

# COLLOQUE PNRPE

PROGRAMME  
NATIONAL  
DE RECHERCHE  
SUR LES  
PERTURBATEURS  
ENDOCRINIENS

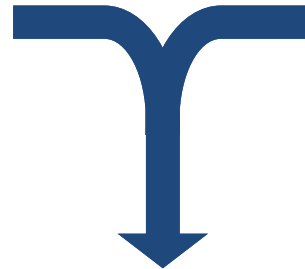
**Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne, aux différents stades de développement du poisson Médaka : mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires**



E. Barbeau, S. Paris-Palacios, S. Biagianti-Risbourg, S. Gimeno, M. Leonard, and C. Pineau

# Contexte scientifique

**Reproduction humaine**  
(*déclin spermatique*)



**Perturbateurs endocriniens**



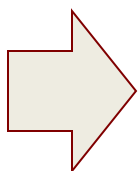
Réglementation sur l'usage des substances chimiques en cosmétologie:

## REACH

enRegistration, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques

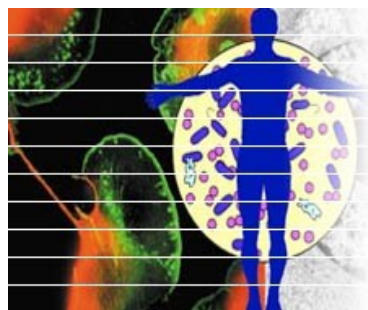
# REACH

<b>R60</b>	Peut altérer la fertilité
<b>R61</b>	Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
<b>R62</b>	Risque possible d'altération de la fertilité
<b>R63</b>	Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
<b>R64</b>	Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel



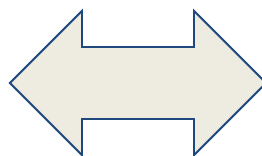
**Réglementation sur l'usage des substances chimiques dans les cosmétologies**

# Moyens d'évaluation de l'action des Perturbateurs endocriniens



**Pathologie**

Lien  
pathologie/exposition



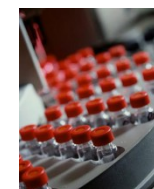
**Exposition**



**Evaluer  
l'exposition ?**



**Dosages  
des PE**

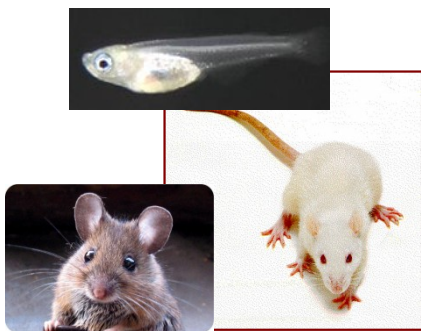


**Problème :**

**La population humaine est multi-exposée**

# Moyens d'évaluation de l'action des Perturbateurs endocriniens

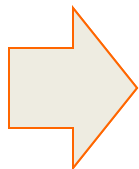
## Lien pathologie/exposition



Modèle animal en  
exposition contrôlée

Rechercher un/des  
marqueur(s) biologiques

*Problème : pas de bio-marqueurs fiables disponibles*



Mise en évidence de bio-marqueurs  
d'effets des PE oestrogéniques

# Contexte du projet

## Contraintes en Ecotoxicologie pour les industriels de la cosmétique

- ⊙ Directive sur l'expérimentation animale strictes
- ⊙ Normes OCDE strictes
- ⊙ Test actuel: dépistage sur animaux juvéniles trop long



**Nécessité d'un test de dépistage précoce**




# Objectifs du projet



- ⊙ Détection et identification de biomarqueurs protéiques liés à la perturbation endocrinienne aux stades précoces de développement chez le poisson
- ⊙ Contribution à la validation du test réglementaire en développement « extended OECD N° 210 »
- ⊙ Développement d'un essai robuste et de courte durée permettant de cribler un grand nombre de substances chimiques.

