dibromide) utilisé dans l'industrie de la chimie pour la synthèse de colorants. Ce composé est également présent dans l'essence au plomb et à été utilisé comme pesticide par fumigation. Cette substance entraîne une toxicité aigue après inhalation mais également chronique avec l'apparition de cancers dans les modèles animaux. L'attaque successive des deux carbones du 1,2-dibromoéthane par le groupe thiol du glutathion entraîne la libération des deux atomes de Brome et la formation d'un ion épisulfonium hautement électrophile (Figure 26) (Boelsterli 2003; Guengerich 2003).

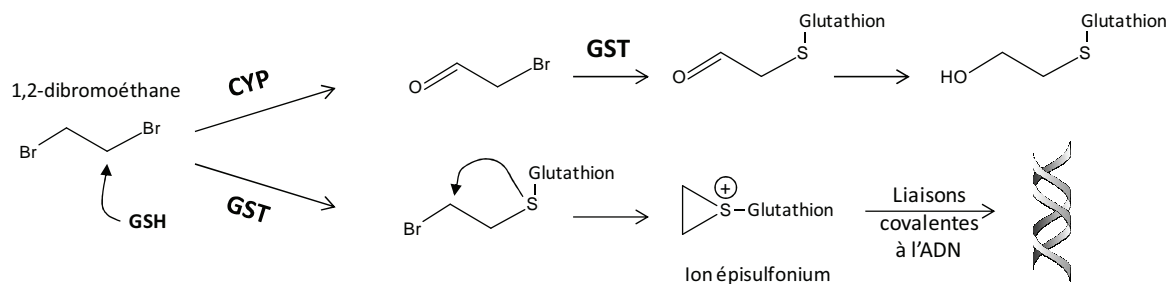


Figure 26. Voies de bioactivation du 1,2-dibromoéthane par les CYP et la GST

D'après (Boelsterli 2003; Guengerich 2003).

En conclusion, les réactions de phase I et de phase II conduisent dans la majorité des cas à la formation de métabolites dépourvus d'activité biologique. Toutefois, les EMX entraînent parfois la formation de métabolites réactifs et toxiques. Etant donné que toutes les espèces n'expriment pas qualitativement et quantitativement les mêmes EMX, il est important de noter que le devenir d'un xénobiotique entre des espèces différentes peut être variable. Il en est de même entre des modèles *in vitro* d'origine (Homme, poisson, rat, souris, cobaye par exemple) et de nature (lignées cellulaires, cultures primaires, cultures d'explants par exemple) différentes. Par conséquent, la prise en compte du devenir des xénobiotiques dans l'interprétation toxicologique d'études menées entre des modèles *in vitro* ou *in vivo*, est nécessaire.

II.3. Capacités de biotransformation des xénobiotiques chez les poissons téléostéens

La connaissance des capacités de biotransformation envers les xénobiotiques est actuellement plus approfondie dans des modèles humains et rongeurs que pour les poissons. C'est pourquoi, dans ce chapitre, les capacités de biotransformation des xénobiotiques des modèles poissons téléostéens (et en particulier du poisson zèbre) seront mises en perspective avec celles des modèles biologiques humains et rongeurs. L'évaluation du potentiel toxique des xénobiotiques peut être réalisée en utilisant des modèles biologiques provenant de différentes espèces et de différents tissus. Trois types de paramètres doivent en particulier être pris en considération dans l'évaluation toxicologique : (1) la complexité biologique des modèles (animal entier vivant, organes perfusés, culture organotypique, culture primaire de cellules, culture de lignées cellulaires, fractions subcellulaires), (2) les stades de développement des modèles animaux (embryon, fœtus, larve pour le poisson et les amphibiens, adulte), et (3) l'espèce du modèle animal ou de laquelle provient un modèle *in vitro* (poisson, rat, souris, cochon d'Inde, lapin, chien, cochon, singe, Homme, par exemple). Selon la complexité

biologique des modèles, leur stade de développement et leur origine, les capacités de biotransformation des xénobiotiques des modèles biologiques seront nécessairement différentes en nature et en intensité.

II.3.1. Les capacités de biotransformation de phase I

II.3.1.1. Les enzymes de phase I chez le poisson zèbre

II.3.1.1.1. *Les monoamines oxydases (MAO)*

Contrairement aux mammifères qui possèdent deux gènes de monoamine oxydase (MAO-A, MAO-B), le poisson zèbre comme d'autres d'espèces de poissons n'en possède qu'un. Les homologues de séquences de la MAO du poisson zèbre avec celles (MAO-A et MAO-B) du rat, de la souris et de l'Homme sont d'environ 68% (Anichtchik et al. 2006; Panula et al. 2010).

II.3.1.1.2. *Les flavines monooxygénases (FMO)*

Chez les mammifères, cinq isoformes de FMO ont été identifiées. Leur distribution tissulaire, leur régulation et leur spécificité de substrats diffèrent assez sensiblement. Seuls 5 des 11 gènes identifiés codent pour des protéines fonctionnelles chez les mammifères. L'expression des FMO peut être modifiée en fonction du régime alimentaire et de l'exposition à des hormones stéroïdiennes ainsi que lors de la gestation. Chez d'autres organismes, et notamment chez les poissons, l'hypoxie, une diminution de température et des conditions hyperosmotiques peuvent être à l'origine d'une modulation de l'expression des FMO (Lavado et al. 2013). Des FMO ont également été identifiées chez plusieurs espèces de mammifères, de vertébrés et d'invertébrés (Schlenk 1998). Chez le poisson, différentes FMO fonctionnelles ont été caractérisées dans les organes de biotransformation des xénobiotiques comme le foie, le rein, les intestins mais aussi dans les tissus olfactifs des poissons euryhalins.

II.3.1.1.3. *Les cytochromes P450 (CYPs)*

Le poisson zèbre compte 94 gènes codant pour des CYPs répartis en 18 familles également retrouvées chez les mammifères (Goldstone et al. 2010).

CYPs 5 à 51

Parmi ces gènes, 32 appartiennent aux familles 5 à 51 qui sont pour la plupart des orthologues de gènes humains. Ces CYPs prennent principalement part à la biotransformation de substrats endogènes. Le fort degré de similarité de séquences ADN de ces CYPs entre l'Homme et le poisson zèbre suggère

une conservation des activités enzymatiques. C'est notamment le cas des CYPs impliqués dans la stéroïdogénèse (CYP19 = aromatasase, CYP11A = P450_{scc}, CYP17 = 17 α -hydroxylase).

CYPs 1 à 4

Une complexité plus importante a été observée pour les CYPs jouant un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques mais aussi dans le métabolisme des acides gras, à savoir les CYP1, 2, 3, et, dans une moindre mesure, les CYP4.

CYP1

Le poisson zèbre possède 5 gènes codant pour des CYPs de la famille 1, répartis en 4 sous-familles : CYP1A, CYP1B, CYP1C1, CYP1C2 et CYP1D1. Chez l'Homme, on ne retrouve pas de CYP1C, et le CYP1D1 est un pseudogène. Les CYP1 du poisson zèbre ont tous été identifiés chez d'autres poissons ainsi que chez des tétrapodes non-mammaliens. En général, les CYP1A et 1B1 sont fortement impliqués dans la biotransformation de nombreux xénobiotiques, de stéroïdes et d'acides gras. Concernant les CYP1C et 1D1, peu d'informations sont encore disponibles quant à leurs substrats endogènes et exogènes.

CYP2

Chez le poisson zèbre, comme chez les mammifères, c'est la famille 2 de CYPs qui regroupe le plus grand nombre d'isoformes. Le poisson zèbre possède 47 gènes de CYP2 contre 16 chez l'Homme, dont seulement deux sont orthologues (CYP2R1 et CYP2U1). Chez l'Homme, le CYP2R1 correspond à la vitamine D 25-hydroxylase et le CYP2U1 exprimé dans le cerveau et le thymus catalyse l'hydroxylation (α et ω -1) d'acides gras, dont l'acide arachidonique. Les 11 gènes des CYPs de poisson zèbre des sous-familles 2N, 2P, 2V et 2AD font partie du même embranchement phylogénétique que le CYP2J2 humain, suggérant une origine commune. Les fonctions des ces 11 CYPs de poisson zèbre sont actuellement inconnues. Seules les activités des CYP2P3, 2N1 et 2N2 de poissons regroupés sous la dénomination « killifish » ont été mises en évidence et semblent être très proches de celle du CYP2J2 humain impliqué dans l'époxydation de l'acide arachidonique. La sous-famille CYP2K comprend 8 CYPs. Ce groupe de gènes codant pour ces CYPs sont en synténie avec le CYP2W1 humain qui a la particularité d'être exprimé seulement dans des cellules cancéreuses. Le CYP2K6 du poisson zèbre est responsable de la bioactivation délétère de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde impliqué dans des processus cancéreux. Toutefois, la faible expression du CYP2K6 aux stades embryonnaires et larvaires peut probablement constituer une explication à l'absence de toxicité de l'aflatoxine B1 dans les embryons de poisson zèbre avant l'âge de 5 jours après fécondation (days post fertilization ou dpf). Chez la truite arc-en-ciel l'oxydation de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde est prise en charge par un CYP de la même sous-famille, le CYP2K1 (Yang et al. 2000). Les fonctions des autres CYP2K du poisson zèbre sont méconnues. Les CYP2Y3 et 2Y4 du poisson zèbre sont en

synténie avec le cluster de gènes humains codant pour des CYP2 impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques comme les CYP2A6, 2A13, 2B6, 2F1.

CYP3

Le génome du poisson zèbre comprend 5 gènes de CYP3 à savoir, le CYP3A65 et quatre CYP3C (3C1 à 3C4). Contrairement à l'Homme qui possède 4 CYP3A, le poisson zèbre n'en possède qu'un, le CYP3A65. Ce dernier partage 54% d'homologie de séquences avec le CYP3A4 humain. Toutefois, les CYP3C du poisson zèbre sont en synténie avec les CYP3A3, 3A4 et 3A7 humains. Il a été montré pour d'autres espèces de poissons que des CYP3A sont présents et jouent un rôle dans la 6 - hydroxylation de la testostérone (James et al. 2005). Concernant les CYPs de la famille 4, le poisson zèbre possède 4 gènes codants pour les CYP4F43, 4T8, 4V7 et 4V8 contrairement à l'Homme qui en possède 12.

CYP4

Chez les mammifères, les CYP4 jouent un rôle dans l'hydroxylation d'acides gras et, dans une moindre mesure que les CYP1, 2 et 3, dans la prise en charge de xénobiotiques comme les phtalates ou l'acide perfluorooctanoïque (PFOA).

Expression temporelle des CYPs

Comme illustré par l'exemple de l'époxidation de l'aflatoxine B1 et du CYP2K6 du poisson zèbre, l'interprétation des résultats toxicologiques se doit de prendre en considération les différences d'expression des EMX selon les stades de développement de l'organisme considéré. Chez le poisson zèbre, l'expression de transcrits de certains CYPs peut varier d'un facteur 10 durant son développement (Goldstone et al. 2010). C'est le cas des CYP2P6, 11A2, 26A1, 26B1, 2AA7-AA9, 2AA12, 2Y3, 2Y4 et CYP20. Entre 3 heures après fécondation (heures post fertilization ou hpf) et 48 hpf, certains CYPs ont leur maximum d'expression à 3 hpf, d'autres à 48 hpf, d'autres entre ces deux temps de développement. Certains CYPs comme les CYP2K22, 2N13, 3A65 et 8B1 semblent avoir une expression bimodale, avec un maximum à 3 hpf et à 48 hpf, contre 2 h et 36 hpf pour les CYP5A1, 21A1, 2K17, 8B3 et 4T8. Bien qu'appartenant à la même sous-famille, les CYP2P10, 2P14, 2AD2, 2AD6 sont fortement exprimés à 3 hpf alors que les CYP2P6, 2P7 et 2V1 sont fortement exprimés entre 6 et 12 hpf. Le fort taux de transcrits de certains CYPs dès 3 hpf suggère une origine maternelle. Ces transcrits maternels seraient alors présents dans l'œuf au stade 1 cellule. La recherche de transcrits de CYPs dans les œufs non fécondés a montré une expression significative des CYP1A, 2V1 et 2AA4.

Le tableau 11 présente des exemples de caractérisation de l'activité catalytique d'enzymes de phase I notamment chez le poisson zèbre.

Tableau 11. Caractérisation des activités catalytiques d'enzymes de phase I chez le poisson
 ADH : alcool désydrégénases ; MAO : monoamine oxydase ; MPTP : 1 méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine ; dpf : days post fertilization soit jour après fécondation ; hpf : hours post fertilization soit heures après fécondation

Enzyme	Espèce	Genre	Cibles	In vivo	Organes ou tissus	In vitro	Substrat	Test fonctionnel	Référence
MAO	<i>Danio rerio</i>	M et F	ARNm	Adulte	cerveau>intestins>foie>coeur>branchies	-	Tyramine>sérotinine>phényléthylamine>MPTP>dopamine	Mesure du taux de H ₂ O ₂ lors de l'oxydation d'amines	(Anichtchik et al. 2006)
	<i>Danio rerio</i>	-	ARNm	Embryon et larve : 4 – 144 hpf : ↑ Adulte	- foie	-	-	-	(Dasmahapatra et al. 2001)
ALD	<i>Danio rerio</i>	-	ARNm	24 hpf – 6 dpf 8B stable, 8A ↑ Adulte	- foie>cerveau, nageoire, branchies, coeur, rein, muscle	-	8A : Ethanol (pas 8B) 8B : pentanol, hexanol, octanol	Mesure du taux de NADH formé	(Reimers et al. 2004)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	Protéines	Adulte	foie, rein, branchies, intestins	-	Aldicarbe	-	(Schlenk et Buhler 1991) (Schlenk 1995)
FMO	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	Protéines et ARNm	Juvenile (5 mois)	activités catalytiques : foie>intestins>tissus olfactifs>rein	-	Méthyl-p-tolyl sulfide (MITS) et Benzylamine (BZN)	Activités enzymatiques : p-tolyl sufoxydation (MITS) et benzylamine N-oxygénation (BZNO)	(Lavaado et al. 2013)
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-		Juvenile	activités catalytiques : foie>intestins>tissus olfactifs	-			(Lavaado et al. 2014)
	<i>Danio rerio</i>	M et F	ARNm	Adulte	Foie et ovaire (cerveau, yeux, intestins, coeur, branchies, testicules, muscle : ARNm absent)	-	-	-	(Wang-Buhler et al. 2005)
3A65	<i>Danio rerio</i>	-	hybridation <i>in situ</i>	Larve	Expression du CYP dès 72 hpf dans le foie et dès 84 hpf dans le l'intestin	-	-	-	(Tseng et al. 2005)
CYP	1A	-	-	-	-	Clonage des séquences des CYPs chez <i>E. coli</i> et purification des CYPs.	7-Ethoxyrésorufine (ER) 7-Méthoxyrésorufine (MR) 7-Benzoylrésorufine (BR) 7-Pentoxylrésorufine (PR) 7-Benzoyloxy-4-(trifluorométhyl)coumarine (BFC) 7-Méthoxy-trifluorométhylcoumarine (MFC) Benzo[a]pyrène (BaP)	Activité catalytique des CYPs en présence de substrats : -ER : 1A>1C2>1B1, 1C1>1D1 -MR : 1A>1C1, 1C2>1B1 -BR : 1A, 1B1>1C1, 1C2>1D1 -PR : 1A, 1C1>1C2>1D1 -MCF et BCF (déalkylation) : 1A>>1C1, 1C2, 1B1 (1B1 : MCF seulement) - tous les CYP is → BaP-1,6-dione + BaP-3,6-dione - CYP1B1 et 1C2 → 3-hydroxy-BaP - CYP1A et 1C1 → BaP-7,8-dihydroxydiol + 3-hydroxy-BaP	(Scornatenchi et al. 2010b)
	1B1								
	1C1								
	1C2								
	1D1								
1A 1B1 1C1 1C2 1D1 3A65	<i>Danio rerio</i>	-	-	-	-	Clonage des séquences des CYPs chez <i>E. coli</i> et purification des CYPs.	17 -estradiol (E2)	Implication des CYPs dans le métabolisme de l'E2. 2-OHE2 produit par tous ces CYPs 4-OHE2 non produit par 1D1 et 3A65 16 -OHE1 produit par A1 Taux de métabolisme de E2 : 1A, 1C1>>1C2>>1B1, 1D1, 3A65	(Scornatenchi et al. 2010a)
<i>Danio rerio</i>	-	-	Larve	-	-	-	BaP -naphthoflavone	↑ activité EROD mesurée entre 4 et 8 dpf	(Noury et al. 2006)

II.3.1.2. Capacités de biotransformation liées aux CYP dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme.

De nombreuses études toxicologiques utilisent des modèles *in vitro* humains afin d'évaluer l'effet d'un xénobiotique. La nature du modèle *in vitro* (lignées cellulaires et cultures primaires par exemple) et son origine tissulaire (foie et glande mammaire par exemple) sont autant de facteurs pouvant faire varier la nature et la quantité d'EMX et notamment les CYPs. *A fortiori*, le devenir d'un xénobiotique entre des modèles *in vitro* d'espèces différentes (Homme et poisson zèbre par exemple) est probablement différent. C'est pourquoi, il est important de considérer les capacités de biotransformation, notamment de phase I, entre les modèles biologiques afin de mieux pouvoir interpréter les résultats toxicologiques. C'est pourquoi le tableau suivant (Tableau 12) présente les capacités de phase I connues entre des modèles issus d'espèces différentes (Homme et poissons), de natures différentes et d'origines tissulaires différentes. Les capacités de biotransformation de ces modèles cellulaires sont très variables. Le modèle cellulaire pour lequel cette caractérisation est la plus importante est HepaRG (Gripon et al. 2002). L'expression d'EMX de phase I dans la lignée cellulaire HepaRG se rapproche le plus de celle d'hépatocytes humains en culture primaire. Pour les autres modèles cellulaires, bien que certaines études rapportent des taux d'expression de gènes d'EMX ou bien des activités fonctionnelles, encore peu de données sont actuellement disponibles. La connaissance parcellaire des capacités de biotransformation de ces modèles montrent la nécessité d'approfondir la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques eu égard au rôle que jouent les EMX dans les profils toxicologiques des xénobiotiques.

Tableau 12. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux CYPs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson

EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase, DMBA :7-12-diméthyl-benz[a]anthracène hydroxylase

	Modèle cellulaire	Origine	Utilisation	ARNm de CYPs	Test fonctionnel de CYPs	Référence	
Humain	Culture primaire	Hépatocytes (H)	Foie	Toxicologie hépatique	Expression des ARNm des CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43, 7A1	-	(Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
	Lignée cellulaire	HepaRG (RG) (Gripon et al. 2002)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique	-Globalement : H>RG>G2 -CYP1A1, 3A4, 7A1 : RG≥H>G2 -H: 3A4, 2C8>2E1, 2A6>3A5, 3A7, 2D6, 2C19 -RG: 1A1, 7A1>3A4>3A7, 2C9, 2C19>1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2E1>2D6 -G2: 7A1>3A7, 2C19>2A6, 2D6	-Activité basale CYP1A faible mais fortement induite -Activités basales CYP2C9, 2E1, 3A4	(Aninat et al. 2006) (Guillouzo et al. 2007) (Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
		HepG2 (G2) (Knowles BB et al. 1980)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique		-	(Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
		MELN (Balaguer et al. 1999)	Cancer du sein. Cellules MCF-7 modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	MCF-7 : Expression basale des ARNm et des protéines des CYP1A1, 1A2, 1B1	-	(Coumoul et al. 2001) (Szafer et al. 2012) (Piotrowska et al. 2013)
		T47D-KBLuc (Wilson et al. 2004)	Cancer du sein. Cellules T47D modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	T47D : expression (ARNm) basale et induite du CYP1B1. Expression du 1A1 après induction	-	(Angus et al. 1999) (Coumoul et al. 2001)
Poisson	Culture primaire	Hépatocytes de truite arc-en-ciel	Foie d' <i>Oncorhynchus mykiss</i> adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-	Activité basale EROD (CYP1A) augmentée par inducteurs	(Pesonen et Andersson 1991) (Cravedi et al. 1996) (Laville et al. 2004) (Grans et al. 2010)
		Hépatocytes de poisson zèbre	Foie de <i>Danio rerio</i> adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	Expression (ARNm) CYP1A1 et 3A65 (Mâle>Femelle)	-	(Eide et al. 2014)
	Lignée cellulaire	ZFL (Gosh et al. 1994)	Foie normal de <i>Danio rerio</i> adulte	Toxicologie hépatique	Faible expression basale des ARNm des CYP1A1 et 3A65	Activité EROD et DMBA augmentées par inducteurs	(Miranda et al. 1993) (Collodi et al. 1994) (Eide et al. 2014)
		PLHC-1 (Hightower et Renfro, 1988)	Hépatocarcinome de <i>Poeciliopsis lucida</i>	Toxicologie hépatique	-	Faible activité basale EROD Inhibition de l'activité basale EROD Activités CYP3A-like et 2K-like	(Laville et al. 2004) (Thibaut et al. 2009) (Della Torre et al. 2011)

II.3.2. Les capacités de biotransformation de phase II

II.3.2.1. Glucuroconjugaison et sulfoconjugaison chez le poisson zèbre

II.3.2.1.1. Les UGTs

Chez les mammifères, les gènes *UGTs* sont classés en deux familles : *UGT1* et *UGT2*. Chez le poisson zèbre, la description récente du répertoire des gènes *UGTs* (Huang et Wu 2010) a mis en évidence 45 gènes *UGTs* divisés en 3 familles : *UGT1*, *UGT2* et *UGT5*. Les familles 1 et 2 sont elles-mêmes divisées en deux clusters a et b : *UGT1a*, *UGT1b*, *UGT2a* et *UGT2b*. Les familles 1 et 2 du poisson zèbre sont génétiquement proches des familles 1 et 2 codant pour les UGTs des mammifères. La famille 5 a seulement été identifiée à ce jour chez les amphibiens et les poissons téléostéens.

Chez le poisson zèbre adulte, l'expression des transcrits des isoformes des gènes *UGTs* est très variable selon les tissus (Wang et al. 2014) (Tableau 13). D'autres résultats, qui diffèrent parfois de ceux de Wang et al. (2014) suggèrent que les transcrits des *UGT1a*, *UGT1b*, et *UGT5a4* sont plus fortement exprimés dans le foie chez les mâles que chez les femelles. Il en est de même pour les transcrits des *UGT1b* dans les testicules, des *UGT5a1* et *5a3* dans les intestins chez le mâle, et de l'*UGT5c2* dans le cerveau mâle (Christen et Fent 2014). Chez la larve de poisson zèbre, l'expression des transcrits des *UGTs* varie également selon l'âge de développement. L'expression des 7 *UGTs 1a*, *1b*, *5a1*, *5a3*, *5a4*, *5c2* et *5c3* est plus élevée à 24 hpf qu'à 48 hpf. Leur taux d'expression augmente dans les heures qui suivent (72, 96, 120 hpf). Contrairement aux autres *UGTs*, l'expression du *5a5* est plus faible à 24 hpf qu'à 48 hpf (Christen et Fent 2014).

Chez les mammifères aussi bien que chez les poissons, l'expression des *UGTs* diffère selon les tissus. Chez l'Homme, les *UGTs* majoritaires dans le foie sont les *UGTs 2b4*, *1a9*, *2b7*, *1a4*, *2b10*, *1a1* (par ordre décroissant), alors que chez le poisson ce sont les *UGTs 1a1*, *1a3*, *1b7*, *2a3*, *2a5* et *5a1*. Chez l'Homme, les isoformes *2a3*, *1a10*, *1a1*, *1a6* et *2b7* sont les plus exprimées dans l'intestin grêle, et les isoformes *1a10* et *2a3*, dans le colon. Chez le poisson zèbre les *UGTs* majoritaires dans l'intestin sont les isoformes *1a1*, *1a3*, *2a1*, *2a3*, *2b1* et *5a1* (Christen et Fent 2014).

Avec l'objectif d'évaluer l'activité biologique de plusieurs UGTs du poisson zèbre, Wang et al. ont exprimé dans les cellules HEK293T les protéines correspondantes puis ont vérifié leur fonctionnalité à l'aide de substrats de référence. Les composés phénoliques et les acides carboxyliques sont majoritairement pris en charge par les UGTs de la famille 1. Les UGT 1A1, 1A7, 1B1 possèdent la plus forte activité envers ces substrats. L'UGT1A1 est, par exemple, la plus fortement impliquée dans la conjugaison du bisphénol A. Contrairement à la famille 1, les UGTs de la famille 2 et 5 possèdent une faible activité envers les composés phénoliques. Par ailleurs, il a été montré que la prise en charge de l'œstradiol (E2) était principalement réalisée par les UGT1A1, 1B1, 5A5, 5B2 et 5E1, celle de la testostérone par les UGT5A5 et 5E1, et celle de la bilirubine par le 1B7 (Wang et al. 2014).

Tableau 13. Taux d'expression des gènes UGTs (ARNm) dans différents tissus issus du poisson zèbre adulte âgé de 6 mois
u1 et u2 sont des variants des isoformes. D'après (Wang et al. 2014).

Familles d'UGTs	Isoformes	Cerveau	Yeux	Branchies	Cœur	Reins	Rate	Foie	Intestins	Ovaires	Testicules	Muscle	Corps entier	
1	a1	+	0	+	0	0	++	+++	+++	+/0	+++	+/0	+++	
	a2	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0/+	
	a3	0	0	0	0	0	0	+++	+++	0	+	0	+++	
	a4	0	0	+	0	0	+/0	++	++	0	+	0	+++	
	a5	0	0	+++	0	+	0	+/0	0	0	0	0	+	
	a6	0	0	0	0	0	0	+	+/0	0	0	0	0	
	a7	0	0	+	0	0	0	0	++	0	0	0	0	
	b1	+	+	++	++	+	+	+	+	+	0	0	+	+
	b2	0	0	0	0	+/0	0	0	+	+	0	0	+/0	+
	b3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0
	b4	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+
	b5	0	0	0	0	0	+/0	0	+	0	0	0	0	+
	b7	0	0	0	0	0	0	0	+++	+	0	+/0	+/0	+
	2	a1	0	0	++	+	++	++	++	+++	+	++	+	++
a2		0	0	0	0	+/0	+/0	+	+	+/0	+	+/0	+/0	
a3		+/0	+	+	+	+	+	+++	+++	++	++	+	++	
a4		0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	
a5		++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+++	
a6		0	0	+	+	+/0	+/0	+	+	+	+	0	++	
b1		0	0	0	0	0	0	+	++	+++	0	+	+/0	
b3		0	0	0	0	0	0	0	++	++	0	+/0	0	++
b5	0	0	+/0	0	++	+/0	++	++	0	++	0	0	+++	
b6	0	0	0	0	+/0	0	0	+	0	+/0	0	0	0	
5	a1	0	+	0	0	0	+	++	+++	0	+/0	0	++	
	a2	0	+/0	0	0	+/0	+	++	+	0	+/0	0	++	
	a3	0	0	0	0	0	0	+/0	+/0	0	0	0	+	
	a4	0	0	0	0	0	0	++	++	0	0	0	++	
	a5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+/0	+	++	
	b1 (u1)	0	0	+	+/0	+/0	++	+/0	+/0	0	0	0	+/0	
	b1 (u2)	0	0	+	0	+	+	+	+	+/0	0	0	+	
	b2 (u1)	+	+	+	0	+	++	++	+	+	+	+	+	
	b2 (u2)	0	+	++	0	+	0	0	0	0	0	0	++	
	b3	0	0	0	0	0	0	0	+/0	+	0	0	0	++
	b4	+	+	+	0	++	+	+	+	+	0	+/0	0	+
	c1	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0	0	+/0	0	0
	c2	0	+/0	0	0	+	++	++	+++	++	++	+/0	0	+++
	c3	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	d1	0	0	0	0	0	0	0	++	++	0	+/0	0	++
	e1	0	0	+/0	+/0	+/0	0	0	0	0	0	+/0	0	+
	f1	++	0	++	++	++	0	+	+	++	+++	+	+	+++
	g1	+	0	++	++	++	0	++	++	++	++	++	+/0	++
g2	0	+++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0	

II.3.2.1.2. Les SULTs

Chez l'Homme, quatre familles de SULTs ont été identifiées (SULT 1, 2, 4 et 6) regroupant 13 isoformes (Gamage et al. 2006). Chez le poisson zèbre, 20 SULTs réparties en 6 familles (SULT 1, 2, 3, 4, 5 et 6) ont été mises en évidences (Sugahara et al. 2003; Kurogi et al. 2013). Chez l'Homme, les SULTs de la famille 1 sont : SULT1A1 et 1A2 (considérés comme les principales SULTs impliquées dans les processus de détoxification), SULT1A3 (spécifiquement impliquée dans la conjugaison de la dopamine et des catécholamines), SULT1B1 (sulfatation des hormones thyroïdiennes), SULT1C2 et 1C4 (impliquées notamment dans la bioactivation des hydroxyarylamines) et SULT1E1 (métabolisme

des œstrogènes). Parmi la famille 2 on trouve : SULT2A1 (sulfatation de la déhydroépiandrostérone), SULT2B1a (métabolisme du cholestérol), SULT2B1b (métabolisme de la prégnénolone). Enfin, il a été montré qu'une SULT de la famille 4 est présente au niveau cérébral. Quant à la SULT 6, elle n'est pas encore totalement caractérisée (Kurogi et al. 2013). Chez le poisson zèbre, un recouvrement très important des substrats endogènes et exogènes des SULTs a été mis en évidence (Tableau 14). Toutefois, les SULT1 (ST1, ST2 et ST3) ont montré les plus fortes activités envers de nombreux médicaments, même si des SULTs appartenant à d'autres familles sont également impliquées dans leur prise en charge (Kurogi et al. 2010; Kurogi et al. 2013).

Tableau 14. Exemples de substrats endogènes et exogènes des SULTs du poisson zèbre

D'après (Liu et al. 2010; Kurogi et al. 2013).

Famille de SULT	Isoforme de SULT	Substrats endogènes	Substrats exogènes
1	ST1	Déhydroépiandrostérone, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST2	Déhydroépiandrostérone, L-dopa, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST3	Déhydroépiandrostérone, L-dopa, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol, anisole hydroxybutylé
	ST4	Déhydroépiandrostérone, estrone, thyroxine	Génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol, anisole hydroxybutylé
	ST5	Hormones thyroïdiennes	Bisphénol A , anisole hydroxybutylé, génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol
	ST6	Estrone, 17 -œstradiol	anisole hydroxybutylé, génistéine, 2-naphtol, <i>p</i> -nitrophénol
	ST7	Non connu	Paracétamol, daidzéine, génistéine, 2-naphtol, PCBs hydroxylés
	ST8	Non connu	3-chloro-4-biphenylol, daidzéine, PCBs hydroxylés
2	ST1	17 -œstradiol, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	Non connu
	ST2	17 -œstradiol, estrone, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	Non connu
	ST3	Corticostérone, 17 -œstradiol, déhydroépiandrostérone, prégnénolone	Non connu
3	ST1	17 -œstradiol, estrone, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	Bisphénol A , diéthylstilbestrol, 17 -éthynylestradiol, tetrachlorobiphényldiol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST2	Corticostérone, 17 -œstradiol, prégnénolone, hydrocortisone	3-chloro-4-biphenylol, désipramine, diéthylstilbestrol, 17 -éthynylestradiol, tetrachlorobiphényldiol
	ST3	Corticostérone, 17 -œstradiol, prégnénolone, hydrocortisone	Bisphénol A , désipramine, diéthylstilbestrol, dextorphan, hydrozine, minoxidil, troglitazone
6	-	Dopamine, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, <i>p</i> -nitrophénol

Chez la larve de poisson zèbre, la nature des SULTs exprimée est moins bien caractérisée. Il est cependant notable qu'elle est très variable selon les heures de développement (Tableau 15).

Tableau 15. Taux d'ARNm des SULTs selon le stade de développement du poisson zèbre

La quantité d'ARNm est représentée par les nuances de gris allant du blanc (absence d'ARNm) au noir. NF : œuf non fécondé, hpf : heure après fécondation (hours post fertilization), M : mâle, F : femelle, IND : indifférencié, n.r.: non recherché. D'après (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008).

SULTs	NF	Hpf									Semaine après fécondation				Mois		
		0	1	3	6	12	24	48	72	1	2	3	4	M	F	IND	
														3	3	3	
1	ST1													n.r.	n.r.		
	ST2													n.r.	n.r.		
	ST3													n.r.	n.r.		
	ST4													n.r.	n.r.		
	ST5													n.r.	n.r.		
	ST6													n.r.	n.r.		
2	ST1															n.r.	
	ST2															n.r.	
	ST3															n.r.	
3	ST1															n.r.	
	ST2															n.r.	

II.3.2.2. Capacités de biotransformation liées aux UGTs et aux SULTs dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme.

La caractérisation de l'expression des transcrits des UGTs et SULTs dans les modèles cellulaires humains et hépatiques montre que les UGTs sont davantage exprimées dans les hépatocytes humains en culture primaire, et le modèle cellulaire HepaRG que dans les cellules HepG2 (Tableau 16). Pour les SULTs, l'expression des transcrits semble être la même entre ces modèles cellulaires. Aucune ou très peu d'informations sont disponibles pour les lignées cellulaires humaines issues des glandes mammaires (MELN, T47DKBLuc) et les modèles cellulaires de poissons (Hépatocytes en culture primaire, ZFL et PLHC-1). Ce défaut d'information montre la nécessité d'approfondir la caractérisation des capacités de biotransformation de ces modèles *in vitro* utilisé en toxicologie.

Tableau 16. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux UGTs et SULTs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson

		Modèle cellulaire	Origine	Utilisation	ARNm des UGTs et SULTs		Activité fonctionnelle	Référence
Humain	Culture primaire	Hépatocytes (H)	Foie	Toxicologie hépatique	UGTs Expression des ARNm des UGTs 1A, 1A6, 2A3, 2B4, 2B15, 2B17, 2B28, 3A1 et 8 Globalement : H>RG>G2	SULTs Expression des ARNm des SULTs 1A1, 1A2, 1B1, 1C2, 1C4, 1E1, 2A1 Globalement : H=RG=G2	-	(Hart et al. 2010) (Westerink et Schoonen 2007)
		HepaRG (RG)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique			-	(Hart et al. 2010)
	Lignée cellulaire	HepG2 (G2)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique	-H: 1A, 2B4, 2B28 > 2A3, 2B15, 3A1 > 1A6, 2B17, 8 -RG: 1A, 2B4, 2B15, 2B28 > 1A6, 2A3 > 2B17, 3A1, 8 -G2: 2B28, 2A3 > 1A, 2B4, 2B15, 3A1, 1A6, 2B17, 8	H, RG et G2: 1A1, 1A2, 2A1 > 1B1 1C2, 1C4, 1E1	-	(Hart et al. 2010) (Westerink et Schoonen 2007)
		MELN	Cancer du sein. Cellules MCF-7 modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	MCF-7 : UGT2B15		-	(Harrington et al. 2006)
		T47D-KBLuc	Cancer du sein. Cellules T47D modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	T47D : UGT2B15		-	(Harrington et al. 2006)
Poisson	Culture primaire	Hépatocytes de truite arc-en-ciel	Foie d' <i>Oncorhynchus mykiss</i> adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-	-	-	-
		Hépatocytes de poisson zèbre	Foie de <i>Danio rerio</i> adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-	-	-	-
	Lignée cellulaire	ZFL	Foie normal de <i>Danio rerio</i> adulte	Toxicologie hépatique	-	-	-	-
		PLHC-1	Hépatocarcinome de <i>Poeciliopsis lucida</i>	Toxicologie hépatique	-	Testostérone → conjugué sulfate 1-naphthol → conjugués glucuronide et sulfate	-	(Thibaut et al. 2009)

II.3.3. Exemples de biotransformation chez le poisson zèbre par les EMX de phase I et II

Il n'existe pas beaucoup d'exemples pour lesquels une comparaison directe et détaillée puisse être faite entre poisson zèbre et mammifères. L'une des comparaisons de biotransformation actuellement les mieux étayées par la littérature est celle du 17 -œstradiol (E2). Chez les mammifères, les CYP1 et 3A sont majoritairement responsables de la biotransformation de l'E2 en métabolites oxydés tels que la 2-OH-E2, la 4-OH-E2, la 16 -OHE1. Contrairement aux mammifères, il semble que chez le poisson zèbre, les CYP1A et 1C soient les principales isoformes impliquées dans la biotransformation

de l'E2 (Scornaienchi et al. 2010a) avec des taux plus élevés de biotransformation lors d'incubations réalisées avec les CYP1A et 1C1, et dans une moindre mesure pour celles réalisées avec le CYP 1C2. Quant aux CYP1B1, 1C2 et 3A65, ils ne sont responsables que de la formation en faible proportion des métabolites.

Différentes études ont montré la capacité du poisson zèbre à prendre en charge la biotransformation de la testostérone. La formation de la 6 -hydroxytestostérone démontre la présence d'une activité équivalente à l'activité CYP3A4/5 humaine dans la prise en charge de la testostérone chez la larve (Alderton et al. 2010; Chng et al. 2012), les hépatocytes de poisson zèbre (Reschly et al. 2007) ainsi que les microsomes hépatiques de poisson zèbre (ZLM) (Chng et al. 2012). Chez la larve, un seul métabolite hydroxylé a été identifié alors que quatre l'ont été dans les hépatocytes, à savoir les métabolites de la testostérone hydroxylés en position 6 , 15 , 16 et 16 . Chng et al. a mis en évidence encore davantage de métabolites formés suite à l'incubation de la testostérone dans les ZLM : 2 -, 6 -, 16 -hydroxytestostérone, et 3 autres métabolites potentiels non identifiés. Cette même étude a également mis en évidence la formation de la 6 -hydroxytestostérone ainsi qu'un conjugué glucuronide et un métabolite non identifié dans les homogénats de larves âgés de 5 dpf et dans le milieu de culture. Les études de docking *in silico* de Chng et al. semblent indiquer l'implication des CYP3A65 et 3C1 dans le métabolisme de la testostérone. Les profils de biotransformation de la testostérone semblent différer selon les espèces. Bien que le métabolite majoritaire (la 6 -hydroxytestostérone) soit commun, davantage de métabolites hydroxylés semblent être formés par les ZLM que par les HLM (human liver microsome) (Chng et al. 2012).

Chez l'Homme, différents CYPs (2E1, 1A2, 3A4) peuvent être impliqués dans la bioactivation du paracétamol en un métabolite réactif, la *N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), inactivée par la conjugaison au glutathion. L'hépatotoxicité du paracétamol, médicament de référence, a également été démontrée chez le poisson zèbre (North et al. 2010) pour qui la formation du NAPQI a été mise en évidence avec les ZLM. Toutefois, la formation de NAPQI semble être quantitativement inférieure à celle obtenue avec des HLM (Chng et al. 2012). Des différences de cytotoxicité et de biotransformation du paracétamol ont déjà été observées entre le rat, la souris et l'Homme (Jemnitz et al. 2008). Les études de docking de Chng et al. mettent en avant l'implication possible des CYP3A65 et 3C1 dans la bioactivation du paracétamol (Chng et al. 2012). Cet exemple illustre la nécessité de caractériser les capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés à des fins toxicologiques, et ce notamment lorsque des comparaisons inter-espèces doivent être faites avant de pouvoir extrapoler les données. L'étude de la biotransformation d'un autre médicament, l'ibuprofène, a été réalisée chez le poisson zèbre à l'état larvaire (Jones et al. 2009). Le principal métabolite formé chez les mammifères, l'hydroxy-ibuprofène, a été retrouvé dans l'eau et dans les homogénats de

larves. Ces résultats démontrent qu'à un stade précoce de développement (72-96 hpf), la larve est déjà dotée de capacités oxydatives rappelant les activités CYP2C9 et 2C19 humaines. D'autres études ont montré la capacité de la larve de poisson zèbre âgée de 7 dpf à réaliser des oxydations, mais aussi des *N*- et des *O*-déméthylations, des *N*-déalkylations, des sulfatations et des glucuronidations (Alderton et al. 2010) de composés pharmaceutiques comme le cisapride, le vérapamil et la chlorpromazine. Le cisapride est majoritairement transformé en *N*-sulfate par la larve âgée de 7 dpf. Chez les mammifères, ce métabolite est minoritaire et n'a été observé que chez le chien. Les principales biotransformation de phase I et II du cisapride (pipéridine *N*-déalkylation, oxydation du noyau fluorphényl, oxydation en 3-hydroxy cisapride, glucuronoconjugués) observées chez l'Homme ne sont pas retrouvées chez la larve de poisson zèbre. La biotransformation du vérapamil par la larve donne lieu à la formation de métabolites également retrouvés chez l'Homme. Toutefois, d'autres métabolites oxydés ont été retrouvés chez la larve. Il a aussi été montré que la larve de poisson zèbre était capable de former le paracétamol à partir de la phénacétine, réaction catalysée chez l'Homme par le CYP1A2. De même, la larve est capable de déméthylater le dextrométhorphan en dextrophan, réaction catalysée chez l'Homme par le CYP2D6 (Alderton et al. 2010).

