

Outils de criblage in vitro et in vivo chez le poisson pour l'évaluation des effets endocriniens de polluants aquatiques

Selim Ait-Aissa, François Brion

► **To cite this version:**

Selim Ait-Aissa, François Brion. Outils de criblage in vitro et in vivo chez le poisson pour l'évaluation des effets endocriniens de polluants aquatiques. Rapport Scientifique INERIS, 2010, 2009-2010, pp.54-56. ineris-01869277

HAL Id: ineris-01869277

<https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-01869277>

Submitted on 6 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Outils de criblage *in vitro* et *in vivo* chez le poisson pour l'évaluation des effets endocriniens de polluants aquatiques



S. Aït-Aïssa/F. Brion

Les perturbateurs endocriniens (PE) regroupent des substances d'origines et de structures très diverses qui peuvent agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine et induire des effets néfastes sur la santé d'un organisme, ou sa descendance, secondairement à des changements de la fonction endocrine. En raison des risques qu'ils font courir en particulier sur la fonction de reproduction, le développement de stratégies de tests et d'outils de criblage est devenu un enjeu majeur pour identifier les substances actives et quantifier leurs effets. Dans ce contexte, les poissons apparaissent comme des organismes cibles particulièrement sensibles pour lesquels

des études démontrent des liens forts entre l'exposition environnementale à des composés PE et des effets néfastes sur les individus et les populations sauvages.

Pour étudier les effets endocrines des substances chimiques chez le poisson, l'INERIS s'appuie sur une démarche intégrant différents niveaux de complexité biologique : moléculaire (expression de gènes), cellulaire, tissulaire et de l'organisme (impacts physiologiques). La mise en œuvre de cette approche passe par le développement et la validation d'outils de caractérisation du danger des substances chimiques. Face à la diversité des molécules et des mécanismes d'action impliqués, l'utilisation de tests de criblage sensibles et spécifiques (incluant des essais *in vitro* et *in vivo* à court terme) est indispensable pour l'évaluation des substances chimiques vis-à-vis de leurs effets sur la fonction endocrine.

Dans ce contexte, le développement et la validation de tests de criblage adaptés à des espèces non mammifères constitue un enjeu important dans l'évaluation du danger des PE pour les espèces aquatiques. En effet, des différences interspèces peuvent significativement influencer sur la réponse du test. Par exemple pour les récepteurs aux œstrogènes, il existe des différences d'affinité et, dans une moindre mesure, de spécificité vis-à-vis de certaines substances, entre le récepteur humain (hER α) et celui de la truite arc-en-ciel

(rtER α). Il peut également exister des différences de réponse en fonction du contexte cellulaire étudié (type cellulaire, tissu ou espèce d'origine, etc.). Plusieurs études récentes décrivent le développement de modèles cellulaires de poisson et leurs applications en écotoxicologie pour l'évaluation de polluants émergents [4], [5], toutefois la validation de ces modèles pour l'étude des PE et leur comparaison aux modèles mammifères existants reste encore insuffisamment documentée.

DES MODÈLES CELLULAIRES

Un des objectifs de nos travaux est de développer des modèles cellulaires basés sur l'utilisation de cellules de poisson pour étudier les spécificités de réponse de récepteurs hormonaux (e.g. récepteur des œstrogènes) ou de xénobiotiques (e.g. récepteur de la dioxine, récepteur PXR) à des polluants aquatiques, en comparaison aux modèles cellulaires mammifères plus largement décrits. Nous avons ainsi mis au point une lignée cellulaire exprimant de manière stable le récepteur ER de truite arc-en-ciel (rtER) couplé au gène rapporteur de la luciférase dans les cellules hépatiques PLHC-1, dérivées du vairon (*Poeciliopsis lucida*) (Cosnefroy *et al.*, 2009). Cette nouvelle lignée, nommée PELN-rtER (PLHC-1 ERE-Luciferase-Neomycine), a été caractérisée vis-à-vis d'un panel de xéno-estrogènes et comparée à d'autres modèles *in vitro* d'œstrogénicité (tableau 1, [2]).