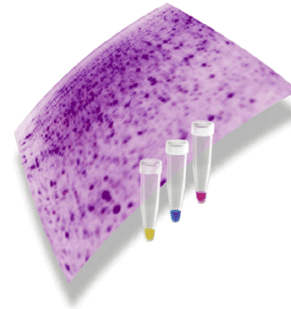
# Contraintes liées au projet

Deux contraintes importantes devant être prises en compte:

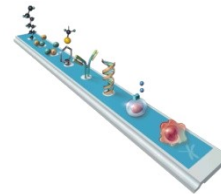
- 
- ⊙ Nécessité de travailler sur le poisson entier et non sur des organes après dissection
  - ⊙ Nécessité de développer un test rapide à mettre en place, de faible complexité technique et peu coûteux

# Choix des approches techniques

⊙ 2D-DIGE



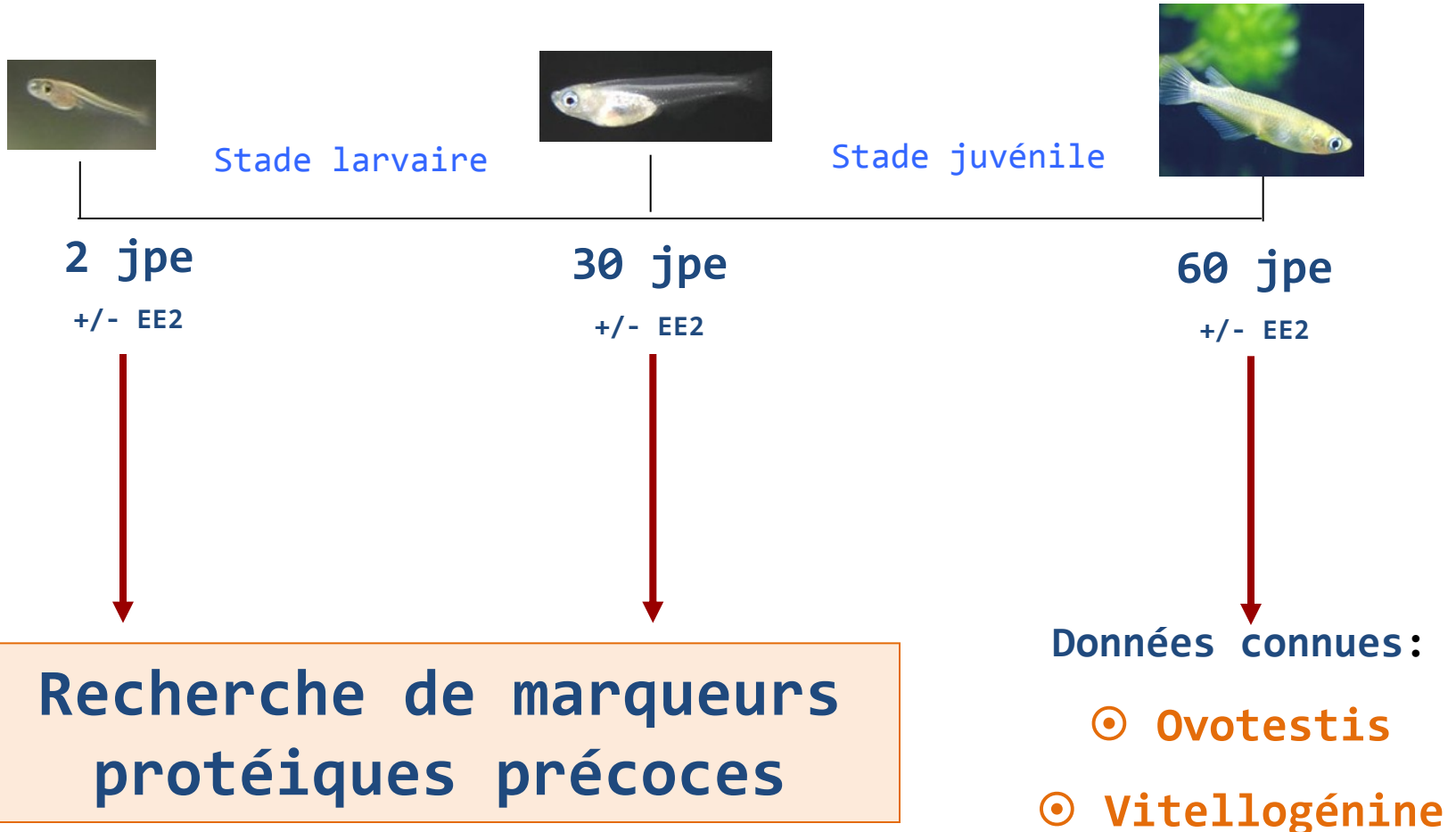
⊙ ProteinChip®



- Types de protéines étudiées/mises en évidence
- Quantité d'échantillon
- Robustesse et reproductibilité