L'ensemble de ces données montrent que le poisson zèbre est doté de capacités de biotransformation des xénobiotiques non seulement chez les adultes mais également au stade larvaire. La majorité des informations disponibles sont relatives à des taux d'expression de transcrits d'EMX et non à une caractérisation fonctionnelle des enzymes. De plus, ces informations (stades de développement, activité enzymatique, répartition tissulaire) sont variables selon la nature des enzymes considérées (CYPs, UGTs, SULTs). Il est évident que la caractérisation de capacités de biotransformation des modèles cellulaires du poisson, et notamment du poisson zèbre est encore parcellaire. Une caractérisation plus approfondie à des fins toxicologiques est nécessaire non seulement pour mieux caractériser le modèle poisson zèbre, mais aussi pour permettre des approches comparatives entre espèces et entre stades de développement.

Enfin, l'expression de ces EMX dans les modèles *in vivo* et *in vitro* étant sous le contrôle de mécanismes de régulation, la compréhension de ces mécanismes et de leur modulation par les xénobiotiques constituent également des considérations clefs pour l'interprétation des résultats toxicologiques.

II.4. Mécanismes de régulation de l'expression des enzymes de biotransformation

L'exposition des organismes (ou des systèmes cellulaires) à des xénobiotiques peut conduire à l'induction ou à la répression de l'expression d'EMX (phase I et II) et des protéines de transport (phase III). Ces mécanismes de régulation vont en général dans le sens d'une détoxification et d'une meilleure élimination des xénobiotiques et de leurs métabolites (Figure 27). Au travers de l'interaction avec des récepteurs nucléaires, les xénobiotiques peuvent non seulement entraîner la survenue d'un effet biologique, mais aussi moduler l'induction ou la répression de leurs propres enzymes de biotransformation.

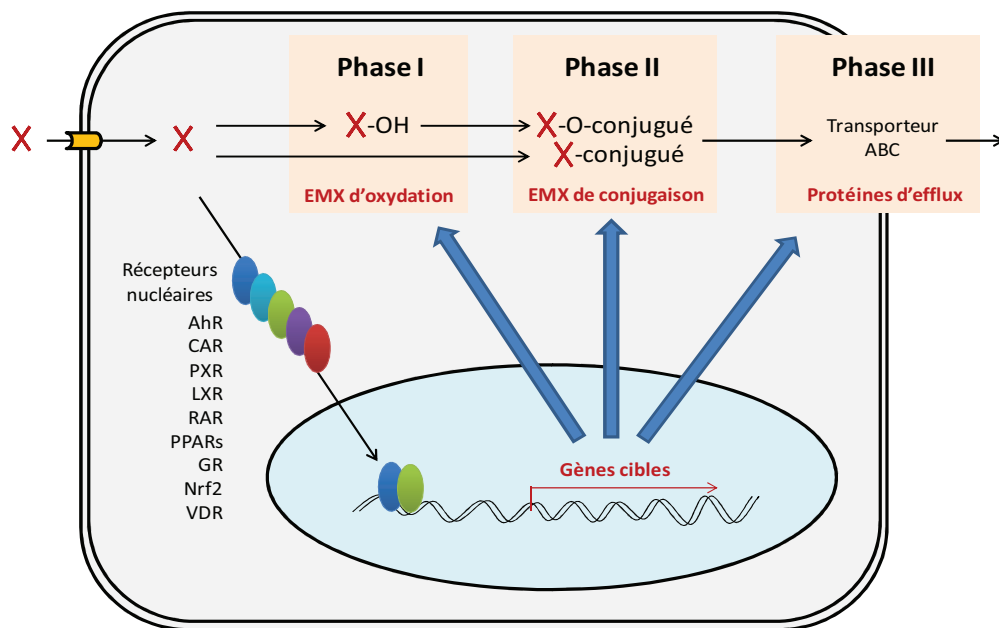


Figure 27. Principe de la régulation de l'expression des EMX de phase I et II et des protéines d'efflux (phase III) par l'interaction des xénobiotiques avec les récepteurs nucléaires

D'après (Nakata et al. 2006).

De nombreux récepteurs nucléaires dont le AhR (aryl hydrocarbon receptor), Nrf2 (nuclear factor-erythoroid 2 p45-related factor), CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor), LXR (liver X receptor), PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor), RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoid X receptor) sont des molécules clés impliquées dans les mécanismes de

modulation de l'expression des protéines de phase I, II et III (Tableau 17 et 18). Les récepteurs CAR et PXR sont considérés comme des récepteurs sentinelles hautement sensibles à la présence des xénobiotiques. Toutefois, à ce jour, il semble que chez le poisson le CAR soit absent. Sa fonction serait assurée par un récepteur CAR/PXR provenant d'un gène ancestral. Les CAR et PXR humains présentent une grande redondance de ligands. Chez le poisson zèbre, un plus faible nombre de ligands est capable d'activer le PXR de part la structure plus restrictive de la poche de liaison aux ligands de ce récepteur (Ekins et al. 2008).

Tableau 17. Exemples d'interactions ligand/ récepteur et de leurs effets sur l'expression des enzymes de phase I et II, et des transporteurs, chez l'Homme

D'après (Nakata et al. 2006).

Ligand	Récepteur nucléaire	Élément de réponse	Gène cible (+ induction, - répression de l'expression)		
			Phase I	Phase II	Phase III
Xénobiotiques	AhR	XRE	CYP1A1 (+) CYP1A2 (+) CYP1B1 (+)	UGT1A1 (+) UGT1A6 (+)	ABCG2 (+)
Xénobiotiques (dont phénobarbital)	CAR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP2A6 (+) CYP2B1 (+) CYP2B6 (+) CYP2C9 (+) CYP2C19 (+)	UGT1A1 (+)	ABCC2 (+) ABCC3 (+) ABCC4 (+)
Xénobiotiques Stéroïdes	SXR/PXR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP1A1 (+) CYP2B6 (+) CYP2C9 (+) CYP2C19 (+) CYP3A4 CYP3A7 CYP7A1 (-) CYP3A (+)	SULT2A1 (+) UGT1A1 (+) UGT1A3 (+) UGT1A4 (+)	ABCA1 (+) ABCB1 (+) ABCB11 (+) ABCC1 (+) ABCC2 (+) ABCC3 (+) ABCG2 (+)
Oxystérols	LXR	DR-4	CYP2B6 (+) CYP3A4 (+)		ABCA1 (+) ABCG1 (+) ABCG4 (+) ABCG5 (+) ABCG8 (+)
Acides gras Fibrates	PPAR	DR-1	CYP4A1 (+) CYP4A3 (+) CYP7A	UGT1A9 (+) UGT2B4 (+)	ABCA1 (+) ABCC2 (+) ABCD2 (+) ABCD3 (+)

Tableau 18. Exemples de substrats (inducteurs ou répresseurs) des EMX de phase I et II chez les mammifères et le poisson

* : cas du poisson zèbre. D'après (Miranda et al. 1998; Song 2001; Harris et al. 2004; Thibaut et Porte 2004; Waring et al. 2008; Creusot 2011; Chang et al. 2013; Kubota et al. 2013).

	Enzyme		Inducteur	Récepteur nucléaire	Répresseur
MAMMIFÈRES	CYPs	CYP1A1	HAP, oméprazole	AhR	-naphtoflavone, Kétoconazole, Clotrimazole
		1A2	HAP, TCDD, oméprazole,	AhR	
			Rifampicine	PXR	
			Carbamazépine	CAR	
			Barbituriques, Phénytoïne	CAR/PXR	
	UGTs	UGT1	Benzo[a]pyrène, TCDD	AhR	Bisphénol A
		UGT1 et 2	b-naphtoflavone, Quercétin, Sulforaphane, Eicosanoïdes, Bilirubine	Nrf2	
		UGT1A1	Phénobarbital, Pénytoïne, Carbamazépine, Rifampicine	PXR/CAR	
			Fibrates	PPAR	
	SULTs	-	Methotrexate, Genistéine, Acide rétinolique	-	Flavonoïdes, Phénols, Plastifiants (Bisphénol A), Alkylphénols
POISSONS	CYPs	CYP1A	HAP, dioxines, furanes, PCB	-	-naphtoflavone, Parathion, Clotrimazole, Kétoconazole, Miconazole, Ellipticine, Isosafrole, Pipéronyl butoxide
		CYP2AA1* CYP2AA2*	TCPOBOP, Phénobarbital	PXR	
		CYP3A	Kétoconazole, Nonylphénol, Rifampicine, TCDD, Dexaméthasone, Fluoxétine	-	-naphtoflavone, Parathion, Clotrimazole, Kétoconazole, Miconazole, EE2, Nonylphénol, Isosafrole, Pipéronyl butoxide
		CYP3A65*	Dexaméthasone, Rifampicine, TCDD	AhR2	
	UGTs	-	-	-	Alkylphénols, Phtalates, Orgénoétains
	SULTs	-	-	-	Alkylphénols, Phtalates, orgénoétains

Par ailleurs, il existe des communications croisées (crosstalk) entre les différents récepteurs nucléaires qui rendent moins prévisible la régulation des gènes cibles. Le crosstalk PXR-CAR/ER, par exemple, entraîne une diminution du taux d'hormones circulantes par l'augmentation de l'expression des enzymes prenant en charge la biotransformation des stéroïdes endogènes (Kliwer et al. 1999). Le crosstalk AhR/ER, via la formation de l'hétérodimère AhR-ARNT-ERE, participe au contrôle de l'expression des gènes cibles du ER (Ohtake et al. 2003).

En conclusion, ce chapitre consacré au métabolisme des xénobiotiques montre la complexité de la biotransformation des substrats endogènes et exogènes et l'impact potentiel des biotransformations sur les réponses toxicologiques. Différents paramètres tels que les activités enzymatiques, la répartition tissulaire des enzymes, les différences et similitudes entre espèces et entre modèles (*in vitro* et *in vivo*) ainsi que les mécanismes de régulation de l'expression des EMX sont, par conséquent, à prendre en considération notamment dans le contexte de l'évaluation du danger liés aux xénobiotiques. Actuellement, trop peu d'informations relatives aux capacités de biotransformation des modèles et outils biologiques sont disponibles, et ce en particulier pour des modèles alternatifs de plus en plus utilisés en toxicologie comme le poisson zèbre.

III. CONTEXTE REGLEMENTAIRE ET OUTILS BIOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Le poisson zèbre est un modèle qui présente de nombreux avantages pratiques et un intérêt scientifique évident. Plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés ou sont en cours de développement à partir de cette espèce, avec comme objectif d'identifier le potentiel perturbateur endocrinien et notamment œstrogéno-mimétique de substances chimiques. La mise en place de ces modèles (cellules transfectées, animaux transgéniques, criblage haut-débit...) constitue des défis techniques et scientifiques mais doit aussi répondre à des exigences réglementaires. L'impact délétère des perturbateurs endocriniens sur l'environnement et le danger qu'ils représentent pour l'Homme a conduit les instances européennes et internationales à réfléchir à la mise en place d'un cadre réglementaire visant à répertorier, évaluer et autoriser l'usage des substances chimiques. Ce cadre réglementaire qui exige une évaluation rapide du potentiel toxique de substances chimiques, a renforcé la nécessité de développer de nouveaux outils biologiques. De nombreuses équipes œuvrent en ce sens afin d'améliorer nos connaissances des modèles biologiques et de mettre au point de nouveaux outils de criblage.

III.1. Etude des PE : des modèles intégratifs aux modèles de criblage

L'effet d'un PE peut être évalué à différentes échelles biologiques, de la cellule à l'organisme. Un grand panel de modèles biologiques peut être utilisé. Ces modèles sont d'une complexité biologique variable. Les modèles *in vivo* (non humains) permettent une évaluation toxicologique dans un système intégratif. Les variations de paramètres biochimiques mesurés *in vivo* sont dans ce cas le reflet de perturbations physiologiques globales. Cette complexité biologique ne facilite cependant pas la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces troubles physiologiques. Les modèles *in vitro* permettent d'accéder à l'échelle moléculaire en écartant toute possibilité immédiate de vision intégrative à l'échelle de l'organe ou de l'organisme. On comprend alors aisément la complémentarité que représentent ces deux approches (Figure 28). Toutefois, les modèles *in vivo* sont peu compatibles avec une approche de criblage toxicologique haut débit de contaminants chimiques dont la variété augmente au fur et à mesure de l'industrialisation. La durée d'exposition, la

surveillance des animaux, les temps nécessaires aux prélèvements des échantillons biologiques, les coûts associés, et les considérations éthiques sont autant de facteurs limitant l'utilisation d'expérimentations *in vivo* (Tableau 19). Ce n'est pas le cas des modèles *in vitro*, qui sont les mieux adaptés aux besoins de criblage. Cependant, les modèles *in vitro*, qui peuvent toutefois être combinés, peuvent ils apporter des réponses suffisantes quant à l'évaluation toxicologique comprise à l'échelle de l'organisme ? Car *in fine* c'est bien l'effet du contaminant dans le système global et complexe qu'est l'organisme qui intéresse les évaluateurs du danger et du risque toxicologique. Le choix du ou des modèles biologiques utilisés dépend alors de la question scientifique posée : mettre en évidence l'activité biologique d'une substance chimique, ou bien mettre en évidence les effets délétères de cette substance chez l'organisme cible.

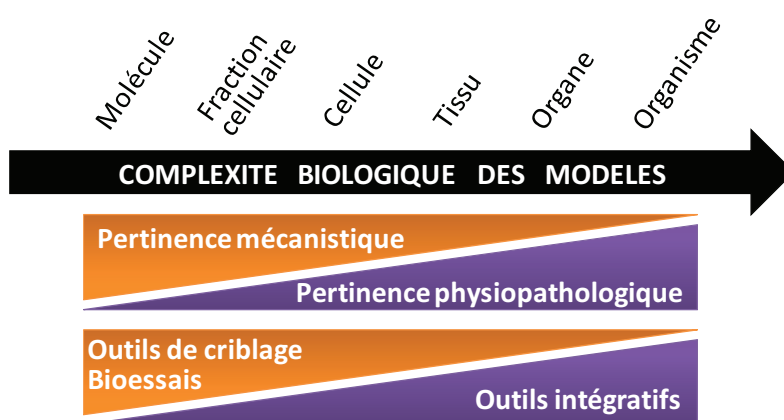


Figure 28. Paradigme des analyses en toxicologie

Tableau 19. Avantages et inconvénients des modèles *in vivo* et *in vitro* dans les analyses toxicologiques

OUTILS BIOLOGIQUES	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
Avantages	Intégratif	Sensibles	
	Réponse globale	Spécifiques	
	Prise en compte d'autres facteurs biologiques notamment ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination, pharmacodynamie)		Rapides
			Peu coûteux
			Sans problème éthique
			Adapté au criblage
	Identification possible des mécanismes en jeux		
Inconvénients	Durée d'exposition	Risque de faux positifs	
	Coûts	Risque de faux négatifs	
	Ethique	Simplicité relative des systèmes	
	Sous l'influence de facteurs externes non ou partiellement maîtrisés pouvant influencer la réponse biologique	Ne reflète pas une réponse à l'échelle de l'organisme	
	Difficulté à identifier un mécanisme sous-jacent à l'effet biologique observé	Pas de prise en compte ou prise en compte partielle des paramètres ADME	

Il est important de noter que les modèles *in vivo* embryonnaires du poisson zèbre sont, au sens réglementaire, des modèles *in vitro* jusqu'à 5 jours après fécondation, c'est-à-dire tant que les larves se nourrissent en puisant leurs nutriments dans le sac vitellin (UE 2010). Bien que le stade de développement soit précoce, la majorité des organes sont fonctionnels. Ce modèle embryo-larvaire peut également être plus aisément utilisé pour du criblage haut débit. Par conséquent, il constitue une alternative intéressante au modèle *in vivo* classiquement utilisé dans les études toxicologiques.

III.2. Cadre et problématique réglementaires relatifs aux perturbateurs endocriniens

La question de la réglementation des produits chimiques dotés de propriétés de perturbateur endocrinien a été prise en considération par les institutions publiques à partir de la fin des années 1990. Pour autant, les premières publications scientifiques faisant état d'altérations de la reproduction chez des animaux sauvages (poissons, batraciens) remontent aux années 1970. C'est en 1991 que le terme de « perturbateur endocrinien » fut employé pour la première fois lors d'une conférence scientifique réunie à l'initiative de Theo Colborn et connu sous le nom de « conférence de Wingspread ». Devant l'accumulation d'observations de troubles hormonaux chez de nombreuses espèces animales, puis avec les études épidémiologiques montrant une augmentation des troubles de la reproduction chez l'Homme et une diminution de la fertilité masculine, la Commission Européenne publia en 1999 une stratégie communautaire sur les PE.

Différentes agences nationales, européennes, américaines et internationales participent aujourd'hui à l'évaluation du danger et du risque que représentent les PE pour l'Homme et l'environnement : l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), l'ECHA (agence européenne des produits chimiques), l'EFSA (autorité européenne de sécurité des aliments), l'EPA (agence américaine de protection de l'environnement), la FDA (agence américaine des produits alimentaires et des médicaments). D'autres structures s'attachent au développement et à la validation de nouveaux tests scientifiques destinés à l'évaluation des PE : l'EURL ECVAM (centre européen pour la validation des méthodes alternatives) et l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques).

III.2.1. La question de la définition des perturbateurs endocriniens : un enjeu scientifique et réglementaire

La notion de PE a été officiellement définie pour la première fois en 1996 à Weybridge au Royaume-Uni, lors d'un colloque réunissant la Commission Européenne, l'OCDE, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et l'industrie chimique européenne : « *une substance chimique étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale* » (UE 1996). Contrastant avec cette définition, celle de l'EPA proposée lors d'un groupe de travail avec Kavlock et al. (1996), insiste davantage sur les modes d'actions de ces PE que sur leur nocivité : « *un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la reproduction, du développement et/ou du comportement* ». Aujourd'hui, la définition de l'OMS émise, en 2002 à la suite du programme international sur la sécurité chimique est la plus consensuelle : « *une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant de ce fait des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance* » (OMS 2002). L'EFSA s'est inspirée de la définition de l'OMS pour établir la suivante : « *tout produit chimique susceptible d'interagir directement ou indirectement avec le système endocrinien, et par voie de conséquence de produire un effet sur ce dernier et d'impacter les organes et les tissus* » (EFSA 2010). La notion de PE potentiel a ensuite été introduite : « *une substance ou un mélange exogène possédant des propriétés dont l'on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance* ». Au-delà de ces définitions, la notion d'« effets néfastes » a été précisée en 2009 : « *changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, la reproduction, le développement ou la longévité d'un organisme, se traduisant par une perte de capacités fonctionnelles ou une perte de capacité à compenser un stress additionnel ou une sensibilité accrue aux effets nocifs découlant d'autres influences environnementales* » (OMS 2009).

Bien que la définition d'un PE ait évolué au cours des années et présente quelques différences parfois notables entre les instances, il n'en reste pas moins à définir les critères scientifiques à transposer de manière réglementaire afin de statuer sur le caractère de « perturbateur endocrinien » d'une substance chimique. En 2007, l'Union Européenne a mis en place le règlement « REACH » relatif à l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Ce règlement a pour objectif de rationaliser et d'améliorer l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne sur les produits chimiques. Toutefois, il n'est pas spécifiquement dédié aux PE. Et d'ailleurs la pertinence des méthodologies suivies dans le cadre de REACH pour les PE est discutée. Mais en l'absence de critères scientifiques et réglementaires au sujet des PE, l'Europe ne peut réellement revoir leur réglementation. A la fin de l'année 2011, un rapport commandé par la direction générale de l'environnement de la

Commission Européenne et ayant pour objectif de faire un état des lieux sur les PE a fait évoluer la considération des instances politiques sur les PE. Ce rapport, écrit sous la direction d'Andreas Kortenkamp (Kortenkamp et al. 2011) reprend l'ensemble des avancées scientifiques sur les PE depuis 2002 et pose des recommandations relatives à la question des PE dans la législation européenne relative aux produits chimiques : révision et actualisation des méthodes d'essais validés internationalement, récusation de la notion de seuil d'exposition relativement rigide comme critère de définition au profit de critères de nocivité prenant en compte les modes d'action endocriniens. En 2013, à l'initiative d'Andreas Kortenkamp, la sonnette d'alarme est tirée par 89 scientifiques mondialement reconnus par la publication d'un manifeste intitulé « déclaration de Berlaymont » invitant la Commission Européenne à réagir face aux dangers et aux risques sanitaires liés aux PE. Toutefois, certains scientifiques en désaccord avec les notions toxicologiques que posent les PE et le principe de précaution, font savoir leur mécontentement et publient un éditorial accompagné d'une lettre ouverte à la conseillère scientifique du président de l'Union européenne. Un consensus est finalement trouvé mais cette mésaventure n'a fait que retarder les prises de décisions européennes. Face à cette problématique, la France a été le premier pays européen à réagir en prenant en considération les alertes au sujet du bisphénol A. Le Parlement français a voté en 2012, la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de tout conditionnement comportant du bisphénol A et destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires destinées aux enfants âgés de moins de trois ans. Cette loi, en vigueur depuis le 1^{er} janvier 2013 est également destinée aux consommateurs de tous âges à compter du 1^{er} janvier 2015. En mars 2012, l'ANSES a publié un avis relatif à une demande d'appui scientifique et technique concernant la révision de la stratégie européenne relative aux PE (ANSES 2012). L'Etat français a demandé à l'agence (1) d'élargir ses analyses à des substances chimiques suspectées d'être des PE et relevant de la réglementation des biocides et substances chimiques couvertes par REACH, (2) de donner un avis argumenté sur les critères « PE » déjà proposés dans d'autres pays (Allemagne, Royaume-Unis, Danemark) ainsi que par des organisations non gouvernementales et des industriels de la chimie, (3) de proposer, si besoin est, d'autres critères pertinents de perturbation endocrinienne qui s'appliquent aux réglementations concernées (phytopharmaceutiques, biocides, substances chimiques couvertes par REACH). En 2013, le parlement européen a remis un rapport sur la protection de la santé publique contre les perturbateurs endocriniens (EU 2013). Ce document comporte d'importantes avancées dans la prise en considération du danger que représentent les PE et met en avant la nécessité de mettre en adéquation les données toxicologiques propres aux PE avec la réglementation européenne. C'est ainsi que l'on peut lire « [...] l'absence de connaissances précises, notamment d'éléments établissant un lien inconstatable de cause à effet, ne doit pas faire obstacle à des mesures de protection sanitaire prises en vertu du principe de précaution, sous réserve qu'elles respectent le principe de proportionnalité ». Ce rapport aborde aussi les critères généraux de définition des PE en prenant en compte les effets combinés de substances : « [...] estime que les critères de définition des

perturbateurs endocriniens doivent reposer sur des éléments visant à définir l' « effet préjudiciable », et le « mécanisme d'action endocrinien », [...] souligne que les éventuels effets combinés tels que les mélanges ou les effets cocktails doivent être pris en compte ». De plus, ce rapport indique que le parlement européen « est en total désaccord avec les tentatives visant à introduire le critère d' « activité » en tant que seuil de définition des perturbateurs endocriniens ». Il ajoute que « [...] les perturbateurs endocriniens doivent, dans ces conditions, être assimilés à des substances « dépourvues de seuil » [...] ». En décembre 2013, l'ANSES publie un rapport d'expertise collective relatif à la méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation (ANSES 2009). L'ANSES a en effet été chargée (1) d'identifier les produits contenant des substances reprotoxiques ou susceptibles de l'être (perturbateurs endocriniens notamment), (2) de sélectionner les produits à étudier en priorité, (3) d'analyser et, si possible, de quantifier les voies d'exposition de la population générale à ces substances en précisant les sources directes et indirectes, et incluant des populations vulnérables et les personnes en milieu de travail, (4) de procéder à une évaluation bénéfice/risque, (5) d'envisager des substitutions. En février 2014, est enregistré à la Présidence de l'Assemblée Nationale un rapport d'information déposé par la Commission des affaires européennes sur la stratégie européenne en matière de perturbateur endocrinien ou « perturbateurs endocriniens, l'urgence d'agir » (AN 2014). Ce document, qui reprend notamment l'ensemble des informations scientifiques émanant de différents rapports d'expertise et qui expose les moyens permettant la mise en place d'une meilleure réglementation européenne, souligne le devoir pour l'Union européenne de « faire primer la vérité scientifique, dans l'intérêt des personnes, en tant que citoyens, consommateurs et contribuables ». Aujourd'hui, en France, les critères scientifiques d'identification d'un PE applicables aux réglementations REACH, biocides et pesticides sont basés sur ceux des autorités danoises. C'est ce qui a été proposé par l'ANSES en 2012 (ANSES 2012). Les PE sont ainsi divisés en deux catégories (catégorie 1 : avérés ; catégorie 2 : potentiels). La catégorie 2 est elle-même divisée en catégorie 2a (PE suspectés) et 2b (substances avec des interactions de perturbation endocrinienne). Enfin, en juin 2014, la Commission européenne a publié sa feuille de route relative à la définition des critères d'identification des PE dans le contexte de la mise en œuvre du règlement relatif à la protection des végétaux et du règlement relatif aux produits biocides. Plusieurs options de définitions des critères d'identification des PE y sont abordées. Les options proposées se caractérisent soit par un *status quo*, soit par les critères émis par l'OMS en 2002, soit par ces mêmes critères en introduisant différentes catégories (PE avérés, PE suspectés, substances avec des indications de perturbation endocrinienne), soit par ces mêmes critères de l'OMS en ajoutant la notion de « potentiel » comme élément participant à la caractérisation du danger. Concernant les différentes approches de prise de décision au niveau réglementaire, est notamment proposée l'introduction de considérations socio-économiques comprenant la notion de bénéfice/risque.

III.2.2. Le cadre de l'évaluation réglementaire des PE par l'OCDE

Le groupe d'étude spécial de l'OCDE pour l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, mis en place en 1998, est chargé de la mise au point des méthodes d'essai permettant de répondre aux besoins de criblage des PE avec des tests validés. Aujourd'hui, plusieurs tests sont validés au niveau international par l'OCDE afin d'évaluer certaines propriétés biologiques relatives aux perturbations endocriniennes de substances chimiques, aussi bien pour l'Homme que pour les espèces sauvages, sur la base de la mesure de paramètres biologiques définis. Ces outils biologiques mammaliens et non mammaliens sont regroupés dans un schéma conceptuel de tests à 5 niveaux. Le niveau 1 concerne des données existantes sur des substances chimiques ou obtenues par des moyens autres que des tests biologiques. Les niveaux 2 et 3 correspondent à des tests *in vitro* donnant des informations sur des mécanismes d'action définis. Le niveau 4 correspond aux tests *in vivo* donnant des informations sur des effets délétères, d'après des paramètres définis de perturbations endocriniennes. Le niveau 5 correspond à des tests *in vivo* donnant des informations permettant une meilleure compréhension des effets délétères sur la base de paramètres définis de perturbations endocriniennes allant au-delà du cycle de vie de l'organisme considéré (effets transgénérationnels). L'ensemble de ces tests biologiques permet de mettre en évidence des propriétés endocriniennes de substances chimiques via des effets médiés par les récepteurs aux œstrogènes, les récepteurs aux androgènes, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, et les perturbations de la stéroïdogénèse. Les tableaux 20 et 21 présentent les tests, validés ou en cours d'étude, spécifiques à l'identification des PE.

Tableau 20. Lignes directrices des tests spécialement développés ou actualisés pour l'identification ou l'évaluation de propriétés endocriniennes de substances chimiques

D'après ; OCDE, 20 septembre 2014 ;

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>

En gris: test réalisable (ou en partie réalisable) chez le poisson zèbre

Ligne directrice	Titre	Année d'adoption
440	Test utéro-trophique chez le rongeur : essai de dépistage à court terme de propriétés œstrogéniques	2007
407 (actualisée)	Etude de toxicité à doses répétées par voie orale sur 28 jours chez les rongeurs	2008
211 (actualisée)	Test de reproduction chez la Daphnie (<i>Daphnia magna</i>)	2011
441	Bio-essai de Hershberger chez le rat : essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques	2009
229	Test de reproduction à court terme chez le poisson	2009
230	Essai de 21 jours chez les poissons : essai de dépistage à court terme de l'activité œstrogénique et androgénique, et d'inhibition de l'aromatase	2009
231	Bio-essai de métamorphose des amphibiens	2009
455	Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur d'œstrogène alpha humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste des substances testées	2009
233	Essai de toxicité sur le cycle de vie des chironomes dans un système eau-	2010

	sédiment chargé ou eau chargée-sédiment	
234	Essai de développement sexuel des poissons	2011
456	Essai de stéroïdogénèse H295R	2011
457	Essai de transactivation faisant appel au récepteur des œstrogènes BG1Luc pour identifier les agonistes ou antagonistes des récepteurs des œstrogènes	2012

Tableau 21. Tests non validés actuellement en cours d'étude pour l'identification des perturbateurs endocriniens

D'après ; OCDE, 20 septembre 2014 ;

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>

En gris: test développé chez le poisson zèbre en cours d'évaluation

Test en cours d'étude	Pays
Essai de cycle de vie chez le poisson/ Essai multigénérationnel chez le poisson Medaka	USA/JPN/DEU
Essai de reproduction/cycle de vie partiel chez le poisson	USA
Essai de développement et de croissance de larves d'amphibiens	USA/JPN
Essai de dépistage d'une activité thyroïdienne chez le xénope à l'état embryonnaire	FRA
Essai de dépistage de substances endocriniennes agissant via le récepteur aux œstrogènes chez le poisson zèbre à l'état d'embryon	FRA
Essai de toxicité sur le cycle de vie de la crevette Mysid	USA
Essai de reproduction et de développement chez les Copépodes	SWE
Essai de reprotoxicité chez les mollusques – développement et validation des lignes directrices	DEU/GBR/FRA/DNK
Essai aviaire de reprotoxicité sur 2 générations	USA
Essai de binding sur le récepteur des œstrogènes alphas humains recombinant	USA/EC/DEU/JPN
Essai de détection des activités androgéniques et anti-androgéniques (STTA)	JPN
Essai de détection de l'activité anti-œstrogénique des produits chimiques	E
Essai de transactivation du récepteur aux androgènes	EC
Essai de transactivation pour la détection de composés œstrogéniques et anti-œstrogéniques par les cellules MELN	EC
Thyroid Scoping Document	OECD Secr.
Mise à jour des test TG 421 et 422	DK

III.2.3. Les capacités de biotransformation des tests biologiques appliqués aux PE : une priorité scientifique et réglementaire ?

Comme expliqué précédemment, les biotransformations d'un xénobiotique dans un modèle biologique considéré peuvent considérablement moduler la réponse toxicologique mesurée. Or ces capacités de biotransformation varient selon les modèles biologiques. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de différences dans ces capacités de biotransformation. Pour les modèles *in vivo* de tels facteurs sont par exemple l'espèce, le stade de développement, la durée et la voie d'exposition à un xénobiotique. Pour les modèles *in vitro* ces facteurs sont, entre autres, l'espèce de provenance, la durée d'exposition et les conditions de culture. L'un des reproches que l'on peut faire au sujet des tests *in vitro* est, en règle générale, leur faible capacité de biotransformation en comparaison avec les tests *in vivo*. Or les considérations éthiques actuelles et les recommandations scientifiques vont dans le sens d'une

moindre utilisation des modèles *in vivo* au profit des modèles *in vitro*. Dans ce contexte, la question est de savoir dans quelle mesure les tests *in vitro* peuvent rendre compte de l'effet biologique qui serait observé chez l'animal (et chez l'Homme), sans oublier de prendre en compte la biotransformation des xénobiotiques. Ainsi la comparaison des résultats visant à évaluer l'activité endocrinienne de substances chimiques, d'une part entre des tests *in vitro* aux capacités de biotransformation différentes, d'autre part entre des tests *in vivo*, et enfin, *a fortiori* entre des tests *in vitro* et *in vivo*, peut conduire à des différences importantes d'interprétation comprenant notamment des faux positifs et négatifs à l'échelle de l'organisme considéré. Dans le cas où le métabolite d'un composé présente une activité biologique pour la cible considérée similaire à celle du composé parent, il est logique de ne pas observer de différence d'effet biologique entre un système qui ne métabolise pas et un système qui métabolise (au final, la concentration en substances actives sera similaire). En revanche, dans le cas où le métabolite d'un composé peu actif présente une activité biologique pour la cible considérée plus importante que le composé parent, alors un système biologique métaboliquement compétent indiquera une toxicité beaucoup plus importante qu'un système biologique dépourvu de capacité de biotransformation. Ceci peut être observé dans le cas de SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator) tels que le tamoxifène qui est métabolisé en hydroxy-tamoxifène. A l'inverse, si la métabolisation résulte en une détoxification (molécule parente active et métabolite inactif), la mesure d'activité reflétera peu ou pas l'activité de la molécule testée.

En 2007, l'OCDE a publié un rapport sur l'utilisation de systèmes de biotransformation pour l'évaluation *in vitro* de l'activité endocrinienne de substances chimiques (OCDE 2008). En 2012, l'OCDE a émis un nouveau rapport afin d'évaluer les besoins à venir en termes de réglementation concernant des tests *in vitro* de biotransformation et de biodisponibilité pour les PE (OCDE 2012). La nécessité absolue et prioritaire d'évaluer le métabolisme des PE dans le cadre de leur évaluation toxicologique a été rappelé par Myriam Jacobs en 2013 (Jacobs et al. 2013).

Dans son rapport publié en 2008, l'OCDE, conclue que la solution idéale serait une évaluation simultanée de l'activité endocrinienne et du métabolisme des substances chimiques, mais que cet objectif est difficilement atteignable dans un futur proche. Toutefois, ce rapport met en avant l'utilisation possible de combinaisons de tests déjà disponibles. Par exemple, ce rapport préconise la caractérisation des capacités de biotransformation de tests déjà utilisés dans l'évaluation de l'activité endocrinienne des produits chimiques, ou bien encore parmi d'autres propositions, le développement de systèmes exprimant spécifiquement des enzymes de phase I et/ou II, ou encore la mise en place d'approches permettant une extrapolation *in vivo* à partir de tests *in vitro*. Or, depuis 2008, relativement peu d'avancées ont été réalisées et traduites en termes réglementaires. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser des modèles biologiques dépourvus de capacités de biotransformation (la levure par exemple) pour attribuer sans équivoque une activité biologique au composé testé. Toutefois, dès que l'objectif est de comprendre le comportement d'un xénobiotique dans un modèle *in vitro* suffisamment « riche », alors le recours à d'autres modèles notamment cellulaires ou à des

modèles animaux à un stade de développement très précoce et considérés réglementairement comme des modèles *in vitro*, est nécessaire. Certains efforts ont permis d'établir des critères de standardisation pour l'obtention et l'utilisation des fractions subcellulaires hépatiques S9 de poissons pour évaluer les biotransformations de composés chimiques (Johanning et al. 2012). De plus, les modèles *in vitro* déjà en place, validés par l'OCDE ou très largement utilisés dans les laboratoires de recherche sont invités à faire l'objet d'un travail de caractérisation de leurs capacités de biotransformation, illustrées par l'étude du devenir de substances chimiques clefs (Jacobs et al. 2013). Des recommandations à court, moyen et long terme ont été émises par l'OCDE (2008, 2012) et relayés et renforcés par M. Jacobs et al. en 2013. Brièvement, à court terme, les objectifs sont (1) de fixer une liste de substances de référence pour l'étude de leur biotransformation dans des systèmes biologiques dédiés à l'évaluation des activités endocriniennes, (2) de valider des tests *in vitro* S9 au sein des systèmes biologiques *in vitro* validés pour l'évaluation des activités endocriniennes, (3) de caractériser les capacités de biotransformations des modèles cellulaires (validés ou non) utilisés pour évaluer les activités endocriniennes des substances chimiques. On peut citer par exemple des modèles comme les cellules MCF-7 (MELN) (Balaguer et al. 1999), les cellules T47D et d'autres modèles notamment des modèles en développement dont ZFL et ZELH-zfERs (Cosnefroy et al. 2012) et le EASZY assay (Brion et al. 2012). A moyen terme, les propositions sont notamment d'intégrer des tests de biotransformation dans les différents niveaux du cadre conceptuel des tests de l'OCDE. A long terme, l'objectif serait de développer les modèles prédictifs *in silico* sur la base des données *in vitro* et *in vivo* en termes de biotransformation (harmonisation des bases de données, définition des voies métaboliques, développement d'outils prédictifs).

Au final, il existe déjà un certain nombre d'outils pour évaluer les capacités de biotransformation des modèles biologiques et pour évaluer le devenir des substances chimiques. Mais le développement de modèles et de tests complémentaires, et la bonne intégration de ces tests par rapport aux modèles biologiques déjà validés, restent à être menés dans le cadre réglementaire de l'évaluation de l'activité endocrinienne des substances chimiques. Le poisson zèbre continue de faire l'objet de recherches afin de développer des modèles à la fois sensibles, spécifiques, et faciles d'utilisation, pour améliorer nos capacités à évaluer le caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques, que celles-ci représentent un danger pour la santé humaine ou environnementale.

III.3. Place des modèles issus du poisson zèbre dans l'étude des perturbateurs endocriniens œstrogéniques

Le poisson zèbre est l'une des espèces à partir de laquelle ont été développés différents modèles biologiques visant à évaluer le caractère perturbateur endocrinien de substances chimiques. Les modèles poisson zèbre peuvent être utilisés à différentes fins : mise en évidence de propriétés (anti)œstrogéniques et (anti)androgéniques, étude des rétrocontrôles hormonaux, de la fonction gonadique, et du système thyroïdien (Tableau 22). Le poisson adulte représente le principal modèle utilisé pour ces études. Certains modèles *in vitro/in vivo* (cellules transfectées et larves transgéniques) ont par ailleurs récemment été développés afin de mettre en évidence l'activité œstrogénique des xénobiotiques. Les larves âgées de moins de 5 jours après fécondation, qui sont dépendantes des nutriments présents dans le sac vitellin, ont l'avantage d'être considérées comme des modèles *in vitro* d'un point de vue réglementaire (UE 2010). Ces larves bien qu'en développement, représentent un modèle assez intégratif puisque la majorité des organes est déjà fonctionnel à ce stade.

