

PNRPE

PROGRAMME
NATIONAL
DE RECHERCHE
SUR LES
PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS

Colloque de restitution

12 avril 2010, Rennes

Bilan des projets de recherche financés
dans le cadre de l'appel à propositions 2005

Résumé des projets présentés



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE



Ministère
de l'Écologie,
de l'Énergie,
du Développement
durable
et de la Mer

Commissariat Général au Développement Durable
Direction de la recherche et de l'Innovation
Service de la Recherche



☉ SOMMAIRE

☉ Un programme national pour répondre à des enjeux majeurs	4
☉ Programme du colloque	7
☉ SESSION 1 : Exposition humaine aux perturbateurs endocriniens et épidémiologie	9
Expositions gestation/lactation vs puberté/adulte à des faibles doses et mélanges de deux perturbateurs endocriniens : Impact au niveau de plusieurs tissus et organes cible	11
Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal	15
Fipronil et retardateurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne	19
☉ SESSION 2 : Impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux naturels	25
Interactions entre composés oestrogéniques et dioxines sur la reproduction des poissons	27
Évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques (SURVAQUA)	31
☉ SESSION 3 : De nouveaux outils expérimentaux en appui aux tests réglementaires	35
Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement	37
Développement d'un test physiologique « in vitro » rapide sur les embryons amphibiens pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes	41
☉ Membres du comité d'orientation du PNRPE	45
☉ Membres du conseil scientifique du PNRPE	47



🕒 Un programme national pour répondre à des enjeux majeurs

Le Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) a pour objectif de soutenir des recherches fondamentales et appliquées en appui aux praticiens de l'action publique sur les questions de perturbation endocrinienne. Par le caractère transversal et pluridisciplinaire des problématiques qu'il aborde, le PNRPE a vocation à rassembler les acteurs de différentes disciplines (biologie fondamentale, médecine, (éco)toxicologie, épidémiologie, sciences humaines et sociales...) et à contribuer au développement d'une communauté de chercheurs sur la thématique de la perturbation endocrinienne.

La question de la perturbation endocrinienne liée à des substances présentes dans l'environnement a émergé dans les années 1960 aux Etats-Unis. Les productions scientifiques sur ce phénomène se sont amplifiées dans les années 1990. C'est notamment à cette époque qu'ont été publiées plusieurs études sur le déclin de la qualité du sperme, l'augmentation de la fréquence du cancer du testicule et de certaines anomalies du développement du tractus génital, ainsi que l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies hormono-dépendantes chez les humains.

Simultanément, des anomalies du système reproducteur de diverses espèces aquatiques (poissons, mollusques, amphibiens) vivant dans des rivières, lacs et estuaires ont été observées, en relation avec des contaminations de ces milieux par des polluants chimiques. Des travaux plus fondamentaux, in vivo et in vitro, ont permis de commencer à déchiffrer les mécanismes par lesquels certains xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme vivant) peuvent interagir avec le système endocrinien. Les substances à l'origine de ces perturbations biologiques sont communément désignées sous le terme de « Perturbateurs Endocriniens ».

Afin de répondre à ces enjeux environnementaux et de santé publique, le PNRPE a été créé en 2005 par le Ministère en charge de l'environnement et du développement durable, suite à l'avis rendu par le Comité de prévention et de précaution (CPP). La conduite du programme est assurée par le Service de la Recherche au sein de la Direction de la Recherche et de l'Innovation du Commissariat Général au Développement Durable. Son Conseil Scientifique est présidé depuis 2008 par Rémy SLAMA (Inserm et Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot à Grenoble).

« Un perturbateur endocrinien (PE) est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations »

Définition adoptée par l'Union Européenne en 1999.



⊙ Le PNRPE aujourd'hui ...

⊙ 4 thématiques étudiées

- Les mécanismes d'action, les relations structure-activité, les mélanges de perturbateurs endocriniens,
- La mesure des expositions, l'épidémiologie, l'écotoxicologie, la surveillance et l'évaluation des risques pour les milieux et les organismes,
- Les outils de la réglementation : criblage d'activité, développement de tests...
- La sociologie de l'action publique.

⊙ 2 appels à propositions de recherche (APR)

- 2005, couvrant l'intégralité des axes de recherche du PNRPE
- 2008, introduisant une dimension sciences humaines et sociales

⊙ 22 projets de recherche financés

- 7 en 2005
- 15 en 2009

⊙ 60 équipes de recherche mobilisées

- AFSSA, CEMAGREF, CNRS, CTIS, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, INERIS, INRA, INSERM, L'Oréal, Muséum National d'Histoire Naturelle, Procter & Gamble, Universités, Watchfrog ...

⊙ 3 millions d'euros de budget de soutien engagés, dont

- 0,4 M € financés par l'ADEME
- 2,6 M € financés par le MEEDDM

⊙ 1 colloque de présentation des résultats

- Organisé à Rennes le 12 avril 2010
- Bilan des premières années du programme, résultats des recherches terminées et perspectives pour les années à venir

⊙ ...et demain

- ⊙ un troisième appel à propositions de recherche (APR) approfondissant les thèmes engagés prévu à la mi-2010
- ⊙ des séminaires de suivi et de valorisation des appels à propositions de recherche (APR) 2008 et 2010

⊙ Pour en savoir plus et suivre l'actualité du programme, consultez le site dédié :

www.pnrpe.fr



9H00 Accueil des participants

9H30	Allocution d'ouverture	
9H40	Introduction	Rémy SLAMA Président du Conseil Scientifique du PNRPE
9H50	Conférence introductive sur le phénomène de la Perturbation endocrinienne, l'historique de la question dans le monde et en France	Bernard JÉGOU Inserm-IRSET, Univ. Rennes 1 - EHESP

Session 1 : Exposition humaine aux perturbateurs endocriniens et épidémiologie

10H10	Expositions gestation/lactation vs puberté/adulte à des faibles doses et mélanges de deux perturbateurs endocriniens : Impact au niveau de plusieurs tissus et organes cible	Jacques AUGER Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction / CECOS - Hôpital de Cochin
10H30	Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal	Sylvaine CORDIER - INSERM U625 - Univ. Rennes 1
10H50	Fipronil et retardeurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne	Catherine VIGUIE Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales - INRA - ENVT-UMR 181
11H10	Synthèse	Pierre JOUANNET Hôpital Cochin - Saint-Vincent-de-Paul Jean LESNE** - AFSSET
11H20	Échanges avec la salle	
11H40	Pause	

Session 2 : Impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux naturels

11H55	Évaluation des effets endocrines des œstrogènes mimétiques et des composés à activité dioxine sur l'expression de gènes ciblés et impacts fonctionnels sur la reproduction chez le poisson	François BRION - INERIS
12H15	Évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques	Nathalie HINFRAY - INERIS Olivier GEFFARD - Cemagref - Lyon
12H35	Synthèse	Thierry CAQUET* - INRA - Rennes Olivier PERCEVAL** - ONEMA
12H45	Échanges avec la salle	
13H00	Pause déjeuner	

Session 3 : De nouveaux outils expérimentaux en appui aux tests réglementaires

14H30	Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne aux différents stades de développement du poisson Médaka - Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement	Charles PINEAU Inserm U625 - Rennes
14H50	Développement d'un test physiologique « in vitro » rapide sur les embryons amphibiens pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes	Barbara DEMENEIX Museum National d'Histoire Naturelle CNRS UMR 7221 / MNHN
15H10	Synthèse	Maria-Christina ZENNARO* - INSERM / PARCC - Hôpital Européen Georges Pompidou - Paris Huguette DÉCHARIAUX Ministère de la santé et des sports - DGS
15H20	Échanges avec la salle	
15H35	Pause (15')	

Session 4 : Conférences et table ronde

15H50	Conférence : Les interactions reproduction-balance énergétique sous l'angle de la perturbation endocrinienne	Jean-Pierre BOURGUIGNON Université et CHU de Liège, Belgique
16H20	Conférence : Point sur les recherches « Perturbations endocriniennes » soutenues dans d'autres programmes	En cours de programmation
16H50	Table ronde : Perturbation endocrinienne en France : expression de parties prenantes sur les préoccupations actuelles et les perspectives en terme de recherche	En cours de programmation
17H30	Allocution de clôture	

Fin à 17H45

⦿ Les articles qui suivent ont été rédigés par les équipes de recherche à l'occasion du colloque de restitution et accompagnent les exposés des intervenants



◎ SESSION 1 :
Exposition humaine aux perturbateurs
endocriniens et épidémiologie

Expositions gestation/lactation vs puberté/adulte à des faibles doses et mélanges de deux perturbateurs endocriniens : Impact au niveau de plusieurs tissus et organes cible

J. Auger^{1,*}, MC. Canivenc-Lavier², M. Perrot-Applanat³, R. Habert⁴, JF. Savouret⁵ and JP. Cravedi⁶

¹ Service de Biologie de la Reproduction, Hôpital Cochin, Paris, ² INRA UMR 1129 FLAVIC, Dijon, ³ U553 INSERM, Hôpital St Louis, Paris, ⁴ U566 INSERM/ CEA, Université Paris 7, Fontenay aux Roses, ⁵ INSERM UMR-S530, Université Paris 5, Paris, ⁶ INRA/ENVY UMR 1089 Xénobiotiques, Toulouse. *e-mail: jacques.auger@cch.aphp.fr

Introduction

Cette recherche s'est appuyée sur les données de la littérature récente et les résultats originaux acquis dans une pré-étude initiale, indiquant de possibles effets négatifs des perturbateurs endocriniens (PE) lors d'expositions *in vivo* à faibles doses. Ses objectifs initiaux étaient de :

- déterminer les impacts d'un mélange à faibles doses de génistéine et de vinclozoline sur divers tissus et organes régulés par les androgènes et/ou oestrogènes (appareil reproducteur, mais aussi, cartilage, glandes salivaires, glande mammaire),
- étudier la part respective des expositions gestationnelles/lactationnelles et adultes dans les effets observés chez l'adulte,
- évaluer si les expositions à doses faibles chez le père ont un impact dans la descendance (en première génération),
- tenter de préciser les mécanismes en cause,
- compléter les données sur le devenir dans l'organisme et les concentrations tissulaires des molécules et/ou de leurs métabolites, notamment lorsque vinclozoline et génistéine sont associées.

Méthodologie

Le programme proposé reposait principalement sur une exposition aux deux composés, isolément ou en association (1mg/kg/jour, par voie orale) permettant d'étudier les organes et tissus choisis à des temps variés du développement selon deux modalités d'exposition comme dans la Figure ci-dessous.