# Stratégie expérimentale

Modèle d'étude: Medaka - Exposition à un oestrogénique fort (EE2)



# Stratégie d'analyse



Extraction des protéines sur Poisson entier

Comparaison des profils  
*DIGE et ProteinChip*



Protéines œstrogéno-modulées



Contrôles à 60 jPE  
Histologie  
Dosage Vitellogénine

**Biomarqueurs potentiels**  
*Identification par spectrométrie de masse*

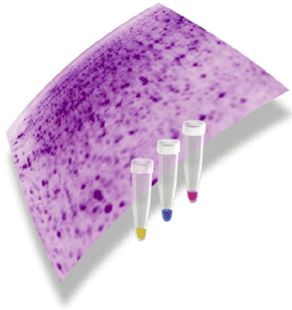


# Etapes du projet

- ⊙ Mise en place et choix de l'élevage (*souches FLFII et DrR abandonnées*)
- ⊙ Stabulation des poissons
- ⊙ Contrôle des conditions d'exposition (*dosage EE2 par LC MS/MS*)
- ⊙ Sélection des mâles (*RT-PCR Dmy sur une nageoire*)
- ⊙ Extraction des protéines totales à partir du poisson entier
- ⊙ Fractionnement des échantillons sur gel
  
- ⊙ Profilage DIGE
- ⊙ Profilage sur ProteinChip®

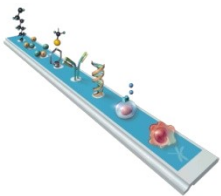
# Résultats

## 🕒 DIGE :



- 🕒 22 protéines différentielles identifiées à 60 jpe
- 🕒 8 déjà présentes à 2jpe

## 📊 ProteinChip:



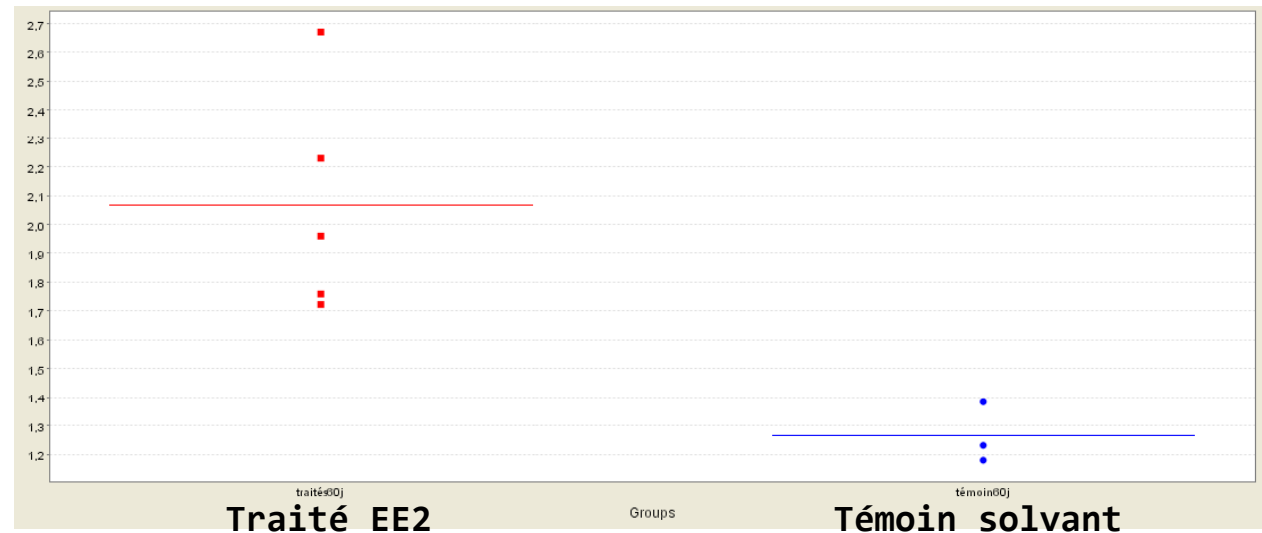
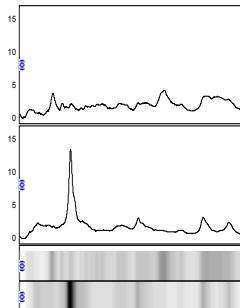
- 🕒 39 candidats biomarqueurs à 60jpe
- 🕒 9 déjà présents à 2jpe
- 🕒 La caractérisation biochimique de ces biomarqueurs est en cours.