Tableau 22. Liste non exhaustive de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle biologique destiné à l'étude des perturbations du système endocrinien

Perturbations endocriniennes	Modèles et paramètres mesurés	Références
Potentiel œstrogénique et anti-œstrogénique	- Taux de vitellogénine (ELISA) ou de ses transcrits (RT-qPCR). - Modèles transgéniques : Tg(ERE-Luc), Tg(ERE-zvtg1:GFP), EASZY assay (cyp19a1b-GFP) - Modèles cellulaires transfectés (ZELH-zfERs)	(Arukwe et Goksoyr 2003) (Segner 2009) (Legler et al. 2000) (Chen et al. 2010) (Brion et al. 2012) (Cosnefroy et al. 2012)
Potentiel androgénique et anti-androgénique	- Taux de 11-kétotestostérone - Réversion du sexe - Sexe ratio - Indice gonadosomatique	(Scholz et Mayer 2008) (Kwok et al. 2005)
Rétrocontrôles centraux des PE sur les régulations endocriniennes	- Axe HHG : gonadotrophines (FSH, LH, TSH), GnRH - Métabolisme des stéroïdes cérébraux	(Scholz et Mayer 2008) (Kwok et al. 2005) (Lohr et Hammerschmidt 2011) (Baudiffier et al. 2012) (Segner 2009)
Effets des PE sur la reproduction, le développement et la maturation gonadique	- Proportion d'œufs fécondés - Histopathologie gonadique - Taux des stéroïdes sexuels (œstradiol, 11-kétotestostérone) - Indice gonadosomatique - Sexe ratio	(Segner 2009) (Scholz et Mayer 2008)
Effets des PE sur le système thyroïdien	- Taux de T3 et T4 circulants - T4 immunofluorescence quantitative disruption test (TIQDT) - Niveau d'expression de <i>thraa</i> , <i>thrab</i> (TR α) et <i>thrb</i> (TR β), <i>slc5a5</i> , <i>tg</i> , <i>tshb</i> - Hypertrophie/ hypotrophie de la glande thyroïde, altération de la morphogénèse, nombre et position des follicules fonctionnels	(Raldúa et al. 2012) (Scholz et Mayer 2008)

La majorité des modèles cellulaires actuellement destinés à évaluer le potentiel œstrogénique des xénobiotiques est issue de lignées cellulaires d'origine humaine provenant de cancers du sein ou du col de l'utérus (Tableau 23). Trois modèles cellulaires ichthyens, dont un développé à partir du poisson zèbre, ont été construits à partir d'hépatocytes ou de cellules gonadiques. Ces modèles cellulaires ont la particularité d'exprimer un gène rapporteur (GFP, luciférase, -galactosidase par exemple) permettant de mettre en évidence un effet rapide du xénobiotique étudié, suite à sa fixation sur un récepteur nucléaire. Les cellules sont généralement transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse d'un récepteur donné (ER par exemple). Ce récepteur peut être présent de façon endogène ou introduit par transfection stable ou transitoire. Une fois activé, le récepteur se fixe sur le promoteur du gène. Toutefois, ces modèles cellulaires ne permettent pas d'appréhender les conséquences (expression de gènes) de cette activation du récepteur nucléaire considéré. De manière similaire aux cellules, un modèle transgénique du poisson zèbre permet aujourd'hui d'évaluer le potentiel œstrogénique des xénobiotiques par la mesure de la fluorescence émise par la GFP. Le gène codant pour la GFP a été introduit chez le poisson zèbre et placé sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'aromatase B cérébrale (*cyp19a1b*) dont l'expression est œstrogéno-régulée (Menuet et al. 2005). Ce modèle de poisson zèbre au stade larvaire, développé à l'INERS, exprimera alors la GFP après avoir été exposé à une substance chimique activant le ER (Tong et al. 2009; Brion et al. 2012).

Tableau 23. Bioessais *in vitro* basés sur l'expression de gènes naturels ou transfectés pour l'étude des propriétés œstrogéniques des produits chimiques

Fond orange : modèle levure ; **fond bleu** : modèles humains ; **fond vert** : modèles poissons ; **lettres rouges** : modèles poisson zèbre ; ed : endogène, ex : exogène , R : gène rapporteur , N : gène naturel , St : tranfection stable , Tr : tranfection transitoire. D'après (Creusot 2011).

Récepteur	Lignée cellulaire (Isotype, Système)	Lignée Mère (Espèces-Tissus)	Référence
ER	YES (hER α -ex, R- β Gal-St)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Levure)	(Routledge et Sumpter 1996)
	MELN (hER α -ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	(Balaguer et al. 1999)
	MVLN (hER α -ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	(Pons et al. 1990)
	HELN (hER α / β -ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	(Balaguer et al. 1999)
	ER-CALUX® (hER α / β -ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	(Legler et al. 1999)
	T47D-KBluc (hER α / β -ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	(Wilson et al. 2004)
	BG1Luc4E2 (hER-ed,R-Luc-St)	BG1 (Homme, cancer ovaire)	(Rogers et Denison 2000)
	HELN-rtER (rtER α -ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	(Molina-Molina et al. 2008)
	ZELH (zfER α / β 1/ β 2-ex, R-Luc-St)	ZFL (Poisson, hépatocytes)	(Cosnefroy et al. 2012)
	PELN-rtER (rtER α -ex, R-Luc-St)	PLHC-1 (Poisson, hépatocytes)	(Cosnefroy et al. 2009)
	RTG-2-rtERα (rtER α -ex, R-Luc-St)	RTG-2 (Poisson, gonades)	(Ackermann et al. 2002)
	Modèle animal in vitro	Espèce animale	Référence
EASZY assay (Tg, <i>cyp19a1b</i> -GFP, stade larvaire)	Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i> , souche AB)	(Tong et al. 2009) (Brion et al. 2012)	

Il existe également un certain nombre de bio-essais *in vivo* actuellement développés chez le poisson (et notamment chez le poisson zèbre), pouvant être utilisés de manière réglementaire selon le schéma conceptuel de l'OCDE. Mais aucun bio-essai *in vitro* développé chez le poisson zèbre et dont l'objectif est la mise en évidence de PE, n'a encore été validé par l'OCDE. La validation de tels bio-essais *in vitro* permettrait d'élargir le panel de tests actuellement disponible pour l'évaluation du potentiel œstrogénique des xénobiotiques.

Démarche expérimentale et choix méthodologiques

I. Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité d'une démarche ayant pour objectif le développement et la caractérisation de modèles du poisson zèbre *in vivo* et *in vitro* permettant une meilleure évaluation de l'activité œstrogénique des substances chimiques. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL (ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012) et *in vivo* basés sur l'expression de la Green Fluorescent Protein (GFP) placée sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* régulé par les œstrogènes et exprimé au niveau cérébral (EASZY assay) (Brion et al. 2012). Pour utiliser ces modèles dans une démarche intégrée combinant les tests *in vivo* et *in vitro*, la prise en compte du métabolisme des xénobiotiques dans les différents systèmes d'essai est nécessaire. En effet, la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques, qui permet de s'intéresser aux processus de bioactivation et de détoxification dans l'évaluation des effets biologiques des xénobiotiques, est un déterminant essentiel qui n'est que peu pris en compte dans les modèles utilisés en toxicologie.

Plus précisément ce travail a consisté, d'une part, en l'étude du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux émergents à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre et, d'autre part, en l'étude du métabolisme de ces contaminants dans les différents systèmes d'essai *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre, complétée par une étude de métabolisme comparée avec des modèles cellulaires d'origine humaine.

Afin de mener à bien ce projet, l'INERIS et l'INRA ont décidé de collaborer sur un tel projet dont les objectifs principaux sont :

- (1) l'amélioration de la caractérisation du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux et alimentaires dans les modèles de poisson zèbre
- (2) la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles de poisson zèbre utilisés en toxicologie
- (3) la compréhension et l'interprétation des réponses biologiques observées dans ces modèles
- (4) l'évaluation de leur intérêt en termes de changement d'échelle

II. Démarche expérimentale

Ce chapitre a pour objectif d'exposer la stratégie expérimentale ainsi que les choix méthodologiques et les approches expérimentales utilisés pour répondre à la problématique de la thèse. Le lecteur pourra se rapporter aux paragraphes « Matériel et Méthodes » des publications où l'intégralité des données expérimentales est donnée.

II.1. Stratégie expérimentale

Pour mener à bien ce projet, différentes études complémentaires ont été réalisées.

Après avoir mis en place le modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH), le potentiel œstrogénique d'un panel de xénobiotiques a été évalué dans les modèles du poisson zèbre. Certains des xénobiotiques retenus sont des contaminants environnementaux émergents ou de référence [benzophénone-2 (BP2), bisphénol A (BPA), bisphénol F (BPF), bisphénol S (BPS)].

Par la suite, le devenir de la BP2 et du BPS radiomarqués (^3H -BP2 et ^3H -BPS) a été exploré dans les différents modèles du poisson zèbre (PZFH, ZFL, ZELH-zfERs), ainsi que dans des lignées cellulaires humaines hépatiques (HepG2, HepaRG) ou issues des glandes mammaires et utilisées régulièrement dans l'évaluation du potentiel œstrogénique des xénobiotiques (MELN, T47D-KBLuc). Après exposition des différents modèles biologiques à la ^3H -BP2 et au ^3H -BPS, et suite à une étape de développement analytique, les profils métaboliques ont été étudiés par radio-CLHP. L'identification des métabolites a été réalisée par des techniques de biochimie et confirmée par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR).

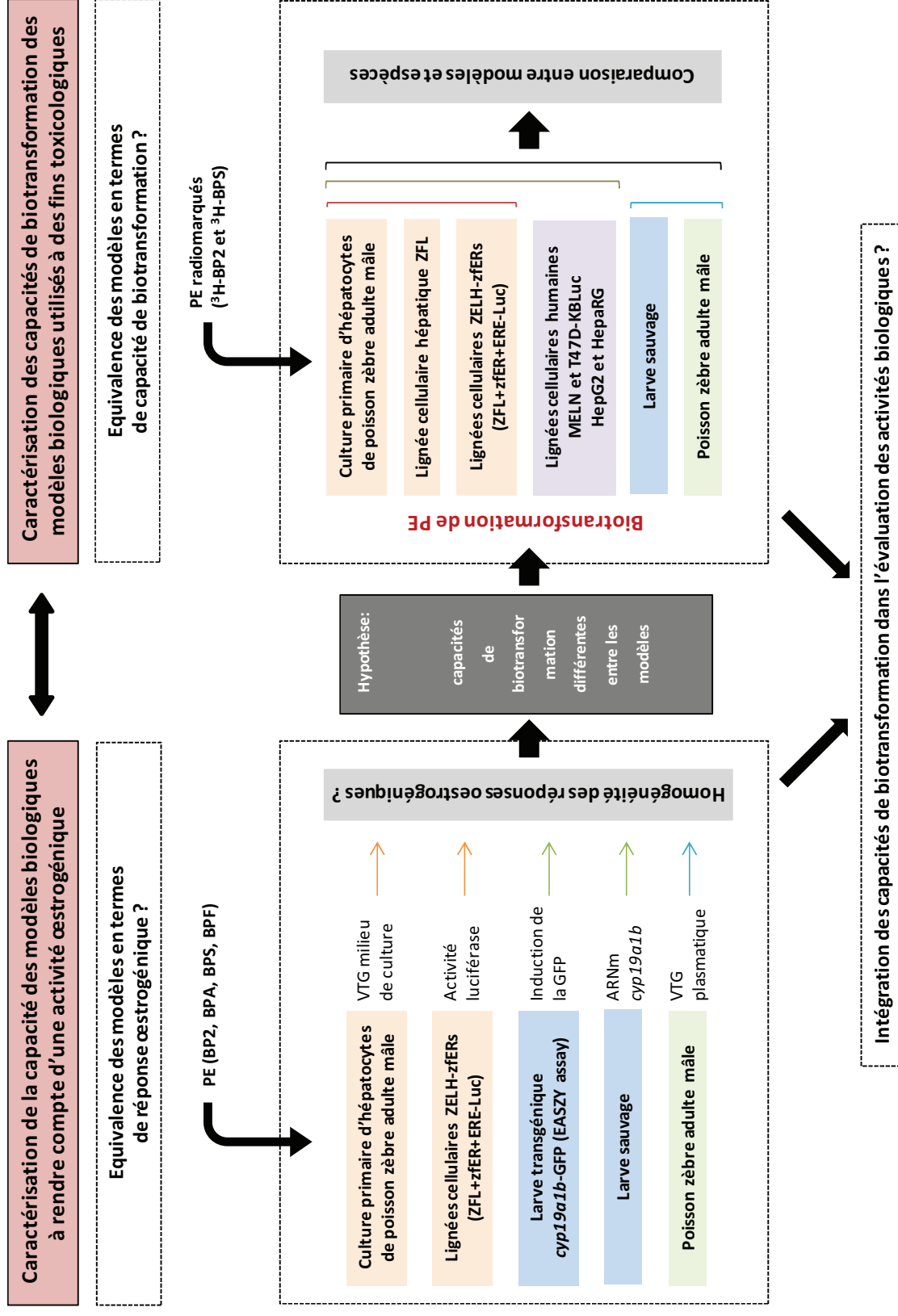


Figure 29. Démarche expérimentale générale

II.2. Modèles biologiques

II.2.1. Modèles cellulaires

Les différents modèles cellulaires utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt sont présentés dans le tableau 24.

II.2.1.1. Evaluation du potentiel œstrogénique des PE

L'étude de l'activité œstrogénique des xénobiotiques d'intérêt a été réalisée dans deux modèles cellulaires issus du poisson zèbre.

Les cultures primaires possèdent en général de plus grandes capacités de biotransformation que les lignées cellulaires qui sont issues de cellules cancéreuses, et qui ont perdu tout ou partie de leurs capacités métaboliques. Pour cette raison, il était pertinent de mettre en place une culture primaire d'hépatocytes à partir de poisson zèbre adulte mâle (PZFH) pour servir de référence à l'étude du devenir de xénobiotiques d'intérêt abordés dans cette thèse. La capacité du modèle PZFH à répondre à une stimulation œstrogénique a été évaluée par l'utilisation de xénobiotiques de référence, qui sont retrouvés dans l'environnement ou suspectés l'être compte tenu de leur utilisation.

Outre ce modèle de culture primaire, l'évaluation du potentiel œstrogénique de substances chimiques a été réalisée dans les lignées cellulaires nouvellement développées ZELH-zfERs (Cosnefroy et al. 2012). Ces lignées cellulaires sont issues d'une double transfection stable, de l'un des récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (zfER₁, zfER₂ ou zfER₃) et du gène de la luciférase (Luc) placé sous le contrôle de l'élément de réponse des œstrogènes (ERE). L'activation des ER par la présence d'un composé chimique va entraîner la fixation d'un complexe ER sur l'ERE. Il s'en suit l'expression du gène de la luciférase placé sous le contrôle de l'ERE. La prise en charge du substrat D-luciférine par la luciférase va entraîner la formation d'oxyluciférine et l'émission d'une lumière. L'intensité de la luminescence émise est proportionnelle à l'activité œstrogénique du composé chimique à l'étude (Figure 30).

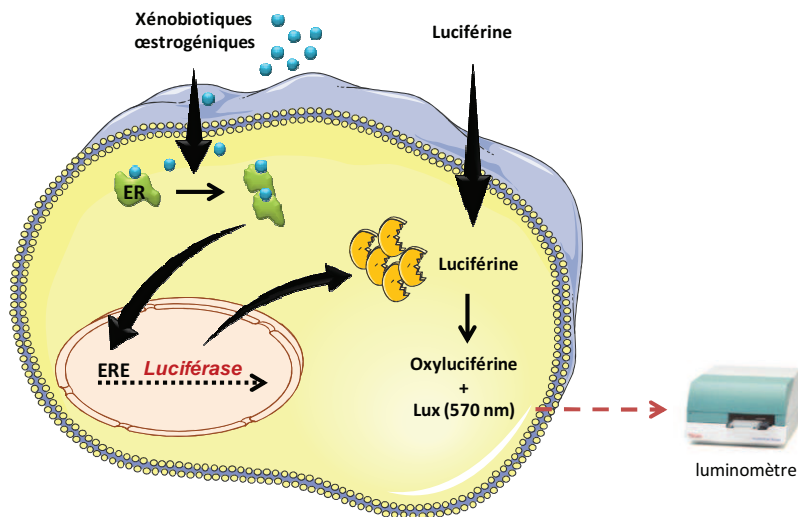


Figure 30. Principe de la mesure du potentiel œstrogénique d'un xénobiotique dans les modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre doublement transfecté, par l'émission de lumière suite à l'activation des ER. Certains éléments iconographiques proviennent de Servier Médical Art.

II.2.1.2. Étude du devenir des PE d'intérêt

L'étude du devenir de PE d'intérêt a été réalisée dans différents modèles cellulaires issus du poisson zèbre et de l'Homme.

Les modèles cellulaires du poisson zèbre sont ceux utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'activité œstrogénique de PE dans ce travail de thèse, à savoir la culture primaire PZFH et les lignées ZELH-zfERs, auxquelles s'ajoute la lignée cellulaire hépatique ZFL du poisson zèbre de laquelle sont issues les lignées ZELH-zfER et ZELH-zfER 2. En effet, il est important d'évaluer l'impact potentiel de la double transfection de la lignée ZFL sur la capacité de biotransformation de ces cellules.

D'autres lignées cellulaires telles que MELN (Balaguer et al. 1999) et T47D-KBLuc (Wilson et al. 2004), toutes deux d'origine humaine, sont fréquemment utilisées pour évaluer le potentiel œstrogénique de PE. Par conséquent, la comparaison du devenir de PE entre ces modèles issus d'espèces différentes mais qui sont utilisées avec des objectifs similaires était indispensable. Toutefois, ces lignées cellulaires humaines MELN et T47D-KBLuc ont une origine tissulaire différente des lignées ZELH-zfERs. MELN et T47D-KBLuc sont respectivement issues des lignées cellulaires MCF-7 et T47D, provenant de glandes mammaires humaines. Afin de comparer le devenir de PE dans des cellules d'origine tissulaire identique à celle des modèles cellulaires du poisson zèbre, nous avons complété nos études de biotransformation par l'utilisation des lignées hépatiques humaines HepG2 (Knowles et al. 1980) et HepaRG (Gripon et al. 2002), qui ne sont pas utilisées dans

l'évaluation du potentiel œstrogénique de PE, mais qui sont connues pour la conservation de leur capacités métaboliques, en particulier pour ce qui est d'HepaRG, un modèle de plus en plus utilisé en toxicologie (Hewitt et Hewitt 2004; Antherieu et al. 2012). Les cellules HepG2 sont encore plus fréquemment utilisées dans le cadre d'étude toxicologique, mais leur relevance sur le plan métabolique mériterait d'être davantage précisée.

II.2.2. Modèles animaux

Les différents modèles animaux utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt sont présentés dans le tableau 24.

II.2.2.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE

L'étude de l'activité œstrogénique des PE d'intérêt a également été réalisée dans trois modèles animaux du poisson zèbre.

Le poisson zèbre adulte (souche AB) a été choisi comme modèle le plus intégratif. La réponse biologique obtenue tient ainsi compte des paramètres pharmacocinétiques (ADME) et des processus de régulation à différentes échelles (cellules, tissus, organes, organisme).

La larve du poisson zèbre (également de souche AB) a été utilisée en complément du modèle larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) qui constitue l'autre modèle de criblage de l'activité œstrogénique de PE récemment développé à l'INERIS (Brion et al. 2012). Dans ce modèle transgénique, le gène codant pour la GFP a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'aromatase B cérébrale (*cyp19a1b*) dont l'expression est œstrogéno-réglée. En présence d'un ligand du ER, les récepteurs activés vont se fixer à l'élément de réponse et induire l'expression de la GFP (Figure 31). La quantité de fluorescence émise est proportionnelle à l'activité œstrogénique du composé chimique étudié. A la différence des autres modèles, le contexte cellulaire de l'activation des ER n'est, dans ce cas, pas hépatique, mais cérébral, puisque l'aromatase B est exprimée dans les cellules gliales radiaires du poisson zèbre. Le modèle larve, bien que correspondant à un modèle animal précoce, présente l'avantage d'être un modèle plus intégratif qu'un modèle cellulaire. Bien que la larve soit un modèle *in vivo*, elle est considérée, au niveau réglementaire, comme étant un modèle *in vitro* jusqu'au stade de développement 5 dpf, c'est-à-dire tant qu'elle se nourrit que des réserves vitellines (Strahle et al. 2012).

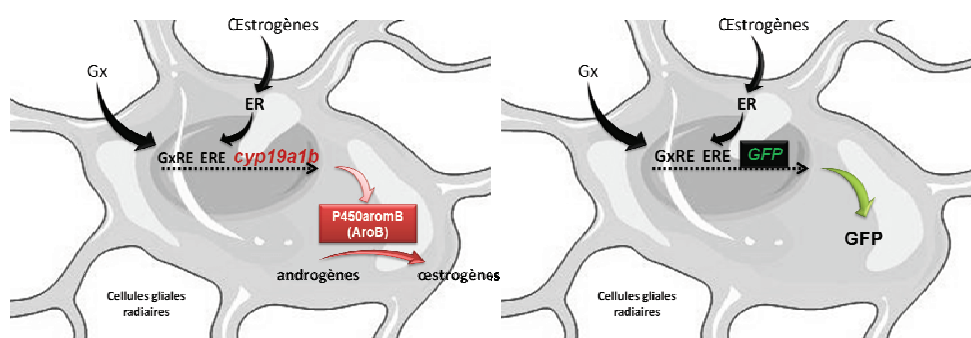


Figure 31. Expression de la GFP dans les cellules gliales radiaires du modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay)

Certains éléments iconographiques proviennent de Servier Medical Art.

II.2.2.2. Etude du devenir des PE d'intérêt

L'étude du devenir de PE d'intérêt a été réalisée, pour ce travail de thèse, dans les deux modèles animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique, à savoir le poisson zèbre adulte (souche AB) et la larve (souche AB). Afin d'appréhender un changement d'échelle potentiel entre les modèles *in vitro* et *in vivo*, cette étude de biotransformation de PE d'intérêt dans ces modèles animaux était indispensable.

Le tableau suivant reprend l'ensemble des modèles cellulaires et animaux utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt.

Tableau 24. Modèles cellulaires et animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique de PE et leur devenir

	Modèle cellulaire	Nature	Origine tissulaire	Description	Utilisation		Référence	
					Activité œstrogénique	Biotransformation		
IN VIVO	ADULTE	Sauvage	-	Souche AB	X	X	-	
	LARVE	Sauvage	-	Souche AB	X	X	-	
	EASZY assay	Transgénique	-	<i>cyp19a1b</i> -GFP Souche AB	X		(Tong et al. 2009) (Brion et al. 2012)	
IN VITRO	Poisson zèbre	PZFH	Culture primaire	Foie sain	Sauvage Souche AB	X	X	D'après (Ibabe et al. 2005; Bjorkblom et al. 2007)
		ZFL	Lignée cellulaire	Foie sain	-		X	(Ghosh et al. 1994)
		ZELH-zfER	Lignée cellulaire	Foie sain	zfER + ERE-Luc	X	X	(Cosnefroy et al. 2012)
		ZELH-zfER 1	Lignée cellulaire	Foie sain	ZfER 1 + ERE-Luc	X		
		ZELH-zfER 2	Lignée cellulaire	Foie sain	ZfER 2 + ERE-Luc	X	X	
	Humain	MELN	Lignée cellulaire	Adénocarcinome glandes mammaires	MCF-7 + ERE-Luc		X	(Balaguer et al. 1999)
		T47D-KBLuc	Lignée cellulaire	Adénocarcinome glandes mammaires	T47D + ERE-Luc		X	(Wilson et al. 2004)
		HepG2	Lignée cellulaire	Carcinome hépatocellulaire	-		X	(Knowles et al. 1980)
HepaRG		Lignée cellulaire	Carcinome hépatocellulaire	Cellules bipotentes (hépatocytes et cellules biliaires)		X	(Gripon et al. 2002)	

II.3. Choix des xénobiotiques

Pour ce travail, les xénobiotiques retenus ont été des molécules œstrogéniques de référence, mais aussi des contaminants environnementaux émergents (Tableau 25 et Figure 32).

Tableau 25. Caractéristiques des molécules utilisées au cours des expositions des modèles biologiques
 E2 : 17-œstradiol, EE2 : éthynylestradiol, BP2 : benzophénone-2, BPA : bisphénol A, BPF, bisphénol F, BPS : bisphénol S

Molécule	Classe	Fonction	Masse molaire (g/mol)	Log P	Concentration					
					Modèles cellulaires		Modèles larves		Modèle adulte	
					Activité œstrogénique	Métabolisme	Activité œstrogénique	Métabolisme	Activité œstrogénique	Métabolisme
E2	Hormone œstrogénique naturelle	-	272,4		0,1 pM – 0,01 μM	-	0,1 μM	-	0,01 μM	-
EE2	Hormone de synthèse	Agoniste du ER	296,4	3,67	-	-	0,05 nM	-	-	-
BP2	Benzophénone	Filtre UV	246,2	2,57	0,01 – 10 μM	0,1 – 200 μM	0,01 – 20 μM	1 μM	4 – 20 μM	1 μM
BPA	Bisphénol	Xéno-œstrogène	228,3	3,43	0,01 – 10 μM	-	0,25 – 10 μM	-	-	-
BPF	Bisphénol	Xéno-œstrogène	200,2	2,73	0,01 – 10 μM	-	0,01 – 20 μM	-	0,1 – 20 μM	-
BPS	Bisphénol	Xéno-œstrogène	250,3	1,83	0,01 – 10 μM	0,1 – 200 μM	0,25 – 30 μM	1 μM	-	1 μM

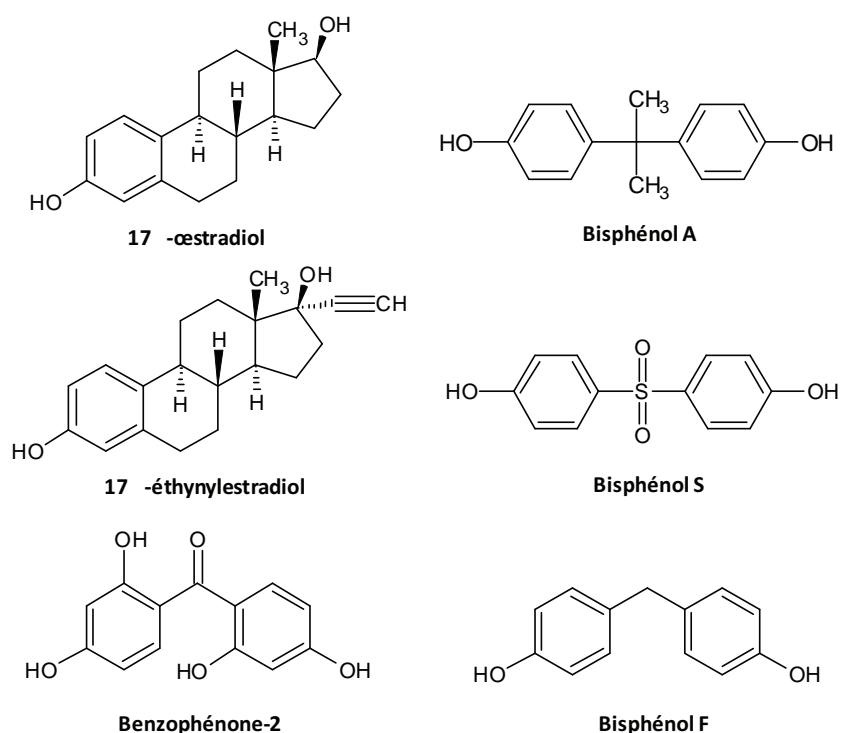


Figure 32. Formule chimique développée des molécules utilisées

II.3.1. 17 -œstradiol et éthinylestradiol

Ces deux molécules ont été utilisées comme témoins positifs d'une activité œstrogénique. La 17 -œstradiol (E2) est la principale hormone œstrogénique des vertébrés. L'éthinylestradiol (EE2) est le dérivé de synthèse de l'E2 le plus couramment utilisée dans les pilules contraceptives. Son activité œstrogénique et sa présence avérée dans l'environnement en font l'un des xéno-œstrogènes de référence.

II.3.2. Benzophénone 2

Les benzophénones sont des substances chimiques de synthèse qui ont la capacité d'absorber les rayonnements ultra-violet. Ces filtres UV sont, pour cette raison, utilisés dans de nombreux produits de consommation courante comme des revêtements (peinture, vernis), des plastiques alimentaires, des textiles et des produits cosmétiques (crèmes solaires, shampooings, baumes à lèvres). Ils sont utilisés comme adjuvant dans la majorité de ces produits ou bien en tant que substance active dans les crèmes solaires. L'utilisation de plus en plus fréquente de cette famille de composés chimiques entraîne une contamination environnementale. Les benzophénones sont retrouvées dans les eaux usées, les rivières, les lacs, l'eau de mer à des concentrations de l'ordre du ng/L, dans le sol et les sédiments à des concentrations de l'ordre du ng/kg, et dans les poissons à des concentrations de l'ordre de ng/g de lipides (Balmer et al. 2005; Jeon et al. 2006; Zenker et al. 2008; Fent et al. 2010).

Les benzophénones, dont la benzophénone-2 (BP2), sont des PE capables de perturber différents types de fonctions hormonales. La BP2 a été caractérisée comme ayant des propriétés anti-androgéniques (Molina-Molina et al. 2008) et antithyroïdiennes (Schmutzler et al. 2007). Une altération de la stéroïdogenèse par la BP2 a également été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (Kim et al. 2011). Les propriétés œstrogéniques de différentes benzophénones, dont la BP2, ont été démontrées avec l'utilisation de différents modèles cellulaires d'origine humaine (Nakagawa et al. 2000; Schlumpf et al. 2001; Nakagawa et Suzuki 2002; Suzuki et al. 2005; Kunz et al. 2006; Molina-Molina et al. 2008). *In vivo*, l'effet œstrogénique de la BP2 a été montré chez le poisson à tête de boule (*Pimephales promelas*) par la mise en évidence d'une altération de la fonction de reproduction associée à une augmentation du taux de Vtg circulante (Weisbrod et al. 2007). Chez la souris, un hypospadias ER-dépendant a été retrouvé chez les nouveau-nés issus de mères exposées à la BP2 (Hsieh et al. 2007). Chez le rat, l'essai utérotrophique s'est révélé positif à la suite d'une exposition à la BP2 (Yamasaki et al. 2003).

Enfin, à ce jour, une seule étude décrivant les produits de transformation de la BP2 *in vivo* pour une espèce de mammifère (le rat) a été publiée. Deux métabolites de la BP2, un conjugué à l'acide glucuronique et un conjugué sulfate, ont été retrouvés dans le plasma et les urines chez le rat, après exposition par voie orale (Schlecht et al. 2008).

II.3.3. Bisphénols A, F et S

Les bisphénols, molécules issues de la synthèse chimique, sont des monomères utilisés dans la fabrication de résines époxydes et de polycarbonates. Ils sont principalement retrouvés dans certains plastiques. Le bisphénol le plus utilisé à ce jour est le bisphénol A (BPA) qui rentre dans la composition de très nombreux produits de consommation courante : matériaux plastiques, revêtements intérieurs des boîtes de conserve, laques, vernis, peintures, tickets de caisse, ciments dentaires, fluides caloporteurs, lubrifiants... (ANSES 2011). Comme expliqué dans le paragraphe III.2.1. de la synthèse bibliographique, depuis le 1^{er} janvier 2013, les matières contenant du bisphénol A et en contact direct avec les aliments destinés aux enfants de moins de 3 ans sont interdites en France. Cette mesure s'est étendue à l'ensemble des contenants alimentaires à compter du 1^{er} janvier 2015. D'autres bisphénols comme le bisphénol F et le bisphénol S sont potentiellement des composés de substitution pour le bisphénol A. Des études *in vivo* et *in vitro* réalisées chez l'Homme ou l'animal dont le poisson zèbre ont montré que ces trois bisphénols possèdent des activités de type œstrogénique. Toutefois, les cibles moléculaires de ces bisphénols ne sont pas restreintes aux récepteurs des œstrogènes (Olea et al. 1996; Perez et al. 1998; vom Saal et al. 1998; Chen et al. 2002; Yamasaki et al. 2002; Lindholst et al. 2003; Van den Belt et al. 2003; Kuruto-Niwa et al. 2005; Cabaton et al. 2009; Vandenberg et al. 2009; Grignard et al. 2012; Ji et al. 2013; Molina-Molina et al. 2013; Naderi et al. 2014).

Bisphénol A

Le bisphénol A présent dans l'environnement a une origine anthropique. Le BPA a été retrouvé dans tous les milieux environnementaux. Il a été identifié dans les rivières, les lacs, les estuaires et les océans. Les concentrations environnementales en BPA dans les eaux de différents pays sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de ng/L. Dans les sédiments, les concentrations en BPA mesurées sont de l'ordre du µg à la centaine de µg/kg (ANSES 2013). Le BPA a également été retrouvé chez l'Homme dans les urines et dans le sang (ANSES 2013). Le BPA total (BPA et métabolites) a été identifié dans plus de 90% des échantillons urinaires provenant de la population américaine (USA) (Calafat et al. 2008). D'autres études ont montré la présence de BPA (libre ou conjugué) dans le liquide amniotique (Yamada et al. 2002; Edlow et al. 2012), le sang de cordon ombilical (Lee et al. 2008; Chou et al. 2011) et le placenta humain (Jimenez-Diaz et al. 2010; Cao et al. 2012) suggérant une exposition foetale, ce qui conforte les conclusions relatives à la distribution de ce composé chez l'animal, suite à

une exposition gestationnelle (Zalko et al. 2003). Différentes études épidémiologiques et expérimentales ont évalué les effets potentiels du BPA sur l'environnement et l'Homme. Selon les rapports de l'ANSES (ANSES 2011, 2013), certains effets du BPA, qualifiés d'avérés chez l'animal, touchent le cerveau et le comportement (modification histologique de la neurogénèse lors d'expositions pré ou périnatales), l'appareil reproducteur femelle (kystes ovariens, hyperplasie de l'endomètre, avancement de l'âge de la puberté, lors d'expositions pré ou postnatales), le métabolisme énergétique (altération de la lipogénèse lors d'une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte), l'appareil reproducteur mâle (altération de la production spermatique lors d'exposition à l'âge adulte) et la glande mammaire (accélération de la maturation et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires à l'âge adulte en lien avec une exposition pré ou périnatale). Chez l'Homme, les effets suspectés concernent l'appareil reproducteur femelle (maturation oocytaire chez la femme dans un contexte de procréation médicalement assistée), le système cardio-vasculaire (maladies coronariennes) et le métabolisme énergétique (diabète). Compte tenu des études animales, il est possible que le BPA joue un rôle dans les problèmes de fertilité masculine par ailleurs avérés. Le Bisphénol A est aujourd'hui considéré comme un xénobiotique de référence dans les études expérimentales portant sur les PE.

Différentes études portant sur la biotransformation du BPA ont été menées dans des modèles *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*. Chez la souris gestante, un conjugué glucuronide, plusieurs double-conjugués, et des conjugués méthoxylés excrétés dans les urines ont été mise en évidence (Zalko et al. 2003) suggérant la formation de petites quantités de métabolites réactifs *in vivo*. L'emploi de fractions microsomales hépatiques S9 de souris a permis de mettre en évidence l'oxydation du BPA et la production d'intermédiaires réactionnels dont la formation est dépendante des CYPs (Jaeg et al. 2004). Ces intermédiaires réactionnels sont responsables de la formation d'adduits à l'ADN (Atkinson et Roy 1995). Par ailleurs, le BPA entraîne une inhibition de certaines formes de CYPs et interfère avec la conjugaison d'autres composés comme la testostérone et l'umbelliférone (Pfeiffer et Metzler 2004). Le BPA et ses métabolites conjugués (glucuronide et sulfate, simples ou doubles conjugués) sont majoritairement éliminés par voie urinaire chez l'Homme et par voie fécale chez le rat (Lindholst et al. 2003).

Bisphénols F et S

L'utilisation du bisphénol F (BPF) et du bisphénol S (BPS) en tant que substituts au BPA est déjà effective. En effet, le BPS a été retrouvé dans des cannettes et des boîtes de conserve (Vinas et al. 2010; Gallart-Ayala et al. 2011) et dans des tickets de caisses thermiques (Becerra et Odermatt 2012; Liao et al. 2012b). De plus, le BPS a été retrouvé dans plus de 81% des échantillons urinaires provenant de la population américaine (USA) (Liao et al. 2012a) suggérant une large exposition des populations. Bien que les concentrations environnementales du BPS et du BPF semblent être

inférieures à celle du BPA (Fromme et al. 2002; Stachel et al. 2003), la contamination environnementale par ces bisphénols de substitution devrait aller en augmentant avec leur utilisation.

Selon les modèles cellulaires utilisés, il a été montré que le BPS exerce une activité œstrogénique plus faible (Molina-Molina et al. 2013) ou similaire à celle du BPA (Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Kitamura et al. 2005; Kuruto-Niwa et al. 2005; Grignard et al. 2012). Récemment, deux études menées chez le poisson zèbre adulte exposé au BPS ont mis en évidence une altération de la fécondité (diminution de la qualité spermatique) et des troubles hormonaux (hormones stéroïdes, hormones thyroïdiennes) (Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014). Concernant le BPF, des études ont également confirmé son activité œstrogénique *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* (Perez et al. 1998; Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Yamasaki et al. 2002; Stroheker et al. 2004; Cabaton et al. 2009; Molina-Molina et al. 2013).

Les études de biotransformation du BPF avec des systèmes subcellulaires comme des fractions microsomales ou des fractions S9 de foie ont révélé la formation de métabolites de phase II (glucurono- et sulfoconjugués) et de phase I. Plusieurs métabolites hydroxylés ont été identifiés. Les métabolites de phase I majoritaires sont les BPF *méta*- et *ortho*-hydroxylés (catéchol) dont la formation est dépendante des CYPs (Cabaton et al. 2008). Chez le rat, l'excrétion du BPF et de ses métabolites est majoritairement urinaire. Plusieurs métabolites du BPF y ont été retrouvés, le métabolite majoritaire étant dans ce cas un conjugué sulfate. Chez la ratte gestante, le BPF et ses métabolites ont été détectés dans l'utérus, le placenta, le liquide amniotique et le fœtus (Cabaton et al. 2006). Concernant le BPS, les premières informations relatives à sa biotransformation proviennent du travail réalisé dans le cadre de cette thèse (articles 3 et 4, paragraphe IV et V de la partie résultats).

II.3.4. Molécules retenues pour les études de biotransformation

Deux molécules ont été sélectionnées pour l'étude de leur devenir dans les modèles biologiques. Il s'agit de la benzophénone-2 et du bisphénol S. Ce choix se justifie d'une part par les résultats précédemment obtenus, qui montraient une différence de réponse œstrogénique entre des modèles biologiques du poisson zèbre, et d'autre part, par l'intérêt que présentent ces molécules émergentes d'un point de vue environnemental, et plus généralement, d'un point de vue de sécurité sanitaire.

L'étude du devenir de ces molécules nécessitait leur marquage radioactif. Pour ceci, ces molécules ont été synthétisées avec un marquage au tritium sur les noyaux aromatiques, par des prestataires spécialisés.

II.4. Modalités d'exposition des modèles biologiques aux xénobiotiques

II.4.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE

II.4.1.1. Cultures cellulaires

II.4.1.1.1. Culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre

La culture primaire d'hépatocytes issue du foie de poisson zèbre adulte mâle (PZFH) a fait l'objet d'un travail de développement au sein du laboratoire INERIS co-encadrant mon travail de thèse. Cette mise au point a été réalisée sur la base de protocoles précédemment décrits chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Bjorkblom et al. 2007) et le poisson zèbre (Ibabe et al. 2005). La modification de différents paramètres clefs des différentes étapes de la mise en culture a conduit à l'établissement d'un procédé finalisé détaillé dans l'article 3 (paragraphe IV de la partie résultats) (Le Fol et al. 2015). Le foie étant richement **VASCULARISE**, l'une des difficultés a été l'élimination du plus grand nombre d'hématies possible au cours des étapes de mise en culture. La composition de la solution de lavage, la composition de la solution de dissociation, les différents paramètres de dissociation (durée, température, agitation, aspiration/refoulement), le procédé de filtration, les centrifugations et la densité d'ensemencement ont fait l'objet d'essais successifs.

L'exposition des hépatocytes en culture primaire a été réalisée en plaques 96 puits pendant 96 heures à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figure 33). Les cellules ont été exposées dans un milieu de culture LDF sans rouge de phénol contenant du SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté et déstéroïdé (5% v/v). Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO (0,15% v/v). Le 17 -œstradiol a été utilisée comme contrôle positif de l'induction de l'expression de la vitellogénine. Le contrôle négatif correspondait à des cellules exposées à du DMSO sans xénobiotique. La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) a été utilisée pour la mesure de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufin *O*-dééthylase), test enzymatique reflétant l'activité des CYP1A. La moitié du milieu de culture a été renouvelée à 48h. A la fin de l'exposition, le milieu de culture de chaque puits a été récupéré puis stocké à -80°C . La mesure de l'activité EROD sur les cellules des puits et l'analyse de la quantité de vitellogénine par ELISA ont ensuite été entreprises.