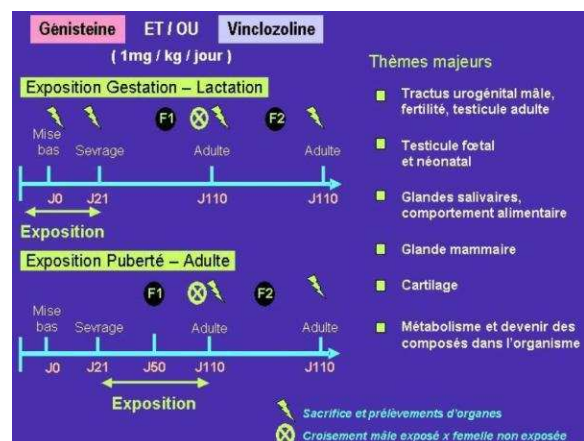


Figure : Protocole principal d'exposition chez le rat. F1 : première génération exposée ; F2 : deuxième génération non exposée issue de pères exposés

En relation avec la question actuellement débattue de possibles effets trans-génération après exposition à des PE, le programme prévoyait de rechercher de tels effets dans la génération F2 non exposée issue de mâles exposés.

Dans le but de mieux comprendre les possibles mécanismes d'action, le programme se fondait sur l'utilisation de divers modèles expérimentaux complémentaires : souris invalidée pour les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes, approches variées *in vitro*, approches « omiques » (moléculaires) et étude du devenir des molécules dans l'organisme.

Le programme prévoyait également une exposition cette fois-ci continue, de la conception à l'âge adulte avec des doses environnementales, c'est à dire des doses encore plus faibles très similaires aux doses d'exposition humaines, pour étudier les mêmes tissus, organes et fonctions chez le rat. Malheureusement la complexité de ce protocole se poursuivant sur de nombreux mois du fait de l'élevage de deux nouvelles générations alliée à des difficultés organisationnelles et des retards dans les financements n'ont pas permis de réaliser cette deuxième exposition qui sera cependant faite de manière élargie dans le cadre du programme CIME (PNRPE 2008) débutant fin 2009 compte tenu des résultats du présent programme.

Résultats

L'exposition *in utero* à la vinclozoline diminue le nombre de gonocytes dans la période néonatale sans conséquence à long terme sur la production de spermatozoïdes. D'une manière générale, les expositions pendant la gestation/lactation ne retiennent pas sur la stéroïdogénèse en période néonatale. Des anomalies développementales de l'appareil

reproducteur mâle, principalement des testicules non descendus, sont observées pour environ 1/3 des animaux exposés au mélange. Les petits continuent à être exposés aux deux composés pendant la lactation. La vinclozoline n'est pas détectée dans le lait ou dans le sang des rats, seuls les métabolites actifs M1 et M2 de la vinclozoline sont détectés. L'exposition pendant la gestation/lactation à la vinclozoline ou au mélange retarde la puberté chez le mâle. Les trois modalités d'exposition féminisent le comportement alimentaire chez les mâles en début de puberté, modifient l'histologie et la vitesse de maturation des glandes salivaires avec un effet lié au sexe, elles perturbent sévèrement le développement pubertaire de la glande mammaire. Curieusement, il a été trouvé que l'exposition à la vinclozoline ou au mélange induisait la formation de nodules cartilagineux ectopiques paravertébraux. Un poids épидidymaire diminué et une moindre production spermatique ont été trouvés chez les mâles exposés de manière chronique à la génistéine ou à la vinclozoline à partir de la période postlactation, alors que l'anomalie de la reproduction la plus importante après une exposition gestationnelle/lactationnelle consistait en une augmentation des taux de pertes post-implantatoires lors du croisement des mâles exposés avec des femelles témoin. Enfin, des formations ectopiques paravertébrales, des anomalies du comportement alimentaire et de l'appareil génital mâle ont été observées en deuxième génération non exposée issue de pères exposés. Les premiers résultats sur les modes d'action produisant les effets rapportés indiquent des voies nombreuses et complexes dépassant les définitions de la perturbation endocrinienne, comme l'illustre par exemple les modifications trouvées du transcriptome testiculaire adulte (analyse des testicules des animaux de la pré-étude, exposition continue, de la conception à l'âge adulte). Le décryptage des

mécanismes d'action est toujours en cours dans la plupart des équipes.

Discussion et conclusion

En conclusion, ce programme multidisciplinaire est à notre connaissance le premier montrant de manière concomitante des altérations notables de la physiologie de plusieurs organes en réponse à une exposition à dose alimentaire de génistéine et/ou une dose faible, inférieure au NOAEL, de vinclozoline, principalement après une exposition gestationnelle et lactationnelle mais aussi avec une exposition post-lactationnelle jusqu'à l'âge adulte.

Références

J. Merlet, C. Racine, E. Moreau, S.G. Moreno, R. Habert. Male fetal germ cells are targets for androgens which physiologically inhibit their proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104: 3615-3620.

J. Merlet, E. Moreau, R. Habert, C.Racine. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. Cell cycle 2007, 6: 2258-2262.

F. Eustache, F. Mondon, M.C. Canivenc-Lavier, C. Lesaffre, Y. Fulla, R. Berges, J.P. Cravedi, D. Vaiman, J. Auger. Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome and Fertility. Environmental Health Perspectives 2009, 117 : 1272-1279.

Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal

S. Cordier^{1,2}, P. Kadhel^{2,3}, F ; Rouget¹, C. Monfort¹, L. Guldner¹, J. Lebreton¹, E. Janky³, H. Bataille⁴, G. Muckle⁵, J. Gagnon⁵, A. Giusti⁶, JP. Thomé⁶, and L. Multigner^{1,2}

¹ Inserm U 625, Université Rennes 1, Rennes, Bretagne ;

² Inserm U 625, Pointe à Pitre, Guadeloupe ; ³ Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Pointe à Pitre/abymes, Pointe à Pitre, Guadeloupe ; ⁴ Service de Pédiatrie, CHU Pointe à Pitre/Abymes, Pointe à Pitre, Guadeloupe ; ⁵ CRCHUQ, Université Laval, Québec ; ⁶ CART Université de Liège, Liège, Wallonie.

Introduction

Les départements français d'Amérique, Guadeloupe et Martinique, subissent une pollution environnementale par le chlordécone, un insecticide organochloré employé par le passé dans la culture de la banane. Son usage a entraîné une pollution, toujours présente, des sols et des cours d'eaux conduisant à une contamination de certaines ressources alimentaires végétales et animales et à l'imprégnation des populations.

De nombreuses données expérimentales attestent du caractère neurotoxique et reprotoxique du chlordécone, incluant des effets sur le développement intra-utérin et postnatal (Chernoff et al, 1976 ; Mactutus et al, 1982 ; Faroon *et al*, 1995). De plus, le chlordécone est considéré comme un perturbateur endocrinien de par ses propriétés hormonales œstrogéniques bien établies (Hammond et al, 1979 ; Lemaire *et al*, 2006).

Afin d'étudier l'impact des expositions environnementales au chlordécone sur le déroulement de la grossesse et le développement de l'enfant, une cohorte prospective de femmes enceintes a été mise en place en Guadeloupe.

Méthodologie

Entre fin 2004 et début 2008, 1101 femmes en fin de grossesse (taux de participation 92,8%) ont été incluses. Leurs caractéristiques sociodémographiques, antécédents obstétricaux et habitudes de vie ont été recueillis lors d'un entretien à l'inclusion. Les informations médicales concernant le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et l'état de santé du nouveau né ont pu être recueillies dans les maternités pour 1074 femmes. Des prélèvements de sang maternel et de sang de cordon ont été réalisés. Un questionnaire alimentaire fréquentiel et semi-quantitatif portant sur l'alimentation pendant la grossesse a pu être administré à 857 femmes en suite de couches. Parmi les enfants nés à terme sans malformations ou retard de croissance intra-utérine et de mères n'ayant pas eu de pathologie majeure de grossesse, 267 ont été examinés à 3 mois et 238 à 7 mois. A 3 mois, les mouvements généraux de l'enfant ont été enregistrés et interprétés. A 7 mois les tests de Teller et de Fagan ont été administrés. A 3 mois, des prélèvements de sang ont concerné 227 enfants et des prélèvements de lait 165 mères allaitantes. L'exposition prénatale au chlordécone a été estimée par plusieurs indices : l'apport

alimentaire ($\mu\text{g}/\text{j}$) estimé à partir des réponses au questionnaire alimentaire, les concentrations de chlordécone (ng/ml) mesurées dans le sang maternel et dans le sang du cordon. Ces deux indicateurs ont été retrouvés significativement corrélés (Guldner *et al*, 2009).

Les analyses statistiques ont compris des analyses univariés et multivariés (modèle de Cox, régression logistique, régression linéaire multiple,...).

Résultats

Les pathologies de la grossesse étaient fréquentes : 54,2% des femmes ont présenté au moins une pathologie, les plus fréquentes étant le diabète gestationnel, l'hypertension gravidique et l'asthme. Les 1074 grossesses ont donné lieu à 6 interruptions de grossesse ou mort-nés, 1042 naissances vivantes uniques et 26 naissances vivantes multiples. Quatre vingt enfants étaient atteints de malformations (incluant 2 hypospadias et 25 testicules non en place dans les bourses au moment de l'accouchement) ou anomalies (incluant les polydactylies). Parmi les naissances vivantes uniques conçues sans procréation médicalement assistée, 15,7% étaient des naissances prématurées (avant 37 semaines d'aménorrhée), 12,1% nouveau-nés présentaient un poids inférieur à 2500g et 7,9% des enfants ont été considérés comme trop petits par rapport à leur potentiel de croissance (restriction de croissance). Parmi les enfants suivis à 3 mois, 42,9% ont des mouvements généraux classés anormaux (38% modérément, 4,9% certainement), ce qui est conforme à ce qui est observé dans d'autres populations générales.

Le chlordécone a été détecté dans 62 % des prélèvements de sang maternel et 28 % des prélèvements de sang du cordon (limite de détection : $0,25 \mu\text{g}/\text{l}$) avec des

concentrations maximales observées de 19,3 et 22,9 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivement. L'apport alimentaire journalier en chlordécone a été estimé en moyenne à 3,3 $\mu\text{g}/\text{j}$ (maximum de 22,2 $\mu\text{g}/\text{j}$). Cet apport était en moyenne plus élevé en cas de résidence au début de la grossesse dans une commune possédant de sols pollués. Les principaux contributeurs de l'exposition alimentaire au chlordécone sont les poissons et crustacés (40 %), les légumes racines (30 %) et les cucurbitacées (10 %).