	PELN-rtER (lignée cellulaire de poisson PLHC1)	MELN (lignée cellulaire humaine MCF7)	PRTH (hépatocytes de truite en primoculture)
Substances chimiques	REP	REP	REP
17β-Œstradiol	1 (EC ₅₀ = 5 nM)	1 (EC ₅₀ = 0,018 nM)	1 (EC ₅₀ = 22 nM)
Œstrone	0,04	0,03	-
Œstriol	0,03	0,18	-
Éthynil-œstradiol	1,54	2,56	1,94
Hexestrol	0,50	-	0,11
DES	0,24	0,10	0,18
α-Zéaralanol	0,22	0,13	0,56
α-Zéaralénol	0,12	-	-
β-Zéaralénol	0,011	-	-
Génisteine	0,010	6,7E-04	0,013
Bisphénol A	0,016	1,9E-04	-
4-Octylphénol	2,9E-03	3,3E-04	6,3E-04
4-Nonylphénol	2,4E-04	5,3E-05	-
Benzophénone 1	1,6E-03	1,9E-06	2,3E-04
Benzophénone 2	0,014	5,5E-06	7,6E-04
Benzophénone 3	sans effet	8,8E-07	sans effet
Trihydroxybenzophénone	0,009	4,5E-06	3,8E-04

TABLEAU 1

COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE DE SUBSTANCES CHIMIQUES DANS DIFFÉRENTS TESTS CELLULAIRES.

Développés à partir de cellules de poisson (PELN-rtER, PRTH) et humaines (MELN). Le potentiel œstrogénique (REP) d'une substance, déterminé relativement à l'action de l'œstradiol, hormone de référence, varie selon le test cellulaire et s'avère globalement plus fort en cellules de poisson qu'en cellules humaines. REP = potentiel œstrogénique relatif à l'œstradiol.

- : non testé

En dépit d'une sensibilité moindre aux œstrogènes des modèles cellulaires dérivés du poisson par rapport aux modèles cellulaires d'origine humaine (MELN), l'utilisation de modèles dérivés du poisson s'avère très pertinente pour identifier les molécules environnementales qui présentent un potentiel œstrogénique relatif plus important chez le poisson (affinité relative des molécules à l'œstradiol). C'est le cas notamment de métabolites de la zéaralénone et de dérivés de la benzophénone. Les benzophénones sont des molécules largement utilisées en tant que filtre chimique anti-UV dans différents produits industriels et cosmétiques et sont de plus en plus fréquemment décrites en tant que contaminants des milieux aquatiques. Ainsi, dans nos études, ces molécules se sont-elles montrées plus affines, relativement à l'œstradiol, pour le récepteur des œstrogènes de truite que pour le récepteur humain (Molina-Molina *et al.*, 2008, Cosnefroy *et al.* 2009, Pillon *et al.* 2005). Ces résultats soulignent des différences entre les modèles *in vitro* humains et ichthyens qui seraient liées à des contextes cellulaires différents (*e.g.* hépatique *versus* mammaire) et/ou à des récepteurs de sensibilité différente.

LE PROJET NEMO

Les travaux en cours du projet NEMO, programme de recherche dédié au développement de nouvelles méthodes pour l'étude des effets des PE chez le poisson mené en partenariat avec différents organismes de recherche. INSERM, INRA, CNRS visent en particulier au développement de tests biologiques *in vitro* et *in vivo* de *screening* des substances chimiques chez une espèce modèle, le poisson zèbre.