# Résultats



## 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 EE2 à 60jpe



# Résultats



Des différences d'expression de protéines sont observables dès 2 jpe post éclosion chez le Médaka mâle traité à l'EE2:

⊙ **DIGE: 15 spots protéiques différentiels correspondent à 8 protéines non redondantes**

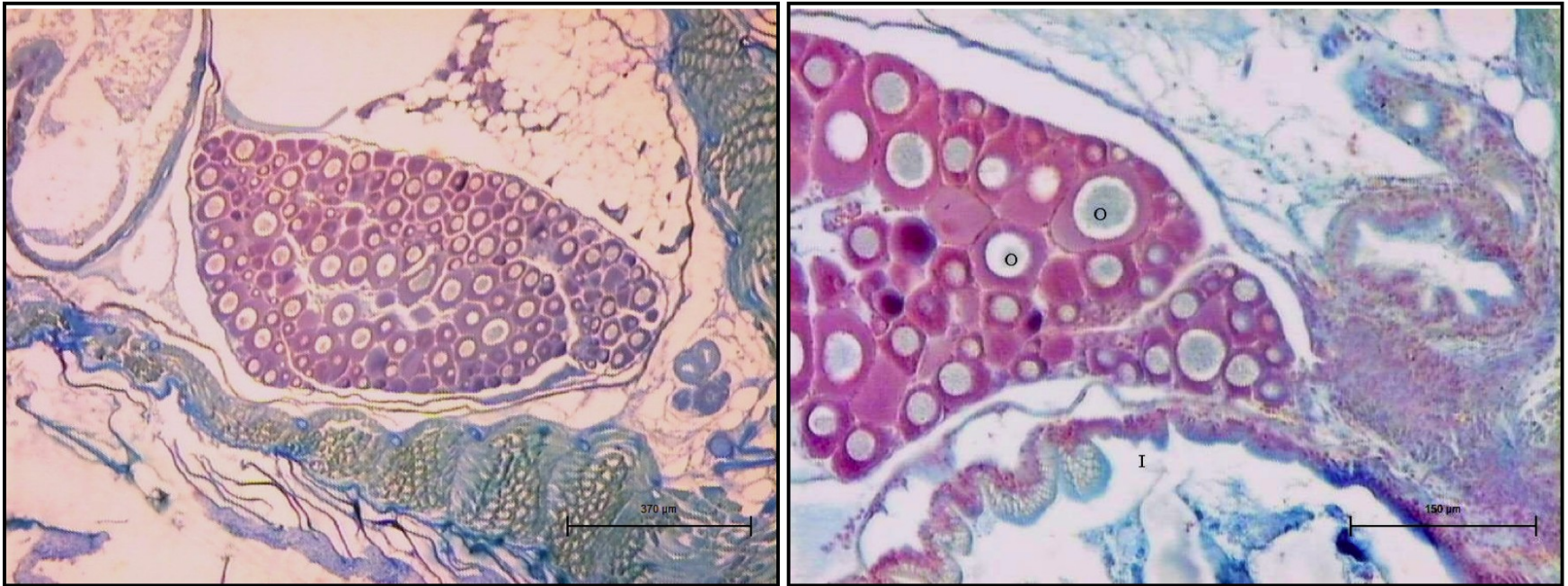
cytokeratin type II  
tubulin b2c  
tubulin b1c  
myosin heavy chain isoform mMYH-2

vitellogenin fragment  
muscle actin O1MA1  
alpha-actin  
myosin heavy chain

⊙ **ProteinChip<sup>®</sup>: 9 protéines et peptides différentiels qui restent à caractériser**