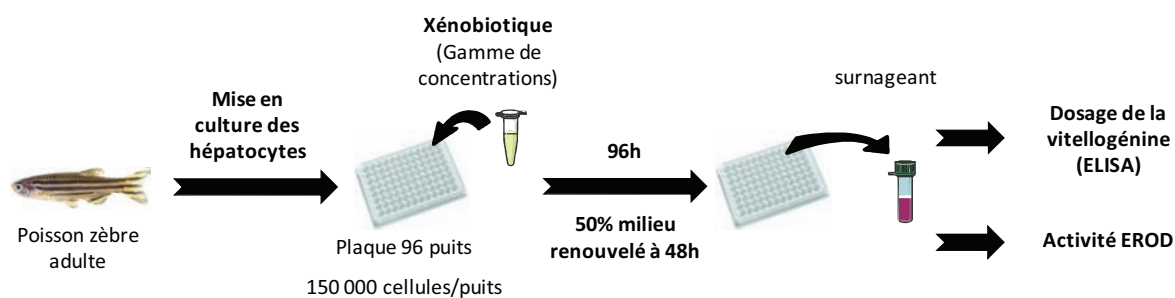


Figure 33. Exposition d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire en vue du dosage de la vitellogénine et de la mesure de l'activité EROD

II.4.1.1.2. Lignées cellulaires ZELH-zfERs

Les lignées cellulaires transfectées ZELH-zfERs ont été développées au laboratoire INERIS (Cosnefroy et al. 2012). Les conditions de culture utilisées dans ce travail ont été identiques à celles mises au point précédemment (Figure 34). Brièvement, les cellules ont été mises en culture à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans du milieu LDF - SVF décomplémenté (5% v/v) et dans du LDF sans rouge de phénol - SVF décomplémenté et déstéroïdé (5% v/v) lors de l'exposition aux xénobiotiques. Suivant la lignée, les densités cellulaires auxquelles ont étéensemencées les cellules en plaque 96 puits, étaient les suivantes : ZELH-zfER 1 à 25000 cellules par puits ; ZELH-zfER 2 à 75000 cellules par puits. Après une nuit, les cellules ont été exposées aux xénobiotiques dissous dans du DMSO (0,15%, v/v) et mises à incuber pendant 72h. Le potentiel œstrogénique des xénobiotiques a ensuite été évalué par la mesure de l'activité de la luciférase.

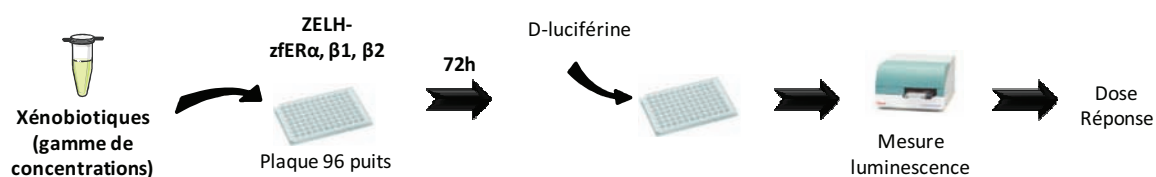


Figure 34. Exposition des cellules ZELH-zfERs en vue de la mesure de l'activité luciférase

II.4.1.2. Larve transgénique *cyp19a1b*-GFP et larves sauvages de poissons zèbres

Le procédé d'exposition a été le même pour les larves transgéniques et pour les larves sauvages (Figure 35). Après la ponte, les œufs fécondés ont été triés sous loupe binoculaire. Dans le cas des larves transgéniques, une mesure de fluorescence a été faite sur chacune des larves. Une quinzaine d'œufs fécondés a été regroupée par condition expérimentale, et l'expérimentation a été réalisée en triplicat. Dans le cas des larves sauvages, le taux de transcrits a été évalué sur un pool de 25 larves par condition, et chacune des conditions a été répétée 3 fois. Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO puis dans l'eau. La concentration finale en DMSO était de 0,01% (v/v). Le témoin négatif correspond à une exposition à cette dilution de DMSO. Les larves ainsi exposées ont été placées dans une étuve à $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ avec un cycle jour/nuit de 14/10 h. La moitié de l'eau a été renouvelée toutes les 24 h. A la fin des 96 heures d'exposition, les larves ont été récupérées pour une mesure de fluorescence dans le cas des larves transgéniques, ou bien pour un stockage à -80°C en vue de l'analyse de l'expression des transcrits dans le cas des larves sauvages.

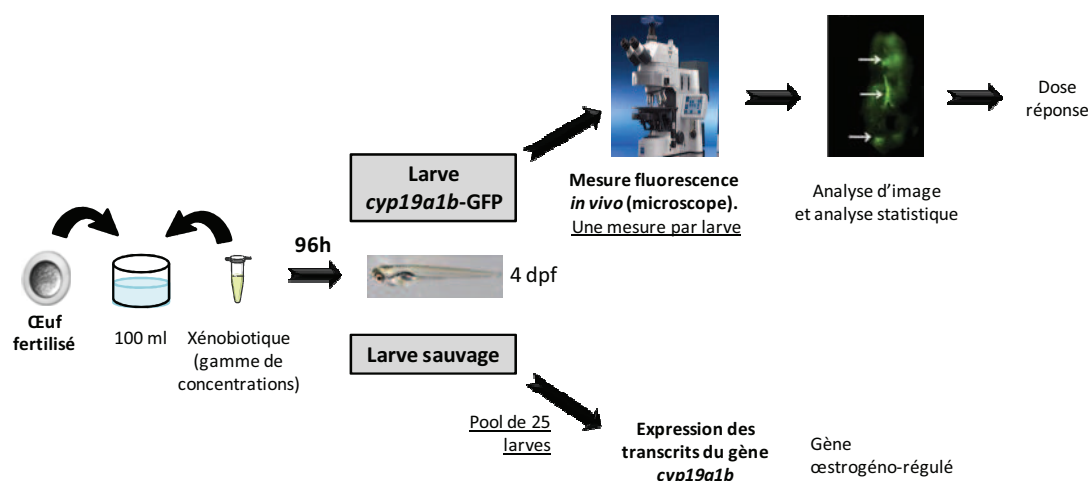


Figure 35. Exposition des larves *cyp19a1b*-GFP et larves sauvages en vue de mesures de fluorescence et d'analyses d'expression de transcrits

II.4.1.3. Poisson zèbre adulte

Les poissons zèbres adultes mâles ont été exposés pendant 7 jours à différents xénobiotiques (Figure 36). La voie d'exposition retenue a été l'eau. Cette voie d'exposition est couramment utilisée au laboratoire et permet des prélèvements d'échantillons d'eau pour une quantification du xénobiotique. Les poissons ont été exposés dans des aquariums de 4 L d'eau en conditions semi-statiques. Pour chacune des conditions expérimentales, huit poissons ont été exposés. Ce nombre de poissons permet de limiter un stress potentiel dû à une surpopulation. L'eau a été renouvelée toutes les 24h. Lors du

changement d'eau, une nouvelle dose de xénobiotique a été ajoutée. Les molécules à l'étude ont été dissoutes dans du DMSO 0,006% (v/v), solvant qui n'entraîne pas de toxicité à cette concentration. De plus, des études réalisées au laboratoire ont montré une absence de modifications des paramètres biochimiques chez les poissons pour ce solvant ou pour de l'eau sans DMSO. Les poissons des aquariums témoins ont été exposés au DMSO à la dilution de 0,006% (v/v). Les conditions d'exposition ont été contrôlées quotidiennement par le suivi de paramètres physicochimiques de l'eau (température, pH, conductivité et concentration en oxygène dissous).

Les concentrations en xénobiotique ont été déterminées avant le dernier renouvellement d'eau (24h après la dernière exposition). Les échantillons d'eau ont été purifiés et concentrés sur colonne SPE (Solid Phase Extraction). La concentration en xénobiotiques a été évaluée par CLHP à l'aide d'une gamme de standards.

A la fin de l'exposition, les poissons ont été sacrifiés à l'aide d'eau glacée (mélange de glace et d'eau). Cette méthode d'euthanasie est spécifique des poissons d'eau chaude. Pour chaque poisson, le poids et la taille ont été mesurés. Différents organes et tissus ont été prélevés : (1) 10 μ L de sang dans du PBS hépariné conservés à -20°C, (2) le foie, le cerveau et une des deux gonades dans du RNAlater® (Sigma-Aldrich, France) et conservés à -20°C en vue d'analyses potentielles d'expression de gènes, (3) une gonade par animal a été recueillie dans du liquide de Bouin pour des analyses histologiques et immunohistochimiques potentielles.

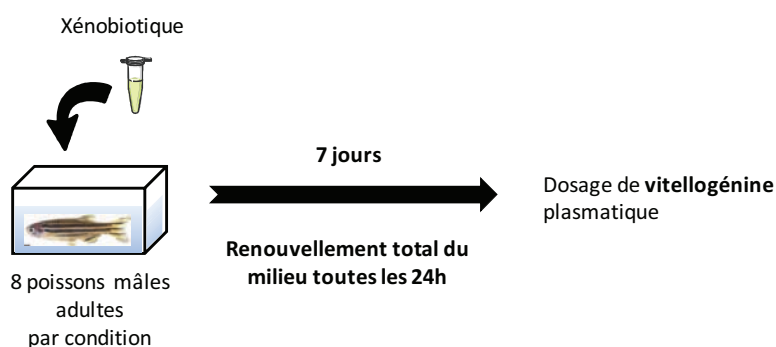


Figure 36. Exposition de poissons zèbres adultes mâles en vue du dosage de la vitellogénine

II.4.2. Etudes de biotransformation

II.4.2.1. Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires humaines (MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG) et de poisson zèbre (ZFL, ZELH-zfER et ZELH-zfER 2) ainsi que les cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH) ont été exposées à la ^3H -BP2 et au ^3H -BPS pour l'étude de leur biotransformation dans les modèles biologiques (Figures 37 et 38).

Les modèles cellulaires du poisson zèbre ont été cultivés à 28°C dans des milieux de culture identiques à ceux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique des xénobiotiques (Cosnefroy et al. 2012). Les modèles cellulaires humains ont été cultivés à 37°C \pm 2 dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé pour les cellules MELN et T47D-KBLuc a été celui décrit précédemment (Molina-Molina et al. 2008). Les cellules HepaRG ont également été utilisées dans des conditions déjà décrites (Aninat et al. 2006). Brièvement, les milieux de culture des cellules MELN et T47D-KBLuc se composaient principalement de DMEM enrichi en SVF décomplémenté (15% v/v), du MEM enrichi en SVF décomplémenté (10% v/v) pour les cellules HepG2, et du Williams' E enrichi en SVF (10% v/v) pour les cellules HepaRG. Après 24h de culture, le milieu a été remplacé par du milieu sans SVF pour HepG2 et HepaRG, ou par du milieu contenant du SVF décomplémenté et déstéroïdé pour MELN et T47D-KBLuc (cas identique aux modèles cellulaires du poisson zèbre). Toutes les expérimentations ont été réalisées dans des milieux sans rouge de phénol.

Les modèles cellulaires ZFL, ZELH-zfERs, MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG ont été ensemencés à 350 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits contenant 2 ml de milieu par puits. Les hépatocytes en culture primaire ont été ensemencés à 195 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits contenant 500 μL de milieu par puits. Ces densités cellulaires ont été choisies afin de garantir un même ratio nombre de cellules/ surface du puits pour tous les modèles. Après les 24 premières heures, le milieu d'ensemencement a été remplacé par 1 ml du milieu d'exposition pour les cellules ZFL, ZELH-zfERs, MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG, et par 310 μl du milieu d'exposition pour les hépatocytes en culture primaire. Ces volumes ont permis de conserver un même ratio surface du puits/ hauteur du milieu de culture.

Les solutions de ^3H -BP2 (5045 Bq par puits) et le ^3H -BPS (5045 Bq par puits) ont été complétées par l'ajout de BP2 et BPS non radiomarqués pour atteindre les concentrations finales de 0,1, 1, 10, 20, 50, 100, 150 et 200 μM dans les milieux de culture. La BP2 et le BPS radiomarqués et non radiomarqués ont été dissous dans du DMSO dont la concentration finale dans les milieux de culture était de 0,1 % (v/v). Dans ces études de biotransformation, le témoin négatif (200 μM) a été réalisé dans les mêmes

conditions de culture mais sans les cellules. Il s'agissait, dans ce cas, d'évaluer la stabilité (ou la dégradation) de la molécule radiomarquée en l'absence de cellules.

Après 24 heures d'exposition, les milieux de culture ont été récupérés et conservés à -20°C. Les cellules ont été décollées des puits et lysées par un grattage du puits dans une solution H₂O/CH₃CN (50:50, v/v). Ce milieu a été conservé, lui aussi, à -20°C.

La radioactivité dans les milieux de culture et dans les milieux contenant les cellules lysées a été quantifiée par scintillation liquide avant de procéder à l'analyse de leur contenu par radio-CLHP.

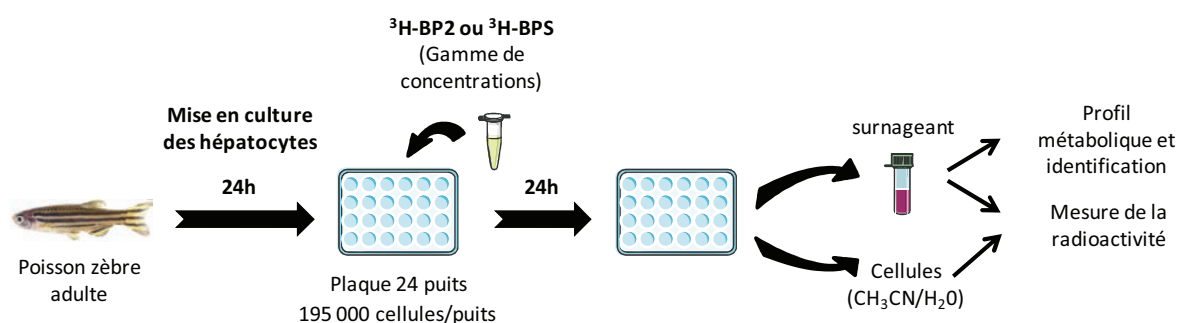


Figure 37. Exposition des hépatocytes de poisson zèbre mâle en culture primaire pour l'étude du devenir des xénobiotiques

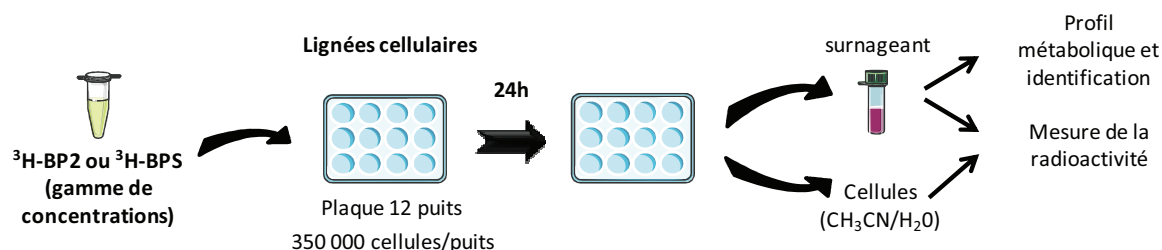


Figure 38. Exposition des lignées cellulaires humaines et des lignées de poisson zèbre pour l'étude du devenir des xénobiotiques

Pour chaque condition d'exposition, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée au PrestoBlue®. Dans ce test, le pouvoir réducteur des cellules viables entraîne la transformation de la résazurine bleue en un composé rouge, associée à l'émission d'une fluorescence. Pour chaque modèle cellulaire, les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits dans les mêmes conditions que décrites précédemment, à une densité cellulaire de 25 000 cellules par puits pour ZFL et ZELH-zfER , de 75 000 cellules par puits pour ZELH-zfER 2, et de 50 000 cellules par puits pour PZFH, MELN,

T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG. Après 24 h de culture, le milieu a été remplacé par le milieu d'exposition non radiomarké correspondant. Les cellules ont été exposées à 0,1, 1, 10, 20, 50, 100, 150 et 200 μM pendant 24 h. Le milieu de culture a alors été remplacé par du PrestoBlue® dilué dans le milieu correspondant à la lignée cellulaire. Après 2 heures d'incubation, la fluorescence émise a été mesurée par spectrométrie. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage du témoin négatif (DMSO).

II.4.2.2. Larves sauvages

Le devenir de la BP2 et du BPS a été exploré sur des larves sauvages, et non sur des larves transgéniques, pour des raisons de conditions d'élevage et de stabulation des poissons. Chaque condition expérimentale a été obtenue sur la base d'un ensemble de 60 œufs fécondés, triés sous loupe binoculaire, placés dans un volume d'eau claire de 50 mL (Figure 39). L'eau (vecteur de l'exposition) contenait un mélange de la molécule radiomarkée et de la molécule non radiomarkée, pour obtenir la concentration finale de 1 μM et une quantité de radioactivité de 841 000 Bq par condition. La concentration de 1 μM a été choisie d'une part car elle permettait d'obtenir une quantité de matière radiomarkée suffisante pour le volume d'eau des expérimentations et d'autre part, car c'est une concentration couramment utilisée dans les études toxicologiques et également présente comme point de gamme dans nos modèles cellulaires. Nos expérimentations préliminaires avaient par ailleurs démontré que l'utilisation d'une concentration de 0,1 μM ne permettait pas de travailler avec une quantité de radioactivité suffisante pour nos objectifs de profilage radio-CLHP. Les xénobiotiques ont été dilués dans du DMSO (0,01 % v/v final). Pour les témoins, nous avons procédé à l'identique mais sans poisson et en utilisant une eau d'élevage (et non une eau claire) ce qui nous permettait de nous assurer de la stabilité du xénobiotique dans les conditions expérimentales. Un bain-marie a été utilisé afin de garantir une température d'exposition de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, et un cycle jour/nuit de 14/10 h a été mise en place.

Après 24 h d'exposition à la BP2 ou au BPS non radiomarké, la totalité de l'eau a été éliminée. Les œufs ont alors été exposés aux mélanges radiomarké/non radiomarké dans 50 mL d'eau claire. Pendant les 72 h suivantes, c'est-à-dire jusqu'au stade 4 dpf, l'eau n'a pas été renouvelée. Ce procédé d'exposition a été adapté d'après celui utilisé pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques par les larves transgéniques. Une durée totale d'exposition de 96 h d'exposition a ainsi été conservée et un renouvellement du milieu a été maintenu à la fin des 24 premières heures. L'absence de renouvellement de l'eau pendant les 72 h suivantes a été choisi afin d'obtenir une plus grande concentration en métabolites et de faciliter l'interprétation des résultats. Cette absence de renouvellement d'eau n'a pas de conséquence sur la qualité de l'exposition comme l'ont démontrés des

expérimentations antérieures visant à évaluer l'activité œstrogénique de composés chimiques (résultats préliminaires non montrés).

A la fin de l'exposition, l'eau a été récupérée pour quantifier la radioactivité et a été conservée à -20°C en vue des profilages métaboliques par radio-CLHP. Les larves ont été euthanasiées par l'ajout d'un faible volume d'eau refroidie à 4°C (0,7 à 1 mL). Les étapes d'extraction des xénobiotiques et de leurs métabolites à partir des larves fraîches ont alors été entreprises. La verrerie a été rincée à plusieurs reprises par des solvants afin de récupérer la totalité de la radioactivité. La radioactivité de ces rinçages a également été mesurée pour être incluse dans le bilan de radioactivité.

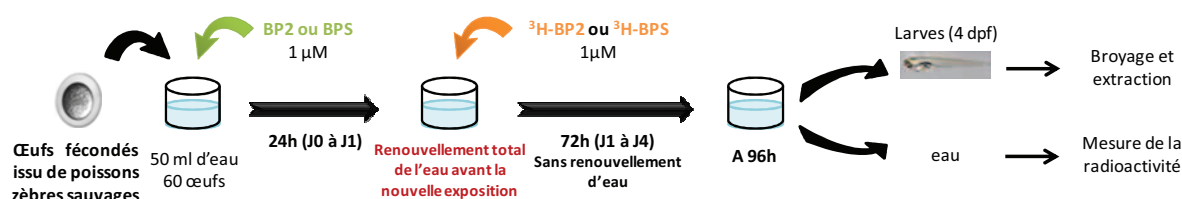


Figure 39. Exposition des larves pour l'étude du devenir des xénobiotiques

II.4.2.3. Poisson zèbre adulte

Dans cette étude de biotransformation, la principale difficulté a été d'avoir un nombre suffisant d'animaux par volume d'eau (biomasse) pour s'assurer d'obtenir une quantité suffisante de radioactivité et pouvoir quantifier chacun des métabolites formés. La condition expérimentale de 8 poissons zèbres adultes pour 4 litres d'eau (soit environ 1 g de poisson par litre d'eau) utilisée pour l'évaluation de l'activité œstrogénique de xénobiotiques, ne nous permettait pas d'atteindre la biomasse suffisante à la quantification des métabolites. Par conséquent, une étude préalable a été menée afin de s'assurer de la faisabilité d'une exposition de poisson zèbre adulte à une biomasse de 10 g de poisson par litre d'eau. Cette étude a montré une absence de variabilité significative des paramètres physico-chimiques de l'eau (oxygène dissout, conductivité, pH, température) et une absence de mortalité et de signes de souffrance de l'animal sur une période de 48 heures. Une exposition préliminaire de poissons zèbres adultes à la ³H-BP2 à une biomasse de 5 g/L a notamment permis de montrer la faisabilité de cette étude à ce niveau de biomasse, deux fois inférieur à celui évalué précédemment sans exposition.

La voie d'exposition retenue pour les expérimentations visant à évaluer l'activité œstrogénique de composés chimiques a été conservée pour les études de biotransformation. Les poissons ont été

exposés aux xénobiotiques à une biomasse de 5 g par litre d'eau, soit 14 à 16 poissons dans 1,5 litre d'eau claire. L'eau radioactive servant à l'exposition a été obtenue par un mélange ^3H -BP2/BP2 ou ^3H -BPS/BPS pour atteindre une concentration finale de 1 μM et une quantité de radioactivité de 1 009 000 Bq par condition. La concentration de 1 μM a été retenue pour les mêmes raisons que dans le cas des larves. Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO (0,005% v/v final). La condition témoin a été obtenue dans les mêmes conditions expérimentales mais en utilisant une eau d'élevage (différente de l'eau claire) et sans poisson. Les potentielles dégradations des molécules radiomarquées notamment par les micro-organismes de l'eau ont alors pu être examinées. Les aquariums ont été placés dans une étuve permettant d'assurer une température d'exposition de $28^\circ\text{C} \pm 2$ et un cycle jour/nuit de 14/10 h.

Le schéma d'exposition (Figure 40) a été adapté de celui utilisé dans le cadre de l'évaluation de l'activité œstrogénique des composés chimiques. Une durée totale d'exposition de 7 jours a été maintenue. Lors des 4 premiers jours, les poissons ont été exposés à une molécule non radiomarquée, et un renouvellement total de l'eau a été réalisé. A partir du 4^{ème} jour, les poissons ont été exposés au mélange radiomarqué/non radiomarqué. L'eau n'a pas été renouvelée jusqu'au 7^{ème} et dernier jour d'exposition. La durée de 72 h sans renouvellement d'eau a permis d'obtenir une plus grande concentration en métabolites et de faciliter l'interprétation des résultats.

De petits échantillons d'eau ont été prélevés au cours de l'exposition, de J4 à J7, afin de quantifier la radioactivité aux heures 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 et 72 (comptées à partir de J4). A la fin de l'exposition, l'eau a été récupérée pour réaliser des comptages de radioactivité, puis stockée à -20°C en vue des profilages métaboliques par radio-CLHP. La radioactivité présente dans les rinçages successifs de l'ensemble de la verrerie et des ustensiles utilisés a également été mesurée. Après avoir sacrifié les poissons dans un volume minimal d'eau refroidie (100 ml), les poissons ont été pesés individuellement puis stockés à -80°C avant les étapes de broyage, d'extraction et de profilage métabolique. L'eau d'euthanasie des poissons a également fait l'objet d'une quantification de la radioactivité.

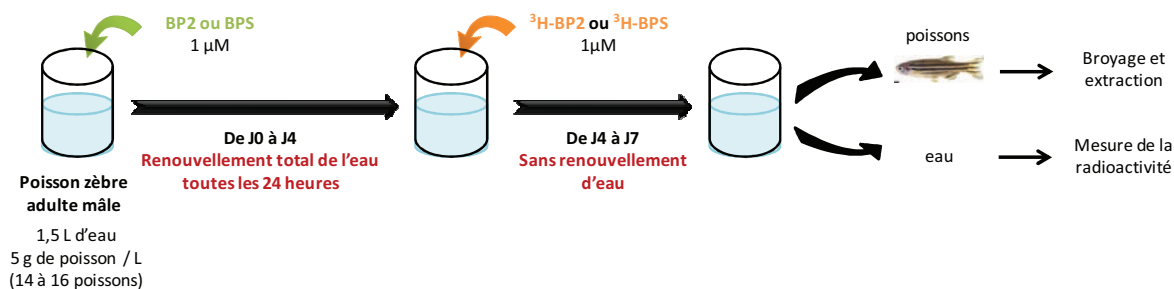


Figure 40. Exposition des poissons zèbres adultes pour l'étude du devenir des xénobiotiques

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité œstrogénique

L'activité œstrogénique des xénobiotiques a été évaluée par l'utilisation de différentes techniques et méthodes selon les modèles cellulaires et animaux : dosage par ELISA de la vitellogénine dans le milieu de culture et dans le sang, activité luciférase, induction de l'expression de la GFP, évaluation du taux de transcrits de gènes œstrogéno-régulés.

II.5.1. Concentration en vitellogénine dans les milieux de culture et dans le sang

Une technique d'immunomarquage ELISA indirect et par compétition (Brion et al. 2002) a été utilisée pour le dosage de la vitellogénine (Vtg) présente dans le surnageant de culture ou dans le sang des poissons (Figure 41). Le principe est basé sur une compétition pour les anticorps (primaires) anti-Vtg (anticorps polyclonaux de Vtg de poisson zèbre DR-264) entre la Vtg contenue dans l'échantillon (surnageant de culture ou sang) et la Vtg purifiée de poisson zèbre (zf-Vtg) fixée sur une microplaque. D'une part, la Vtg purifiée (zf-Vtg) a été fixée sur une microplaque 384 puits sur la nuit. D'autre part, l'échantillon contenant la Vtg à doser et une solution standard de zf-Vtg ont été dilués plusieurs fois. Une quantité connue et excédentaire d'anticorps primaire anti-Vtg a alors été ajoutée à chacune des dilutions pour obtenir la formation de complexes anticorps/antigène. Le lendemain, lors du transfert de ces solutions dans la plaque contenant l'antigène zf-Vtg fixé, les anticorps primaires libres ont pu former un complexe avec la zf-Vtg de la plaque. Les complexes précédemment établis ont été éliminés par des lavages. L'incubation d'un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire, couplé à la peroxydase du raifort, a permis, par l'ajout de son substrat (le tétraméthyl benzydine (TMB)), une quantification colorimétrique (absorbance) par spectrophotométrie. Par conséquent, dans ce dosage

Vtg par ELISA, plus l'échantillon est riche en Vtg, plus le signal à 450 nm est faible, et inversement. Pour déterminer l'absorbance maximale (B_0), des échantillons contenant seulement de l'anticorps primaire (pas de Vtg) ont été incubés pour chaque série de dosage.

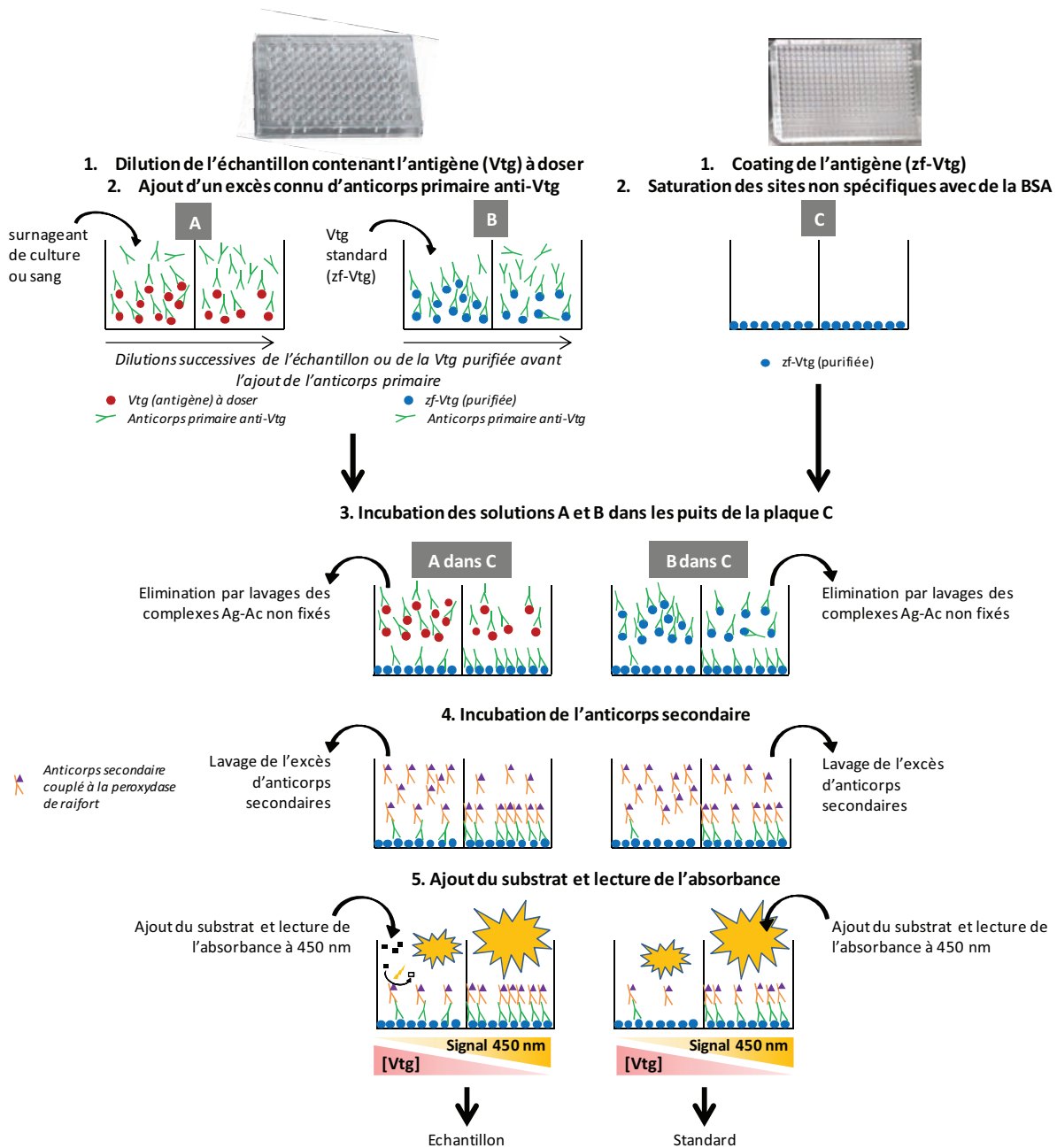


Figure 41. Principe du dosage ELISA compétitif et indirect de la vitellogénine du poisson zèbre D'après (Brion et al. 2002). BSA : bovine serum albumine, Vtg : vitellogénine

Le pourcentage de fixation de l'anticorps primaire dans le puits (B_i/B_0) a été calculé d'après l'équation suivante :

$$\frac{B_i}{B_0} = \left[\frac{\text{Absorbance du standard ou de l'échantillon} - \text{bruit de fond}}{\text{Absorbance de la fixation maximale} - \text{bruit de fond}} \right] \times 100$$

$B_i/B_0 = 100\%$ correspond à la situation où l'échantillon ne contient pas de Vtg. Tout l'anticorps primaire a pu se fixer à l'antigène purifié (zf-Vtg) fixé à la plaque.

$B_i/B_0 = 0\%$ correspond à la situation où l'échantillon est très chargé en antigène à doser (Vtg). Tout l'anticorps primaire a été saturé en Vtg pendant l'étape de pré-incubation (Figure 41, étape 2) avec l'échantillon. Aucun anticorps primaire n'a alors pu se fixer à l'antigène purifié (zf-Vtg) fixé à la plaque.

La figure suivante représente le dosage de la Vtg purifiée.

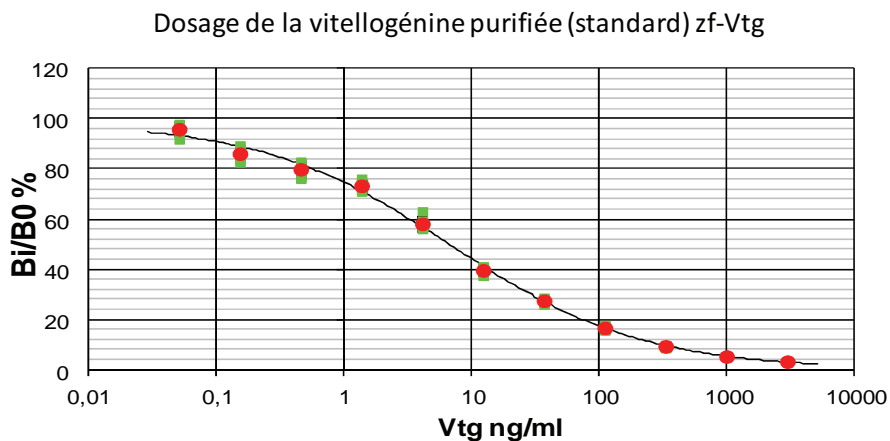


Figure 42. Dosage ELISA du standard de vitellogénine (zf-Vtg)

Ce dosage correspond à la situation « B dans C » de la Figure 41

II.5.2. Activité EROD

Dans le cadre de la caractérisation du modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH) qui a été mis en place, l'activité EROD (7-éthoxyrésorufin *O*-dééthylase) qui reflète celle des CYP1A, a été évaluée comme décrit précédemment (Laville et al. 2004). A la fin de l'exposition des hépatocytes (96h), le milieu a été remplacé par 100 μ L de milieu sans sérum contenant de la 7-éthoxyrésorufine. La cinétique de production de la résorufine a été suivie pendant 45 minutes par fluorométrie. A la suite, un dosage des protéines totales a été réalisé par l'emploi de la fluorescamine (Lorenzen et Kennedy 1993). Brièvement, après une étape de congélation décongélation des cellules, une gamme d'albumine sérique de bœuf (BSA) a été réalisée pour permettre la quantification des protéines totales contenues dans les cellules. Suite à l'ajout de la fluorescamine dans chaque puits et après une incubation de 10 minutes à l'abri de la lumière, la fluorescence émise a été mesurée. L'activité EROD a alors été rapportée à la quantité de protéines totales, et exprimée en pmol de résorufine / min/ mg de protéine.

II.5.3. Taux relatifs de transcrits

Les variations d'expression des gènes *cyp19a1b*, *vtg1* et *vtg2* (Tableau 26) ont été mesurées chez la larve sauvage. Ces mesures ont permis d'appréhender l'effet œstrogénique des substances étudiées en complément des résultats obtenus dans le modèle larve transgénique *cyp19a1b*-GFP.

Tableau 26. Caractéristiques des gènes cibles et du gène de référence

Nom	Nom développé	Fonction de la protéine	Séquence de l'amorce sens (5' vers 3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5' vers 3')	Numéro d'accès
<i>cyp19a1b</i>	Cytochrome P450, famille 19, sous-famille A, polypeptide 1b	Stéroidogénèse	ACTAAGCAAGTCC TCCGCTGTGTACC	TTTAAACATACCTA TGCATTGCAGACC	NM_131642.1
<i>vtg1</i>	Vitellogenin 1	Précurseur de protéines du sac vitellin	AACGAACAGCGAG AAAGAGATTG	GATGGGAACAGCGA CAGGA	NM_0010448 97.2
<i>vtg2</i>	Vitellogenin 2	Précurseur de protéines du sac vitellin	GGCTCAGTTCAAG GACAAGC	TTGCAAAGCAACCAC AAGAG	Gene ID: 559931
<i>gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Enzyme impliquée dans l'oxydation du glucose	GAGCACCAGGTTG TGTCCTCA	TGTCATACCATGTGA CCAGCTT	Gene ID: 317743

Les gènes *cyp19a1b*, *vtg1* et *vtg2* ont été quantifiés par PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction). L'ARN total a été extrait des larves par l'emploi de Trizol[®]. La qualité des ARN totaux a été vérifiée par migration sur gel d'agarose. Après une quantification et une normalisation de la concentration en ARN total, une étape de transcription inverse a permis l'obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN.

La validité des amorces a été vérifiée auparavant sur des échantillons témoins afin d'évaluer leur spécificité et leur qualité. Une PCR classique suivie d'une migration sur gel d'agarose a permis d'évaluer leur spécificité et la taille de l'amplicon. Des essais de PCR quantitative ont été réalisés sur des échantillons témoins afin d'évaluer l'efficacité de la réaction PCR selon les amorces et leur concentration.

La PCR quantitative a été réalisée sur les ADNc. Le principe de la PCR est l'amplification d'un brin d'ADNc, spécifique d'un gène, à l'aide d'un couple d'amorces. Cette amplification, réalisée par un thermocycleur, se déroule selon des cycles de PCR caractérisés par trois étapes, chacune correspondant à une température spécifique : (1) la dissociation des ADNc « double brin », (2) l'hybridation des amorces, et (3) l'élongation de l'amplicon grâce à l'enzyme polymérase. Dans notre cas, l'amplification des brins d'ADNc a été évaluée par l'utilisation du SYBR Green[®]. Ce composé se lie aux doubles brins au fur et à mesure de leur formation au cours de l'élongation. A chaque cycle, la fluorescence mesurée, augmente avec la quantité d'acides nucléiques. Cette augmentation de

fluorescence est liée à l'efficacité de l'amplification qui est théoriquement de 2. La fluorescence mesurée est donc en relation avec la quantité de produits d'amplification obtenue, qui est elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc. Après n cycles, la fluorescence dépasse un seuil de détection. Plus l'ADNc est concentré, plus son cycle de sortie appelé Ct (« Cycle treshhold ») est bas, c'est-à-dire qu'un plus faible nombre de cycles de PCR est nécessaire pour atteindre ce Ct.

Les résultats des PCR quantitatives ont été exprimés en taux de transcrits du gène cible de manière relative à un gène de référence (*gapdh*) pour lequel l'absence de variation des taux de transcrits selon les traitements subies par les larves a été vérifiée. La méthode de quantification relative, souvent utilisée, pour laquelle le taux d'expression des ARNm est obtenu selon le calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$, fixe arbitrairement l'efficacité de la PCR à 2. Or, la valeur réelle d'efficacité peut varier. Dans notre cas, l'expression des résultats tient compte de cette variabilité d'efficacité de la PCR (efficacité minimale retenue : 1,8). Le programme associé au thermocycleur Eppendorff realplex4 Mastercycler egradient S, permet de calculer, à partir d'une gamme de concentration d'ADNc, une concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pour chaque Ct. Ainsi, grâce à cette gamme d'ADNc obtenue par dilutions successives, le résultat de chaque qPCR a été exprimé en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Par la suite, le rapport entre la concentration du gène cible et la concentration du gène de référence, pour chaque traitement et réplicat, a permis d'obtenir un rapport d'induction. La moyenne de ce rapport a été ramenée à 1 pour le traitement témoin à savoir le DMSO. Selon les traitements, le taux d'induction du gène cible a alors été exprimé relativement au témoin.

II.5.4. Activité luciférase

Dans les modèles cellulaires du poisson zèbre ZELH-zfERs, l'activité œstrogénique de substances chimiques a été évaluée en mesurant l'activité luciférase. Cette méthode consiste à mesurer la bioluminescence produite par l'activité luciférase dans les cellules vivantes. La D-luciférine (substrat de la réaction) est transformé en oxyluciférase en présence d' O_2 et d'ATP. A l'état excité, cette molécule instable retourne à son état initial en émettant de la lumière. La luminescence a été lue puits par puits pendant deux secondes par un luminomètre. Les résultats bruts ont été obtenus en unité de luminescence relative (RLU). Par la suite, ils ont été exprimés en pourcentage par rapport à l'activité maximale induite par le témoin positif, à savoir le 17 β -œstradiol à 10^{-8} M (Figure 43).