La conduite d'expérimentations *in vivo* chez cette espèce présente de nombreux avantages : espèce de petite taille à cycle de vie court, développement embryonnaire rapide et transparence du chorion, génome bien caractérisé, maîtrise du cycle de vie permettant d'étudier différents stades de développement, espèce recommandée par l'OCDE pour l'évaluation des substances chimiques. Dans le cadre d'une thèse menée à l'INERIS, des lignées cellulaires de poisson zèbre exprimant les différents isoformes des récepteurs des œstrogènes identifiés chez ce poisson (isoformes α, β1, β2) ont été développées et sont utilisées pour caractériser les effets *in vitro* de diverses substances chimiques chez ce poisson

RÉFÉRENCES

- [1] Brion F., Tyler CR., Palazzi X., Laillet B., Porcher J. M., Garric J. and Flammarion P. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68(3): 193-217, 2004.
- [2] Cosnefroy A., Brion F., Guillet B., Laville N., Porcher J. M., Balaguer P. and Ait-Aïssa S. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicology in vitro*, 23:1450-4, 2009.
- [3] Hinfray N., Palluel O., Turies C., Cousin C., Porcher J. M. and Brion F. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 21(4): 332-7, 2006.
- [4] Laville N., Ait-Aïssa S., Gomez E., Casellas C. and Porcher J. M. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196(1-2): 41-55, 2004.
- [5] Laville N., Ait-Aïssa S., Casellas C. et Porcher J. M. Application de modèles cellulaires pour l'étude des effets potentiels des médicaments chez les poissons. *Environnement, Risques et Santé* 5(4): 284-289, 2006.
- [6] Molina-Molina J. M., Escande A., Pillon A., Gomez E., Pakdel F., Cavailles V., Olea N., Ait-Aïssa S. and Balaguer P. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 22(1): 384-395, 2008.
- [7] Tong SK., Mouriec K., Kuo MW., Pellegrini E., Gueguen MM., Brion F., Kah O., Chung BC. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells. *Genesis* 47 : 67-73, 2009.