Parmi les accouchements n'ayant pas été déclenchés, on observe une association statistiquement significative entre les apports alimentaires en chlordécone moyens (2^{ème} tercile) et une diminution de la durée de gestation. Une tendance à une diminution de la durée de gestation est également observée en lien avec un niveau détectable de chlordécone dans le sang du cordon. De façon concordante avec ce qui a été observé pour la durée de gestation, on observe une augmentation du risque de prématurité en lien avec les apports alimentaires en chlordécone moyens (2^{ème} tercile). Aucune association n'est observée entre les indices d'exposition au chlordécone et le poids de naissance. On observe un accroissement du risque de restriction de croissance pour un niveau intermédiaire de la concentration de chlordécone dans le sang maternel. Les résultats actuels ne suggèrent pas d'association entre l'exposition prénatale au chlordécone et le risque de malformations ou anomalies génitales chez le garçon. En ce qui concerne la distance anogénitale, la seule association statistiquement significative est observée entre une concentration moyenne de chlordécone dans le sang maternel et une augmentation de cette distance chez les filles. Aucune association significative n'est observée entre l'exposition prénatale au chlordécone et le risque de mouvements généraux anormaux à 3 mois. Par contre il existe une

relation forte et positive entre la présence de chlordécone dans le sang du cordon et l'accroissement de la prise de poids et de l'index pondéral de la naissance à l'âge de 3 mois.

Discussion et conclusion

En l'état actuel des analyses effectuées, certaines associations sont suggérées entre l'exposition prénatale au chlordécone, croissance intra-utérine, paramètres du système génital et croissance de l'enfant à 3 mois. Compte-tenu des niveaux relativement faibles d'exposition, la réalisation de la totalité des déterminations de concentrations de chlordécone dans les prélèvements biologiques est une priorité pour aboutir à des conclusions plus solides et tenter une interprétation des associations trouvées. L'acquisition des données concernant les expositions au chlordécone dans les diverses matrices (sang maternel, sang du cordon et lait maternel) se poursuit tout comme les dosages d'acides gras polyinsaturés, métaux et oligo-éléments, et autres organochlorés (PCBs, DDT, DDD, DDE, α , β , γ - HCH et aldrine).

Ce travail a été soutenu par le Programme National de Recherches sur les Perturbateurs Endocriniens, le Programme de Recherches Santé – Environnement (AFSSET), l'ANR Programme de Recherches en Nutrition Humaine, la Direction Générale de la Santé, la DSDS Guadeloupe et l'InVS.

Références

- Chernoff N et al (1976). Fetal toxicity of Kepone in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 38, 1989-1994.
- Faroon O, Kueberuwa S, Smith L & De Rosa C (1995). ATSDR evaluation of health effects of chemicals. II. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate. *Toxicol Ind Health*, 11, 1-203.
- Guldner L, Multigner L, Héraud F, Monfort C, Pierre Thomé J, Giusti A, Kadhel P, Cordier S (2009). Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: Ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone. *Environ Res*,
- Hammond B et al. Estrogenic activity of the insecticide chlordécone and interaction with uterine estrogen receptors. *Proc Natl Acad USA*, 76, 6641-5, 1979
- Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, et al (2006) Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci*, 79, 1160-1169
- Mactutus CF et al (1982). Neonatal chlordecone exposure impairs early learning and memory in the rat on a multiple measure passive avoidance task. *Neurotoxicology*, 3, 27-44.

Fipronil et retardateurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienn

Catherine Viguié¹, Jean-Marc Soulat², Luc Belzunces³, Anne Lespine⁴, Pascal Martin⁴, Daniel Zalko⁵, Roger Rahmani⁶,

¹UMR 181 INRA ENVT31076 Toulouse, France – ²Service des maladies Environnementales et professionnelles Hôpitaux de Toulouse, France – ³UMR INRA, UAPV, 84000 Avignon, France – ⁴UR INA 66, 31931 Toulouse, France, ⁵UMR INRA, ENVT 1089, – ⁶: UMR INRA, ENVT 1089, 31931 Toulouse, France

Introduction

L'ensemble des enquêtes épidémiologiques menées à l'échelon mondial montre depuis quelques années une augmentation préoccupante de la fréquence des pathologies potentiellement liées à un dysfonctionnement endocrinien. Parmi ces pathologies, les altérations de la fonction thyroïdienne ont vu leur incidence augmenter de façon importante. La fonction corticotrope (gestion du stress), quant à elle n'est que très rarement évaluée

Une régulation précise de ces deux fonctions est requise pour un développement harmonieux du système nerveux central au cours de l'ontogenèse et pour le maintien de son intégrité chez l'adulte. Une hypothèse actuelle est que l'exposition des mères à des perturbateurs thyroïdiens ou corticosurréniens pendant la grossesse pourrait être associée à des troubles ultérieurs du développement intellectuel et/ou cognitif chez l'enfant.

Le fipronil un insecticide agrovétérinaire très répandu a été identifié par les études toxicologiques comme un perturbateur potentiel de la fonction thyroïdienne

Les retardateurs de prise de feu de la famille des poly-bromo-diphényle éthers

(PBDE) sont des produits chimiques incorporés dans les matières plastiques et dans la production de mousses et matériaux de capitonnage dans le but de leur conférer des propriétés ignifuges. Leur production mondiale est en constante augmentation. Depuis le 15 août 2004, seul le Decabromodiphényl ether est autorisé au sein de l'UE. (décision 76/769/EEC). L'implication des PBDE ou de leurs métabolites en tant que dérégulateurs endocriniens apparaît probable, notamment à cause de leur affinité importante pour les protéines de transport des hormones thyroïdiennes .

Le programme de recherche proposé avait pour ambition d'établir un schéma intégratif aussi complet que possible de l'exposition et du mode d'action de deux types de composés sur les fonctions thyroïdienne et corticotrope .

Méthodologie

I . Evaluation de l'exposition

1. *Evaluation comparative des paramètres pharmacocinétiques (PK) du fipronil dans différents modèles animaux*

Modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques en toxique au cours du temps suite à une administration unique

2. Evaluation quantitative et qualitative de l'exposition au fipronil chez l'homme

Etude ergotoxicologique en milieu professionnel : usine de conditionnement de fipronil. Caractérisation de la relation entre l'exposition interne en fipronil et son métabolite sulfone et les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et TSH.

II. Mécanismes de l'exposition: passage de la barrière digestive, transport et pénétration cellulaire

1. Caractérisation du passage de la barrière digestive sur des lignées cellulaires humaines :

Etude du passage et de la métabolisation du fipronil et de sa cytotoxicité sur monocouche de cellules caco II polarisées.

2. Interaction avec des transporteurs pompes à efflux

Effet des toxiques (dose/réponse) sur l'accumulation intracellulaire de substrats spécifiques des transporteurs PgP, BCRP et MDR sur des cultures de cellules surexprimant ces transporteurs.

III. Modulation de l'exposition : devenir métabolique

1. Evaluation qualitative de l'exposition dans des modèles animaux lors de contamination par voie orale

Caractérisation des profils plasmatiques et urinaires en fipronil et ses métabolites suite à l'administration de fipronil marqué.

2. Etudes métaboliques in vitro

Caractérisation des profils intra et extracellulaires en fipronil et ses métabolites sur hépatocytes humains en culture primaire

3. Métabolisme hépatique

Cytotoxicité hépatique du fipronil et des ses principaux métabolites (dose/réponse) sur hépatocytes en culture primaires, approche multipesèce.

Profils d'induction enzymatique sur hépatocytes humains en culture

Effets du fipronil sur le transcriptôme hépatocytaire (hépatocytes humains et murins)

IV. Marqueurs d'exposition, marqueurs d'effets au niveau hépatique

Effet d'un traitement au fipronil sur le transcriptôme hépatique d'animaux traités: puces pangénomiques et/ou puces dédiées récepteurs nucléaires

V. Effets physiopathologiques sur les systèmes endocriniens

1. Approche descriptive : caractérisation des effets sur les axes thyroïdiens et corticotrope in vivo

Effet d'un traitement au fipronil sur les profils en hormones thyroïdiennes, TSH et cortisol plasmatiques chez le rat (référence en toxicologie) et l'ovine (référence pour le schéma de régulation de la fonction thyroïdienne).

2. Approche mécanistique : détermination du niveau d'interaction avec les axes hypothalamo-hypophysaire thyroïdien

- *Effet d'un traitement au fipronil sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes (rat et ovin) : détermination de la clairance plasmatique de la thyroxine (T4) sur un modèle d'animaux dépourvus de thyroxine endogène.*
- *Effets directs sur la glande thyroïde : transcriptôme de la glande thyroïde (puce pangénomique)*
- *Effets potentiels sur le système nerveux central : Approche in vitro : cytotoxicité sur cultures neuronales à phénotype dopaminergique (lignée SH-SY5Y)*

Résultats/Discussion

L'ensemble du travail réalisé sur le fipronil suggère et ce, quel que soit l'approche et le modèle, que le principal mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne passerait par une stimulation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes induisant une augmentation de la clairance de la thyroxine (T4). Ceci est particulièrement clair chez le rat mais a également pu être montré chez le mouton grâce à une approche sensible de mesure de la clairance de la T4 libre.

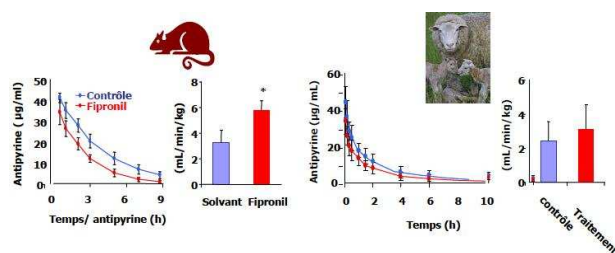


Figure 1 : Effets d'un traitement au fipronil par voie orale chez la rate (3mg/kg/j) et la brebis (5 mg/kg tous les 4jours) sur la clairance de la thyroxine totale.

Chez l'ovin, les effets du fipronil sont beaucoup moins marqués et ne se traduisent pas par des altérations des profils hormonaux. Cette divergence entre

les deux espèces pourrait être expliquée par des différences dans les voies métaboliques du fipronil conduisant à des schémas d'exposition différents (exposition au sulfone beaucoup plus importante chez le rat). Les résultats obtenus sur hépatocytes indiquent en effet des différences quantitatives dans les principales voies métaboliques entre espèces comme le suggère le profils de métabolites obtenus sur culture d'hépatocytes de différentes espèces dont l'homme (Fig. 2).

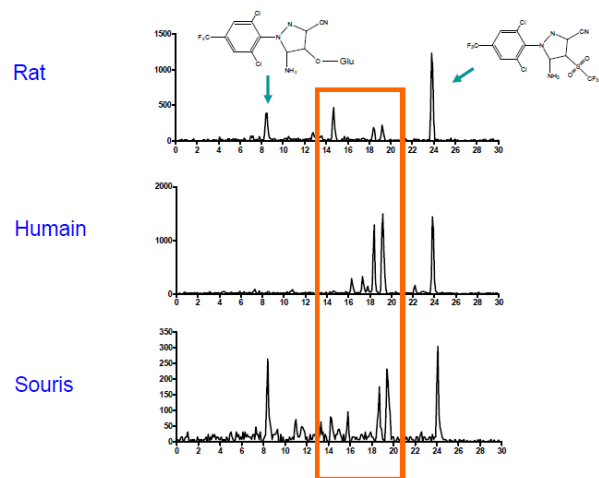


Figure 2 : Radiochromatogramme du fipronil et de ses métabolites après incubation d'hépatocytes de rat d'homme et de souris.