# Contrôles

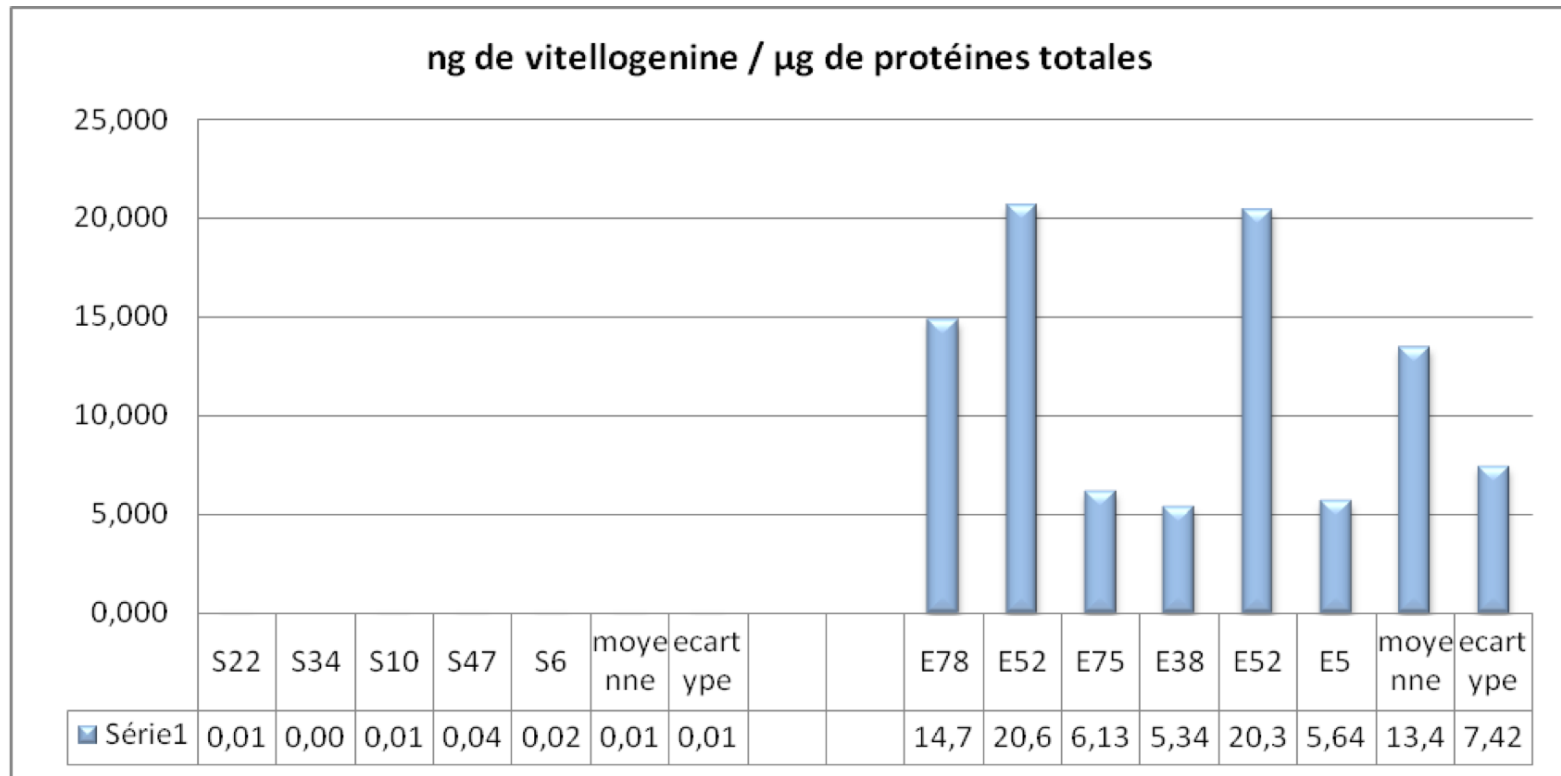
Coupe histologique de la gonade du Medaka mâle traité à l'EE2



- ⊙ Présence d'ovocytes pré-vitellogéniques ou en début de vitellogénèse (type III et IV)
- ⊙ Aucune cellules de la lignée germinale mâle

# Contrôles

## Dosage de la vitellogénine



*Dosage de la vitellogénine chez Les Médaka à 60jpe en présence de EE2 (Lot E78, E52, E75, E38, E5) ou chez Les Lots témoins (S22, S34, S10, S47, S6)*