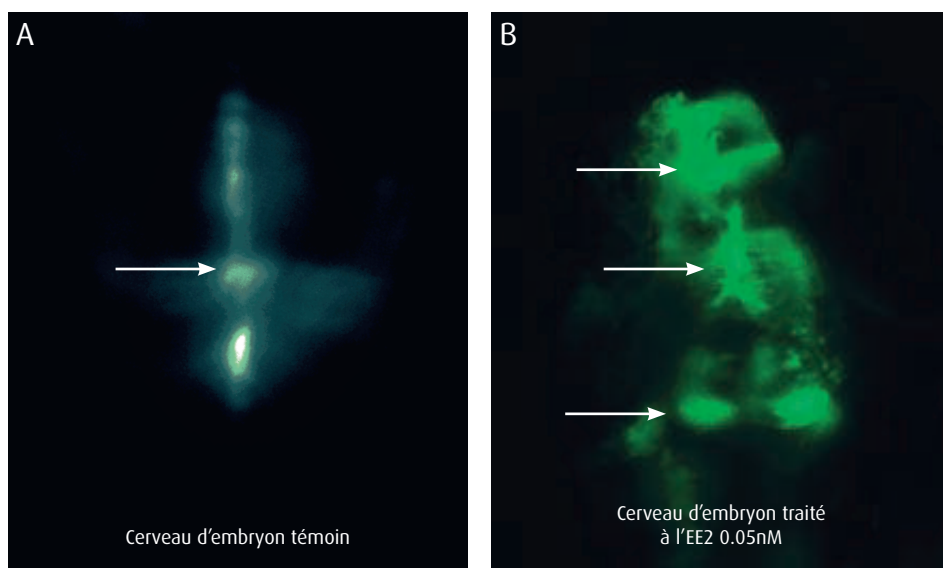


FIGURE 1
 EFFET DE L'ÉTHINYL-ŒSTRADIOL (EE2) *IN VIVO* SUR LA LIGNÉE DE POISSON ZÈBRE aroB-GFP.
 Expression *in vivo* de la GFP (Green Fluorescent Protein) chez des embryons de poisson zèbre transgénique cyp19a1b-GFP âgés de 5 jours post-fécondation. Chez le poisson témoin (A), la GFP est faiblement exprimée alors que chez l'embryon exposé (B) à l'éthinylœstradiol, la GFP est fortement induite. Cette induction de l'expression de la GFP témoigne de la capacité de la molécule à induire un effet œstrogénique *in vivo* dans le cerveau du poisson au cours de son développement embryonnaire. L'effet mesuré s'observe à des concentrations faibles d'éthinylœstradiol ce qui témoigne de la sensibilité du modèle biologique pour détecter les substances chimiques œstrogéno-mimétiques. L'analyse de la GFP se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence sur embryon vivant (méthode non invasive et non létale).

(thèse Anne Cosnefroy). Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des dangers des substances, il est indispensable de replacer les mécanismes et les effets observés *in vitro* dans le contexte de l'organisme *in vivo*.

Nos recherches menées ces dernières années ont vu la mise en place de nombreux outils moléculaires et biochimiques qui permettent d'étudier l'expression *in vivo* de gènes cibles hormono-régulés dans le cerveau (aromatase cérébrale), le foie (vitellogénine) et les gonades (enzymes de la stéroïdogénèse) de poisson zèbre, contribuant à une meilleure caractérisation du potentiel perturbateur endocrinien des substances chimiques et de leurs modes d'action [1], [3]. Plus récemment, un modèle de poisson zèbre transgénique exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur du gène cyp19a1b de poisson zèbre a été développé par l'équipe du Professeur Chung de l'université de Taiwan [7] et implanté en laboratoire à l'INERIS, en vue de sa validation. Le gène cyp19a1b code pour l'aromatase cérébrale, une enzyme clé de la stéroïdogénèse responsable de la synthèse des œstrogènes. Conformément au mécanisme d'action de l'œstradiol sur l'expression de l'aromatase B, les xéno-œstrogènes induisent de manière dose-dépendante l'expression de la GFP après une exposition de court terme chez des embryons (figure 2).

De manière très significative, les concentrations requises en éthinylœstradiol pour induire la GFP sont très faibles (de l'ordre du ng/L) et pertinentes du point de vue de la contamination environnementale. Ceci démontre la très grande sensibilité du modèle cyp19a1b-GFP vis-à-vis des œstrogènes et en fait un test *in vivo* de *screening* des xéno-œstrogènes très prometteur. Les outils mis en place permettent une évaluation des effets PE

des substances chimiques à différents niveaux d'organisation biologique chez le poisson. Leur application au criblage de diverses familles de substances chimiques est en cours et fournira des informations importantes, d'une part, sur le potentiel PE des substances, et d'autre part, sur la complémentarité des tests et par conséquent sur les stratégies de tests à mettre en œuvre pour évaluer le danger PE de polluants aquatiques.

ABSTRACT

Current concern on the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) to fish and human health has stimulated the development and implementation of screening and testing procedures, notably within the perspective of the new EU regulatory framework for chemicals (REACH). Given the complexity of modes of action and the effects of EDCs, various biological targets are to be evaluated at molecular, cellular, organism and population levels. Here, we set up a panel of new *in vitro* and *in vivo* mechanism-based tools to study chemical interaction with estrogen-regulated pathways in fish. By using stable reporter cell lines derived from fish and human cell lines, it is shown that estrogenic responses vary between models, likely due to cell context and/or cross-species differences. In addition, such *in vitro* screening of various environmental molecules allowed identifying those that exert higher estrogenic potency in fish cellular context, such as UV screens. To further assess such specific effects *in vivo*, we report the use of hormone-regulated gene expression and a transgenic line expressing green fluorescent protein under the control of brain aromatase promoter (cyp19a1b) that were developed in a model fish species, the zebrafish. The developed assays offer rapid, specific and sensitive *in vitro* and *in vivo* screening tools that could serve in EDCs testing strategies for aquatic vertebrates.