Nos expérimentations de criblage génomique sur foie d'animaux traités (Fig. 3A) et sur hépatocytes en culture (Fig. 3B) suggèrent l'implication probable de récepteurs nucléaires aux xénobiotiques dans les mécanismes conduisant à une augmentation du métabolisme hépatique. Cette implication de récepteurs nucléaires est un des facteurs pouvant contribuer à des différences interspécifiques importantes dans les effets du fipronil sur la fonction thyroïdienne.

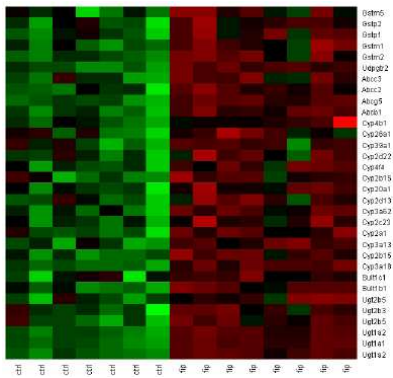


Figure 3A : Régulation de gènes du métabolisme hépatique des xénobiotique dans le foie d’animaux contrôles (ctrl) ou traités au fipronil (fip).

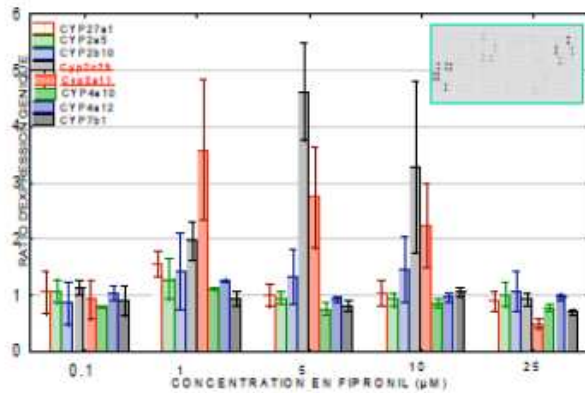


Figure 3B : Effets d’une exposition au fipronil sur l’expression de gènes codants pour différents enzymes cytochromes hépatiques sur des cultures d’hépatocytes humains.

Le travail réalisé sur lignées neuronales suggère que le fipronil pourrait agir au niveau du système nerveux central par des mécanismes de stimulation de l’apoptose. Toutefois, d’autres travaux sont nécessaires pour confirmer ces études à des doses en relation avec l’exposition réelle des populations humaines telles que celles décrites dans ce travail en milieu professionnel (Fig.4).

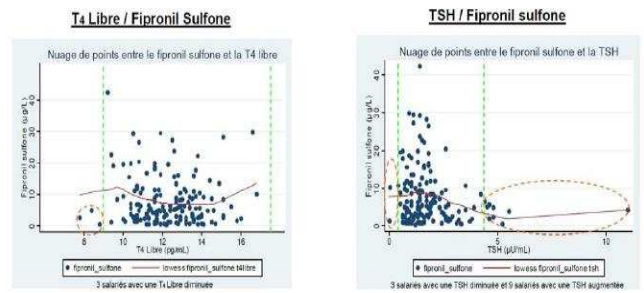


Figure 4 : Concentrations plasmatiques en fipronil sulfone en fonction de deux paramètres usuels d’évaluation de la fonction thyroïdienne : Thyroxine libre et TSH, dans une population de travailleurs potentiellement exposés au fipronil . Ces résultats ne supportent pas l’hypothèse d’un effet inhibiteur d’une faible exposition chronique (4 ans en moyenne) au fipronil/fipronil sulfone sur la fonction thyroïdienne chez l’homme sain.

Du point de vue du transport du fipronil, nos résultats indiquent que son absorption à travers la barrière intestinale serait très efficace et procéderait de mécanismes passifs et actifs. Nos résultats sur lignée cellulaire transfectées désignent le transporteur BCRP, dont l’action est inhibée par le fipronil et son métabolite sulfone à faible dose, comme transporteur potentiel du fipronil.

L’approche génomique mise en place sur la thyroïde souligne l’importance du potentiel de compensation de la thyroïde face à un agent perturbant le métabolisme de ses hormones.

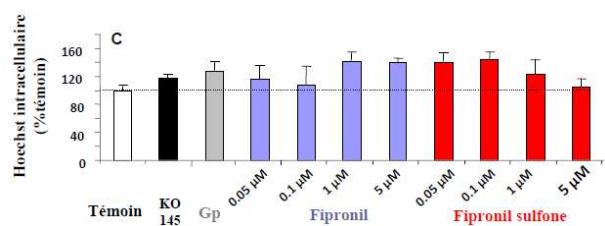


Figure 5 : Effet du fipronil et de son métabolite sulfone sur l’accumulation intracellulaire d’un substrat spécifique des BCRP (Hoechst). L’augmentation de la concentration

intracellulaire du substrat indique une inhibition du transporteur par le fipronil et son métabolite à faibles doses.

Quant aux PBDE, nos résultats suggèrent que le composé decabromé se métabolise très faiblement *in vivo* et sur cultures d'hépatocytes. Il n'aurait pas, du moins à court terme et à faible dose, d'effets importants sur la fonction thyroïdienne dans un modèle ovin.

En revanche, le mélange contenant des composés moins bromés (PBDE) à très faible dose (100ng/kg/j) diminue le temps de demi-vie de la thyroxine sous sa forme libre.

Temps de demi-vie de la T4 libre

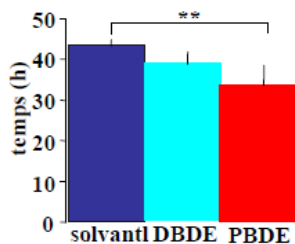


Figure 6 : Effets du decabromodiphényl ether pur (PBDE 100 ng/kg/j iv x 28 jours) et d'un

mélange contenant des dérivés faiblement bromés (pentamix : PBDE 100 ng/kg/j) sur le temps de demi-vie de la thyroxine libre chez la brebis.

Le modèle ovin a permis en outre de tester l'hypothèse d'une interaction possible avec la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez l'homme et le mouton, la TBG. Nos résultats suggèrent que les dérivés faiblement bromés (PBDE) pourraient interagir avec cette protéine induisant des modifications subtiles du comportement pharmacocinétiques de la forme libre des hormones dont une diminution du temps de demi-vie (fig.6).

Ni le fipronil, ni les PBDE n'ont entraîné de modifications des taux de cortisol circulant.

Conclusion

Ce travail souligne la place centrale du métabolisme hépatique comme cible de perturbateurs thyroïdiens et met en exergue tout le poids des différences interspécifiques dans l'interprétation des résultats des évaluations toxicologiques.



◎ SESSION 2 : Impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux naturels

Interactions entre composés oestrogéniques et dioxines sur la reproduction des poissons

F. Brion¹, N. Hinfray¹, G. Monod², F. Pakdel³, O. Kah³

¹INERIS, Unité "Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*", Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France ; ²INRA-SCRIBE, 35000, Rennes, France, ³UMR CNRS 6026 Université de Rennes 1, 35000, Rennes, France

Introduction

Dans l'environnement, les organismes sont le plus souvent exposés à des mélanges complexes de substances dont les interactions sont délicates à appréhender. Parmi les substances largement présentes dans le milieu aquatique figurent des composés œstrogènes mimétiques et « dioxine-like ». Les œstrogènes mimétiques sont capables de moduler par divers mécanismes la transcription de certains gènes œstrogéno-dépendants et d'affecter la reproduction des individus. Les dioxines sont capables d'activer des récepteurs cytoplasmiques, les récepteurs hydrocarbures aromatiques (aryl hydrocarbon receptor ou AhR) qui, en présence d'un cofacteur Arnt (AhR nuclear translocator), forment un complexe AhR/Arnt qui se fixe sur des séquences régulatrices de certains gènes dont ils modifient l'activité transcriptionnelle. Ces complexes AhR/Arnt sont en outre capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique et présenter des activités œstrogéniques ou anti-œstrogéniques sans se fixer aux ERs (Safe *et al.*, 1998, Ohtake *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, ces effets sont très peu renseignés chez le poisson et il existe peu de données permettant de relier les mécanismes

d'action de ces molécules aux effets biologiques et aux risques qu'elles peuvent représenter *in vivo* sur la fonction de reproduction.

Dans ce contexte, l'objectif de ce programme est d'étudier les interactions entre ces deux classes de composés ubiquistes, les œstrogènes mimétiques et les composés à activité dioxine-like, sur des modèles poissons et d'en évaluer les impacts sur la fonction de reproduction.

Méthodologie

Notre stratégie combine des modèles biologiques de complexités variables afin d'appréhender les effets à des niveaux d'organisation biologiques variés :

Au niveau moléculaire :

Il s'agit d'étudier *in vitro* les interconnexions entre les récepteurs Ah et ERs et d'évaluer l'impact des dioxines, seules et en mélange, sur la signalisation œstrogénique à l'aide de modèles cellulaires. L'expression des gènes hormono-régulés comme les gènes de l'aromatase cérébrale (gène *cyp19a1b*) et ovarienne (gène *cyp19a1a*), a été étudiée dans des différentes lignées cellulaires, les cellules gliales radiaires et les cellules ovarienne de hamster chinois (CHO).

Au niveau de l'organisme :

Il s'agit de replacer les mécanismes et effets dans un contexte physiologique par la conduite d'expérimentations *in vivo* chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) exposés aux stades embryo-larvaires et juvéniles à des (xéno)-œstrogènes et à des composés à activités dioxines, seuls ou en mélange et d'étudier les impacts sur la régulation de gènes cibles hormono-régulés impliqués dans la reproduction (gène de l'aromatase cérébrale, *cyp19a1b* et gène de l'aromatase ovarienne, *cyp19a1a*). Par ailleurs, des expérimentations sur le poisson zèbre et la gambusie (*Gambusia holbrooki*) sont menées afin d'étudier l'impact fonctionnel des interactions entre récepteurs Ah et ER sur la reproduction du poisson en se focalisant sur la différenciation sexuelle (poisson zèbre) et la vitellogenèse (gambusie).

Résultats et Discussion

Les œstrogènes régulent positivement l'aromatase cérébrale.

L'exposition d'embryons ou de larves de poisson zèbre à des œstrogènes se traduit par une forte induction du gène de l'aromatase cérébrale dans les cellules gliales radiaires *in vivo* et l'intérêt de ce gène comme marqueur d'exposition des xéno-œstrogènes au cours du développement précoce du poisson (stade embryonnaire et larvaire). De façon intéressante, la régulation gliale-spécifique du gène *cyp19a1b* par les œstrogènes *in vivo* est reproduite *in vitro* dans un contexte cellulaire neuro-gliales. Cette induction ER-dépendante du gène de l'aromatase B requiert des ERE fonctionnelles dans la région promotrice du gène aromatase B (Menuet et al., 2005) ainsi que des facteurs neuro-gliaux encore non identifiés qui agissent via des

séquences GxRE situées dans la région promotrice du gène aromatase B (Le Page et al., 2008).