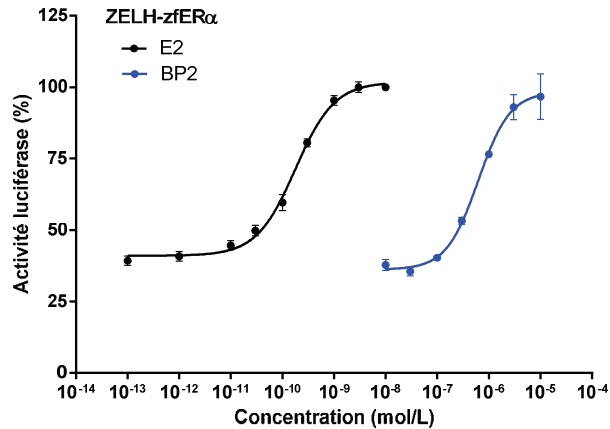


Figure 43. Courbe dose-réponse de l'activité luciférase du 17 β -œstradiol (E2) et de la benzophénone-2 (BP2) dans les cellules ZELH-zfER

II.5.5. Induction de l'expression de la GFP

Dans le modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP, l'activité œstrogénique des substances chimiques a été évaluée par la mesure de la fluorescence liée à l'expression de la GFP. La mesure de la fluorescence a été réalisée sur chacune des larves exposées. Ces dernières ont été placées dans une goutte d'eau sur des plaques en verre compartimentées sous un microscope à fluorescence couplé à une caméra. La tête de chaque larve a été photographiée en vue dorsale (Figure 44). Toutes les photographies ont été réalisées avec les mêmes paramètres (objectif X10, temps d'exposition de 134 ms, et intensité maximale). La quantification de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Pour chaque image, la somme des niveaux de gris de chaque pixel dans la région d'intérêt a été déterminée. Le bruit de fond du niveau de gris a été défini à 290. Les résultats ont été exprimés en moyenne d'induction par rapport au solvant contrôle (DMSO).

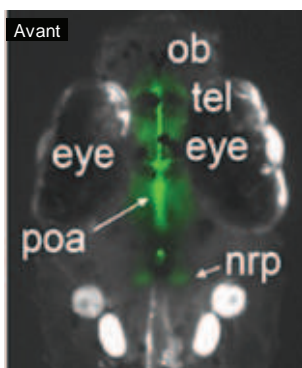


Figure 44. Tête d'une larve en vue dorsale exprimant la GFP

nrp : récessus postérieur de l'hypothalamus caudal ; **ob** : bulbe olfactif ; **poa** : aire préoptique ; **tel** : telencéphale

II.6. Méthodes d'évaluation de la biotransformation des xénobiotiques

Les méthodes détaillées ici ont pour objectif la séparation et l'identification des métabolites (radiomarqués) issus de la biotransformation de la molécule parente (radiomarquée) par les systèmes enzymatiques de phase I et II fonctionnels dans les modèles biologiques étudiés. Contrairement à l'eau, les échantillons animaux (poisson adulte, larve) ont dû faire l'objet de développements analytiques préalables (broyages, extractions, préparations). Les échantillons ont été analysés par différentes techniques dont l'objectif était soit de mesurer la quantité totale de radioactivité contenue dans un échantillon (par scintillation liquide directe ou après brûlage à l'oxidizer), soit de séparer les différentes molécules radiomarquées d'un échantillon [radio-chromatographie liquide haute performance (radio-CLHP)], soit d'identifier les molécules [hydrolyses enzymatiques et spectrométrie de masse haute résolution (SMHR)].

II.6.1. Synthèse des approches utilisées pour les études de métabolisme

La figure suivante présente de manière schématique l'ensemble des expérimentations et des étapes qui ont conduit à l'analyse du devenir de la BP2 et du BPS marqués au tritium.

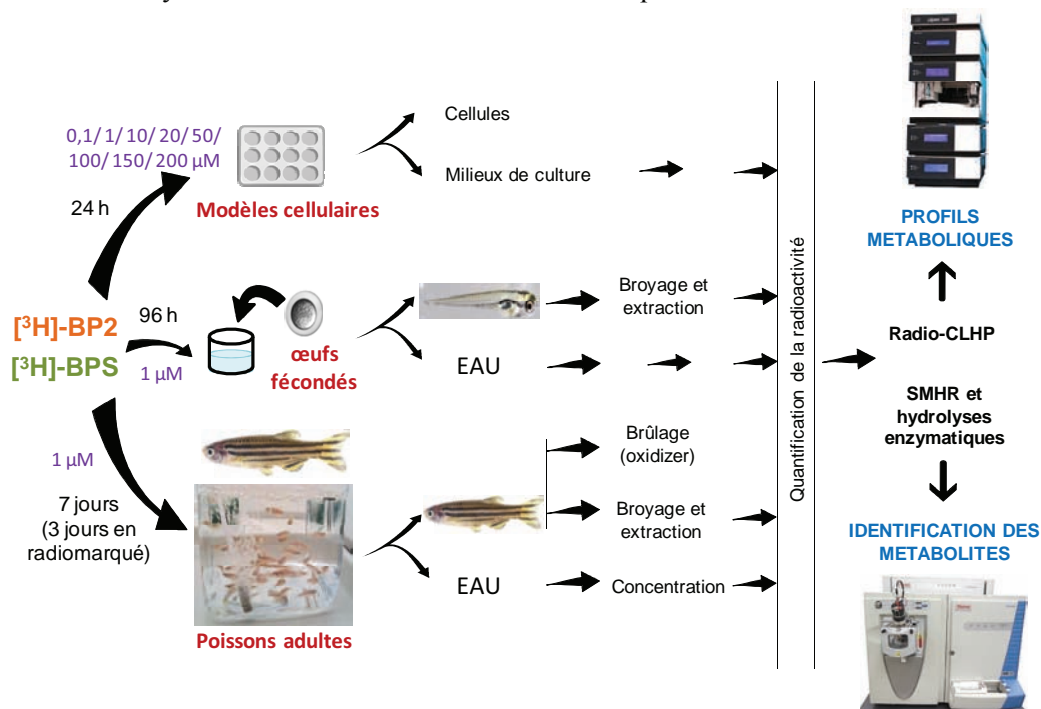


Figure 45. Vue d'ensemble des étapes mises en œuvre pour l'analyse de la biotransformation de la ³H-BP2 et du ³H-BPS dans les différents modèles *in vitro* et utilisés au cours de ce travail

II.6.2. Traitement des échantillons liquides et solides en vue de leur profilage métabolique

II.6.2.1. Les modèles cellulaires

Comme expliqué dans le paragraphe II.4.2.1., après 24 heures d'exposition, les milieux de culture ont été récupérés et conservés à -20°C. Les cellules ont été décollées des puits et lysées avec une solution H₂O/CH₃CN (50:50, v/v) en vue d'extraire les molécules radiomarquées (molécules parentes ± métabolites) potentiellement encore contenues dans les cellules. Cet extrait cellulaire a également été conservé à -20°C dans l'attente de son analyse.

Les deux matrices (milieu de culture et solution d'extraction eau/acétonitrile) ont fait l'objet d'un comptage de radioactivité au compteur à scintillation liquide. Les matrices contenant de la radioactivité ont ensuite été analysées, avant et après hydrolyse enzymatique, en radio-CLHP (profilages métaboliques) et en SMHR (identification/confirmation des métabolites présents).

II.6.2.2. Le modèle larve

La radioactivité contenue dans l'eau d'exposition des larves, dans les échantillons d'eau des rinçages et dans l'eau qui a servi à l'euthanasie des larves a été mesurée par scintillation liquide. L'eau d'exposition a ensuite été analysée par radio-CLHP.

Pour mesurer la radioactivité contenue dans les larves, des étapes de broyage et d'extraction ont été nécessaires. Les 60 larves correspondant à chaque condition et à chaque réplicat ont été broyées dans des microtubes à billes dans une solution d'extraction acétonitrile/méthanol/tampon acétate d'ammonium CH₃CN/CH₃OH/CH₃CO₂NH₄ 40 mM pH 3,5 (6:3:1, v/v). Au préalable, l'absence de fixation de la BP2 et du BPS (molécules tritiées) dans les tubes à billes a été vérifiée. Cette étape de broyage a fait l'objet de mises au point (quantité de solvant, durée et force du broyage). Après une étape de centrifugation, le surnageant a été récupéré. Cette étape de broyage/extraction a été répétée trois fois pour chacune des conditions expérimentales. Un comptage de la radioactivité de ces extraits a ensuite été réalisé par scintillation liquide, et chacun a fait l'objet d'une analyse par radio-CLHP précédée (ou pas) par des hydrolyses enzymatiques spécifiques permettant de mettre en évidence les métabolites conjugués à l'acide glucuronique et les conjugués sulfates.

II.6.2.3. Le modèle poisson adulte

A la fin de l'exposition des poissons adultes à la ^3H -BP2/BP2 ou au ^3H -BPS/BPS, l'eau d'exposition, l'eau d'euthanasie des poissons et les solutions de rinçage des aquariums ont fait l'objet de comptages de radioactivité au compteur à scintillation liquide.

Eau d'exposition

Compte tenu du volume d'eau et de la quantité de radioactivité, il a été nécessaire de concentrer par évaporation l'eau d'exposition afin de procéder à l'analyse par radio-CLHP, là aussi, avec ou sans une étape préalable d'hydrolyse enzymatique. Plusieurs méthodes de concentration de l'eau ont été évaluées : (1) évaporateur rotatif (évaporation sous pression réduite abaissant la température d'ébullition des solvants des échantillons placés dans un ballon en rotation pouvant plonger dans un bain-marie chauffé), (2) flux d'azote (évaporation de l'échantillon placé dans un contenant adapté sous un léger flux d'azote (gaz inerte)) et (3) SpeedVac (évaporation de solvants d'échantillons en centrifugation, sous pression réduite). Les résultats de ces mises au point ont montré que le rendement des ces trois méthodes était équivalent dans le cas des molécules étudiées. Le choix du SpeedVac a été retenu sur trois critères : le faible volume à évaporer par condition (2 ml), la plus grande facilité de mise en œuvre et le gain de temps par rapport aux autres méthodes qui, par ailleurs, n'ont pas présenté d'avantages spécifiques (absence de chauffage dans tous les cas, par exemple). A la suite de l'évaporation de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 à 200 μL , une analyse par radio-CLHP avant et après hydrolyses enzymatiques a été réalisée.

Poissons zèbres

Afin de pouvoir évaluer le devenir de la BP2 et du BPS dans le poisson adulte, des étapes de broyages et d'extractions ont été nécessaires. Ces étapes ont, elles aussi, ont fait l'objet de mises au point.

Broyages des poissons zèbre adultes congelés à -80°C :

Le choix de la technique de broyage des poissons s'est porté sur un broyage de type vibrant (MM400, Retsch, Figure 46) utilisant des bols à billes.

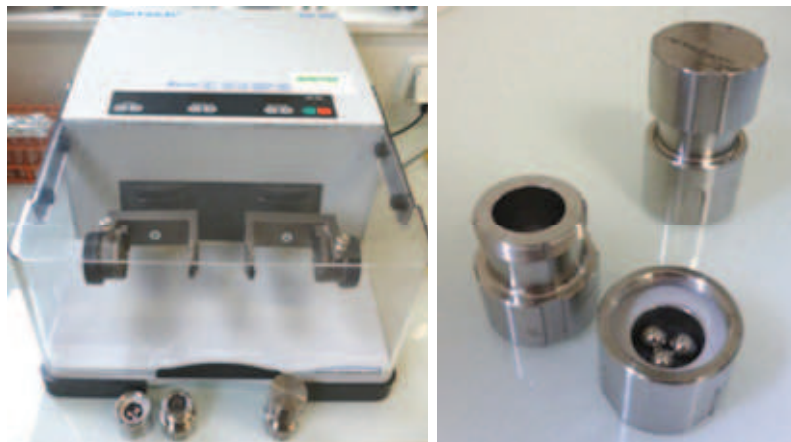


Figure 46. Broyeur vibrant (MM400, Retsch) et les pôts à billes dans lesquels sont placés les échantillons à broyer

Par rapport aux broyeurs à tige de type ultra-turrax[®], ce type de broyage présente certains avantages : (1) un broyage plus reproductible entre les lots de poissons, (2) la possibilité de broyer des échantillons congelés et à sec évitant tout risque de projection, et (3) la possibilité d'effectuer un broyage simultané de deux lots de poissons. Les différents paramètres de broyage ont été ajustés lors d'essais préliminaires sur poissons non exposés afin d'obtenir une poudre homogène : nombre de billes par bol, nombre et masse de poissons par bol, fréquence de vibration des bols (Hz) et durée du broyage. Au final les conditions retenues ont été les suivantes : 3 billes par bol, avec environ 1 g de poisson (2 poissons) par bol, une fréquence de 28,5 Hz, et une durée de 2 min 30s.

Extraction des molécules radiomarquées

Plusieurs essais ont été nécessaires afin de mettre au point les conditions d'extraction des molécules radiomarquées à partir d'échantillons des poissons zèbres. Au préalable, la poudre contenue dans les bols a été récupérée à la spatule dans des tubes en verre (Corex), puis un rinçage des bols au méthanol a été effectué en vue des comptages permettant d'établir les bilans de récupération de la radioactivité (bilans métaboliques).

Le premier essai a consisté en une extraction par une solution acétonitile/ méthanol/ tampon acétate d'ammonium 40 mM pH 3,5 (6:3:1, v/v/v). Après des étapes (1) de mélange au vortex et (2) de centrifugation, un précipité blanc et des gouttelettes lipidiques rendaient l'échantillon non homogène et donc inexploitable pour le profilage. La peau, assez riche en matière grasse, était apparemment à l'origine d'une quantité suffisante de matière grasse pour entraîner la formation de ces gouttelettes lipidiques.

Le deuxième essai a donc consisté en une méthode d'extraction, dérivée de la méthode de Folch (Folch et al. 1956), permettant la séparation des lipides, des protéines et des molécules solubles en

phase aqueuse. Une solution méthanol/ eau/ dichlorométhane (1:1:2, v/v/v) a alors été utilisée. A la suite d'un mélange (vortex) de 15 min, puis d'un refroidissement de l'homogénat à 4°C, et d'une étape de centrifugation (15 min, 4°C), les phases aqueuses (partie supérieure) et lipidiques (partie inférieure) ont été récupérées. Cette extraction a été répétée une nouvelle fois. Un comptage de radioactivité a alors été réalisé sur ces deux phases. Les phases aqueuses, telles quelles et après hydrolyses enzymatiques, ont fait l'objet d'une analyse par radio-CLHP.

II.6.3. Quantification de la radioactivité

La quantification de la radioactivité contenue dans les échantillons biologiques exposés (cellules, larves, poissons adultes) mais également dans les solutions de rinçage du matériel d'exposition est une étape indispensable à la réalisation du bilan de radioactivité, permettant ainsi de s'assurer que la totalité de la radioactivité introduite dans le milieu d'exposition est retrouvée en fin d'expérimentation.

Pour les échantillons liquides, la quantification de la radioactivité par scintillation liquide a été réalisée directement sur les milieux liquides (milieux de culture et milieux d'extraction des cellules) après une étape éventuelle d'évaporation afin de concentrer les molécules radiomarquées (eaux d'exposition).

Pour les échantillons solides (larves et poissons adultes) deux méthodes de quantification de la radioactivité ont été utilisées :

- une quantification de la radioactivité par scintillation liquide après brûlage des échantillons congelés (poissons adultes)
- une quantification de la radioactivité par scintillation liquide après des étapes de broyage et d'extraction (larves et poissons adultes).

Une fois le bilan de radioactivité obtenu, le profilage métabolique des différents milieux (milieux de culture, eaux d'exposition, extraits des larves, extraits des poissons adultes) a été réalisé par radio-CLHP avant et après hydrolyses enzymatiques spécifiques des conjugués glucuronides et sulfates. La confirmation de la structure des métabolites a été réalisée par spectrométrie de masse haute résolution.

II.6.3.1. Brûlage des échantillons tritiés à l'oxidizer

La radioactivité contenue dans les poissons adultes a été déterminée par brûlage à l'oxidizer (Model A307 Sample Oxidizer, PerkinElmer). Cette méthode permet une quantification de la radioactivité contenue dans des échantillons solides en s'affranchissant des étapes de broyage et d'extraction, pour déterminer avec exactitude les niveaux de résidus présents. Toutefois, le brûlage à l'oxidizer n'est pas compatible avec le profilage métabolique de l'échantillon. Il est donc nécessaire de procéder à cette

phase de travail en parallèle des extractions destinées au profilage radio-CLHP. Brièvement, à la suite de la combustion de l'échantillon organique (ici le poisson), les vapeurs de combustion sont récupérées par condensation et mélangées à un liquide scintillant (monophase[®] S, PerkinElmer) permettant un comptage de radioactivité au compteur à scintillation liquide. Les résultats obtenus au minimum en triplicat, sont moyennés et rapportés au poids d'échantillon brûlé, permettant le calcul de la concentration de radioactivité par unité de poids d'échantillon examiné.

II.6.3.2. Compteur à scintillation liquide

Le compteur à scintillation liquide permet de mesurer la quantité de radioactivité d'émetteurs (cas du tritium, mais aussi du carbone 14), contenue dans un échantillon liquide. Cette mesure nécessite une mise en solution des molécules radioactives dans un solvant contenant des molécules scintillantes (liquide scintillant ; Ultima Gold[™] ou monophase[®] S (en cas de brûlage préalable), PerkinElmer). Lors de la désintégration des atomes radioactifs, les particules α - libérées excitent les molécules du liquide scintillant. Lors du retour à un état stable, ces molécules émettent des photons. Ces derniers sont détectés par un photomultiplicateur. Le nombre de photons émis est proportionnel à l'énergie initiale des particules α - . Les corrections de quenching sont effectuées automatiquement par l'appareil sur la base d'un standard interne. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) puis transformés en désintégrations par minutes (dpm).

II.6.4. Profilage métabolique et identification des métabolites

II.6.4.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur de radioactivité

L'approche analytique par radio-CLHP a permis de séparer les différentes molécules radiomarquées (métabolites et molécule parente) contenues dans les échantillons issus de l'exposition de nos modèles biologiques à la ³H-BP2 et au ³H-BPS. L'obtention de ces profils métaboliques a requis la mise au point d'un système CLHP spécifique pour chacun des deux xénobiotiques. En effet, le type de colonne, le débit, le choix des phases mobiles, le gradient de phases mobiles et la température, sont autant de facteurs pouvant influencer la bonne séparation des molécules, dont le comportement diffère compte tenu de leur différence structurale. Le type de colonne (dans notre cas une colonne avec greffage octadecyl (C18) de 25 cm), le débit, la température et les phases mobiles ont été choisis d'après l'expertise du laboratoire et l'expérience de ce type d'analyse pour des molécules chimiquement proches comme le bisphénol A et F par exemple.

Les gradients CLHP ont quant à eux fait l'objet de mises au point aussi bien pour la BP2 que pour le BPS. J'ai réalisé ce développement dans les premières étapes de mon travail sur le métabolisme à l'INRA, à partir d'échantillons issus de la synthèse biochimique des métabolites oxydés et conjugués de chacune des molécules. L'utilisation de ces échantillons, contenant une grande diversité de métabolites a été utile afin de mettre au point le gradient permettant une séparation satisfaisante de l'ensemble de ces molécules. Pour l'obtention des métabolites glucuroconjugés et sulfoconjugés, des microsomes de foie de cobaye en présence d'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) ou de cytosol de cobaye en présence de 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) ont été utilisés, respectivement. Ce travail préliminaire a également permis d'explorer les phases I et II mises en jeu pour la BP2 et le BPS.

L'analyse radio-chromatographique a été rendue possible par l'utilisation d'un détecteur de radioactivité (Flo-One A500, PerkinElmer) placé en sortie de colonne. Au fur et à mesure de la sortie de l'échantillon, ce dernier a été mélangé, au niveau du Flo-One à un liquide scintillant (Flo Scint II™, PerkinElmer) permettant une mesure de la radioactivité couplée à la séparation chromatographique.

Au final, les différents paramètres chromatographiques qui ont été retenus pour la BP2 et le BPS sont les suivants :

Pompe : Spectra P1000, Thermo Separation Products

Pré-colonne : C18 (18x4 mm, 5 µm), Macherey-Nagel

Colonne : Zorbax SB-C18 (250x4.8 mm, 5 µm), Agilent technologies

Débit : 1 ml/min

Température : 30°C

Phase mobile A : tampon acétate d'ammonium (20 mM, pH 3,5) et acétonitrile, 95:5 v/v

Phase mobile B : tampon acétate d'ammonium (20 mM, pH 3,5) et acétonitrile, 10:90 v/v

Les mises au point ont conduit à l'établissement des gradients présentés dans la figure suivante (Figure 47). Dans ces systèmes analytiques en phase inverse (phase stationnaire moins polaire que la phase mobile initiale), les composés les plus polaires sont élués les premiers. Dans leur système respectif, le temps de rétention de la BP2 est de 42,5 min et celui du BPS de 27,7 min.

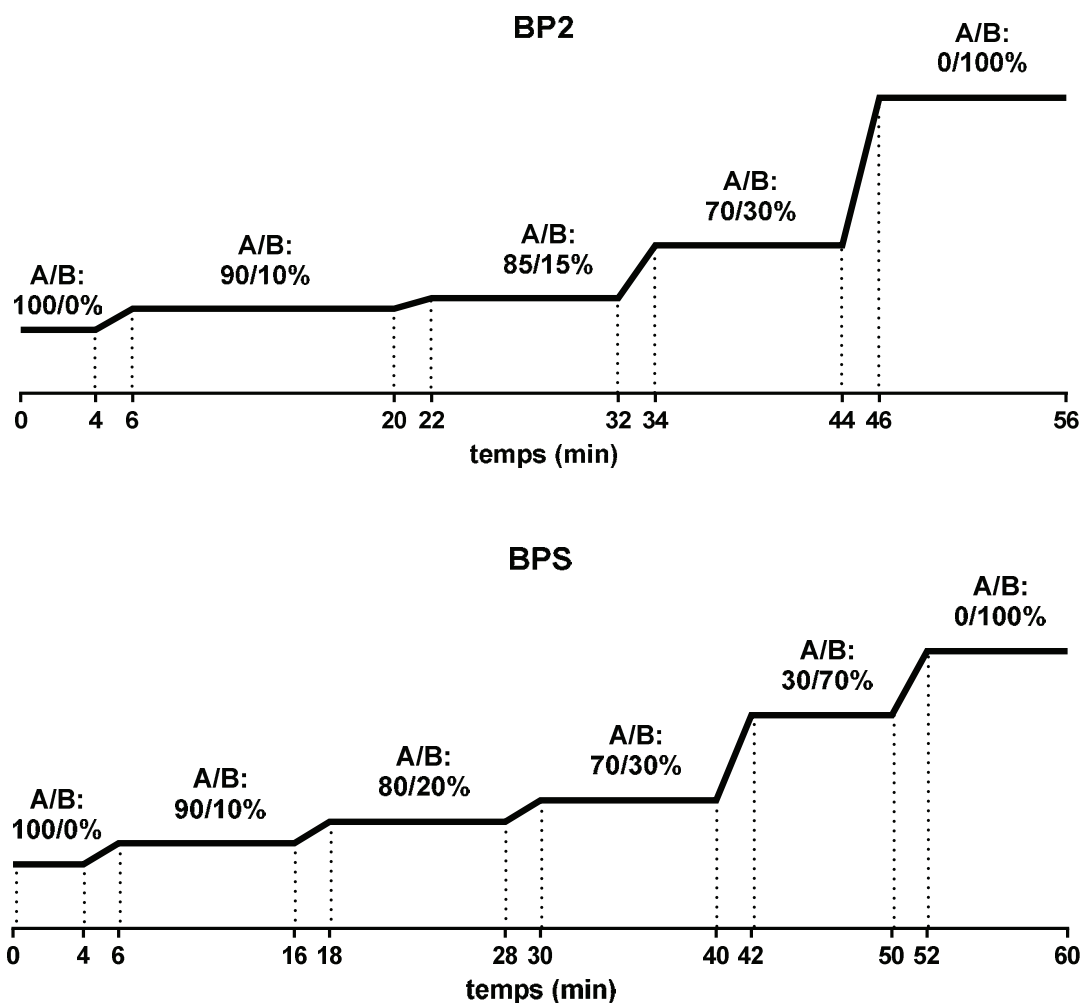


Figure 47. Gradientes analytiques développés pour les analyses respectives de la BP2 et du BPS

A et B sont les phases mobiles polaires. Dans ce système analytique en phase inverse, les métabolites les plus polaires sont élués les premiers.

II.6.4.2. Hydrolyses enzymatiques

Les techniques biochimiques d'hydrolyse enzymatique permettent de déterminer la nature glucurono- ou sulfo-conjuguée des métabolites formés. Les échantillons (surnageants de culture cellulaire, extraits des larves, phases aqueuses des extraits poissons adultes, eaux d'exposition) ont été incubés avec l'enzyme aryl-sulfatase provenant d'*Aerobacter aerogenes* ou avec l'enzyme β -glucuronidase pendant 3 heures à 37°C sous agitation douce. Ces incubations ont nécessité au préalable une évaporation sous flux d'azote des solvants non aqueux (méthanol et acétonitrile) pour les échantillons concernés (extraits des larves et phase aqueuse des extraits de poissons). Pour chaque hydrolyse, un témoin correspondant à une incubation dans les mêmes conditions mais sans enzyme a été réalisé. L'hydrolyse a été arrêtée par refroidissement de l'échantillon à 4°C. Ces échantillons ont alors été

mélangés à la phase mobile A afin d'être analysés par radio-CLHP. Avec ce type de protocole, en présence d'un conjugué sulfate et de la sulfatase, les pics éventuels correspondants à des conjugués sulfate diminuent ou disparaissent du profil métabolique (contrairement aux incubations témoins), pour redonner la molécule parent (en cas de conjugué « direct ») ou un autre métabolite (s'il s'agit d'un métabolite secondaire). Le principe est le même pour les incubations examinées après incubation avec de la β -glucuronidase, pour les conjugués à l'acide glucuronique éventuellement formés lors des expérimentations de métabolisme *in vitro* ou *in vivo*.

II.6.4.3. Spectrométrie de masse haute résolution

Suite aux étapes de quantification et de profilage métabolique ainsi qu'aux premiers éléments de caractérisation structurale fournis par les études biochimiques, nous avons procédé à la confirmation de l'identification des métabolites par spectrométrie de masse haute résolution. Le choix s'est porté sur une approche en chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution LTQ (Linear Trap Quadrupole) Orbitrap XL hybrid (Thermo Scientific). Ces analyses ont été réalisées sur les surnageants de culture cellulaire. Ce travail spécifique a été réalisé sous la supervision de Laurent Debrauwer, responsable de la plateforme Axiom Metatoul de l'INRA. Afin de réaliser le couplage entre le chromatographe et le spectromètre, un fractionnement d'un quart de l'éluât issu de la colonne chromatographique et entrant dans le spectromètre a été réalisé (« split »), ce qui correspond aux conditions standard du laboratoire pour le couplage radio-CLHP. Des études précédentes sur le BPA et le BPF et les premiers essais réalisés sur la BP2 et le BPS, ont conduit à choisir le mode d'ionisation par électrospray en mode négatif (ESI⁻). Les différents paramètres de spectrométrie (MS et MS/MS) utilisés afin de déterminer les rapports masse/ charge (m/z) sont précisés dans l'article 3 (paragraphe IV de la partie résultats).

Tableau 27. Ensemble des paramètres des expérimentations menées dans les modèles biologiques *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre et d'Homme pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques et de leur biotransformation
 BP2 : benzophénone 2, BPA : bisphénol A, BPF : bisphénol F, BPS : bisphénol S

Modèle biologique	Molécule et concentration (µM)				Volume d'exposition par condition (ou par puits (p))	Biomasse par condition ou nombre de cellules/puits (c/p)	Milieu d'exposition	Durée de l'exposition	Renouvellement du milieu	Paramètres mesurés	Techniques utilisées	
	BP2	BPA	BPF	BPS								
<i>In vivo</i> Poisson zèbre	Adulte mâle	4 – 20	-	0,1 – 20	-	4 L	1 g/L	Eau claire	168 h	100% toutes les 24 h	Vig plasmatique Transcrits des <i>ERs</i>	ELISA RT-qPCR
	Larve <i>cyp19a1b</i> -GFP	0,01 – 20	0,25 – 10	0,01 – 20	0,25 – 30	100 mL	15 œufs fécondés	Eau claire	96 h	50% toutes les 24 h	GFP	Microscopie à fluorescence
	Larve sauvage	10	-	0,1 – 10	-	100 mL	25 œufs fécondés	Eau claire	96 h	50% toutes les 24 h	Transcrits du <i>cyp19a1b</i>	RT-qPCR
<i>In vitro</i>	PZFH	3 – 30	-	0,1 – 10	-	150 µL/p Plaque 96 puits	150 000 c/p	LDF SVF-DCC	96 h	50% à 48 h	Vig	ELISA
	ZELH-zER	0,01 – 10	0,01 – 10	0,01 – 10	0,01 – 10	150 µL/p Plaque 96 puits	25 000 c/p	LDF SVF-DCC	72 h	Aucun	Activité luciférase	Luminométrie
	ZELH-zER 1						25 000 c/p					
ZELH-zER 2	75 000 c/p											
<i>In vivo</i>	Adulte mâle	1	-	-	1	1,5 L	5 g/L (entre 14 et 16 poissons)	Eau claire /eau d'élevage	168 h (96 h en non-radioactif puis 72 h en radioactif)	100% toutes les 24 h les 4 premiers jours. 0% les jours suivants	Compteur à scintillation liquide Broyages et extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP Oxidizer	
	Larve sauvage	1	-	-	1	50 mL	60 œufs fécondés	Eau claire /eau d'élevage	96 h (24 h en non-radioactif puis 72 h en radioactif)	100% après les 24 premières heures, 0% ensuite	Compteur à scintillation liquide Broyages et extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP	
	PZFH (foie)	0,1 – 200	-	-	1 – 200	310 µL/p Plaque 24 puits	195 000 c/p	LDF SVF-DCC	24 h	Aucun	Radioactivité	
<i>In vitro</i>	ZEL (foie)	0,1 – 200	-	-	0,1 – 200	1 mL/p Plaque 12 puits	350 000 c/p	LDF SVF-DCC	24 h	Aucun	Radioactivité	Compteur à scintillation liquide Extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP Spectrométrie SMHR
	ZELH-zER (foie)											
	ZELH-zER 2 (foie)											
	MELN (sein)	0,1 – 200	-	-	-	1 mL/p Plaque 12 puits	350 000 c/p	DMEM SVF-DCC MEM William's E	24 h	Aucun	Rapport <i>m/z</i>	
	T47D-KBLuc (sein)											
HepG2 (foie)												
HepaRG (foie)												

Résultats

I. Effets œstrogéniques de benzophénones chez le poisson zèbre

I.1. Article 1

Evaluation of estrogenic effects of benzophenone derivatives in zebrafish (*Danio rerio*) using *in vitro* and *in vivo* models.

A. Cosnefroy^{1 §}, S. Aït-Aïssa^{1*§}, V. Le Fol¹, E. Maillot-Maréchal¹, B. Piccini¹, O. Palluel¹, O. Kah², P. Balaguer³, F. Pakdel², JM. Porcher¹ and F. Brion^{1*}

¹INERIS, Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc Alata, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

²IRSET, Rennes, France

³INSERM, Rennes, France

Durant la première partie de ma thèse, qui s'est déroulée à l'INERIS, mon travail a notamment permis de contribuer à l'obtention et à la confirmation de certains résultats présentés dans cet article. Ces données, en particulier celles relatives à la BP2, représentent pour partie, le point de départ de la problématique de thèse.

Présentation de l'article

Les benzophénones sont des filtres chimiques anti ultra-violets utilisés dans des cosmétiques, des emballages alimentaires et dans de nombreux produits plastiques. Les benzophénones sont retrouvées depuis quelques années dans les milieux aquatiques. L'effet oestrogénique des benzophénones peut varier selon l'origine des récepteurs aux œstrogènes avec lesquels elles interagissent. En effet, il a été montré que la benzophénone 2 (BP2), la 2,3,4-trihydroxy-benzophénone (THB) et la benzophénone 1 (BP1) présentaient un potentiel œstrogénique plus élevé pour les récepteurs aux œstrogènes de poisson (truite arc-en-ciel) que pour ceux de l'Homme (Cosnefroy et al. 2009). Afin d'évaluer le potentiel œstrogénique des benzophénones chez le poisson zèbre, une dizaine d'entre-elles a été sélectionnée et testée sur des modèles *in vivo* et *in vitro* complémentaires chez le poisson zèbre. *In vitro*, les BPs ont été testées sur les lignées cellulaires gène rapporteur ZELH-zfERs. *In vivo*, deux modèles ont été utilisés : (1) le modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) dans lequel la GFP est sous le contrôle du promoteur de l'aromatase b (Brion et al. 2012), et (2) le poisson zèbre adulte chez qui l'expression de la Vtg circulante par ELISA et l'expression hépatique de la *vtg1* et de la *vtg2* par RT-PCR quantitative ont été mesurées.

De manière générale, les EC50 des benzophénones testées *in vitro* sont plus faibles dans la lignée transfectée avec le zfER₂ que celles transfectées avec les zfER₁ et zfER₃. Les benzophénones présentent de fortes différences de capacité d'activation des 3 types de récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre. Par exemple, seuls 5 des benzophénones testées (BP2, THB, BP1, 4BP (4-hydroxybenzophénone) et 44'BP (4,4'-dihydroxybenzophénone)) sont actives sur les 3 récepteurs à savoir zfER₂, zfER₁ et zfER₃. Seule la BP2 présente des EC50 parmi les plus élevées dans les trois lignées cellulaires. Quant à la BP3, sa capacité d'activation de ces récepteurs des œstrogènes est faible et uniquement observée dans la lignée ZELH-zfER₂.

Dans le modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP, les résultats d'expositions réalisées sur une durée de 5 jours dès les premières heures après fécondation montrent des inductions significatives de la GFP pour la 4BP, la BP1, la 44'BP, le THB. Les réponses obtenues dans ce modèle de larve sont donc davantage similaires avec celles obtenues dans les lignées cellulaires ZELH-zfER₂ que ZELH-zfER₁ et ZELH-zfER₃. Il est à noter que la BP3 est responsable d'une induction significative de la GFP, bien que

relativement faible. La BP3 semble donc plus active dans le modèle larvaire que dans les modèles cellulaires. De manière surprenante, la BP2 qui est la plus fortement active des benzophénones testées dans les modèles cellulaires, ne présente pas d'activité œstrogénique dans ce modèle larvaire.

L'activité œstrogénique de la BP2 et de la BP3 (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 mg/L) a été évaluée chez le poisson zèbre adulte en raison des différences d'effet observées entre les modèles cellulaires et le modèle larve transgénique. La BP2 et la BP3 entraînent une augmentation significative de la concentration plasmatique en Vtg après 7 jours d'exposition à 10 mg/L. Par ailleurs, la BP2 est responsable d'une augmentation du taux d'expression des transcrits du gène *vtg2* mais pas *vtg1* dans le foie de poissons mâles adultes. Enfin, l'expression des transcrits des zfERs issus du foie de poissons zèbres mâles adultes n'est pas modifiée par la BP2.

Ce travail s'inscrit dans une démarche globale intégrant des modèles *in vitro* et *in vivo* permettant l'évaluation du potentiel œstrogénique de composés chimiques. La capacité de ces modèles biologiques, caractérisés par des niveaux de complexité biologiques différents, à mettre en évidence les effets œstrogéniques des benzophénones a été vérifiée pour la plupart des composés étudiés. Les résultats obtenus sur les modèles ZELH-zfER β s sont en adéquation avec les effets neurogliaux (activation de l'aromatase b) au stade larvaire, stade au cours duquel les sous-formes β du récepteur sont préférentiellement exprimées. Il reste toutefois le cas surprenant et inattendu de la BP2. Alors que sa capacité à induire une réponse œstrogénique dans les modèles cellulaires d'origine hépatique et chez l'adulte est forte, elle devient inexistante dans le modèle transgénique au stade embryo-larvaire. Etant donné des différences importantes de complexité biologique entre les modèles, des différences de comportement pharmacocinétique et en particulier propres au métabolisme des xénobiotiques peuvent être envisagées. Pour exemple, l'activité œstrogénique observée dans le cas de la BP3 semble principalement liée à la BP1, provenant de la biotransformation de la BP3.

Evaluation of estrogenic effects of benzophenone derivatives in zebrafish (*Danio rerio*) using *in vitro* and *in vivo* models.

A. Cosnefroy^{1§}, S. Aït-Aïssa^{1*§}, **V. Le Fol**¹, E. Maillot-Maréchal¹, B. Piccini¹, O. Palluel¹, O. Kah², P. Balaguer³, F. Pakdel², JM. Porcher¹ and F. Brion^{1*}

¹INERIS, Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc Alata, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

²IRSET, Rennes, France

³INSERM, Rennes, France

Abstract

Several aquatic pollutants are suspected to act as endocrine disruptor compounds (EDCs). The benzophenone derivatives (BPs), are used as UV filters in many different personal care products, paints or plastics used for food packaging and were recently found to be ubiquitous in aquatic systems and to contaminate freshwater species, including fish. In this study, we evaluated the estrogenic activity of ten BPs in zebrafish using an *in vitro* / *in vivo* approach. Recently we developed three *in vitro* specific zebrafish gene reporter models expressing zebrafish estrogen receptors (zERs) in a zebrafish cell line. In order to compare *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of BPs, we exposed transgenic zebrafish to the 10 BPs from 0 to 5 dpf. The transgenic model expressed green fluorescent protein (GFP) driven by the zebrafish brain aromatase *cyp19a1b* promoter. Our results showed that among the ten BPs, two were non active and five were active in the three cell lines. In transgenic *cyp19a1b*-GFP fish, all the compounds that were inactive *in vitro* did not induce GFP expression in zebrafish embryos. Some estrogenic compounds *in vitro* were not able to induce GFP expression. For instance, we observed that BP2 which is the most estrogenic compound *in vitro* did not induce GFP expression. However, this compound induced in a concentration dependent manner vitellogenin gene expression and protein synthesis in male fish. Conversely, we found that BP3 elicited weak estrogenic activity *in vivo* in both *in vitro* models but while only a weak estrogenic activity was found on ZELH-ZFER β 2 cell line. Taken together, our approach allows to characterize the EDC potency of emerging pollutants using *in vitro* and *in vivo* assays within a unique model fish species, the zebrafish. The differences observed between assays deserve further studies to characterize the behavior of compounds in the different biological systems in terms of bioavailability and metabolism but also to better consider the importance of the cellular context in the biological responses measured.

Keywords: Estrogen receptors, benzophenone, aromatase b, zebrafish, GFP, vitellogenin

I. INTRODUCTION

Endocrine disruptor compounds (EDCs) are present in the aquatic environment (Barcelo 2003; Kinani et al., 2010). EDCs are natural or synthetic chemicals issued from different anthropogenic activities and have the ability to interfere with the endocrine system, leading to disturb normal sexual development and reproduction of aquatic species. Among these pollutants, several have been described as xeno-estrogen as they have the ability to interfere with the estrogen receptors (ER) by mimicking or blocking action of estrogen hormones. Some benzophenone derivatives (BPs), emerging pollutants, have been described as xeno-estrogens in both mammalian and fish cells and organisms (Schlumpf et al., 2001; Kunz et al., 2006; Molina-Molina et al., 2008). These chemicals are used as UV filters in many products like personals care products (cream, shampoos, sunscreen cream, lipsticks...), food packaging, textiles and paints. Because of their growing utilization in several applications, together with their persistent character due to hydrophobic properties, they increasingly occur and accumulate in the aquatic environment (Díaz-Cruz et al., 2008). Indeed, these emerging aquatic pollutants have been detected in surface waters, waste waters and biota (fish tissue) (Balmer et al., 2005; Jeon et al., 2006; Fent et al., 2009).