# Résultats

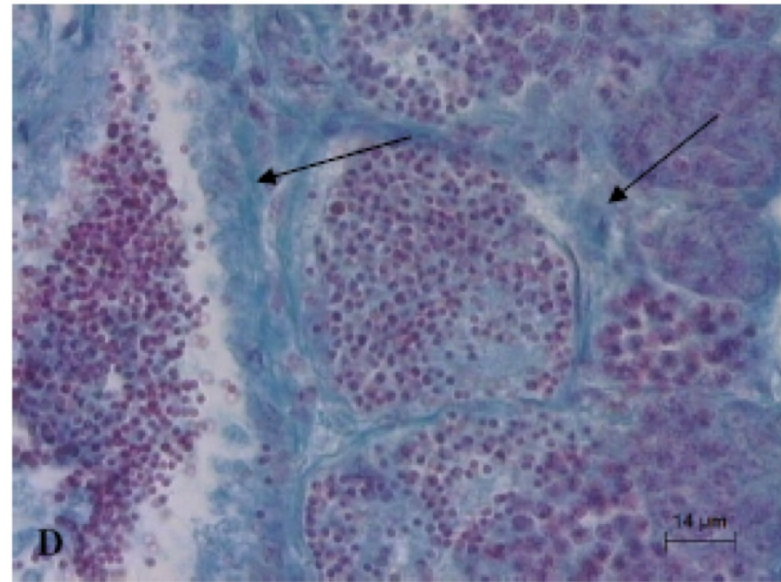
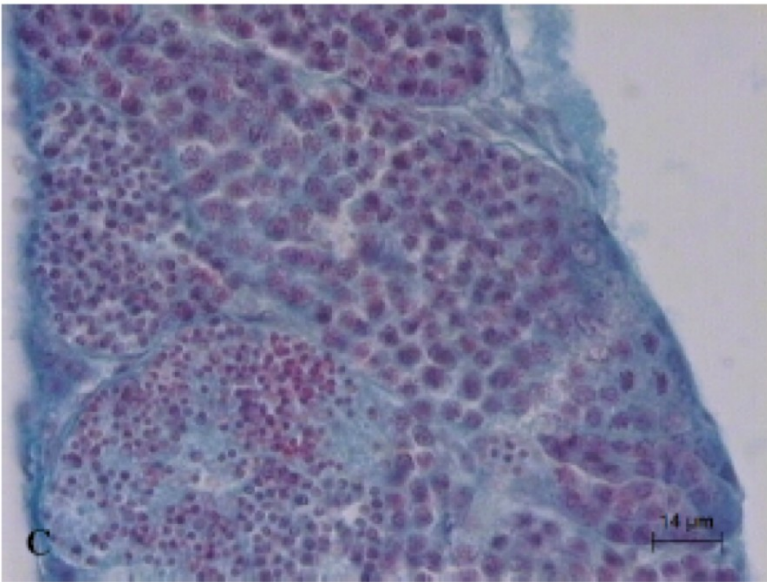
## Une nouvelle piste de travail...

	Effectif (N)	Nombre de Médaka mâles présentant les types cellulaires suivants:			
		Ovocytes	Cellules germinales mâles		
			Spermatocytes	Spermatides	Spermatozoïdes
Témoins	12	0	12	12	10
Témoins solvant (isopropanol 0,001%)	12	0	12	10	2
EE2 10 ng/L	10	10	0	0	0

Analyse histologique des gonades mâles du poisson Médaka (*Oryzias latipes*) à 60 jpe suite à une exposition à un agoniste oestrogénique puissant (17 $\beta$ -Éthinyl oestradiol, EE2)

# Effets du solvant

*Structure des gonades de Médakas mâles exposés à l'isopropanol 0,001%*



- ⊙ La plupart des tubules sont en début de spermatogenèse et ne présentent pas de spermatozoïdes murs
- ⊙ Dépôt de fibres intra-testiculaires autour des tubules



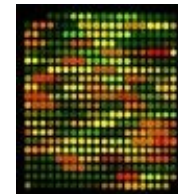
# Ce qui reste à faire

- ⊙ **Caractérisation des marqueurs différentiels identifiés sur ProteinChip**
- ⊙ **Validation statistique des biomarqueurs potentiels sur de larges cohortes**
- ⊙ **Nouvelle piste de travail: Etude de l'effet du solvant**

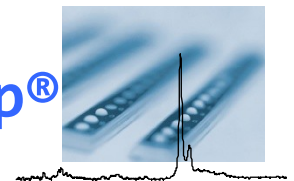
# Perspectives

## Développement de tests de criblage à haut-débit

⊙ Puces dédiées protéines/anticorps



⊙ Profiling différentiel sur ProteinChip®





**L'ORÉAL**

**Emilie Barbeau  
Marc Léonard**

**Régis Lavigne  
Frédéric Bourgeon  
Nathalie Melaine**

**Université de Reims**

**Sylvie Biagiанти  
Séverine Paris**

**Bernard Jégou**

**Andrew Tindall**

**P&G**

**Sylvia Gimeno**

**Inserm**

**U.625**  
Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITÉ DE  
**RENNES 1**

  
**Biogenouest**  
BIOGENOUEST