Contrairement aux œstrogènes, les dioxines seules ne régulent pas l'expression de l'aromatase cérébrale *in vivo*. L'analyse des régions promotrices des gènes de l'aromatase démontre l'absence de fonctionnalité des éléments de réponses aux dioxines des régions promotrices des gènes de l'aromatase de poisson zèbre. Il est donc peu probable que des composés de type dioxine puissent influencer l'expression des aromatasés par la voie classique passant par le complexe récepteur Ah et l'élément de réponse aux dioxines.

Les dioxines exercent des effets anti-œstrogéniques.

Nous montrons que les dioxines sont capables d'antagoniser *in vitro* et *in vivo* les inductions du gène de l'aromatase B médiées par les œstrogènes. En outre, nous montrons que l'anti-œstrogénicité des dioxines requiert des récepteurs Ah fonctionnels *in vitro* et *in vivo* puisque l'ajout d'un antagoniste du récepteur Ah bloque totalement ou partiellement l'effet inhibiteur des dioxines.

L'interférence négative de la voie AhR vers la voie ER au cours de l'embryogenèse semble unidirectionnelle. En effet, à l'aide d'un bio-essai *in vivo* sur embryon de poisson zèbre, nous avons pu quantifier l'induction de l'activité enzymatique du cytochrome P4501A par la dioxine. L'ajout d'œstrogènes dans le milieu ne modifie pas l'induction du CYP1A par la TCDD montrant ainsi l'absence d'interférence de la voie ER activée sur la voie AhR.

Effets de faibles concentrations en éthynyl-oestradiol et en dioxine sur la signalisation oestrogénique et la reproduction.

La question des interactions et des effets de faibles concentrations en ligands ER et AhR sur la reproduction des poissons a été adressée en exposant des poissons zèbres à de faibles concentrations en éthynyl-oestradiol (EE2) et en dioxine (TCDD) seule ou en combinaison, durant la période de différenciation sexuelle chez le poisson zèbre. A la fin de la période d'exposition, les effets de la TCDD et de l'EE2 sur la signalisation oestrogénique ont été évalués en analysant l'expression de gènes ER-régulés dans le système nerveux central (ER α , β 1, β 2 et cyp19a1b) et le foie (vitellogénine). L'analyse histologique des gonades a permis d'évaluer l'impact fonctionnel de ces traitements sur la différenciation gonadique.

Les résultats de cette étude montrent que l'exposition de poisson zèbre à une faible concentration en EE2 (10 ng/L), seule ou associée à la TCDD (10 pg/L), durant les stades précoces de développement altèrent l'expression de gènes impliqués dans la signalisation oestrogénique dans le cerveau comme l'isoforme α du récepteur ER et l'aromatase cérébrale, AroB. Notamment, nous montrons l'effet oestrogénique de l'EE2 par sa capacité à induire l'AroB à des concentrations environnementales et la capacité de faibles doses de TCDD à inhiber ces inductions confirmant l'anti-oestrogénicité de la TCDD à une faible concentration. L'anti-oestrogénicité de la dioxine ne s'observe pas cependant sur l'expression d'une protéine hépatique ER-régulée la vitellogénine, la co-exposition EE2 et TCDD potentialisant l'induction de la vitellogénine par l'EE2 seule. Chez les poissons exposés à l'EE2, la majorité des

individu présente un arrêt du développement gonadique qui n'est pas contrecarré par la co-exposition avec la TCDD.

La forte sensibilité du ER α et du cyp19a1b chez le poisson zèbre exposé à de faibles concentrations d'EE2 et de TCDD soulève le besoin d'évaluer plus précisément les effets des oestrogènes et des dioxines sur les circuits neuro-endocrines impliquées dans la reproduction et renforce l'idée de la vulnérabilité des stades précoces de développement des poissons aux perturbateurs endocriniens

Conclusions

Nous montrons pour la première fois que les composés à activité dioxine-like exercent des effets anti-oestrogéniques sur l'expression d'un gène oestrogéno-régulé, l'aromatase B, dans le contexte gliale radiaire *in vitro* et *in vivo*. En raison du rôle des cellules gliales dans la neurogenèse chez le poisson (Pellegrini *et al.*, 2007) et le rôle suspecté que joue l'oestradiol dans ce processus (Menuet *et al.*, 2005, Pellegrini *et al.*, 2005), les effets observés soulèvent la question des effets des molécules agonistes des récepteurs Ah et ER sur la neurogenèse. L'aromatase s'exprimant dans des structures cérébrales impliquées dans la reproduction, il est possible qu'une altération de l'expression de l'aromatase puisse se répercuter au niveau gonadique. D'une manière plus globale, ces données soulèvent la question des effets neuro-endocrines des molécules oestrogénomimétiques et à activité dioxine. Cet axe de recherche est actuellement mené dans le cadre d'un programme ANR dédié aux effets neuro-endocrines des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (ANR NEED).

Références

Cheshenko K., Brion F., Le Page Y, Hinfray N, Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen R.I.L. (2007). *Toxicological Sciences* 96: 255-267.

Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F. (2008). *Mol Reprod Dev.* 75(10):1549-57.

Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M-M, Dujardin T, Anglade I, Marmignon M, Pakdel F and Kah O. (2005). *J. Comp. Neurol.* 16;485(4):304-20.

Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. (2007) *J Comp Neurol.*;501(1):150-67.

Evaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques (SURVAQUA)

S. Aït-Aïssa¹, F. Brion¹, H. Budzinski³, C. Casellas⁵, A. David⁵, J. Garric², O. Geffard², E. Gomez⁵, N. Hinfray¹, C. Minier⁶, C. Mouneyrac⁴, P. Noury², O. Palluel¹, J-M. Porcher¹

¹INERIS, Unité "Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*", Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 VERNEUIL-EN-HALATTE ; ²Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, Lyon.

³ISM/LPTC, UMR 5255, Université de Bordeaux 1 ; ⁴UCO - Centre d'Étude et de Recherche sur les Écosystèmes Aquatiques, Angers ; ⁵Université de Montpellier 1, UMR 5569 « Hydrosociences » ;

⁶Université du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA)

L'objectif de ce programme pluridisciplinaire était de définir et d'appliquer une démarche expérimentale permettant l'évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens (PE) sur les milieux aquatiques dulçaquicoles et estuariens. Cette démarche a consisté à évaluer, de manière combinée, la contamination des milieux et les effets induits *in situ* sur les organismes. Différents sites ont été sélectionnés en raison de leur typologie de contamination (agricole, urbaine, industrielle) et/ou de leur configuration particulière (amont/aval d'un site de rejet, restauration d'un milieu impacté par une STEP, etc.).

Les activités PE dans le milieu (sédiment) et dans les organismes (invertébrés, bile de poissons) ont été suivies à l'aide d'outils bio-analytiques (tests *in vitro* d'activité hormonale sur cultures cellulaires et levures) et d'analyses chimiques des micropolluants organiques et des stéroïdes sexuels. Les effets *in situ* sur les invertébrés et les poissons ont été évalués en mesurant des variables biologiques au niveau individuel (capacité de reproduction pour les invertébrés, biomarqueurs, histologie des gonades).

Principaux résultats

La plus grande partie des techniques proposées étant disponible dans un ou plusieurs des laboratoires partenaires de ce projet, les développements méthodologiques ont concerné plus particulièrement les invertébrés, pour lesquels, contrairement aux poissons on ne dispose que de peu d'informations sur les critères d'effets des PE.

Sur crustacés, des études au laboratoire ont permis de caractériser le cycle de reproduction des gammarus (*Gammarus fossarum*) et de développer la mesure de l'expression du gène codant pour la vitellogénine comme biomarqueur de la perturbation endocrinienne. L'intérêt de cette mesure comme marqueur d'exposition aux PE a été montré à l'aide de deux molécules modèles (nonylphénol et cyprotérone). Ces travaux seront poursuivis d'une part, pour caractériser et quantifier les protéines de réserve par une méthode analytique LC/MS/MS, et d'autre part pour évaluer le pouvoir discriminant de la vitellogénine en milieu naturel.

Sur Gastéropodes, deux cibles potentielles des PE ont été choisies : les stéroïdes et la vitelline. Trois espèces de gastéropodes ont été sélectionnées : *Potamopyrgus antipodarum*, *Valvata*

piscinalis et *Lithoglyphus naticoides*. Les premiers résultats obtenus par LC-MS et RIA confirment la présence d'hormones stéroïdiennes en quantité quantifiable chez les trois espèces. Chez *P. antipodarum*, où l'on ne dispose que de femelles parthénogénétiques, la testostérone ne semble pas présente sous forme estérifiée contrairement à la progesterone qui en l'état de nos résultats se présente à 80 % sous cette forme. La prochaine étape du travail concernera la variation temporelle des concentrations hormonales sur les organismes du milieu.

Les protéines Vg-like ont été quantifiées directement par densitométrie sur gels d'électrophorèse et indirectement par les méthodes des phosphates alkali-labiles (ALP) et des lipides liés aux protéines (PBL). Le dosage des PBL est apparu mieux adapté à la mesure de Vg-like chez les gastéropodes. Ainsi, chez *L. naticoides*, espèce sexuée et à sexes séparés, nous avons pu montrer que la teneur en PBL et le ratio PBL/ALP étaient associés à des bandes protéiques (300kD) spécifiques des œufs et des femelles. L'exposition de *P. antipodarum* et *V. piscinalis* à du bisphénol A (BPA), de l'octylphénol ou du tributylétain (TBT) a donné des résultats encourageants, qui permettent d'envisager l'utilisation des PBL et du ratio PBL/ALP comme biomarqueurs de stress de la reproduction.

Sur poissons, le travail méthodologique a consisté principalement à comparer ou à harmoniser les protocoles disponibles chez les différents partenaires (méthode de prélèvement poisson, dosage de l'EROD). Un dosage de la vitellogénine spécifique du cheveine a été développé. De plus, le dosage de l'activité aromatase, enzyme qui catalyse la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes, et cible potentielle pour les PE, a été développé et validé dans le

cerveau et les gonades des chevaines et des gardons.

Plusieurs études sur le terrain ont permis d'appliquer les outils disponibles chez les différents partenaires du projet dans des contextes variés (sites dulçaquicoles et estuariens sélectionnés en raison de leur typologie de contamination ou de leur configuration particulière).