To assess the EDCs effect of chemicals, tiered approaches have been proposed for the screening (Tier 1) and testing (Tier 2) (Hotchkiss et al., 2008). Tier 1 includes both *in vitro* and short term *in vivo* assays. Several *in vitro* and *in vivo* models have been developed to study estrogenic properties of compounds. *In vitro*, among the commonly used assays are those based on reporter gene assay either based on yeast cells, such as the YES assay (Kunz et al., 2006), or on mammalian cultured cells, such as ER-CALUX (Legler et al., 1999) or MELN (Balaguer et al., 1999) cells that endogenously express the human ER α (hER α). More recently a growing interest has been paid to the development and the evaluation of non mammalian *in vitro* models to assess species specific effect (Hotchkiss et al, 2008). For instance, fish ER were used in stable (Ackermann et al., 2002; Molina-Molina et al., 2008; Cosnefroy et al., 2009) and transient transfection (Le Page et al., 2006; Katsu et al., 2007; Sabo-Attwood et al., 2007) in either human or fish cell lines. The comparison of fish and mammalian specific models has highlighted inter-species differences in the estrogenic response to certain chemicals. These differences may depend on the species origin of the ER and/or on the cellular context wherein ER is expressed, i.e. cell type, tissue or species origin of cell line (Le Guevel et al., 2001; Matthews et al., 2002; Molina-Molina et al., 2008; Cosnefroy et al., 2009). For instance, some benzophenone derivatives (BP1, BP3, THB) were shown to exert higher affinity to the rainbow trout ER (rtER α) than to hERs (Molina-Molina et al., 2008) while their estrogenic potency relative to estradiol was higher in fish than in human cells (Cosnefroy et al., 2009). Such studies argue for the use of specific *in vitro* fish models to assess estrogenic hazard of chemicals in fish. However there is still a scarcity of studies that have evaluated this assumption by using integrated approaches, i.e. including

effect assessment at different biological levels including cellular (*in vitro*) and organism (*in vivo*) levels.

The zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used as biological model in toxicology because of the many advantages of this specie. Regarding EDCs, it has been proposed as a useful model fish species in identifying targets and mode of action of EDCs at molecular, cellular and organism level as well as in screening and testing (Segner 2009). In zebrafish, three different isoforms of the ER has been isolated and characterized zfER α , zfER β 1 and zfER β 2 (Menuet et al., 2002). Their pattern of expression and regulation by E2 in adult and in developing zebrafish has been well studied (Menuet et al., 2002; Mouriec et al., 2009). Further, the expression of ER-regulated genes in brain (i.e., brain aromatase) and in liver (i.e., vitellogenin) are well characterized and appropriate methods has been developed (Brion et al., 2002; Brion et al., 2004; Menuet et al., 2005; Hinfray et al., 2006), making the zebrafish as a relevant model to study the effect of xenobiotic on ER-signaling pathway.

In the present study, we propose the use of a multi-level approach, using *in vitro* and *in vivo* assays, to assess estrogenic impact of ten BP derivatives (Figure 1) in the zebrafish. For such purpose, *in vitro* zebrafish cell lines that stably express the luciferase reporter gene under the control of different subtypes of recombinant zebrafish ER (zfER), i.e. zfER α , zfER β 1 and zfER β 2, have been developed from the ZFL hepatic cell line (Cosnefroy et al., in prep). These three cell lines allow easy detection of zfERs activation in zebrafish liver cell context, within the same clonal context and thus permit to identify SERMs (selective estrogenic receptor modulator) (Cosnefroy et al., in prep). In addition to cellular effects, estrogenic activity of BPs was quantify *in vivo*, by using a newly developed transgenic zebrafish line that expresses green fluorescent protein (GFP) under the control of the zebrafish brain aromatase *cyp19a1b* promoter. The *cyp19a1b* gene codes for the brain aromatase B that is expressed exclusively in radial glial cells under the control of estrogens. The extreme sensitivity of this gene to exogenous estrogens during zebrafish embryogenesis has been well characterized (Vosges et al., 2010). Further we showed that exposure of tg(*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryo to various chemical compounds allowed rapid (120 h), sensitive and easy detection of *in vivo* estrogenic activity, illustrating the usefulness and the suitability of this model for screening purpose (Brion et al., in prep). Although globally correlated, comparison of *in vitro* and *in vivo* screening showed some differences for certain BPs. These were further tested for their potential estrogenic effect in adult male zebrafish by analyzing hepatic mRNA levels of zf-ER isoforms, Zf-Vtg1 and Zf-Vtg2 and by quantifying circulating concentrations of vitellogenin, a well-known marker of estrogenic compound.

II. Materials and methods

II. 1. Chemicals, materials and reagents

17 β -estradiol (E2), 17 α -ethynylestradiol (EE2), Benzophenone (BP), 4-hydroxybenzophenone (4BP), 4,4'-dihydroxybenzophenone (44'BP), 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3), 2,4,4'-trihydroxybenzophenone (THB), 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (23'44'BP), 2,3,4-trihydroxybenzophenone (234BP), 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP8) were purchased from Sigma-Aldrich (France)(Figure 1). Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM and stored at -20°C. Fresh dilutions of test chemicals were prepared before each experiment. Leibovitz 15 culture medium (L15), HEPES, fetal calf serum (FCS), epidermic growth factor (EGF), G418 and D-luciferin were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France). Insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France), F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (D-MEM hg) powder, penicillin streptomycin were purchased from Gibco (France). Cell culture plastics were obtained from BD Bioscience (France), except 96-well white opaque plates which were purchased from Greiner (France). Trizol reagent was purchased from Invitrogen (France), SYBR green from Quiagen (France). Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), random hexamers, dNTPs, RNAsin and MMLV-RT buffer were obtained from Promega (France).

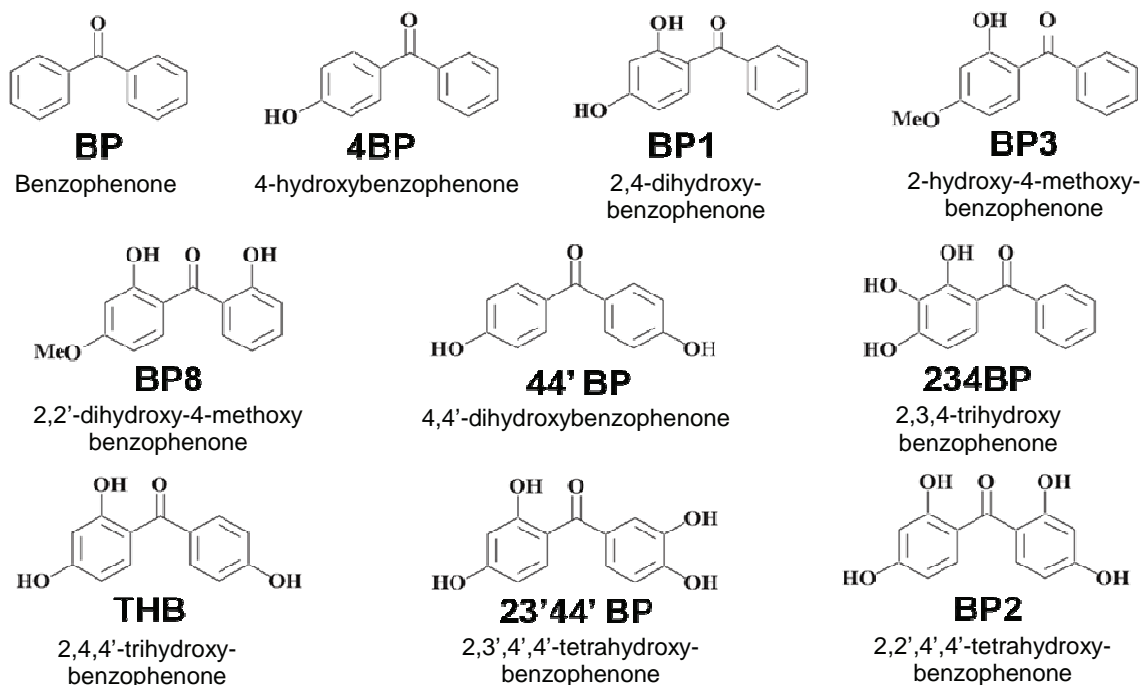


Figure 1 : Structure of benzophenone and derivatives

II. 2. *ZELH-zfERs cell lines: culture conditions*

ZFL cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-2643) and is derived from a pool of approximately normal adult zebrafish (*Brachydanio rerio*) livers ES, 0.01 mg/ml of insulin, 50 ng/ml of EGF and 50 U/ml of penicillin and streptomycin antibiotics. This medium was supplemented with 5% v/v decomplexed fetal calf serum (FCS, Sigma). ZFL cells were grown at 28°C under humidified air atmosphere.

ZELH-zfERs cell lines (for ZFL-ERE-Luc-hygromycin-zfERs) were previously described by (Cosnefroy et al., in prep). Briefly, the ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 1, ZELH-zfER β 2 cells lines obtained by a two steps stable transfection in ZFL cell line (zebrafish liver). ZFL were first stably transfected with an ERE- β Glob-Luc-SV-hygro plasmide yielding the ZELH cell line. ZELH were then stably transfected with Topo-pcDNA3 expression vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA) containing cDNA of zebrafish estrogen receptors (zfER α , zfER β 1, zfER β 2) expressing the Geneticin resistance gene, as previously described (Menuet et al., 2002). These plasmids were given by Dr Farzad Pakdel.

The ZELH-zfERs cell lines were routinely cultured at 28°C in LDF medium supplemented with hygromycin b (0.35 μ g/ml), G418 (3 mg/ml) and 5% v/v dextran-coated charcoal treated fetal calf serum (LDF-DCC medium).

II. 3. *Luciferase induction assay*

Cells were seeded on 96 well plates (at 25,000 cells per well for ZELH-zfER α and ZELH-zfER β 1 cell lines and 50,000 cells per well for ZELH and ZELH-zfER β 2) in LDF-DCC medium and left to incubate for 24 h before chemical exposure. Solvent content was always 0.1 % v/v in the culture medium. Cells were exposed to test chemicals for 72 hours at 28°C. Luciferase activity was then determined in living cells as follows. The culture medium was removed, cells were washed with 150 μ l of PBS and then replaced by 50 μ l of D-luciferin 0.3 mM in LDF-DCC medium without phenol red. After 5 min allowing a stabilization of the luminescent signal, luminescence counts were determined in a microplate luminometer (μ Beta, Wallac). Results were expressed as percentage of maximal luciferase induced by E2, the reference ligand.

II. 4. *Adult zebrafish experiments: chemical exposure and sampling*

Wild type adult zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from our own breeding unit. Male zebrafish were exposed for 7 days to 17 β -estradiol (E2 10 nM, 0.27 ng/L), BP2 and BP 3 (0.1, 1, 5 and 10 mg/l), or solvent alone (DMSO). Exposures were carried out in semi-static conditions with total renewal of water every day. From 6 to ten fish per concentration were used. After exposure, adult fish were euthanized by total immersion in ice. Approximately 5 μ L of blood samples were sampled per fish and diluted in 45 μ l of PBS containing 20 % heparin. Diluted blood samples were stored at -20°C until

vitellogenin ELISA measurement. Livers were removed and kept at 4°C over night in a solution of RNAlaterRM and then stored at -20°C until vitellogenin and zfERs mRNA measurement.

II. 5. Transgenic zebrafish cyp19a1b-GFP: chemical exposure and GFP analysis

Eggs were obtained from adult *Cyp19a1b*-GFP transgenic fish in our breeding unit. Transgenic *cyp19a1b*-GFP embryos were exposed to different concentration of BPs (0.1 to 10 µM), EE2 (0.05 nM) or solvent (DMSO) from 0 to 5 days post-fertilization (dpf). Each experimental group was constituted of n=10 embryos exposed in 100 ml of water. Embryos were kept in an incubator at 28 °C, with no renewal of water. Each concentration was tested in two independent experiments.

At the end of the experiments, the fluorescence was analysed in 10 live larvae for each condition of exposure using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Fluorescence signals were then quantified using the Image J free software (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) and were expressed as integrated density which represented the sum of the values of all pixels within the region of interest. Induction factor were then calculated by the ratio of integrated density of each fish on the mean of solvent group (DMSO).

II. 6. RNA extraction and real-time RT-PCR

RNA extractions from liver samples were realized using trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was quantified using a NanoDrop system (Thermo Scientific).

Real-Time RT-PCR was then performed as described by Mouriec et al., (2009). Briefly, retro-transcription was realized using 1 µg of total liver RNA with Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), random hexamers, dNTPs, RNAsin and MMLV-RT buffer in a Thermocycler (Biometra GmbH, Germany). Real-Time PCR was then carried out on Mastercycler Realplex (Eppendorf) using SYBR according the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers for zfER α , zfER β 1, zfER β 2 were those described by Mouriec et al., (2009) and are given in the (Table 1). Oligonucleotide primers for Vtg 1 and Vtg 2 were designed using the Primer3 software. The sequences and working concentrations are described in the Table 1. Briefly, a 20 µL of reaction mix was set up with 5 µL of ten times diluted reverse transcribed sample, 4 µL of primers, 10 µL SYBR green mix and 1 µL of water. The reaction program was 15 min at 95°C followed by 40 two-step cycles 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Specific amplification of single products was controlled through the establishment of melting curves. Range of dilutions of target DNA fragments (10⁻⁴ to 10⁻¹¹ µg/µL) were analyzed to build standard curves and permit to determine concentration of transcript. PCR reactions were realized in duplicate. Each target DNA fragment, zfER α , zfER β 1, zfER β 2, Vtg 1 and Vtg 2, were analyzed in each sample. Results were analyzed using (Realplex software 2.2). mRNA concentration were normalized by GAPDH expression, and results were expressed as ratio of

mean of exposed fish on DMSO. Each result was expressed as mean \pm standard deviation. Water samples were used as negative control to monitor DNA contamination.

Gene <i>GenBank</i> <i>accession no.</i>	Primer sequences	Concentrations	References
zfER α (ESR1) <i>AB037185</i>	Fw : 5' -CTGGAGATGCTGGACGCTCA-3 Rev : 5' -GCTGCAGCTCCTCCTCTTGG-3	600 nM	(Mouriec et al., 2009)
zfER β 1 (ESR2b) <i>AJ414566</i>	Fw : 5' -TGATCCTGCTCAACTCTAATAAC-3 Rev : 5' -TCCAGCAGATTCAGCACCTTCCC-3	600 nM	
zfER β 2 (ESR2a) <i>AJ414567</i>	Fw : 5' -TGATCCTCCTGAACTCCAACATG-3 Rev : 5' -TCCAGCAGACACAGCAGCTTGGA-3	200 nM	
Vtg 1 559475	Fw : 5' -AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG -3 Rev : 5' -GATGGGAACAGCGACAGGA -3	600 nM	This study
Vtg 2 559931	Fwd : 5'-GGCTCAGTTCAAGGACAAGC-3' Rev : 5'-TTGCAAAGCAACCACAAGAG-3'	400 nM	This study
GAPDH 317743	Fw : 5' -GAGCACCAGGTTGTGTCCA-3' REV : 5' -TGTCATACCATGTGACCAGCTT-3'	400 nM	This study

Table 1 : Sequences of the oligonucleotides used in Real-Time Polymerase Chain Reaction

II. 7. Vitellogenin Competitive Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Quantification of circulating concentration of vitellogenin concentration in blood samples was determined by using a specific competitive ELISA using the method already described by Brion et al. (2002).

II. 8. Data analysis

For *in vitro* assays, a range of concentrations of each chemical was tested in triplicates in at least three independent experiments. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed for significant luciferase induction in treated cells over cell control using one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test (Graph-Pad Prism 5, version 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA). Dose-response curves were modeled by using the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro (available at <http://eric.vindimian.9online.fr/>), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC₅₀ and EC₅ (chemical concentration leading to 50 and 5 % of maximal effect, respectively). Relative estrogenic potencies (REP) were determined as the ratio of EC₅₀ of E2 to that of test chemical.

Concerning *in vivo* experiment, GFP expression, Vtg and zfERs mRNA quantification and Vtg protein expression, normality and homogeneity of variance was first checked using Kolmogorov-Smirnov tests. Then statistical significance of estrogenic effect between control group and exposed fish was

analyzed using the non-parametric Kruskals Wallis test followed by a Dunn's post-comparison test (Graph-Pad Prism 5, version 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA).

III. RESULTS

III. 1. *In vitro* estrogenic activity of benzophenone derivatives in the ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 1, ZELH-zfER β 2 cell lines

The ability of reference estrogens (E2 and EE2) and benzophenone derivatives to activate *in vitro* the three zfERs in zebrafish cells is presented on Figure 2 and their EC50, EC5 and estrogenic potency relative to E2 (REP) determined in the three cell models are given in the Table 2. In these experiments, estrogenic activity of E2 and EE2 were very similar in each models, with a higher affinity of these two compounds in the ZELH-zfER β 1 and ZELH-zfER β 2 cell lines.

BPs induced different estrogenic responses in the three models. Overall, out of the ten molecules tested, five were active on the three receptors (BP2, THB, BP1, 4BP and 44'BP), one was active on two receptors (23'44'BP), two (BP8 and BP3) only weakly activated one receptor (*i.e.* zfER β 2), and BP and 234BP had no effect on any assay (Figure 2, Table 2).

	Alpha				Beta 1				Beta 2			
	EC ₅₀ (nM)	SD	n	REP	EC ₅₀ (nM)	SD	n	REP	EC ₅₀ (nM)	SD	n	REP
E2	0.205	0.05	15	1	0.03	0.01	14	1	0.051	0.023	15	1.00
EE2	0.134	0.039	4	1.52	0.03	0.01	4	1	0.033	0.004	3	1.53
BP1	2195	1395	5	9.32E-05	w.e		3		3859	1618	4	1.31E-05
BP2	991	780	4	1.89E-04	2216	909	4	1.23E-05	1477	694	4	3.43E-05
BP3	n.e		3		n.e		3		w.e		3	
THB	1062	429	4	1.93E-04	3718	757	3	7.35E-06	3902	1285	4	1.30E-05
BP	n.e		3		n.e		3		n.e		3	
BP8	n.e		3		n.e		3		w.e		3	
4BP	30216	24143	5	6.77E-06	2131	1436	5	8.66E-06	2950	2372	6	1.72E-05
44'BP	2968	2285	4	6.90E-05	6752	5415	4	2.73E-06	4985	3018	4	1.02E-05
234BP	n.e		3		n.e		3		n.e		3	
2344'BP	4831	4321	3	4.24E-05	n.e		3		3874	531	4	1.31E-05

Table 2: Effective concentrations (EC50 and EC5) and relative estrogenic potencies (REP) of E2, EE2 and benzophenone derivatives in ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 1 and ZELH-zfER β 2 cell lines luciferase

BP2 was the strongest active BPs, in terms of both effective concentration (EC50) and luciferase induction with a slight over-expression in ZELH-zfER α (Figure 2A). Based on its EC50, THB was 3 or 4 fold more potent in ZELH-zfER α than in ZELH-zfER β 1 and ZELH-zfER β 2 cell lines, respectively. A similar pattern was observed with 44'BP. Conversely, a lower number of BPs was active in the ZELH-zfER β 1 assay as compared to the two other assays. BP1 elicited 80 % of transactivation in ZELH-zfER α and ZELH-zfER β 2 whereas it acted as weak estrogenic compound in ZELH-zfER β 1 cell line. Similarly, 23'44'BP was active in ZELH-zfER α and -zfER β 2 but not on -zfER β 1 cells. These results could be related either to a selective action of these two compounds towards this receptor, and/or to a lower expression of zfER β 1 in ZELH-zfER β 1 as compared to the two other cell lines, which impedes detection of weak estrogen in this assay (Cosnefroy et al., in prep). Finally, it is noteworthy that some differences in BPs ranking were noted depending on the zfER subtype. In ZELH-zfER α , active BPs ranked as follows: BP2 = THB > BP1 > 44'BP > 23'44'BP >> 4BP (Figures 2A and 2B); while in ZELH-zfER β 1: BP2 = 4BP > THB > 44'BP (Figures 2C and 2D); and in ZELH-zfER β 2: BP2 > 4BP > BP1 = THB = 23'44'BP > 44'BP >> BP3 (Figures 2E and 2F). In light of these results, alpha/beta selectivity is suggested regarding 4BP towards zfER β subtypes and, to a lesser extent, 44'BP, BP1 and THB towards zfER α . Those compounds may thus represent *in vitro* selective ER modulators (SERM) of zebrafish estrogen receptors. It is also noted that the preferential action of BPs on zfER α contrasts with the preferential affinity of steroid estrogens E2 and EE2 for zfER β subtypes.

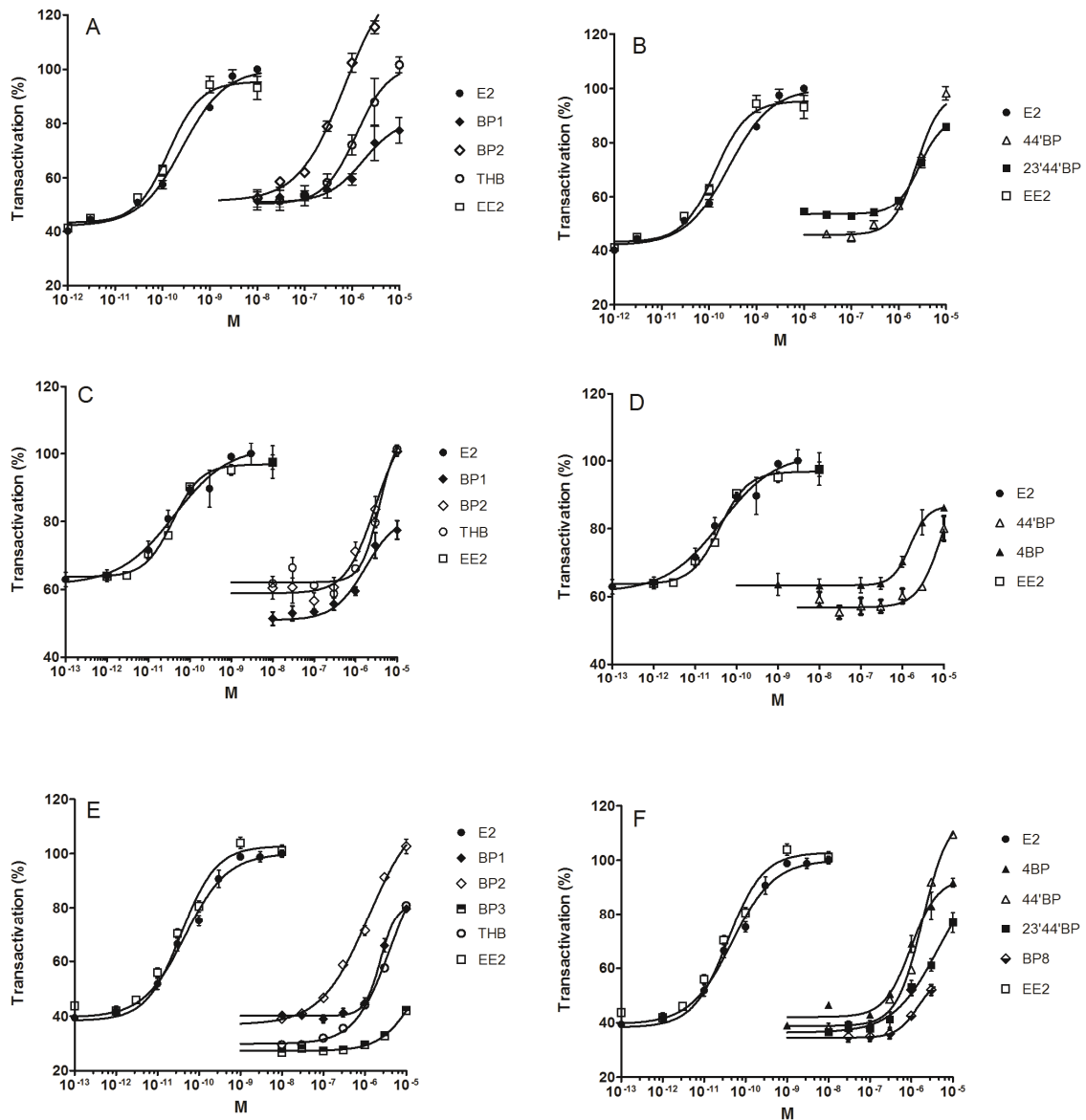


Figure 2 : Dose response curves of luciferase induction in (A, B) ZELH-zfER α , (C, D) ZELH-zfER β 1 and (E, F) ZELH-zfER β 2 cells by xeno-estrogens. 17β -estradiol (E2), 17α -ethynylestradiol (EE2) and benzophenone derivatives: 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2), 2,4,4'-trihydroxybenzophenone (THB), 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (23'44'BP), 2,3,4-trihydroxybenzophenone (234BP), 4-hydroxybenzophenone (4BP), 4,4'-dihydroxybenzophenone (44'BP). Results were expressed as percentage of luciferase activity induction by E2 10 nM in ZELH-zfER α and E2 3 nM in ZELH-zfER β 1 and ZELH-zfER β 2. Cells were exposed for 72 hours at 28°C; values are expressed as means \pm SD of triplicates.

III. 2. *In vivo* estrogenic activity of benzophenone derivatives in *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish

All benzophenone derivatives were tested for their ability to induce the GFP reporter gene in the *Cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line exposed at embryo stage. We showed that embryos treated to the positive control EE2 (0.05 nM) from 0 to 5 dpf exhibited strong GFP expression in the telencephalon, the preoptic area and the inferior lobe of the hypothalamus while in control embryo, GFP signal was very weak and restricted to the preoptic area. Quantification of GFP expression further demonstrated that EE2 lead to a tremendous 20-fold induction of the reporter gene compared to control group. Among the ten BPs tested, BP1, THB, 4BP and 44'BP significantly induced GFP expression in various brain region, the distribution of GFP signal being comparable to EE2. Quantification of GFP, further demonstrated that these compounds induced GFP expression in a concentration dependant manner yielding a maximal GFP signal at the higher tested concentration (10 μ M) for all four BPs (Figure 3). 4BP was the strongest active chemical with a maximal GFP induction factor of 18, very close to EE2 one. BP1 also markedly induced GFP by 12 fold over DMSO control, and then THB and 44'BP induced a less moderate GFP response by 5 and 3 fold, respectively. Surprisingly, no effect was observed with BP2, which was among the most active BPs in our *in vitro* experiments. Finally, BP3 was found weakly active in a first experiment (Figure 4) and additional experiments have to be done to confirm this effect.

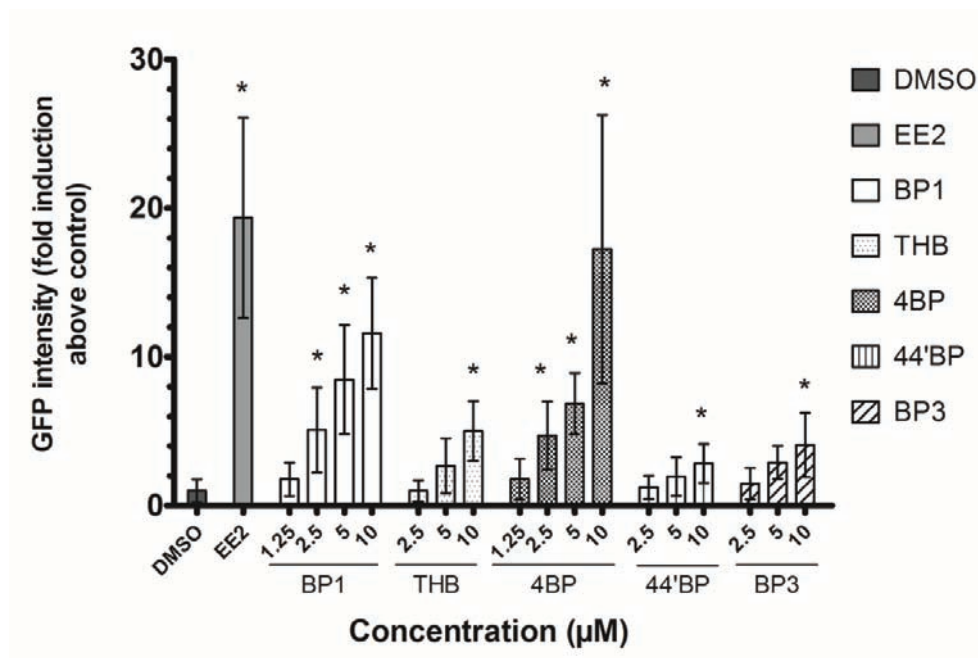


Figure 3: Expression of GFP in larvae of *cyp19a1b*-GFP zebrafish exposed for 120 h (0 to 5 dpf) to EE2 (0.05 nM) and BPs (1.25, 2.5, 5 and 10 μ M). Only BPs that significantly induce GFP in our experiments are presented in this figure. Values are means \pm SEM of two independent experiments ($n=10-20$ embryos per condition), except for BP3 (one experiment; $n=5-6$); *: $p<0.05$.

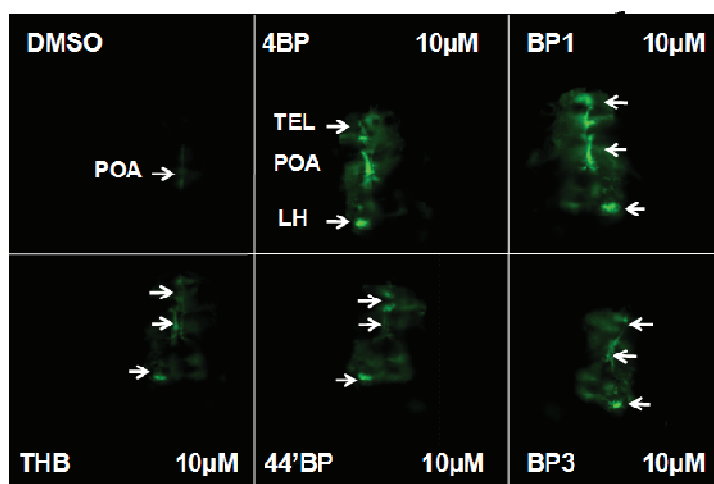


Figure 4: In vivo effects of several BPs on GFP expression in transgenic zebrafish embryos. *BPs cause an increase of GFP in the telencephalon (Tel), the preoptic area (POA), and the inferior lobe of the hypothalamus (LH) at 5 dpf. Dorsal views of the embryos with anterior to the top.*

III. 3. Effects of BP2 and BP3 on circulating concentrations of vitellogenin in male zebrafish

Based on data obtained *in vitro* using the three ZELH-zfERs cell lines and *in vivo* using the transgenic *cyp19a1b*-GFP embryo assay, BP2 and BP3 were further tested for their estrogenicity in adult male fish by measuring zf-ERs (Figure 5) and zf-VTG gene expressions (BP2) (Figure 6) as well as circulating concentrations of Vtg (BP2 and BP3) (Figure 7). In each experiment E2 10nM was used as a positive control. During the experiments, no mortality was recorded in fish exposed to E2, BP2 or BP3.

We found that E2 affect differently the zfER expressions with a strong 150 fold up-regulation of zfER α gene and a moderate induction of both zfER β 1 and zfER β 2 (5 and 8-fold above control respectively) (Figure 5). In contrast to E2, BP2 did not induce any significant changes in zfERs expressions. As expected, exposure of male fish to E2 leads to a tremendous induction of gene expressions and vitellogenin synthesis. Interestingly, BP2 induced in a concentration-dependant manner Vtg 1 and Vtg 2 gene expressions leading to a concentration-dependant induction of circulating concentrations of Vtg with a significant effect from 10 mg/L of BP2 (Figure 6A) . At the highest concentration, the mean measured concentration of vitellogenin reached 460 μ g/ml corresponding to an almost 7000 fold induction above control. In a second experiment exposing male fish to E2 10 nM and to increasing concentrations of BP3, we found that E2 induced vitellogenin at similar concentrations to those measured in the first experiment. Further, BP3 lead to a concentration-

dependant induction of vitellogenin synthesis (Figure 7B). The mean measured concentration of vitellogenin in the group exposed to 10 mg/L of BP3 reached 3200 ng/ml of total blood corresponding to a significant 32 fold increase of vitellogenin compared to the control group. This corresponds to weak vitellogenin inductions compared to those measured in BP2-exposed fish. Overall, our data demonstrate that BP2 and BP3 induced vitellogenin expression in male fish, BP2 being the most estrogenic active compound.

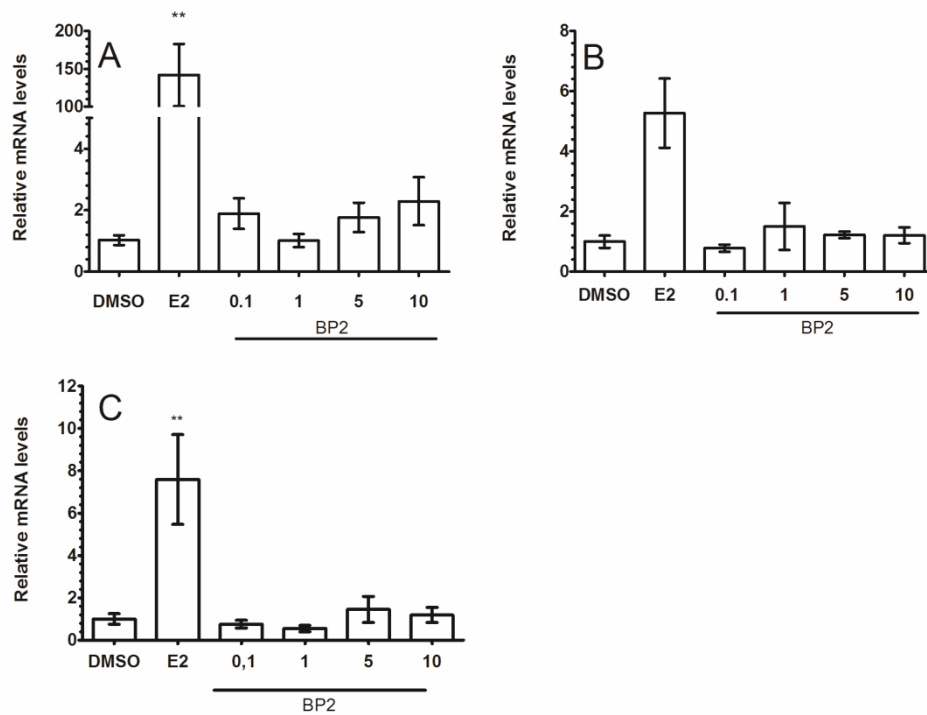


Figure 5 : Expression of *zfERα*, *zfERβ1* and *zfERβ2* in liver of adult male zebrafish exposed to E2 (10 nM) and BP2 (0.1; 1; 5; 10 mg/L). (A) Expression of *zfERα*, (B) *zfERβ1* and (C) *zfERβ2*. The results were normalized using *GAPDH* housekeeping gene and represented as ratio of mean mRNA expression of exposed fishes on DMSO exposed fishes \pm S.E.M (n=6-7). The asterisk represents a statistically significant difference when compared with controls (DMSO), * at $P < 0.05$, ** at $P < 0.01$ and *** at $P < 0.001$.

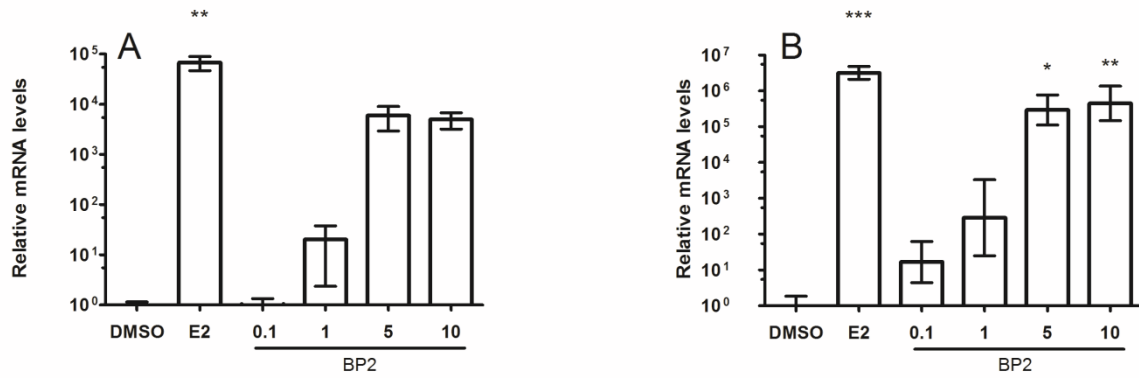


Figure 6: Expression of Vtg1 and Vtg2 in liver of adult male zebrafish exposed to E2 (10 nM) and BP2 (0.1; 1; 5; 10 mg/L). (A) Expression of Vtg1 and (B) expression of Vtg2. The results were normalized using GAPDH housekeeping gene and represented as ratio of mean mRNA expression of exposed fishes on DMSO exposed fishes \pm S.E.M (n=6-7). The asterisk represents a statistically significant difference when compared with controls (DMSO), * at $P < 0.05$, ** at $P < 0.01$ and *** at $P < 0.001$.

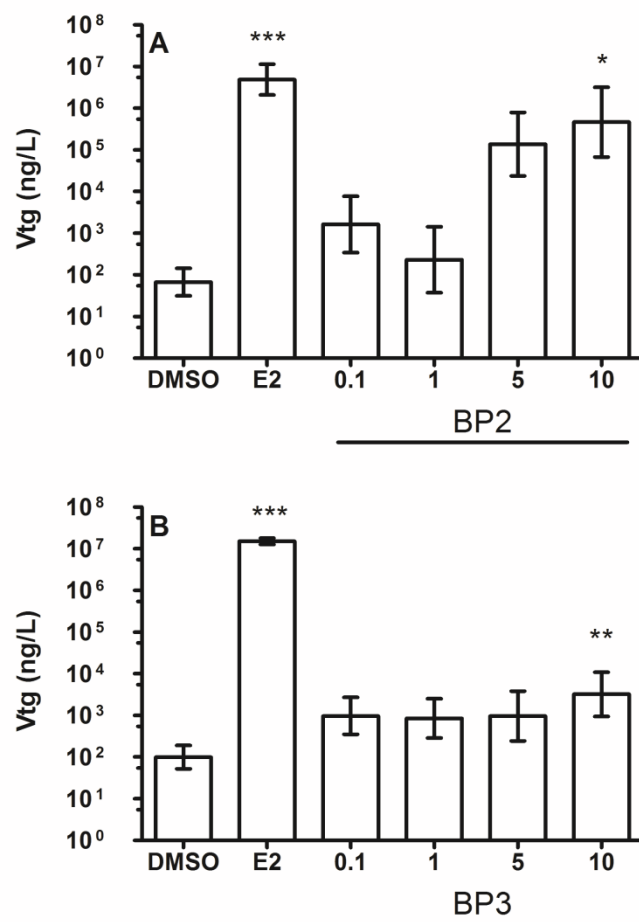


Figure 7: Effect of BP2 (A) and BP3 (B) on Vtg expression on adult fishes measured by ELISA. Exposure concentration of E2 was 10 nM and BP2 (1.25, 2.5, 5 and 10mg/L). Values are means as SD (n= 6-8 adult fish per condition) - * at $P < 0.05$, ** at $P < 0.01$ and * at $P < 0.001$.**

IV. DISCUSSION

In this study, estrogenic activity of several benzophenone derivatives was assessed in a model fish species, the zebrafish by using a combination of newly developed *in vitro* and *in vivo* biological models, namely ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 1, ZELH-zfER β 2 cell lines and *cyp19a1b*-GFP embryos. For the first time, the ability of these compounds to interact as agonist on the three zebrafish estrogen receptor isoforms is reported, yielding different patterns of estrogenic activation according to zfER subtype or the biological system (*i.e.* cell, embryo or adult).

IV. 1. Estrogenic activity of benzophenone derivatives on the ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 1, ZELH-zfER β 2 cell lines.

We studied the estrogenic activity of 10 BPs in zebrafish-specific cell lines which expressed the three zfERs in the same hepatic context. These models allowed to compare affinity of chemicals for each zfER subtypes and potentially identify receptor selective ligands. Five of 10 BPs induced an estrogenic activity on the three models: BP2, THB, BP1, 4BP, 44'BP, while BP and 234BP were non active. These two former compounds have been described as weakly active in transient transfection (ERE-Luc) in MCF-7 cells (Suzuki et al., 2005). These compounds have also been tested in yeast-hER α model (Schultz et al., 2000), showing BP inactive and 234BP as estrogenic (EC₅₀ 5 μ M).