Les sédiments de l'ensemble des sites échantillonnés ont été étudiés à l'aide d'outils bio analytiques (tests *in vitro* sur cellules et sur levure, essai EROD *in vivo* sur larves de *Danio*). Des activités HAP-like et dioxin-like sont détectées et quantifiées dans tous les échantillons étudiés, suggérant une forte imprégnation du milieu par des ligands du récepteur Ah. Des différences intersites ont également été mises en évidence. A noter que les deux sites dulçaquicoles de référence sont parmi les moins actifs en termes de BaP-EQs et TCDD-EQs, ce qui conforte le choix de ces sites comme référence. Différents sites localisés en aval d'activités humaines apparaissent très actifs, comme par exemple le Rhône à Givors (pollution industrielle et urbaine), la Deule à Don (site industriel Metal Europe), le Lez en aval de Montpellier (impacts urbains) ou la Nonette à Chantilly (impacts agricole et urbain). En milieu estuarien, certains points de la Seine et de la Loire sortent très actifs alors que le site de Port du Bec (référence) apparaît également contaminé par des composés inducteurs d'EROD. Ces résultats sont globalement confirmés par le test EROD sur larve de *Danio rerio* (à l'exception de la Drôme à Saillans qui provoque des inductions significatives dans ce test), qui se révèle donc apte à détecter la présence de substances inductrices au sein de sédiments de toute nature et origine.

Les activités œstrogéniques ont été mesurées dans les extraits de sédiment

par le test MELN. Globalement, des activités comprises entre 0.03 et 2 ng d'E2 EQ/g ont été mesurées avec des différences inter-sites qui s'expliquent aisément par le contexte des différents sites. Les sites de référence Drôme, Lez Amont et Port du Bec sont assez peu actifs. A l'inverse, des activités plus fortes sont détectées sur des sites soumis à des pressions anthropiques comme la Nonette, la Jalle d'Eysines, le Rhône, ou encore les sites localisés en aval de Montpellier (Lez aval, lagunes de Méjean et d'Arnel). Les niveaux détectés sur les sites impactés sont du même ordre de grandeur que ceux qui ont été rapportés dans certains sites Européens, en utilisant le même type de modèle cellulaire. Aucune activité androgénique ou anti-androgénique n'a été détectée. Par contre, la mesure de l'activité aromatase *in vitro* en présence d'extraits de sédiments des sites du Rhône, de la Jalle et de la Nonette a mis en évidence la présence de composés inhibiteurs de l'aromatase dans les sédiments.

La comparaison avec les analyses chimiques ciblant des familles de polluants prioritaires a montré une forte contribution des HAPs dans les réponses mesurées par le test EROD. Toutefois, des analyses chimiques supplémentaires (e.g. alkylphénols, stéroïdes) seraient nécessaires afin d'identifier les polluants actifs détectés par le test MELN sur certains sites.

Deux espèces d'invertébrés ont été étudiées en milieu estuarien : *Scrobicularia plana* et *Neiris diversicolor*. Chez les bivalves, on observe une maturité sexuelle précoce dans les sites impactés. L'interprétation des résultats sur l'influence du site, du stade de maturité sexuelle et du sexe sur les niveaux en réserves énergétiques et en hormones stéroïdiennes reste complexe, toutefois,

une meilleure compréhension de la reproduction de *S. plana* permettra de mieux appréhender les impacts des contaminants environnementaux. L'état de santé général et la reproduction chez *N. diversicolor* sont également affectés par le degré de pression anthropique des sites d'origine des vers.

Différents paramètres liés à la perturbation endocrinienne ont été mesurés sur deux espèces de poisson (*Rutilus rutilus* et *Leuciscus cephalus*). Les mesures d'EROD hépatique ont confirmé le caractère ubiquiste de la contamination par les HAPs et Dioxin-like déjà observé dans les extraits de sédiment. Chez les poissons mâles on observe des augmentations de la synthèse de vitellogénine, qui se révèle comme un excellent marqueur d'exposition aux œstrogènes mimétiques susceptibles de différencier les sites. L'identification de poissons intersexués a également été observée, et peut être considérée comme une manifestation frappante d'une perturbation endocrinienne touchant les organes reproducteurs même si le débat permettant de statuer sur le taux naturel d'occurrence n'est pas clos. En conclusion cette étude a permis de mettre en évidence la présence de perturbations endocriniennes chez le gardon sur les sites de Don, Poses et Coëtmioux. Sur chevaines aucun des sites étudiés n'apparaît comme exempt de poissons potentiellement exposés en particulier au regard des niveaux de vitellogénine mesurés.

La mesure de l'activité aromatase (AA), a été mise en place sur gardon et chevaine. L'activité aromatase cérébrale a été mesurée au cours de l'ensemble du cycle de reproduction du gardon et confirme le lien entre cycle de reproduction et activité aromatase cérébrale. L'AA sur les chevaines et les gardons s'est révélée être

perturbée sur différents sites. La corrélation observée entre les AA cérébrales et l'état de maturité de la gonade suggère un caractère prédictif d'effets délétères sur la reproduction du biomarqueur AA, même si en l'état actuel des connaissances, l'interprétation des résultats reste complexe.

Conclusion

Outre la mise en place d'un certain nombre d'outils d'évaluation de la contamination des milieux aquatiques par les PE (tests sur invertébrés, aromatase chez le poisson, tests *in vitro* d'activités œstrogénique et androgénique), ce programme a permis de mettre en évidence la présence d'effets PE sur un certain nombre de sites français.

Mots clefs

biosurveillance, réseau de laboratoires, effets œstrogéniques, impacts

Références

David A., Gomez E., Aït-Aïssa S., Casellas C., Fenet H. Impact of urban wastewater discharges on sediments of a small Mediterranean river and associated coastal environment: assessment of estrogenic and dioxin-like activities, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, accepté.

Gagnaire B, Gagné F., André C., Blaise C., Abacci A. , Budzinski H., Dévier MH., Garric J. 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods : Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquatic Toxicology, 92 : 155-167.

Mouneyrac C., Linot S., Amiard J-C., Amiard-Triquet C., Métais I., Durou C., Minier C., Pellerin J. 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia*

plana from three sites differing by their level of contamination. General and Comparative Endocrinology, 157, 133-141.

Mouneyrac C., Perrein-Ettajani H., Amiard-Triquet C. The use of fitness, reproduction and burrowing behaviour of the polychaete *Nereis diversicolor* in the assessment of estuarine sediment quality. Environmental Pollution, accepté.

Hinfray N., Palluel O., Piccini B., Sanchez W., Aït-Aïssa S., Noury P., Gomez E., Geraudie P. , Minier C., Brion F., Porcher J.M. 2010. Endocrine disruption in wild population of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. Science of Total Environment. 408, 2146-2154.



◎ SESSION 3 :
De nouveaux outils expérimentaux
en appui aux tests réglementaires

Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement

E. Barbeau¹, S. Paris-Palacios², S. Biagiante-Risbourg², S. Gimeno³, M. Leonard¹,
and C. Pineau⁴

¹ Unité d'Ecotoxicologie, L'OREAL Recherche Avancée, 93600 Aulnay sous Bois, France

² Laboratoire d'Ecotoxicologie, EA2069, Université de Reims, 51687 Reims cedex 2, France ; ³ Procter & Gamble, Central Product Safety, Innovation Center, Bruxelles, Belgique; ⁴ Plate-forme Protéomique Biogenouest, Inserm U.625, 35042 Rennes cedex, France.

Introduction

La protection de l'Homme et de l'Environnement vis-à-vis des perturbateurs endocriniens, passe par le développement de méthodes d'essais spécifiques, destinées à l'évaluation des substances chimiques et des effluents ainsi qu'à la surveillance des milieux naturels.

Un premier inventaire des méthodes disponibles et adaptables à l'identification des perturbateurs endocriniens a été présenté par l'OCDE en mai 2001. Il a néanmoins conduit au développement de nouveaux essais. En raison des grandes différences de régulation endocrinienne entre les différentes espèces animales (Damstra *et al.*, 2002 ; OCDE 2001), les essais sélectionnés pour identifier les perturbateurs endocriniens chez les espèces sauvages, portent désormais sur 4 grands groupes : poissons, amphibiens, invertébrés et oiseaux.

Les espèces aquatiques, notamment les poissons, sont privilégiées en raison de la fréquence des rejets industriels et urbains dans les eaux de surface et la contribution de ces dernières à la production d'eau potable. En dépit de l'amélioration globale de la qualité écologique des cours d'eau européens, des effets oestrogénomimétiques ont été observés chez des

poissons en aval de stations d'épuration (Folmar *et al.*, 1996). Ces effets sont principalement attribués aux oestrogènes naturels, xéno-oestrogènes et contaminants aux effets anti-androgènes contenus dans les effluents des stations d'épuration urbaines (pour revue voir : Jobling *et al.*, 2009). Les essais développés sur poissons à ce jour, sont parmi les plus avancés.

La réglementation européenne REACH (Règlement (CE) n° 1907/2006) pour l'évaluation du risque des substances chimiques pour l'Homme et l'Environnement, envisage de soumettre à autorisation et à restriction les substances chimiques identifiées comme perturbateurs endocriniens. Parallèlement, le projet REACH recommande fortement de limiter le recours aux essais sur animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques. Or les essais développés dans le cadre de l'OCDE nécessitent l'utilisation de poissons juvéniles ou adultes, qui répondent à la définition européenne de l'animal de laboratoire (Directive n°86/609/CEE). Il apparaît donc souhaitable, en accord avec les principes développés de projet REACH, de développer des méthodes d'évaluation rapides, peu coûteuses et si possible alternatives à l'expérimentation animale, pour l'identification des

perturbateurs endocriniens chez les poissons.

L'objectif de ce projet a été de mettre en évidence et caractériser des biomarqueurs précoces d'exposition aux perturbateurs endocriniens. Il propose d'identifier par une approche de protéomique différentielle, les protéines qui, chez le poisson modèle Médaka (*Oryzias latipes*), sont associées aux altérations du développement de l'appareil reproducteur tel qu'elles apparaissent à l'issue de l'essai *Extended OECD n° 210* (soit 60 jours après éclosion pour le Médaka). Ces protéines ont également été recherchées à un stade précoce de développement, soit 2 jours après éclosion. Les travaux ont été réalisés avec l'agoniste fort éthynyl oestradiol (EE2).

Méthodologie

Une culture d'œufs fertilisés de Médaka est répartie en boîtes de Pétri en verre de 150mm et stockée dans une enceinte climatique à 26°C avec une photopériode 14h jour / 10h nuit. Les œufs sont exposés uniquement à un milieu d'élevage (Kirschen & West, 1976) contenant ou non de l'EE2 à une dose ayant déjà démontré des effets (*i.e.*, 100 mg/mL). L'EE2 étant solubilisé en isopropanol, un témoin solvant a été utilisé. Après éclosion, les Médakas sont transférés dans des aquariums en verre sous enceinte climatique. L'exposition des alevins à l'EE2 est poursuivie jusqu'à 2 ou 60 jpe.

Une méthode analytique a été spécifiquement développée, comprenant une phase d'extraction en phase solide pour l'étape d'enrichissement suivie d'un dosage par LC/MS-MS. Le 17 β -estradiol-16,16,17-D3 (E2-d3) a été choisi comme étalon interne.

Les alevins sont prélevés individuellement à 2 ou 60 jpe, rincés à l'eau MilliQ. Une nageoire est prélevée pour sexage par RT-PCR sur le gène Dmy (placé sur le chromosome Y) avant immersion flash dans l'azote liquide puis stockage jusqu'à utilisation.

Les analyses protéomiques ont été réalisées en comparant les animaux "témoins solvant" aux animaux traités. En raison de la taille des échantillons, en particulier des animaux à 2jpe, des pools de 25 animaux ont été utilisés pour chaque groupe. L'approche DIGE repose sur le marquage des protéines d'échantillons à comparer par des cyanines fluorescentes préalablement à leur co-séparation sur gel d'électrophorèse 2D. L'identification des protéines différentielles est réalisée grâce au logiciel d'analyse d'image DeCyder™ et les protéines identifiées par spectrométrie de masse (Rolland *et al.*, 2007). Les mêmes échantillons sont été analysés grâce à la technologie ProteinChip® qui associe deux principes d'analyse des protéines, la chromatographie d'affinité par rétention et la spectrométrie de masse (Zhu & Snyder, 2003).

Les analyses Histologiques ont été réalisées à 60 jpe. Les poissons ont été fixés, déshydratés et inclus individuellement en paraffine. Des coupes de 5 microns sont colorées au rouge nucléaire solide micro-indigocarmin et étudiées sur un microscope Leica DMR à caméra numérique et système logiciel Histolab (Microsystem).

La vitellogénine a été dosée à 60 jpe grâce au kit *Medaka Vitellogenin ELISA Kit (Prod. No. V01013403 ; Biosense)* selon les indications du fournisseur.

Résultats

L'étude DIGE a permis la mise en évidence de 22 protéines différemment exprimées à 60 jpe, dont 8 déjà présentes à 2jpe. Ces protéines sont toutes des entités majoritaires, impliquées dans l'organogenèse et composantes de l'architecture cellulaire (myosine, tubuline, actine, cytokératine) ou dans le métabolisme cellulaire (transferrine, apolipoprotéine A1, énoïase 1).

Une étude complémentaire reposant sur la technologie ProteinChip® a permis la mise en évidence de 39 candidats biomarqueurs à 60jpe (Figure 1), dont 9 déjà présents à 2jpe.

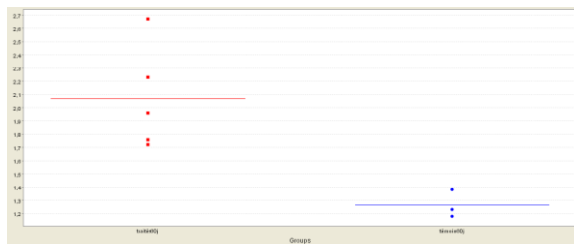


Figure 1 : Exemple de profilage ProteinChip. Mise en évidence d'un candidat biomarqueur de 3253 Da sur barette Q10 à pH6 entre animaux "témoins solvant" versus traités à 60jpe.

Les modifications anatomiques induites par l'exposition à l'EE2 ont été validées (tests OCDE) par des analyses morphologiques et par dosage de la vitellogénine. Nos résultats montrent que les mâles 60 jpe traités à l'EE2 présentent une féminisation des gonades en ovotestis (Figure 2) et produisent des niveaux importants de vitellogénine.

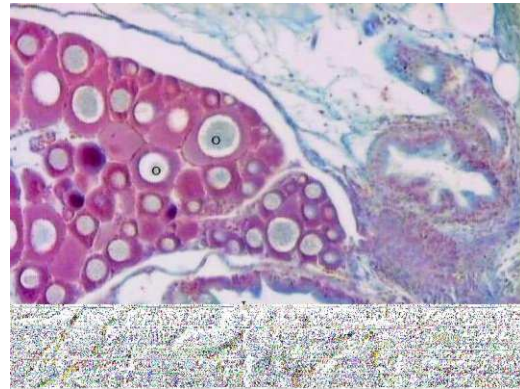


Figure 2 : Coupe histologique représentative de la gonade du Médaka mâle après traitement à l'EE2 (10 ng/L). I : intestin; O : ovocyte.

Discussion et conclusion

La toxicogénomique et la toxicoprotéomique sont des champs disciplinaires en pleine expansion dans le contexte de l'identification de biomarqueurs (pour revues, voir Merrick & Bruno, 2004; Barrier & Mirkes, 2005) avec des retombées déjà significatives en écotoxicogénomique sur des modèles poisson (Miracle & Ankley, 2005).

Les candidats biomarqueurs devaient être identifiés en prenant en compte deux contraintes majeures :

- 1) la nécessité de travailler sur le poisson entier et non sur des organes après dissection, ce qui est techniquement impossible sur les jeunes alevins ;
- 2) la nécessité de développer un test rapide à mettre en place, de faible complexité technique et surtout peu coûteux.

La caractérisation biochimique des biomarqueurs identifiés par l'approche ProteinChip® est en cours. Les marqueurs protéiques Mis en évidence par DIGE et identifiés par spectrométrie de masse sont

des candidats sérieux pour une étude de validation sur des cohortes plus importantes de Médaka “témoins solvant” versus traités.

Après validation, ces biomarqueurs pourront être utilisés en cosmétologie pour le criblage des effets “type perturbateurs endocriniens” de produits actifs afin de tester leur innocuité.

Ce travail a été soutenu par le Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens [subvention CV05000156].

Nous remercions les sociétés **Innova Proteomics** (Rennes) et **Watchfrog** (Evry) pour leur contribution à cette étude.

Références

Kirschen RV & West ER, 1976. The Japanese Medaka : Its care and development » Carolina Biological Supply Co, Burlington, North Carolina.

Barrier M & Mirkes PE, 2005. *Reprod Toxicol*. 19(3): 291-304.

Damstra T, Page SW, Herrman JL and Meredith T. 2002. *J Epidemiol Community Health*. 56(11): 824-825.

Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ Jr. 1996. *Environ Health Perspect*. 104(10):1096-1101.

Jobling S, Burn RW, Thorpe K, Williams R and Tyler C. 2009. *Environ Health Perspect*. 117(5):797-802.

Merrick BA & Bruno ME, 2004. *Curr Opin Mol Ther*. 6(6): 600-607.

Miracle AL & Ankley GT, 2005. *Reprod Toxicol*. 19(3): 321-326.

Rolland AD, Evrard B, Guitton N, Lavigne R, Calvel P, Couvet M, Jégou B and Pineau C. 2007. *J Proteome Res*. 6(2): 683-697.

Zhu H & Snyder M. 2003. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 7(1): 55-63.

Développement d'un test physiologique « *in vitro* » rapide sur les embryons amphibiens pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes

J.B. Fini¹, P. Balaguer², B. Demeneix¹

¹UMR7221, CNRS / MNHN, 75005, Paris, France

² U 896 Inserm, 34394, Montpellier, France

Introduction

Les effets des perturbateurs endocriniens (molécules hormono-mimétiques) sur la reproduction des animaux sont couramment étudiés, mais il y a d'autres perturbations qui peuvent survenir au niveau d'autres glandes endocrines, comme la thyroïde.

La thyroïde est une glande qui produit la thyroxine (tetraiodothyronine ou T₄) dont une certaine fraction est présente dans le sang et qui va être activée par désiodation (en triiodothyronine ou T₃) dans les tissus cibles de l'hormone. Les deux pathologies couramment associées au dysfonctionnement de la thyroïde sont :

- l'hypothyroïdie (faible production de T₄) dont les symptômes sont difficilement discernables de ceux d'une dépression ;
- l'hyperthyroïdie (forte production d'hormones) dont les symptômes sont ceux d'une hyperactivité doublée d'une sensation de chaleur.

L'amphibien est utilisé depuis des décennies comme modèle pour comprendre la mécanistique thyroïdienne. En effet, leur métamorphose est uniquement dépendante d'un pic de la même T₃ (hormone thyroïdienne active) que celle de l'homme. Si on bloque artificiellement ce pic d'hormone la métamorphose n'a pas lieu.

L'ingénierie du laboratoire a permis de créer récemment des modèles transgéniques qui émettent une protéine

fluorescente verte (Green Fluorescent Protein GFP) en présence d'hormone T₃. Plus il y a d'hormone dans le milieu et plus il y a activation et transcription des gènes cibles et plus il y a production de GFP dans les organes ou tissus cibles de la T₃ du têtard. Nous pouvons donc quantifier l'activité du gène par la quantification de la fluorescence dans ces « têtards sentinelles ».

Nous avons développé des modèles amphibiens qui répondent par émission de fluorescence à toute altération de l'axe thyroïdien. Cette technique est basée sur la possibilité de suivre les régulations transcriptionnelles *in vivo* par l'activation d'éléments de réponses génétiques spécifiques des hormones thyroïdiennes placés en amont d'un gène codant pour une protéine fluorescente (TH/bZIP-eGFP). La détection au niveau génétique permet d'intégrer les différents modes d'actions des substances ou des mélanges susceptibles de perturber la synthèse, le transport, ou la signalisation thyroïdiennes. La faisabilité de cette approche a déjà été démontrée (Turque *et al.*, 2005).

Cependant il restait à optimiser cette méthode pour son application industrielle et de manière à réduire les besoins en expérimentation animale. Ainsi, nous avons pour objectifs, premièrement, d'améliorer la rapidité et la sensibilité du test aux substances de références, et

deuxièmement, d'adapter au mieux notre modèle avec les systèmes de lecture déjà disponibles.

Méthodes

Têtards transgéniques

Des générations F1 et F2 de têtards transgéniques ont été produites en croisant des fondateurs transgéniques avec des *X. laevis* sauvages. Les fondateurs (géniteurs) ont été produits en intégrant le transgène TH/bZIP couplé avec un gène de protéine fluorescente verte (GFP). Les têtards ont été triés par stade selon la classification de Nieuwkoop et Faber (NF).

L'optimisation des stades à utiliser pour le MFA (multiwell fluorescent assay)

Afin d'optimiser les stades pour le MFA nous avons quantifié l'activité transcriptionnelle de têtards transgéniques, de seconde génération (F1), des stades embryonnaires NF40 jusqu'aux stades larvaires NF45. L'induction par des hormones thyroïdiennes exogènes à différents moments de développement entre les stades 42 et 52 a été ensuite évaluée.

Produits Chimiques, Traitements, Imagerie

Voir Fini *et al.* 2007 pour plus de détail.

Lecture sur plaque (96 puits) automatisée

Les têtards sont placés dans une plaque 96 puits, noire, à fond conique (Greiner Bio One, France). Un têtard est placé dans chaque puit avec la tête au centre du puit. Les têtards sont orientés avec la face dorsale en contact avec la plaque pour minimiser l'interférence du signal GFP avec les mélanophores présents sur la face dorsale. La fluorescence a été

mesurée avec un lecteur automatique Ultra Evolution X de chez TECAN. Ce système permet une lecture et une acquisition de la plaque complète en 20 minutes.