BP8 and BP3, both containing a methoxy group (Figure 1), were weakly active on ZELH-zfER β 2, as they induced partial luciferase activity at high concentrations, but inactive on the two others cell lines. These weak activities have been reported for BP8 in MCF-7 cells (Suzuki et al., 2005). For BP3, published results showed generally an EC₅₀ > 10 μ M (Suzuki et al., 2005; Kunz et al., 2006; Cosnefroy et al., 2009), except in the study by Schlumpf et al., (2001) using a proliferation assay in MCF-7 cells and reporting an EC₅₀ of 3.73 μ M. Schreurs et al., (2002) also obtained a strong luciferase signal induction in HEK293 stably transfected with the hER at 10⁵M. In order to check the ER specificity of luciferase induction in luminescent cell lines, all BPs were tested in ZELH cells (ZFL transfected only with ERE-Luc-Hygro but expressing no ER). These experiments showed that none of the tested BPs induced significant luciferase signal in ZELH (data not shown), which confirmed the specificity of the weak luciferase induction in ZELH-zfER β 2 cell lines by BP3 and BP8.

23'44'BP and 44'BP were the two less estrogenic compounds tested in our models. These results were different from those obtained by Suzuki et al., (2005), who found these two BPs estrogenic with EC₅₀ of 0.14 μ M for 23'44'BP and 44'BP in human MCF-7 cells.

THB and BP1 have a higher affinity for zfER α than zfER β 1 and zfER β 2 and moreover for THB which elicited EC₅₀ of 3 or 4 fold higher in ZELH-zfER α . In human ER subtype, the results were different. BP1 and THB have higher affinity for hER β than hER α (Molina-Molina et al., 2008). Moreover, in zebrafish zfER β 2 model, THB did not induced 100 percent of maximal transactivation (80 %).

BP2 was the most active in ZELH-zfER α (EC₅₀ 1.08 μ M), ZELH-zfER β 2 (EC₅₀ 1.47 μ M) and the second most estrogenic in ZELH-zfER β 1 (EC₅₀ 2.2 μ M). The estrogenicity of this compound has been demonstrated in different models, *in vitro* using transient transfection in MCF-7 (EC₅₀ 0.3 μ M) (Suzuki et al., 2005), stable transfection in MELN cells (EC₅₀ 3.2 μ M) (Molina-Molina et al., 2008) and also in fish *in vitro* models like yeast-rtER α (EC₅₀ 24.9 μ M), HELN-rtER α (EC₅₀ 0.16 μ M) and PELN- rtER α (EC₅₀ 0.38 μ M) (Kunz et al., 2006; Cosnefroy et al., 2009). We also noticed that 4BP have a clear higher affinity for ZELH-zfER β 1 and ZELH-zfER β 2 than ZELH-zfER α (Table 2).

Finally, the established *in vitro* models can serve to highlight preferential affinity of ligands towards receptor subtypes. We noted differences in BPs ranking depending on the zfER subtype suggested alpha/beta receptor selectivity by certain BPs, notably for 4BP towards zfER β subtypes and, to a lesser extent, 44'BP, BP1 and THB towards zfER α . Those compounds may thus represent *in vitro* selective

ligands of zebrafish estrogen receptors. It is noted that the preferential action of BPs on zfER α contrasts with the preferential affinity of steroid estrogens E2 and EE2 for zfER β subtypes. Molina-Molina et al., (2008) reported similar preferential activity for the human β receptor than for the alpha subtype for BP2, THB and BP1.

IV. 2. Effect of BPs on GFP expression at larval stage using Aro b-GFP transgenic zebrafish

In order to gain further information regarding the estrogenic potency of benzophenone derivatives, we assessed their effect on *in vivo* expression of *cyp19a1b* in zebrafish embryo. For that purpose, we used a newly established tg-(*cyp19a1b*-GFP) embryo assay which has been shown as a reliable and sensitive assay to quantify estrogenic activity of chemical substances (Brion in prep). By quantifying GFP expression in live 5-dpf old zebrafish larvae, we confirm the estrogenic potency of some BP (*i.e.*, BP1, THB, 4BP and 44'BP) as shown by their ability to induce GFP expression in a concentration-dependant manner. However, the ranking of these molecules as a function of their potential estrogenic activity in the cellular models or in the tg-(*cyp19a1b*-GFP) embryo assay is different. For instance, 4BP was the most estrogenic compound *in vivo* but not *in vitro*. Interestingly, this compound presents a strong affinity for zfER β 1 and zfER β 2 while its estrogenic potency in the ZELH-zfER α cell line is very weak. Interestingly, it has been recently shown by means of whole-mount in situ hybridization, that that fER β 1 and zfER β 2 are early expressed in the developing brain, while zfER α are not detected in the brain before two weeks post fertilization. Based on these data, it can be suggested that the effect of 4BP on brain aromatase expression is mediated by zfER β s. Given the very weak estrogenic potency of BP1 in ZELH-zfER β 1 cell line and the strong GFP expression induced by this compound in transgenic embryos, it can be suggested that involvement of zfER β 2 is predominant in the effect mediated by these compounds on brain aromatase expression. This hypothesis is further illustrated by BP3 which exhibited no estrogenic activity in ZELH-zfER α and ZELH-zfER β 1 cell lines and a weak estrogenic *in vitro* in ZELH-zfER β 2 as well as *in vivo* in the in transgenic embryo assay. However, in the specific case of BP3, metabolisation of the parent compound into estrogenic metabolites may also take into account. Indeed, it has been shown that BP3 is metabolized into BP1, whom estrogenic effect has been shown both *in vitro* in the three ZELH-ZfERs cell line and *in vivo* in transgenic embryos as well as in adult fish as shown by the significant vitellogenin induction measured in male fish. Regarding BP2, we showed that this compound has strong estrogenic activity *in vitro* in both ZELH-zfERs models, had no effect of GFP expression in tg(*cyp19a1b*-GFP) embryo model, but induced marked estrogenic effect in adult male fish has shown by the concentration-dependant induction of Vtg expression and synthesis confirming previous data obtained in male fathead minnow (Kunz et al., 2006; Weisbrod et al., 2007). The lack of estrogenic effect of BP2 at embryonic stage of development may be related to difference of biodisponibility and /or metabolisation of this compound between

embryos and adult fish. Such difference may also rely on the cellular context in which the estrogenic effect has been measured. In this way, it would be advisable to determine whether BP2 can induce an estrogenic response in the glial cell line U251-MG transfected with the three zebrafish ER subtypes and the Aro-B promoter linked to a luciferase reporter gene (Le Page et al., 2006). All together, these data deserve further study to explain the difference of responses obtained between the different zebrafish biological models used in this study. Whatever, our study highlighted the interest of using in a testing strategy the combination of *in vitro* and *in vivo* models which possess both their advantages and their limits.

V. Conclusion

Our approach allows to characterize the estrogenic potency of emerging pollutants, the benzophenone derivatives, using *in vitro* and *in vivo* assays within a unique model fish species, the zebrafish. The differences observed between assays deserve further studies to characterize the behavior of compounds in the different biological systems in terms of bioavailability and metabolism but also to better consider the importance of the cellular context in the biological responses measured. Whatever, our study demonstrates the interest in combining various assays to assess the hazard and risk of EDCs.

REFERENCES

- Ackermann, G. E., Brombacher, E. and Fent, K. (2002). "Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(9): 1864-1875.
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A. M., Pons, M., Nicolas, J. C. and Casellas, C. (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." Science of the Total Environment **233**(1-3): 47-56.
- Balmer, M. E., Buser, H. R., Muller, M. D. and Poiger, T. (2005). "Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes." Environmental Science & Technology **39**(4): 953-962.
- Barcelo, D. (2003). "Emerging pollutants in water analysis." Trac-Trends in Analytical Chemistry **22**(10): XIV-XVI.
- Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A. and Porcher, J. M. (2002). "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(8): 1699-1708.
- Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J. and Flammarion, P. (2004). "Impacts of 17[beta]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **68**(3): 193-217.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J. M., Balaguer, P. and Ait-Aissa, S. (2009). "A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens." Toxicology in Vitro **23**(8): 1450-1454.
- Díaz-Cruz, M. S., Llorca, M. and Barceló, D. (2008). "Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment." TrAC Trends in Analytical Chemistry **27**(10): 873-887.
- Fent, K., Zenker, A. and Rapp, M. (2009). "Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland." Environ Pollut **158**(5): 1817-24.
- Hinfray, N., Porcher, J. M. and Brion, F. (2006). "Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **144**(3): 252-262.
- Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., Foster, P. M., Gray, C. L. and Gray, L. E. (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." Toxicological Sciences **105**(2): 235-259.
- Jeon, H. K., Chung, Y. and Ryu, J. C. (2006). "Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1131**(1-2): 192-202.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J. M. and Ait-Aissa, S. (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." Environ Pollut **158**(1): 74-83.
- Kunz, P. Y. and Fent, K. (2006). "Agonistic and antagonistic activities of UV filters towards the human estrogen and androgen receptor and activities of UV filter combinations in vitro." Marine Environmental Research **62**: S241-S241.
- Kunz, P. Y. and Fent, K. (2006). "Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish." Aquatic Toxicology **79**(4): 305-324.
- Kunz, P. Y., Galicia, H. F. and Fent, K. (2006). "Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish." Toxicological Sciences **90**(2): 349-361.
- Le Guevel, R. and Pakdel, F. (2001). "Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods." Apmis **109**: S473-S479.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O. and Pakdell, F. (2006). "Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system." Environmental Health Perspectives **114**(5): 752-758.

- Legler, J., van den Brink, C. E., Brouwer, A., Murk, A. J., van der Saag, P. T., Vethaak, A. D. and van der Burg, B. (1999). "Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line." Toxicol Sci **48**(1): 55-66.
- Matthews, J. B., Fertuck, K. C., Celius, T., Huang, Y. W., Fong, C. J. and Zacharewski, T. R. (2002). "Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **82**(2-3): 181-194.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O. and Pakdel, F. (2002). "Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions." Biology of Reproduction **66**(6): 1881-1892.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F. and Kah, O. (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene." Journal of Comparative Neurology **485**(4): 304-320.
- Molina-Molina, J. M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Aissa, S. and Balaguer, P. (2008). "Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays." Toxicology and Applied Pharmacology **232**(3): 384-395.
- Mouriec, K., Lareyre, J. J., Tong, S. K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B. C., Kah, O. and Anglade, I. (2009). "Early Regulation of Brain Aromatase (cyp19a1b) by Estrogen Receptors During Zebrafish Development." Developmental Dynamics **238**(10): 2641-2651.
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B. and Lichtensteiger, W. (2001). "In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens." Environmental Health Perspectives **109**(3): 239-244.
- Schreurs, R., Lanser, P., Seinen, W. and van der Burg, B. (2002). "Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay." Archives of Toxicology **76**(5-6): 257-261.
- Schultz, T. W., Seward, J. R. and Sinks, G. D. (2000). "Estrogenicity of benzophenones evaluated with a recombinant yeast assay: Comparison of experimental and rules-based predicted activity." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(2): 301-304.
- Segner, H. (2009). "Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **149**(2): 187-95.
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N. and Ohta, S. (2005). "Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens." Toxicology and Applied Pharmacology **203**(1): 9-17.
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K. and Fent, K. (2007). "Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish." Toxicology and Applied Pharmacology **225**(3): 255-266.

I.2. Effet œstrogénique de la Benzophénone-2 chez la larve : données complémentaires à l'article 1

Afin de compléter les résultats relatifs à l'effet œstrogénique de la BP2 obtenus lors des travaux relatifs à l'article 1, deux études complémentaires ont été menées.

La première étude s'est intéressée à la quantification des transcrits des gènes *vtg1* et *vtg2* chez la larve de poisson zèbre exposée à une gamme de concentrations de BP2 allant de $1,25 \cdot 10^{-6}$ à $5,0 \cdot 10^{-5}$ M de 0 à 4 dpf (Figure 48). Contrairement au contrôle positif (E2, $p < 0,005$), la BP2 n'a pas entraîné d'augmentation des taux de transcrits des gènes *vtg1* et *vtg2*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'article 1, à savoir une absence d'augmentation des transcrits des différents ERs chez la larve. En effet, la modulation de l'expression des gènes de la Vtg est sous l'influence d'un mécanisme dépendant des ERs.

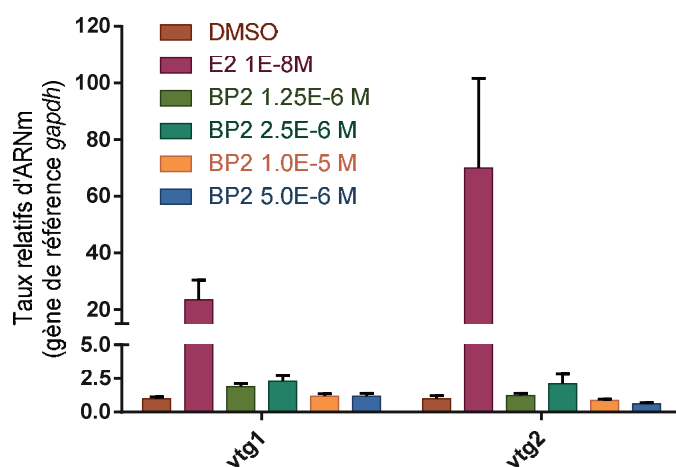


Figure 48. Effet de la BP2 sur l'expression des transcrits des gènes *vtg1* et *vtg2* chez la larve

La deuxième étude menée chez la larve a porté sur l'effet de la BP2 sur l'expression des transcrits du gène œstrogéno-régulé, *cyp19a1b*. Après 4 jours d'exposition à la BP2 à la concentration de $5,0 \cdot 10^{-5}$ M, aucune augmentation des transcrits de ce gène n'a été observée, contrairement au contrôle positif (E2, Figure 49). Ce résultat confirme ceux obtenus dans la larve transgénique *cyp19a1b*-GFP dans laquelle la BP2 n'avait pas entraîné d'augmentation de fluorescence à cette concentration.

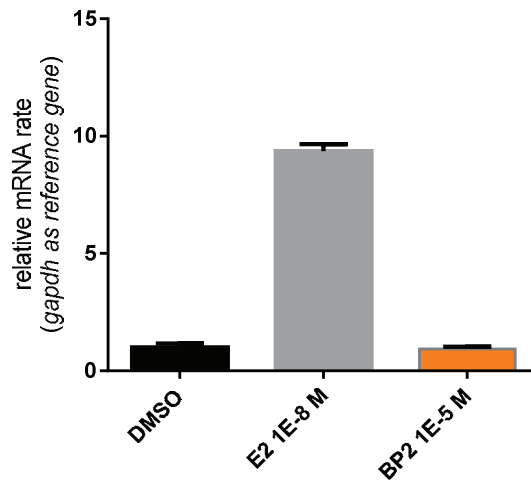


Figure 49. Effet de la BP2 sur l'expression du gène *cyp19a1b* chez la larve

Par conséquent, d'après l'ensemble des résultats obtenus dans l'article 1 et les études complémentaires, la BP2 est responsable d'une activité œstrogénique dans les lignées cellulaires ZELH-zfERs et chez le poisson zèbre adulte, mais ne perturbe pas l'expression de gènes régulés par les œstrogènes chez la larve à 10 μ M.

II. Activité œstrogénique des bisphénols A, F et S chez le poisson zèbre

Article 2

An integrated *in vitro* and *in vivo* approach to assess the estrogenic activity of Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F in the zebrafish.

Vincent Le Fol^{a,b,c}, Manoj Sonavane^a, Selim Aït-Aïssa^{a,*}, Benjamin Piccini^a, Emmanuelle Maillot-Maréchal^a, Olivier Palluel^a, Daniel Zalko^{b,c}, François Brion^{a,*}

^a *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

^b *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

^c *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

* : corresponding authors :

E-mail: françois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 512, fax +33 344 556 767

Selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33 344 556 511, fax +33 344 556 767

Présentation de l'article

De part ses nombreuses applications et sa forte production (Geens et al. 2010; Michalowicz 2014), le BPA est largement répandu dans l'environnement (Careghini et al. 2015). L'exposition de l'Homme au BPA via différentes voies d'exposition (alimentaire, cutanée, pulmonaire) a été bien caractérisée (Yamada et al. 2002; Calafat et al. 2008; Lee et al. 2008; Jimenez-Diaz et al. 2010; Chou et al. 2011; Cao et al. 2012; Edlow et al. 2012). L'exposition au BPA serait responsable de troubles multiples et délétères sur la faune (Oehlmann et al. 2009) et chez l'Homme (Rochester 2013). Il est notamment incriminé dans les troubles de la masculinisation (Rouiller-Fabre et al. 2015) et du développement du cerveau (Negri-Cesi 2015) suite à une exposition fœtale. Etant donné le danger que représente ce composé, le BPA est en voie d'être remplacé par d'autres bisphénols de substitution, notamment le BPF et le BPS, pour lesquels se pose la question de l'évaluation de leurs effets sur le système endocrinien chez l'Homme et l'environnement. Le BPS a déjà été retrouvé dans des papiers thermiques (Becerra et Odermatt 2012) et des produits alimentaires (Gallart-Ayala et al. 2011). L'exposition humaine du BPS a aussi été mise en évidence chez la population américaine (Liao et al. 2012a). Etant donné la probable utilisation croissante de ces substituts au BPA, il est probable de voir augmenter les concentrations environnementales de ces contaminants dans les années à venir. De plus, la proximité structurale de ces composés peut faire craindre des effets délétères similaires à ceux du BPA soulignant la nécessité de recueillir des données toxicologiques afin de caractériser leurs activités biologiques et d'évaluer le risque qu'ils représentent.

Il a été montré que le BPA, BPF et le BPS sont capables d'interagir avec des récepteurs nucléaires dont les récepteurs des œstrogènes, ainsi que d'entraîner des perturbations de sécrétions hormonales dans différents modèles *in vitro* (Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Kitamura et al. 2005; Kuruto-Niwa et al. 2005; Grignard et al. 2012; Molina-Molina et al. 2013; Eladak et al. 2015). Les données *in vivo* bien que moins nombreuses, montrent cependant des perturbations de l'expression de gènes hormono-régulés ainsi que des troubles du développement et de la reproduction (Yamasaki et al. 2002; Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014; Kinch et al. 2015). Les études portant sur l'interaction du BPA, BPS et BPF avec les récepteurs des œstrogènes ont montré des affinités et des activités différentes selon les sous-types des ER humains. Contrairement à l'Homme, chez les poissons dont le poisson zèbre, trois sous-types d'ER à savoir l'ER α , ER β 1 et ER β 2 sont différemment exprimés et régulés dans les tissus (Menuet et al. 2002). Aucune donnée n'existe sur la capacité des substituts du BPA à interagir avec les récepteurs de poisson. Or l'espèce d'origine ainsi que le contexte cellulaire sont des facteurs pouvant influencer les activités œstrogéniques des composés chimiques (Matthews et al. 2000; Wilson et al. 2007; Hotchkiss et al. 2008). Dans ce contexte, nous avons entrepris d'évaluer l'activité de substituts du bisphénol A, à savoir le BPF et le BPS, à travers l'utilisation de deux modèles complémentaires du poisson zèbre. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL

(ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012), ainsi que de la larve transgénique exprimant la GFP placée sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* dont l'expression est cérébrale et œstrogéno-régulée (EASZY assay) (Brion et al. 2012).

Nos résultats confirment que la capacité d'activation du BPA est supérieure vis-à-vis du zfER₂. Contrairement au BPA, les EC50 montrent que la capacité d'activation du BPF et du BPS est supérieure pour le zfER₂ et zfER₁, respectivement. D'autres études réalisées dans le modèle MELN exprimant le hER₂, ont montré que l'activité du BPA était supérieure à celle du BPF et BPS (Molina-Molina et al. 2013) ou bien proches de celle du BPS (Grignard et al. 2012).

Dans le modèle embryon-larvaire *cyp19a1b*-GFP (test EASZY), le BPA et le BPF sont responsables d'une augmentation significative de l'induction de GFP à partir de 5 et 1 µM respectivement. Pour le BPS, des concentrations supérieures sont nécessaires (30 et 60 µM). L'effet maximum du BPS est d'environ 4,3 fois moins important que celui obtenu pour le BPA et le BPF. Cette différence d'activité œstrogénique n'était pas attendue étant donné la proximité structurale de ces composés ainsi que de leur activité proche dans les modèles cellulaires du poisson zèbre (ZELH-zfERs) ou provenant de mammifères (Molina-Molina et al. 2013). La capacité du BPA et du BPS à induire la production de vitellogénine plasmatique dans différentes espèces de poissons dont le poisson zèbre a déjà fait l'objet d'investigation (Van den Belt et al. 2003; Tabata 2004; Brian et al. 2005; Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014; Song et al. 2014). Nous avons choisi d'explorer la capacité du BPF à induire cette protéine œstrogéno-régulée chez le poisson zèbre adulte. Le BPF est responsable d'une augmentation de la vitellogénine plasmatique à 0.1 et 1 µM.

La comparaison des LOEC obtenues par le modèle EASZY et des LOEC obtenues *in vivo* par la mesure de la vitellogénine plasmatique, montre un potentiel œstrogénique semblable pour le BPA entre les deux modèles. Pour le BPS et le BPF, ces LOEC sont beaucoup plus faibles dans le modèle du poisson zèbre adulte qu'elles ne le sont dans le modèle larvaire. Par conséquent, ces données montrent la difficulté à prédire quantitativement le potentiel œstrogénique de ces composés sur la base des seules données *in vitro*. Des paramètres comme l'absorption, la distribution et le métabolisme des xénobiotiques peuvent influencer les réponses biologiques. Par conséquent, ces différences de réponse peuvent reposer, du moins en partie, sur des différences d'ordre pharmacocinétique.

En résumé, nous avons montré que les trois bisphénols sont capables d'exercer une activité sur les sous-types des zfER dans un contexte hépatique avec toutefois, des efficacités différentes selon les sous-types de récepteurs. Nous avons également montré que le BPA et le BPF possèdent une plus forte capacité à induire l'expression de la GFP que ne la possède le BPS dans un contexte cérébral. La comparaison de ces activités entre des modèles de complexité biologique différente pose la question du rôle des paramètres pharmacocinétiques dans l'évaluation du danger des contaminants environnementaux.

An integrated *in vitro* and *in vivo* approach to assess the estrogenic activity of Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F in the zebrafish.

Vincent Le Fol^{a,b,c}, Manoj Sonavane^a, Selim Aït-Aïssa^{a,*}, Benjamin Piccini^a, Emmanuelle Maillot-Maréchal^a, Olivier Palluel^a, Daniel Zalko^{b,c}, François Brion^{a,*}

^a *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

^b *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

^c *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

* : corresponding authors :

E-mail: francois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 512, fax +33 344 556 767

E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33 344 556 511, fax +33 344 556 767

Abstract

Bisphenol A (BPA) is a widely used chemical that has been extensively studied for its endocrine-disrupting properties. Several other bisphenols are already used or are planned to be used as alternatives to BPA, raising the necessity to assess their hazard as regards the endocrine system. In the present study, the estrogenic activity of BPA, BPS and BPF was quantified by using zebrafish-specific mechanism-based *in vitro* and *in vivo* assays. All the bisphenols tested were efficient in transactivating the three zebrafish ER subtypes expressed in ZFL zebrafish hepatic cell line stably expressing luciferase under the control of estrogen responsive elements (ERE). BPA was more active toward ER while BPS and BPF were more efficient to induce an estrogenic response in ZELH-ZfER s cell lines. We further investigated the estrogenic effect at the individual level, by quantifying the expression of brain aromatase using a transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryo assay (EASZY). Using the EASZY assay, we found that BPF was the most active compound, followed by BPA and BPS. BPF and BPA induced GFP in a concentration-dependant manner up to a similar level as EE2 (positive control). In contrast, BPS only partially induced brain aromatase, which occurred solely at the highest concentrations tested (>30µM). Overall, this study confirms the relevance of combining cellular and whole-organism bioassay in a unique model species within an integrated approach devoted to the hazard assessment of chemicals. The differences in terms of estrogenic activity between *in vitro* and *in vivo* assays further support the necessity to assess the fate of chemicals in biological models used for the hazard assessment of endocrine disrupting chemicals.

Keywords: zebrafish, endocrine disruptors, bisphenols, estrogenic activity

1. Introduction

Bisphenol A (BPA: 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) is one of the man-made chemicals produced at the highest volume. It is used to synthesize polycarbonate plastics employed to manufacture a wide variety of industrial and consumer goods), epoxy resins (paints, lacquers, including can-coating lacquers) and as a color revelator in some thermal papers. It is now well established that Human are exposed to BPA (Calafat et al., 2008; Cao et al., 2012; Chou et al., 2011; Edlow et al., 2012; Jimenez-Diaz et al., 2010; Lee et al., 2008; Yamada et al., 2002; Zalko et al., 2011), which is also an environmental contaminant (Careghini et al., 2015). In addition, exposure of human populations to BPA can occur through different routes of exposure (food, skin, air), with specific concerns raised about BPA exposure during the fetal life. The latter scenario has been associated with many reports of adverse effects on the reproductive system, metabolism and development in animals and with masculinization defects (Rouiller-Fabre et al., 2015) and neuro-development disorders in human (Negri-Cesi, 2015). All these adverse effects and studies suggest disorders involving a complex interaction with different hormonal and/or epigenetics signaling pathways in the developing fetus. In the case of BPA, the lack of fetal UFP glucuronosyltransferase (UGT) enzyme (Nishikawa et al., 2010) may explain the higher risk of negative outcomes during fetal development as compared to adult. Although, a large amount of literature data supports that BPA would cause adverse health effects in human (Rochester, 2013) and wildlife (Oehlmann et al., 2009), controversies still remain as regards the risk assessment of BPA. Given the already implemented or upcoming specific BPA regulations in several countries, it is obvious that other bisphenols are intended to replace BPA for specific industrial and consumer's goods applications, raising the question of the potential adverse effects of these lesser known bisphenols on the endocrine system in vertebrates, in human, and in the context of environmental hazard and risk assessment.

BPS (2,2-bis [4-hydroxyphenyl]sulfone) and BPF (2,2-bis [4-hydroxyphenyl]methane) are already used as substitutes to BPA. BPS has already been found in beverage and food cans (Gallart-Ayala et al., 2011; Vinas et al., 2010) and in thermal receipt papers (Becerra and Odermatt, 2012; Liao et al., 2012b). It has been identified in more than 81% of urinary samples from American population (Liao et al., 2012a). Despite the environmental concentrations of BPS and BPF have so far been found to be lower than that of BPA (Fromme et al., 2002; Stachel et al., 2003), an increase of environmental and food-chain contamination by BPS and BPF can be expected in the next few years. Further, due to their structural similarity with BPA, one can reasonably expect that exposure BPS and BPF may produce a large span of developmental effects, which would partly overlap the effects of other xeno-estrogens. This underlines the necessity to acquire sound and detailed data about the properties and toxicology of BPS and BPF. To achieve this goal, the use of species-specific *in vitro* mechanism-based bioassays is a prerequisite. Up to now, most of the data related to the endocrine potency of BPS and BPF have been obtained in mammalian *in vitro* models demonstrating that BPS and BPF are able to activate multiple nuclear receptors (Chen et al., 2002; Grignard et al., 2012; Hashimoto et al., 2001; Kitamura

et al., 2005; Kuruto-Niwa et al., 2005; Molina-Molina et al., 2013), with an induction of cell proliferation (Molina-Molina et al., 2013) or an alteration of testosterone secretion in fetal testis assay (Eladak et al., 2015). *In vivo* studies in mammalian and non-mammalian models are scarcer but have shown that these compounds can affect the expression of hormone-regulated genes and induce developmental and reproductive impairments (Ji et al., 2013; Kinch et al., 2015; Naderi et al., 2014; Yamasaki et al., 2002). Among the molecular targets of bisphenols, the ER interaction of BPA as well as BPS and BPF has been extensively studied showing differential binding affinities and activities depending of human ER subtypes (Molina-Molina et al., 2013). In contrast to human, fish possess three ER subtypes, namely ER α , ER β 1 and ER β 2 which are differently expressed and regulated by estrogens (Menuet et al., 2002). Since the estrogenic activity is known to be influenced by the species of origin as well as the cellular context (Hotchkiss et al., 2008; Matthews et al., 2000; Wilson et al., 2007), we aimed to further investigate the capacity of BPA substitutes to transactivate zfERs using reporter gene assays based on a stable expression of subtypes of zebrafish ER (zfER α , zfER β 1 and zfER β 2) coupled to an estrogen response element (ERE)-driven luciferase in a zebrafish liver cell line (ZFL), that we previously developed (Cosnefroy et al., 2012). In addition to *in vitro* cellular effects of bisphenol congeners, estrogenic activity was further evaluated by using a newly developed *in vivo* zebrafish embryos assay that uses transgenic zebrafish expressing the Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the ER-regulated *cyp19a1b* gene (Tong et al., 2009). This assay, called EASZY (Detection of Endocrine Active Substances acting through estrogen receptors, using transgenic *cyp19a1b*-GFP Zebrafish embryos) is a rapid and cost-effective *in vivo* mechanism-based embryo fish assay providing information regarding the capacity of chemicals to activate the ER-signaling pathway in radial glial cells in the developing brain of fish, while considering the bioavailability and pharmacodynamics of test chemicals (Brion et al., 2012).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (BPA, CAS number 80-05-7), 4,4'-Sulfonyldiphenol (BPS, CAS number 80-09-1), Bis(4-hydroxyphenyl)methane (BPF, CAS number 620-92-8), 17 β -estradiol (E2, CAS number 50-28-2), 17 α -ethynylestradiol (EE2, CAS number 57-63-6) were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France). Leibovitz 15 culture medium (L15), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, G418, hygromycin B, penicillin and streptomycin were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Fetal calf serum (FCS) and epidermal growth factor (EGF) were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France) and sodium bicarbonate and insulin from Dominique Dutscher (Brumath, France). ICI 182-780 (ICI) was purchased from Tocris (Bristol, UK) and Flutamide (FLU) was obtained from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture, chemical exposure and luciferase induction assay

ZELH-zfERs cell lines were established by a two-step stable transfection of the zebrafish hepatic cell line ZFL (ATCC CRL-2643) with 1) the luciferase gene under the control of ERE (yielding stable ZELH cells) and 2) each of the three zebrafish estrogen receptors (yielding stable ZELH-zfER , ZELH-zfER 1 or ZELH-zfER 2 cells) (Cosnefroy et al., 2012). Because the initially established ZELH-zfER 1 clone showed a loss of the receptor and of luciferase induction factor over passages, we improved this model in the present study by establishing new stably transfected clones from the ZELH cell line. For this purpose, we used puromycin instead of geneticin (G418) as the selection antibiotic, in order to enhance the efficiency of the clone selection step, as ZFL were weakly sensitive to G418. The newly developed ZELH-zfER 1 cell line showed a basal level at *ca.* 40%, improving luciferase signal induction along with its stability over passages (data not shown).

ZELH-zfERs cells were routinely cultured at 28°C in a LDF-SVF culture medium, exactly as previously described (Cosnefroy et al., 2012). For chemical exposures, cells were cultured in phenol red free LDF complemented with dextran-coated charcoal treated serum. The cells, seeded in 96-well plates at 25,000 cells per well for ZELH-zfER and ZELH-zfER 1, and at 75,000 cells per well for ZELH-zfER 2, were cultured for 24h before exposure. BPA, BPS and BPF were freshly diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to get a range of concentrations from 3 nM to 10 µM and with a final solvent concentration of 0.1% v/v. After 72h of exposure, luciferase activity was assessed in living cells as previously described (Cosnefroy et al., 2012). Results were expressed as percentage of maximal luciferase signal by the positive control chemical, E2 10 nM.

2.3. Zebrafish embryos, chemical exposure and *in vivo* imaging

Newly fertilized *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish (*Danio rerio*, from AB strain) eggs were collected from the breeding stock of adult zebrafish that had been maintained under controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle) in charcoal filtrated water at 28 ± 1°C and fed SDS-400 (Special Diet Services, Dietex, Argenteuil, France) twice a day and live brine shrimp (*Artemia* spp.; Europrix, Lens, France). Chemical exposures were performed from 0 to 4 dpf (day post-fertilization) in an incubator at 28°C under semi-static conditions. Each condition consisted of a minimum of 10 embryos in 100 ml of water contaminated with the diluted chemical in DMSO to get a final solvent concentration of 0.01% v/v. The exposure protocol comprised the following conditions: BPA: 0.0039 to 10 µM; BPA (10 µM) mixed to flutamide or ICI 182-780 (1 µM); BPS: 0.25 to 60 µM, BPS (30 µM) mixed to flutamide or ICI (1 µM), BPF: 0.01 µM to 20 µM, BPF (5 µM) mixed to flutamide or ICI (1 µM). Ethinylestradiol (EE2) at 0.05 nm was used as the positive control for estrogenic effects. At the end of exposure, transgenic zebrafish larvae were collected for fluorescence measurement by image analysis. Each larva was observed and photographed in dorsal view under a fluorescence microscope combined with AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). All photographs were taken with the same parameters as previously described (Brion et al., 2012) and

analyzed using the Axiovision Imaging Software. Fluorescence quantification was based on the measurement of integrated density of the region of interest for each picture using the ImageJ software as previously described (Brion et al., 2012). Results were expressed as mean fold of induction above control.

2.4. Data analysis

For cell exposure, each chemical was tested in triplicates in at least two independent experiments. Dose–response curves were modeled by using the Regtox EV7.0.7 Microsoft Excel™ macro (available at <http://eric.vindimian.9online.fr/>), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC50 (the concentration of a test chemical which induces 50% of its maximal effect) and PC50 (the concentration of a test chemical which induces a response which is 50% of the maximal positive control response). Graphics have been performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). In the case of no full dose response curves with any plateau, the maximal effect was adjusted to 100%. In the other case, e.g. a full dose response with a plateau and partial or full agonist pattern, no maximal effect was adjusted. Data were expressed as mean ± SD. Depending of the situation, EC50 or PC50 was calculated. For larva, GFP induction by BPA, BPS and BPF was expressed as mean ± SEM and values were compared to DMSO using the one way ANOVA test. Dose-response of GFP induction in transgenic larva was modeled by using the Regtox EV7.0.7 Microsoft Excel™ macro. Co-exposures of each bisphenol with ICI 182-780 or flutamide were analyzed using the Mann-Whitney test.

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* estrogenic activity of BPA, BPS and BPF in ZELH-zfERs cells

Effective concentrations of BPA, BPF and BPS were determined in ZELH-zfERs models after 72h of exposure by measuring luciferase activity. To improve the detection of zfER 1 activation in ZELH, a new clone was for the present study. Regarding the positive control 17 β -estradiol (E2), a very similar EC50 was found using the new ZELH-zfER 1 clone (Fig 1) and the one described previously (Cosnefroy et al., 2012), which supported the relevance of the newly established model and validated its further use in the study. Regarding ZELH-zfER and ZELH-zfER 2, the respective EC50s calculated for E2 were also found to be similar in this study and in the previous one (Cosnefroy et al., 2012).

The results regarding the estrogenic potency of BPA on the three zfERs models confirmed its selectivity towards zfER (EC50 1 μ M), compared to zfER 1 (EC50 17 μ M) and zfER 2 (EC20 18 μ M) (Fig 1, Table 1). Depending on the cellular context and the ER subtype, differential transactivation activities of bisphenols towards ERs were previously reported. Using the MELN cell line stably expressing hER , (Grignard et al., 2012) reported that BPA and BPS have similar activities. Conversely, in another study using the HELN-hER cell line, the most effective compound

was BPA, closely followed by BPF and BPS (Molina-Molina et al., 2013). In this latter study, authors demonstrated that unlike BPF and BPA, BPS was more active on hER α than hER β while BPA and BPS were equally active on both receptors. Overall, our data demonstrate that BPA, BPS and BPF are agonist ligands of all three zfERs subtypes. Interestingly, BPS and BPF are more active toward zfER β s, while BPA is clearly more active toward zfER α .

	ZELH-zfER	ZELH-zfER 1	ZELH-zfER 2
E2	0.15 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02
BPA	807 #	17154 #	18918 **
BPF	5795 ± 4747 *	5337 **	2418 ± 342 *
BPS	4058 #	1016 ± 126	2468 #

Table 1. Effective concentrations (nM) of BPA, BPF and BPS in ZELH-zfERs zebrafish cell models

Each chemical was tested in triplicates in at least two independent experiments.

no SD available in the case of two independent experiments.

Values are expressed as EC50 except those marked by an asterisk (*) which are expressed as PC50 (the concentration of a test chemical which induces a response which is 50% of the maximal response of positive controls)

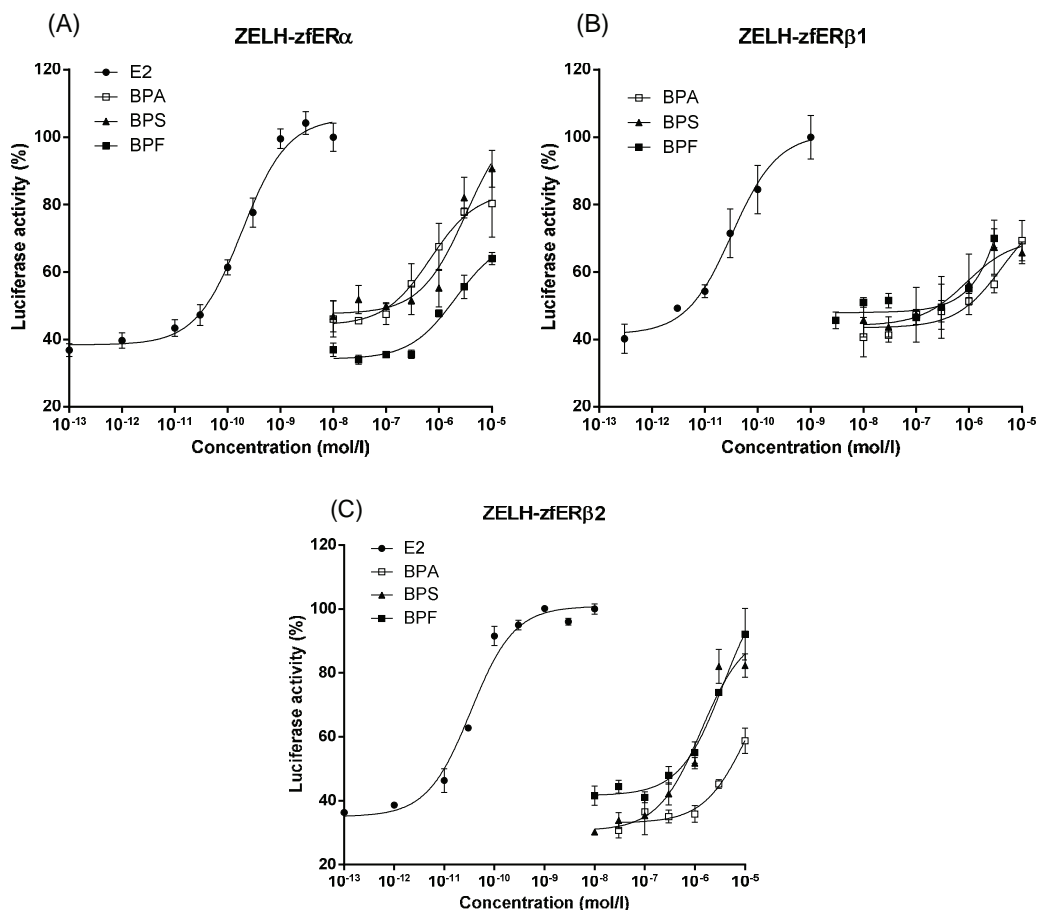


Figure 1. Dose response curves of luciferase induction by BPA, BPS and BPF in (A) ZELH-zfER α , (B) ZELH-zfER β 1, (C) ZELH-zfER β 2. Cells were exposed for 72h. Values are expressed as percentage of luciferase induction by E2 10⁻⁸ mol/L (mean \pm SD).

3.2. *In vivo* estrogenic activity of BPA, BPS and BPF in transgenic *cyp19a1b*-GFP embryos (EASZY assay)

In the EASZY assay, estrogenic activity was assessed by quantifying the fluorescence intensities *in vivo* in the developing brain of each 4-dpf old transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish (Fig 2). BPA exposure led to significant inductions of the fluorescence intensity at 5 and 10 μ M ($p < 0.001$; Fig 2). The mean fold of induction of GFP for BPA 10 μ M was similar to that measured in zebrafish exposed to EE2 0.05 nM (the lowest concentration of EE2 leading to a maximum induction of the brain aromatase gene (Brion et al., 2012)). The mean EC50 derived from these experiments for BPA was 5.7 μ M. Interestingly, in zebrafish exposed to the lowest concentrations of BPA, a weak but not significant 2-fold increase of GFP was found. In BPF-exposed zebrafish embryos, a concentration-dependent induction of GFP was observed with a significant effect from 1 μ M (Fig 2). At the highest concentrations tested, the GFP intensity reached rapidly a plateau from 5 μ M to 20 μ M with a maximum fold of induction similar to BPA 10 μ M and EE2 0.05 nM. The calculated EC50 for BPF was 1.2 μ M.