Analyse statistique des résultats

Les résultats *in vivo* ont été exprimés par des moyennes \pm SEM par groupe. Nous avons utilisé un test ANOVA pour déterminer la significativité statistique des différences entre groupes.

Vérification de la robustesse des résultats par qPCR

Selon les méthodologies déjà publiées par le laboratoire.

Résultats

Deux contraintes conditionnent la sélection du stade d'intérêt de Xénope pour les expériences prévues :

- Absence d'interférence du vitellus avec le signal fluorescent émit par la GFP (green fluorescent protein);
- Préférence pour l'utilisation d'un stade embryonnaire (qui ne se nourrit pas).

Le Xénope se développe grâce aux réserves énergétiques contenues dans le vitellus de l'œuf qui s'amenuisent au fur et à mesure de l'embryogénèse, jusqu'à leur épuisement total au stade NF47. La localisation de ces réserves dans une moitié du têtard encore au stade NF35 va diminuer jusqu'à n'être plus visible que dans le tissu qui formera les intestins à partir du stade NF40. Ces réserves vitellines présentent une fluorescence naturelle qui interfère dans l'intervalle de longueurs d'ondes utilisé pour la détection de la GFP.

Pourtant, afin que le test de criblage rapide puisse être utilisé en routine dans des laboratoires qui n'ont pas forcément d'autorisation d'hébergement d'animaux de laboratoire, il fallait que l'on sélectionne un stade auquel les têtards n'avaient pas commencé à se nourrir (leur survie étant assurée par les réserves vitellines). Pour le Xénope, le stade où l'on commence à voir apparaître des traces de nourriture dans les intestins est le stade 46. Pour ces raisons, il fallait un stade présentant à la fois une faible proportion de vitellus résiduel, mais qui soit également antérieur au stade 46. Nous avons testé les stades 42 (4 jours de développement) et 45 (5 jours de développement) qui répondent tous deux à ces contraintes.

Les premières expériences réalisées sur les stades 42 ont montré une réponse aux hormones thyroïdiennes, détectable et significative mais peu robuste car non reproductible. De plus le suivi de la fluorescence endogène de ces têtards a montré que l'utilisation du stade 42 comme stade de départ pouvait être problématique. Sur la Figure 1 nous pouvons observer que le taux de base de la fluorescence des têtards. La seule différence entre les stades 42 et 44 est une chute de la fluorescence d'environ 60%. La fluorescence au sein même des têtards n'est pas stable dans le temps ce qui signifie que dans une expérience de suivi de fluorescence, avec le stade 42, nous n'aurions pas pu conclure quant à une baisse ou une augmentation de fluorescence. Cette variation observée aurait pu tout autant être attribuée à un retard de croissance qu'à la molécule étudiée elle-même. Ce problème ne se pose pas si nous regardons le stade 45. La fluorescence est stable du point 0 et sur plus de quatre jours (non testé après).

En utilisant des têtards de Xénope au stade NF45 on a pu rapidement détecter les effets de perturbateurs de la signalisation périphérique des HT (hormone thyroïdienne) ainsi que des effets au niveau de la production endogène d'HT. Les concentrations de l'ordre du nanomolaire on pu être détectées en moins de 72h. Notre test a été validé sur les substances suivantes : le méthimazole (1 mM) et perchlorate (3,56 mM) (inhibition au niveau de la glande); le NH₃ (2M) (antagoniste au niveau du récepteur) et l'acide iopanoïque (10mM) (un inhibiteur de la désiodase). Les effets perturbateurs du BPA (10 mM) et du TBBPA (1 mM) peuvent aussi être détectés avec notre test rapide. Ces résultats font l'objet d'une récente publication (Fini *et al.*, 2007).

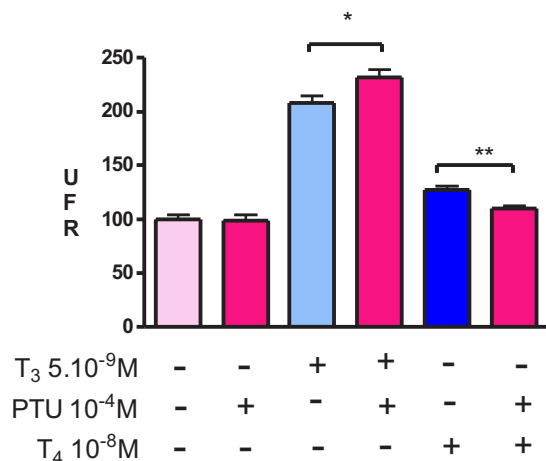


Figure 1 : L'effet avec le PTU (un antagoniste)

Notre test montre une sensibilité équivalente à celle des critères morphologiques mais avec l'avantage d'un gain de temps (3 jours contre 21 jours pour le AMA) et de ressources significatives.

Un dernier objectif de ce projet était d'évaluer, par des méthodes biologiques, l'activité de ligands naturels, synthétiques et environnementaux des récepteurs des hormones thyroïdiennes alpha et bêta. L'équipe du Dr Balaguer a établi une lignée cellulaire exprimant le récepteur TR bêta. Ils ont pu caractériser, à l'aide de cette lignée, et de la lignée TR alpha préalablement établie, l'activité de ligands agonistes connus des récepteurs TR alpha et TR bêta. Ils ont pu montrer que les ligands agonistes T₃ et GC1 et le ligand antagoniste NH-3 sont plus affins pour TR alpha que pour TR bêta. Au contraire, le TRIAC possède une meilleure affinité pour TR bêta que pour TR alpha.

Enfin, ils ont montré que plusieurs molécules environnementales suspectées d'affecter la fonction thyroïdienne, ne se liaient pas aux récepteurs TR alpha et bêta. Le mode d'action de ces molécules pourrait passer par une compétition vis-à-vis de la T3 au niveau des protéines de transport.

Discussion et conclusion

L'avantage du système transgénique est que la modification de l'activité du gène cible est l'étape finale. Si une perturbation a lieu en amont nous pourrions de la même manière voir une baisse de la production d'hormones. Nous savons que les têtards étaient capables de répondre à l'hormone bien avant la production endogène d'hormones. De plus, la réglementation REACH qui limite le recours à l'animal de laboratoire, nous encourageait à recourir à des stades embryonnaires de développement : les stades ultérieures (larvaires) répondant à la définition réglementaire de l'animal de laboratoire (Dir. 86/609/CEE). Enfin, nous

avons dans l'idée de développer une méthode de lecture de la fluorescence automatisée.

Notre approche est compatible avec le criblage de moyen à haut débit et se compare favorablement avec le test de référence reconnu par l'OCDE pour la détection de perturbateurs thyroïdiens, le test de métamorphose amphibien AMA. Cette technologie innovatrice et importante utilisant la lecture automatique montre peu de variabilité et permet de détecter l'inhibition ou l'activation de la signalisation des HT par les perturbateurs endocriniens (PE) *in vivo*.

Références

Fini, J.B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A. (2007). *Environmental science & technology* 41, 5908-5914.

Furlow, J.D., Brown, D.D., 1999 *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 13, 2076-2089.

Nieuwkoop, P. D., Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis*. New York, Garland Publishing.

Turque, N., Palmier, K., Le Mevel, S., Alliot, C., Demeneix, B.A., 2005. *Environmental health perspectives* 113, 1588-1593.

Barbara Demeneix tient à remercier Dr Marc Leonard pour sa contribution à ce projet et ses commentaires sur le rapport final.



⦿ Membres du comité d'orientation du PNRPE

MEEDDM

Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de la Mer
Commissariat Général au Développement Durable – Direction de la Recherche et de l'Innovation
Service de la Recherche – Présidence du Comité d'Orientation

ADEME

Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie

AESN

Agence de l'Eau Seine Normandie

AFSSA

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSET

Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANR

Agence Nationale de la Recherche

CEA

Commissariat à l'Énergie Atomique

MDRGF

Mouvement pour le Droit et le Respect des Générations Futures

MESR

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Ministère de la Santé et des Sports

ONEMA

Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques

Suez Environnement



🕒 Membres du conseil scientifique du PNRPE

Rémy SLAMA (Président) - Inserm, Grenoble - remy.slama@ujf-grenoble.fr

Jacques AUGER - Hôpital Cochin - jacques.auger@cch.ap-hop-paris.fr

Patrick BALAGUER - Inserm, Montpellier - patrick.balaguer@valdorel.fnclcc.fr

Yannick BARTHE - CSI-CNRS - yannick.barthe@ensmp.fr

Catherine BENNETAU-PELISSERO - ENITA, Bordeaux - c-bennetau@enitab.fr

Jean-Pierre BOURGUIGNON - CHU de Liège, Belgique - jpbourguignon@ulg.ac.be

François BRION - INERIS - francois.brion@ineris.fr

Thierry CAQUET - INRA, Rennes - Thierry.Caquet@rennes.inra.fr

Marie-Christine CHAGNON - ENSBANA, Dijon - Marie-Christine.Chagnon@u-bourgogne.fr

Sylvaine CORDIER - Inserm, Rennes - sylvaine.cordier@univ-rennes1.fr

Xavier COUMOUL - Inserm, Paris - xavier.coumoul@univ-paris5.fr

Jean-Pierre CRAVEDI - INRA, Toulouse - jcravedi@toulouse.inra.fr

Barbara DEMENEIX - CNRS- MNHN, Paris - demeneix@mnhn.fr

James DEVILLERS - CTIS, Rillieux la Pape - j.devillers@ctis.fr

Silvia FASANO - Université de Naples, Italie - silvia.fasano@unina2.it

Yves LEVI - Université Paris-Sud XI - yves.levi@u-psud.fr

Nicolas OLEA - Université de Grenade, Espagne - nolea@ugr.es

Martine PERROT-APPLANAT - Inserm, Paris - martine.applanat@inserm.fr

Alexandre PERY - INERIS - alexandre.pery@ineris.fr

Jean-Marc PORCHER - INERIS - jean-marc.porcher@ineris.fr

Daniel VAIMAN - Inserm, Institut Cochin, Paris - daniel.vaiman@inserm.fr

Maria-Christina ZENNARO - Inserm / PARCC / Hôpital Européen G. Pompidou, Paris
- maria-christina.zennaro@inserm.fr

🕒 Contact



Lionel MOULIN

MEEDDM

(Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer
en charge des Technologies vertes et des Négociations sur le Climat)

CGDD, DRI, SR

Tour Voltaire

92055 La Défense cedex

Tel : 33 (0) 1 40 81 14 30

Fax : 33 (0) 1 40 81 14 44

lionel.moulin@developpement-durable.gouv.fr

🕒 Information

www.pnrpe.fr