BPS exposure did not result in a significant fluorescence induction for concentrations ranging from 0.25 to 20 μM (Fig 2). Among the bisphenols tested, BPS was the less efficient in inducing GFP intensity in zebrafish embryos. Indeed, BPS was effective in inducing the brain aromatase gene at 30 and 60 μM with a 4.3-fold less important maximum induction compared to BPA and BPF. This marked difference between the estrogenic activities of BPS and other bisphenols in the EASZY assay was not expected, given the close structural similarity of the three compounds, as well as their similar *in vitro* estrogenic activities in zebrafish ZELH-ZfERs cell lines (this study) or mammalian cells (Molina-Molina et al., 2013). In adult or juvenile fish, BPA and BPS have already been tested for their ability to induce vitellogenin synthesis. This has been shown in various fish species (Brian et al., 2005; Tabata, 2004) including the zebrafish (Ji et al., 2013; Naderi et al., 2014; Song et al., 2014; Van den Belt et al., 2003) (table S1). In the present study, we further documented the estrogenic activity of BPF (which was lacking in the literature) by measuring the induction of the circulating concentrations of VTG in males after 7 days of exposure (Fig S1). We demonstrated that BPF significantly induced VTG in adult males at 0.1 μM and 1 μM ($p < 0.001$) after 7 days of exposure while the highest concentration tested led to a high mortality rate in male, an effect which had not been observed when using in the embryo EASZY assay.

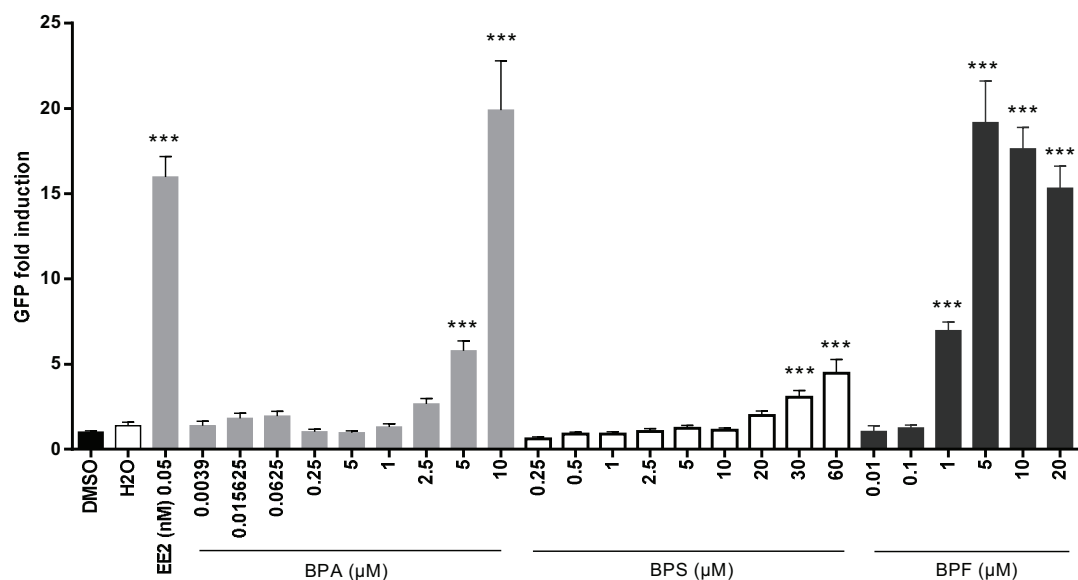


Figure 2. GFP induction by BPA, BPS and BPF in *cyp19a1b*-GFP transgenic larva after 96 h of exposure. Values are expressed as mean \pm SEM. One way ANOVA was used for DMSO comparison (***: $p < 0.001$).

Direct comparison of LOEC obtained in the EASZY assay and LOEC collected from *in vivo* fish VTG assays revealed that the estrogenic potency of BPA was similar in the EASZY assay and the adult fish assay. In contrast, for BPF and BPS the LOEC were much lower in the VTG assay, compared to the EASZY assay. While our *in vitro* and *in vivo* data demonstrate that BPA, BPS and BPF are all efficient to activate ER and to induce the tissue-specific expression of ER-regulated genes in liver (VTG) and brain (aromatase B), they elicited differential relative estrogenic potencies depending on the model used.

Parameters like absorption, distribution and metabolism are known to influence the biological response observed. Consequently, the difference in estrogenic response between BPS and the two others bisphenols may rely on a different fate of these chemicals in ZELH-zfERs cells lines and the zebrafish embryo model. Both phase I and II drug-metabolizing enzymes are expressed in zebrafish, and functional metabolic activities have already been characterized in zebrafish larvae (Alderton et al., 2010; Creusot et al., 2014; Jones et al., 2010; Kurogi et al., 2013; Noury et al., 2006; Wang et al., 2014). In a recent study, the metabolism of BPS was evaluated in zebrafish embryos using similar exposure conditions in term of concentrations and duration of exposure, showing a low bioavailability of BPS and an efficient metabolism of BPS into phase II metabolites (Le Fol et al., in prep). In terms of metabolic capabilities, less data are available for ZELH-zfERs and ZFL cells, e.g. the cell line from which ZELH-zfERs cells are derived.

Notwithstanding, sulfation and glucuronidation of BPS have been characterized in ZFL and ZELH-zfERs cells (Le Fol et al., 2015) with similar metabolic profiles as observed when using zebrafish embryos, suggesting that the qualitative metabolic profiles observed in zebrafish models cannot explain the differential estrogenic activity recorded in ZELH-zfERs and zebrafish embryos experiments. Anyway, it is clear that marked differences were observed between the *in vitro* and the *in vivo* models, highlighting the need to combined cellular and whole-organism assays in hazard assessment.

3.3. Mechanistic information and toxicological relevance of the estrogenic effect of bisphenols found in zebrafish models.

In our study, we found that BPA, BPS and BPF were all effective in activating the three zfERs subtypes and in inducing the expression of the brain aromatase gene, as revealed by the induction of GFP intensity in the developing brain. These data confirm the capacity of BPA and BPS to activate ER in mammalian and non-mammalian species (Molina-Molina et al., 2013); this study), to induce brain aromatase in zebrafish (Brion et al., 2012; Chung et al., 2011; Kinch et al., 2015) and extend this finding to BPF. When co-exposing zebrafish to the pure antagonist of the estrogen receptor ICI 182-780, BPA and BPF-induced aromatase expressions were partially suppressed, demonstrating that functional ERs are involved in the effect mediated by these compounds (Fig 3). However, ICI 1 μ M was unable to block the effect of BPS. In a recent experiment, Kinch et al., (2015) found that co-exposure to BPA and flutamide (6.17 μ M) reduced cyp19a1b expression when these compounds were

administered from 8 to 48 hpf, showing that BPA can induce the transcription of AroB (*cyp19a1b*) via a specific ARs pathway, when exposure occurs during this developmental period. In our study, co-exposure to either BPA (10 μ M), BPF (5 μ M) or BPS (30 μ M) and flutamide (1 μ M) from 0 to 96 hpf, failed to down-regulate the bisphenol-induced GFP intensity. Previous studies have shown that (xeno-estrogen) can strongly stimulate *cyp19a1b*'s expression in zebrafish larvae (Brion et al., 2012; Cheshenko et al., 2007; Menuet et al., 2005; Mouriec et al., 2009). It has been clearly demonstrated that the estrogen-dependent regulation of the brain aromatase gene expression involves functional ERs and the binding of liganded-ER on ERE and $\frac{1}{2}$ ERE located in the promoter region of the *cyp19a1b* gene (Le Page et al., 2006; Menuet et al., 2005). The regulation of *cyp19a1b* also requires glial specific factor(s) that bind to a glial x responsive element (GxRE) acting synergistically with the ERE sequences (Le Page et al., 2008). Furthermore, it has been established that the up-regulation of the brain aromatase gene by some androgens such as testosterone or dihydrotestosterone (Brion et al., 2012; Mouriec et al., 2009) do not involve a direct effect of AR on the regulation of *cyp19a1b* expression (Mouriec et al., 2009). Overall, our data support that the up-regulation of the brain aromatase by BPA and BPF imply ER at the developmental stages studied.

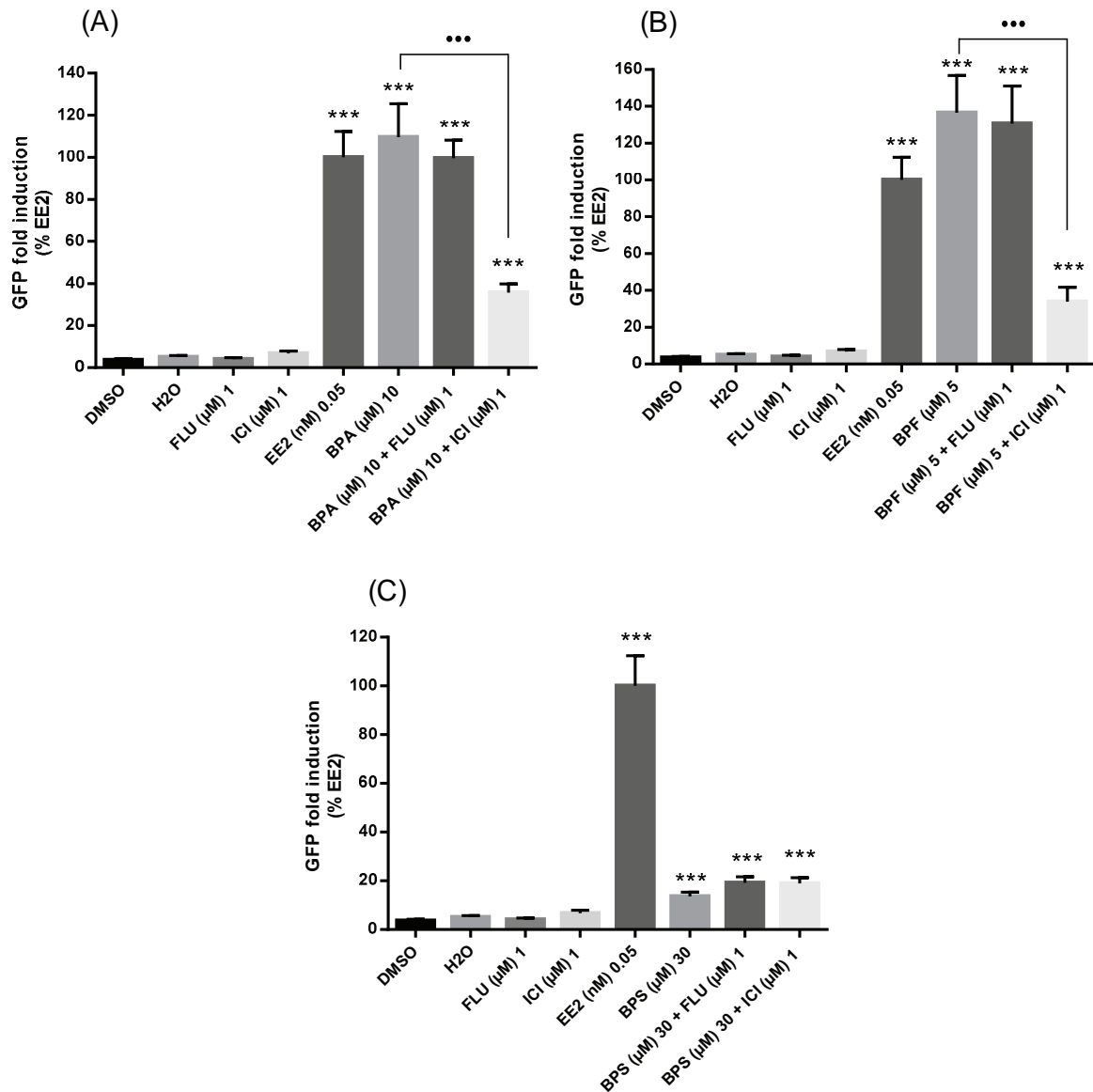


Figure 3. GFP induction by BPA (A), BPS (B) and BPF (C) co-exposed with ICI 182-780 (ICI) or flutamide (FLU) in *cyp19a1b*-GFP transgenic larva after 96 h of exposure. Values are expressed as mean \pm SEM. One way ANOVA was used for DMSO comparison (***: $p < 0.001$). Mann-Whitney test was used for coexposure (***: $p < 0.001$).

In addition to provide a quantification of the estrogenic activity of BPA, BPS and BPF, the EASZY assay can potentially provide important toxicological information regarding the impact of bisphenols on key developmental processes in the brain, which are known to be adversely affected in mammals (Brion et al., 2012; Negri-Cesi, 2015). Indeed, an attractive advantage of the EASZY assay is to provide a true physiological response (disruption of *cyp19a1b* gene expression through measurement of GFP) in radial glial cells. Brion et al., (2012) demonstrated that many chemicals do target the radial glial cells in the developing brain of fish. Since radial glial cells are progenitor cells of neurons in all vertebrates, information provided by the EASZY assay using zebrafish could be relevant for other vertebrate models, notably mammals, as regards neurogenesis. Recently, Kinch et al., (2015) have shown that BPA and BPS induce a precocious neurogenesis in the hypothalamus of zebrafish

embryos, an effect linked to the up-regulation of the brain aromatase, and responsible for an altered behavior in larvae.

4. Conclusion

In the present study, the estrogenic activities of BPA and BPS and BPF have been evaluated in zebrafish-specific cellular and *in vivo* models. We demonstrated that all the tested compounds were effective in activating the three ER-subtypes in an hepatic cellular context. Remarkably, BPA was more efficient to activate zfER α while BPS and BPF were more active towards zfER β 1 and zfER β 2, respectively. We further confirm that BPA and BPS are able to induce the ER-regulated expression of the brain aromatase gene in zebrafish embryos, as well as hepatic vitellogenin synthesis in adults, and extend this findings to BPF. Comparison of the estrogenic activity towards the different models revealed marked differences in term of effective concentrations leading to a significant estrogenic effect, suggesting that the bioavailability, metabolism and pharmacodynamics of the tested compounds can account for such differences. The latter observation argues for a better consideration of the fate of tested compounds in these respective models, with the aim to efficiently predict *in vivo* effects based on *in vitro* data.

References

- Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Richards, F., Gardner, I., 2010. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica* 40, 547-557.
- Becerra, V., Odermatt, J., 2012. Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS. *Analyst* 137, 2250-2259.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfa, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 113, 721-728.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryos. *PLoS One* 7, e36069.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 21, 1699-1708.
- Calafat, A.M., Wong, L.Y., Ye, X., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004. *Environ Health Perspect* 116, 893-897.
- Cao, M., Yang, Y., Xu, H., Duan, J., Cheng, N., Wang, J., Hu, W., Zhao, H., 2012. Germ cell specific expression of *Vasa* in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162, 163-170.
- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E., 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 5711-5741.
- Chen, M.Y., Ike, M., Fujita, M., 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol* 17, 80-86.
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I., 2007. Expression of zebra fish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 96, 255-267.
- Chou, W.C., Chen, J.L., Lin, C.F., Chen, Y.C., Shih, F.C., Chuang, C.Y., 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ Health* 10, 94.
- Chung, E., Genco, M.C., Megrelis, L., Ruderman, J.V., 2011. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17732-17737.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci.* 125, 439-449.
- Creusot, N., Ait-Aissa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ Sci Technol* 48, 3649-3657.
- Edlow, A.G., Chen, M., Smith, N.A., Lu, C., McElrath, T.F., 2012. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol* 34, 1-7.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11-21.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 36, 1429-1438.

- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2011. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 683, 227-233.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S., 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol. In Vitro* 26, 727-731.
- Hashimoto, Y., Moriguchi, Y., Oshima, H., Kawaguchi, M., Miyazaki, K., Nakamura, M., 2001. Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. *Toxicol In Vitro* 15, 421-425.
- Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105, 235-259.
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K., 2013. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8793-8800.
- Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M.F., Olea, N., Vilchez, J.L., 2010. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 3363-3369.
- Jones, H.S., Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Chipman, J.K., 2010. Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae in vivo. *Zebrafish* 7, 23-30.
- Kinch, C.D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.H., Habibi, H.R., Kurrasch, D.M., 2015. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1475-1480.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S., 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* 84, 249-259.
- Kurogi, K., Liu, T.A., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.C., 2013. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. *Drug. Metab. Rev.* 45, 431-440.
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., Terao, Y., 2005. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 121-130.
- Le Fol, V., Ait-Aissa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ Sci Technol* 49, 3860-3868.
- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549-1557.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ Health Perspect* 114, 752-758.
- Lee, Y.J., Ryu, H.Y., Kim, H.K., Min, C.S., Lee, J.H., Kim, E., Nam, B.H., Park, J.H., Jung, J.Y., Jang, D.D., Park, E.Y., Lee, K.H., Ma, J.Y., Won, H.S., Im, M.W., Leem, J.H., Hong, Y.C., Yoon, H.S., 2008. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 25, 413-419.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.B., Nakata, H., Kannan, K., 2012a. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol* 46, 6860-6866.
- Liao, C., Liu, F., Kannan, K., 2012b. Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ Sci Technol* 46, 6515-6522.
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 223-234.

- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66, 1881-1892.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485, 304-320.
- Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J.M., Real, M., Fernandez, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127-136.
- Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (cyp19a1b) by estrogen receptors during zebrafish development. *Dev. Dyn.* 238, 2641-2651.
- Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol.* 148, 195-203.
- Negri-Cesi, P., 2015. Bisphenol A interaction with brain development and functions. *Dose-Response* 13, 1-13.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H., 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 118, 1196-1203.
- Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R., Garric, J., 2006. Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. *Environ Toxicol* 21, 324-331.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2047-2062.
- Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42, 132-155.
- Rouiller-Fabre, V., Guerin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., Livera, G., 2015. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Frontiers in Endocrinology* 6, 58.
- Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G., 2014. Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 112, 275-281.
- Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G., Theobald, N., 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environ Pollut* 124, 497-507.
- Tabata, A., 2004. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 50, 125-132.
- Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67-73.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 271-281.
- Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N., Hernandez-Cordoba, M., 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and bisphenol migrated from food cans. *Anal Bioanal Chem* 397, 115-125.
- Wang, Y., Huang, H., Wu, Q., 2014. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. *Mol. Pharmacol.* 86, 62-75.
- Wilson, V.S., Cardon, M.C., Gray, L.E., Jr., Hartig, P.C., 2007. Competitive binding comparison of endocrine-disrupting compounds to recombinant androgen receptor from fathead minnow, rainbow trout, and human. *Environ Toxicol Chem* 26, 1793-1802.

- Yamada, H., Furuta, I., Kato, E.H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F., Kishi, R., Fujimoto, S., 2002. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 16, 735-739.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, N., Takatsuki, M., 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* 170, 21-30.
- Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., Perdu, E., 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82, 424-430.

Supporting information

BPF exposure and plasmatic vitellogenin measurement in adult zebrafish

Experiments were performed in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 86/609/EEC). Male adult zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were maintained and fed as mentioned in section 2.3. Six months old zebrafish were exposed to BPS or E2 diluted in DMSO to reach a final concentration of solvent of 0.006% in water. For each condition, eight zebrafish were exposed during 7 days in 4 liters of water with a complete water renewal every 24 h. At the end of exposure and after zebrafish were euthanized in a water/ice mix, blood was collected and stored at -80°C until vitellogenin concentration measurement. This quantitative analysis was performed using a competitive zebrafish vitellogenin enzyme linked immune-sorbent assay (zf-Vtg ELISA), as previously described (Brion et al., 2002). Briefly, this assay is based on a competition reaction for the anti-vitellogenin antibodies (DR-264 polyclonal antibodies raised against zebrafish vitellogenin, zf-Vtg) between the vitellogenin in the sample and the purified zf-Vtg coated on the microtiter plate. A standard calibration curve was obtained using purified zf-Vtg. Results were expressed as mean ng per ml of plasmatic vitellogenin, with a confidence interval of 95%. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test.

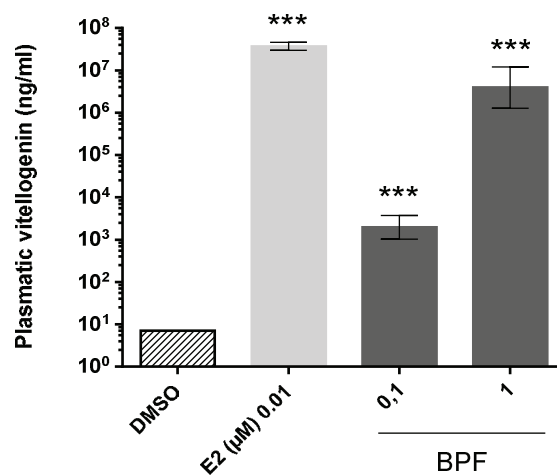


Figure S1. Plasmatic vitellogenin concentration in adult male zebrafish after a 7-days exposure to BPF. Eight fish were exposed for each condition and blood Vtg was measured for each animal (***: $p < 0.001$, Mann-Whitney test).

Table S1. Summary of the currently available data regarding vitellogenin induction in zebrafish *in vivo* models

	From young to adult zebrafish		EASZY assay	
	Exposure parameters	Lowest chemical concentration (mg/L in water) reported to be responsible for a significant induction of plasmatic vitellogenin production	Exposure parameters	Lowest chemical concentration (mg/L in water) reported to be responsible for a significant induction of GFP
BPA	3 weeks exposure	Male: 1.0 (Van den Belt et al. 2003)	From 0 to 4 days post fertilization	1.4 (this paper)
	21 days exposure	Male: 0.5 (Song et al. 2014)		
BPS	75 days exposure from young to adult	Male: 0.1 (Naderi et al. 2014) Female: 0.01 (Naderi et al. 2014)		7.5 (this paper)
BPF	7 days exposure	Male: 0.02 (this paper)		0.2 (this paper)

References

- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 21, 1699-1708.
- Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol.* 148, 195-203.
- Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G., 2014. Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 112, 275-281.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 271-281.

III. Réponse œstrogénique et expression de l'activité CYP1A dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire

1. Contexte et objectifs

La mise en place d'un modèle de culture primaire d'hépatocytes issu du poisson zèbre adulte mâle (PZFH) était un prérequis nécessaire, pour pouvoir ultérieurement mettre en perspective les résultats concernant le devenir métabolique de xénobiotiques d'intérêt dans des modèles biologiques *in vivo* et *in vitro* utilisés dans le criblage des xénobiotiques. Les capacités de biotransformation des hépatocytes en primo-culture sont en général assez proches de celles exprimées dans le foie *in vivo*, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour des lignées cellulaires. Les cultures primaires possèdent en général de plus grandes capacités de biotransformation que les lignées cellulaires, que ce soit sur le plan quantitatif ou sur le plan qualitatif. Elles constituent pour cette raison une bonne base de comparaison pour évaluer si les lignées hépatocytaires correspondantes ont conservé des capacités métaboliques suffisantes. Afin d'utiliser ce modèle de primocultures hépatiques dans les études de biotransformation des xénobiotiques, il a tout d'abord été nécessaire de s'assurer de sa capacité à répondre à une stimulation œstrogénique par l'utilisation de composés de référence et d'intérêt pour l'environnement.

2. Expérimentations

Après la mise en place technique de la culture primaire décrite dans le paragraphe II.4.1.1., deux séries d'expérimentations ont été menées afin d'évaluer (1) sa capacité à répondre à une stimulation œstrogénique par la mesure du taux de vitellogénine dans le milieu de culture par ELISA à la suite d'une exposition à l'E2, à la BP2 ou au BPF, et (2) sa capacité enzymatique CYP1A par la mesure de l'activité EROD à la suite d'une exposition à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et à l'E2. Le matériel et les méthodes utilisés sont décrits dans les paragraphes II.4.1.1, II.5.1. et II.5.2. de la partie démarche expérimentale et choix méthodologiques.

3. Résultats et discussion

3.1. Viabilité et organisation cellulaire

La viabilité des hépatocytes en culture primaire s'est maintenue au dessus de $93 \pm 2,4 \%$ (96h). Au cours du temps, des modifications morphologiques des cellules ont été observées (Figure 50). A la mise en culture, les cellules étaient totalement séparées les unes des autres, présentaient une forme arrondie et flottaient dans le milieu de culture. Après 5 heures de culture, les cellules ont commencé à adhérer à la plaque et à se regrouper. Après 24h, des amas cellulaires étaient formés. Les cellules perdant progressivement leur forme arrondie pour prendre une apparence plus oblongue. Après 96 heures de culture, un réseau de cellules était formé sur la plaque.

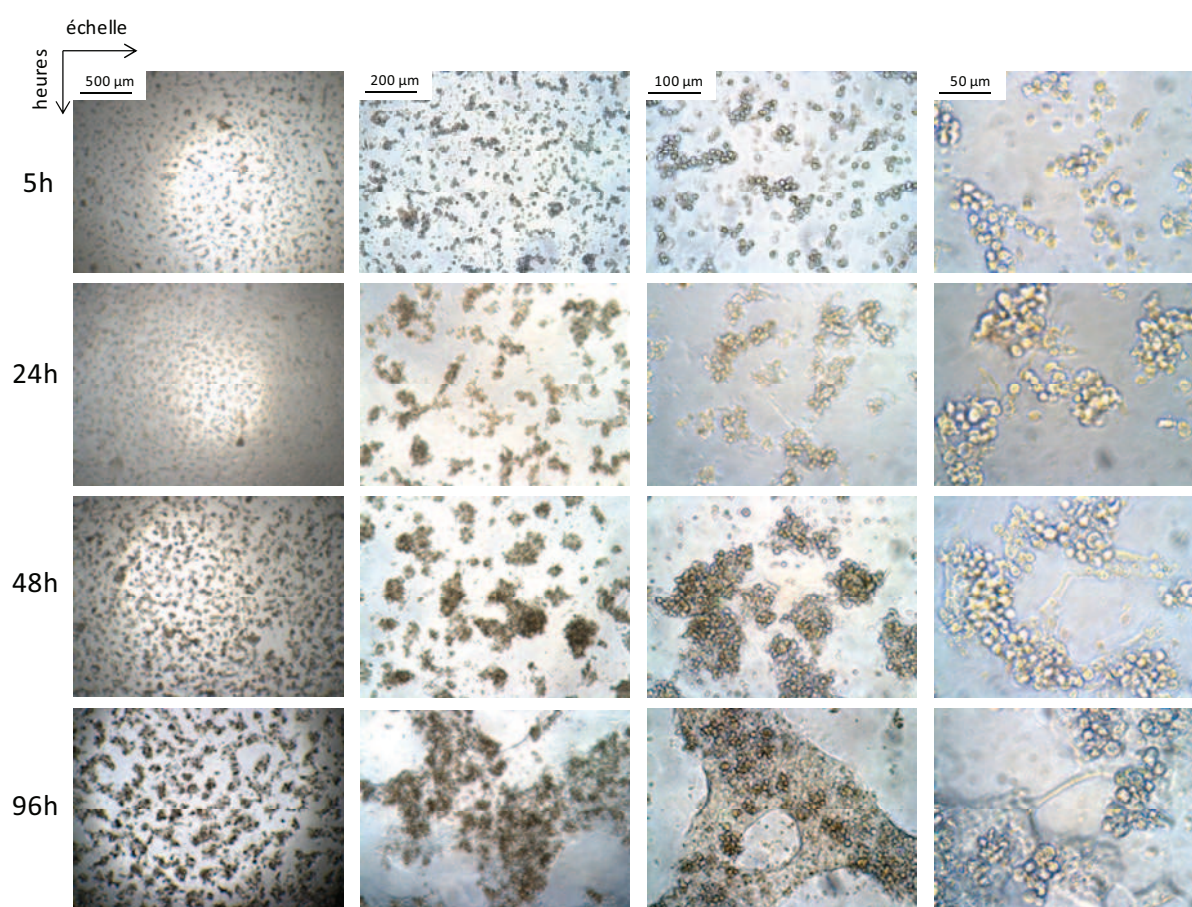


Figure 50. Evolution de la culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre au cours du temps

3.2. Effet de l'E2, de la BP2 ainsi que du BPF sur la production de vitellogénine

L'exposition des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire pendant 4 jours à l'E2 a entraîné une production dose dépendante de vitellogénine. L'EC50 correspondant est de $3,5 \pm 1,4$ nM (Figure 51A et 51B). Ce résultat montre la capacité de ce modèle à répondre à une stimulation œstrogénique suite à l'exposition d'un composé œstrogénique de référence.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux d'autres études est à considérer avec prudence, compte tenu de différences méthodologiques relatives aux méthodes analytiques, à l'espèce et à l'âge des poissons utilisés, et en fonction des paramètres de culture. D'après les informations rapportées par Navas et Segner (Navas et Segner 2006) les plus faibles concentrations qui entraînent une production significative de vtg dans les cultures d'hépatocytes provenant de différentes espèces de poissons sont comprises entre 1 pM et 1 µM. Une grande variabilité des EC50 a également été retrouvée, avec des valeurs comprises entre 0.01 et 1000 nM. Cependant, pour la plupart ces EC50 sont de l'ordre du micromolaire au nanomolaire, ce qui est du même ordre de grandeur que les résultats établis dans notre travail.

Les EC50 de l'E2 obtenues dans les lignées cellulaires du poisson zèbre ZELH-zfERs vont de 0.20 ± 0.05 à 0.03 ± 0.01 nM (Cosnefroy et al. 2012). Des différences de nature de modèle et de méthode de détermination de l'activité œstrogénique peuvent en partie expliquer les différences d'EC50 observées. En effet, les lignées cellulaires de criblage ont été obtenues par une double transfection permettant de mesurer la fluorescence liée à l'activité luciférase pour l'un des trois récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre. Une méthode ELISA permettant la détermination de la concentration en vtg a été utilisée dans les hépatocytes en culture primaire qui par définition n'avaient subi aucune modification. Enfin, la variabilité inhérente aux modèles *in vivo* desquelles proviennent les cellules en culture primaire, peut expliquer un écart-type plus important dans le cas des cultures primaires que dans celui des lignées cellulaires.

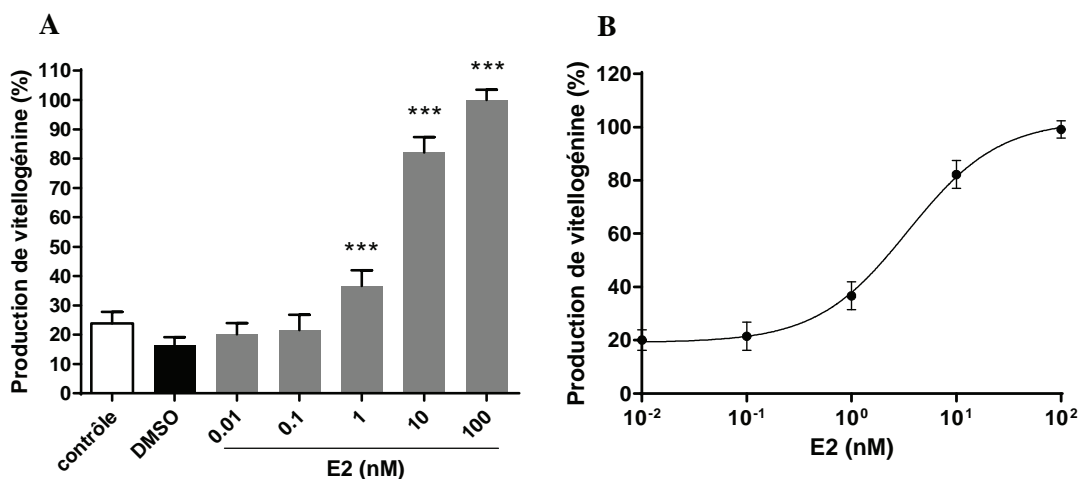


Figure 51. Réponse œstrogénique des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire après une exposition à l'E2
*** p<0,001 ; ** p<0,01 (ANOVA).

La BP2 et le BPF ont également été responsables d'une augmentation significative de la production de la Vtg (Figure 52A et 52B). Ces résultats montrent la capacité de ce modèle à répondre à une

stimulation œstrogénique par des xénobiotiques dont l'activité œstrogénique a également été démontrée dans différents modèles cellulaires humains (Molina-Molina et al. 2008; Molina-Molina et al. 2013) et de poisson zèbre (Cosnefroy et al. 2012).

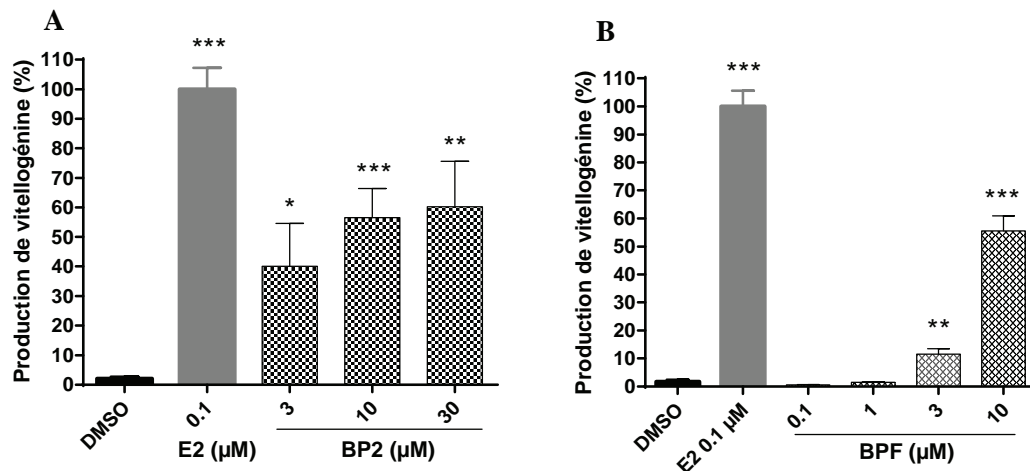


Figure 52. Effet de la BP2 (A) et du BPF (B) sur la production de vitellogénine par les hépatocytes de poissons zèbres en culture primaire

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test de Mann-Whitney)

3.3. Effet de la TCDD sur la production de vitellogénine induite par l'E2

L'exposition d'une cellule à un xénobiotique peut entraîner la mise en jeu de différentes voies de signalisation. Les interactions entre voies de signalisation (crosstalks) passent par l'activation de différents récepteurs nucléaires et aboutissent à une réponse cellulaire globale prenant en compte l'ensemble des messages chimiques. Le crosstalk ER/AhR est l'un des mieux décrits aussi bien chez les mammifères que chez les poissons téléostéens (Coumoul et al. 2001; Mortensen et al. 2006). C'est ainsi que la dioxine (agoniste AhR) peut non seulement antagoniser l'effet des œstrogènes endogènes (Safe et al. 2000) mais également exercer un effet pro-œstrogénique (Ohtake et al. 2003).

La fonctionnalité de ce crosstalk AhR/ER a été mise en évidence dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire. En effet, l'exposition de ces cellules à mélange E2 et TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine) a diminué la capacité des cellules à produire la vtg (Figure 53).

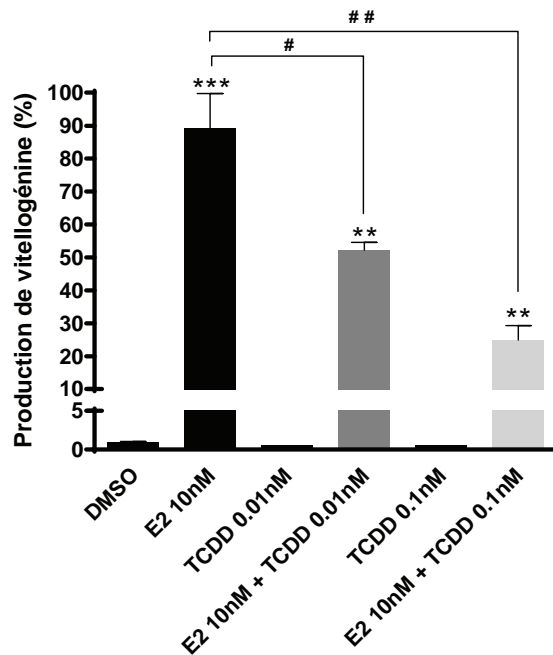


Figure 53. Fonctionnalité du crosstalk AhR/ER dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire
 *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney par rapport au solvant DMSO); ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney)

3.4. Effet de la TCDD et de l'E2 sur l'activité EROD

L'expression génique des enzymes CYP1A fait notamment suite à l'activation du AhR. Cette expression peut être induite suite à l'exposition à un xénobiotique ligand du AhR. Le test enzymatique EROD (éthoxyrésorufine-O-dééthylase) qui permet de mesurer l'activité CYP1A d'un modèle biologique, a été réalisé dans les cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre.

L'activité basale EROD mesurée dans ce travail (6 pmol/min/mg, Figure 54) est du même ordre de grandeur que celle trouvée par Halden et al. (Halden et al. 2011) dans des fractions microsomales S9 provenant du foie du poisson zèbre mâle (10 pmol/min/mg). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le travail de Collodi et al. (Collodi et al. 1992) dans lequel aucune activité EROD n'avait été détectée dans les fractions subcellulaires d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire. Chez la truite arc-en-ciel, une activité basale EROD de 1 à 4 fois supérieure par rapport à celle obtenue dans cette étude a été mesurée (Laville et al. 2004). L'exposition des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire à la TCDD à la concentration de 0.1 et 1 nM a conduit à une augmentation significative de l'activité EROD avec un maximum de 515 pmol/min/mg (Figure 54). Ce résultat met en évidence la présence d'une activité CYP1A fonctionnelle dans ces hépatocytes après 4 jours de culture. L'activité maximale EROD diffère de celle obtenue par Collodi et al. (Collodi et al. 1992) qui avaient observé une activité EROD de l'ordre de 80 pmol/min/mg après 48h d'exposition. Quant à Halden et al. (Halden et al. 2011), une activité EROD de l'ordre de 700 pmol/min/mg avait été

retrouvée lors de l'exposition de fractions S9 hépatiques de poissons zèbres mâles par la (2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxine (TBDD).

Enfin, afin d'évaluer une interaction éventuelle entre voies AhR et ER sur l'activité EROD, les cellules ont été exposées à un mélange TCDD et E2. Cette co-exposition est à l'origine d'une diminution de l'induction de l'activité EROD observée en présence de la TCDD seule. Ce résultat démontre l'effet inhibiteur de l'E2 sur l'activité CYP1A induite par la TCDD.

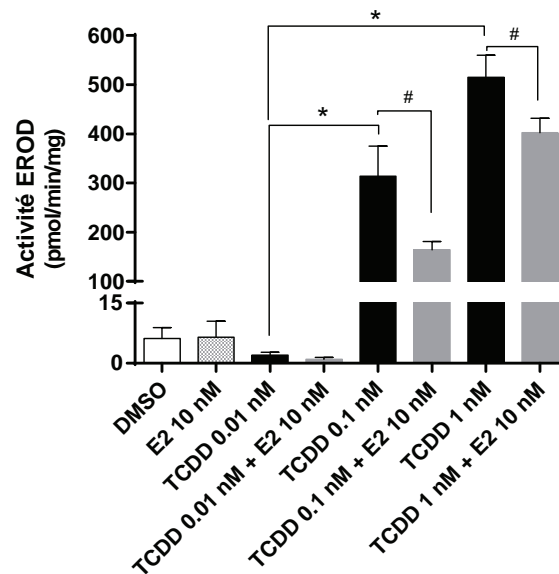


Figure 54. Activité EROD des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire

4. Conclusion

Les hépatocytes en culture primaire provenant du poisson zèbre adulte mâle (1) présentent une bonne viabilité cellulaire, (2) répondent à une stimulation œstrogénique, (3) présentent une activité CYP1A et (4) un crosstalk ER/AhR fonctionnels. Les résultats de cette caractérisation cellulaire sont favorables à l'utilisation de ce modèle dans l'étude comparée de la capacité de biotransformation de modèles *in vivo* et *in vitro*.

Lire
la seconde partie
de la thèse