

Améliorer les tests de criblage des perturbateurs endocriniens

Nathalie Hinfray

► **To cite this version:**

Nathalie Hinfray. Améliorer les tests de criblage des perturbateurs endocriniens: Amélioration des essais in vivo pour l'identification des perturbateurs endocriniens à l'aide de poissons zèbres génétiquement modifiés. Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail, ANSES, 2019, Les perturbateurs endocriniens, pp.26-28. anses-02446269

HAL Id: anses-02446269

<https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-02446269>

Submitted on 20 Jan 2020

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.

Améliorer les tests de criblage des perturbateurs endocriniens

Amélioration des essais *in vivo* pour l'identification des perturbateurs endocriniens à l'aide de poissons zèbres génétiquement modifiés

Nathalie HINFRAY, Ineris, DRC/VIVA/ECOT, Verneuil-en-Halatte

Hélène Budzinski, Université Bordeaux 1, UMR CNRS 5805 EPOC-OASU, équipe LPTC, Talence

Étude en cours depuis 2016 (durée : 40 mois) –
Financement : 197.820 € – Contact :
nathalie.hinfray@ineris.fr

Mots-clés : produit chimique, perturbateur endocrinien, trouble reproduction, système endocrine, organisme vivant, faune aquatique, espèce humaine, exposition, test, protocole, biomarqueur, vitellogénine, vitellogenèse, œstrogène, androgène, gonade, biosynthèse, stéroïdogénèse, stéroïde, gametogénèse, gène, criblage, modèle biologique, animal transgénique, protéine fluorescente, fluorescence, enzyme, oestradiol, pesticide, azolé, antifongique, propiconazole, technique ELISA

Ces dernières années, la communauté scientifique s'est beaucoup intéressée aux perturbations du système endocrinien des organismes vivants (faune sauvage, animaux d'élevage, espèce humaine), suite à l'exposition à des produits chimiques appelés perturbateurs endocriniens (PE). Chez différentes espèces de poissons, l'exposition à des PE a été associée à des effets néfastes sur la reproduction à la fois au niveau de l'individu mais aussi au niveau de la population. Face aux risques liés à l'exposition aux PE, le développement de tests aptes à rendre compte du potentiel PE des substances et de stratégies d'évaluation des risques PE est devenu un objectif essentiel dans le cadre de la réglementation REACH⁷⁰.. Si certains tests *in vitro* et *in vivo* sont validés ou en cours de

⁷⁰ Règlement européen (No 1907/2006) entré en vigueur en 2007 pour mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques liés aux substances chimiques.

développement à l'OCDE, il n'en reste pas moins que l'amélioration des tests qui s'inscrivent dans une stratégie d'évaluation des dangers des PE efficace reste un défi majeur.

Les tests de criblage

Au niveau réglementaire, le criblage du potentiel PE des substances chimiques repose à la fois sur des tests *in vitro* et *in vivo*. Pour caractériser le potentiel PE des substances, les tests *in vivo* les plus utilisés actuellement sont :

- Le test 21 jours chez les poissons adultes⁷¹ ;
- Le test de développement sexuel chez le poisson juvénile⁷².

Dans ces tests, les oestrogènes sont détectés grâce à la mesure d'un biomarqueur, à savoir l'induction de la vitellogénine chez le poisson mâle ; et les anti-oestrogènes grâce à l'inhibition de ce même gène chez les femelles. En revanche, à l'heure actuelle, les perturbations de la voie de synthèse des androgènes et de la voie de synthèse des oestrogènes (inhibiteurs d'aromatase) ne sont prises en compte que de manière indirecte sans que les expressions/activités des enzymes impliquées ne soient mesurées.

Les modèles de poissons transgéniques

Ces dernières années, différents modèles de poissons transgéniques ont été développés. Ces animaux constituent des modèles biologiques pertinents, utiles et pratiques pour le criblage des activités PE des substances chimiques seules ou en mélanges, permettant de réduire le nombre d'animaux et le coût des analyses.

⁷¹ OCDE TG 230 : essai de 21 jours sur les poissons (dépistage à court terme de l'activité oestrogénique, et androgénique et de l'inhibition de l'aromatase).
https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-230-essai-de-21-jours-sur-les-poissons_9789264076235-fr

⁷² OCDE TG 234 : essai de développement sexuel des poissons.
https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-234-essai-de-developpement-sexuel-des-poissons_9789264122376-fr

Toutefois, peu de ces modèles biologiques sont reconnus au niveau réglementaire.

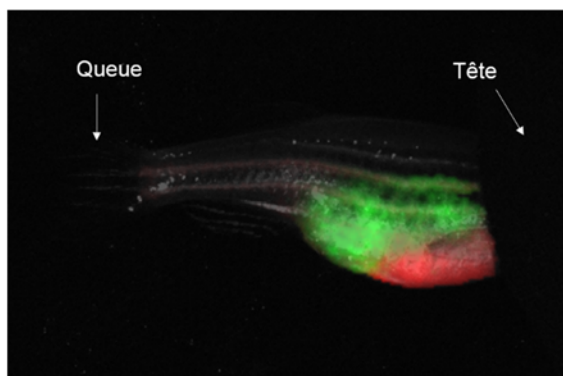


Illustration 14 : Fluorescence *in vivo* de la GFP (vert) dans les ovaires d'une femelle de la lignée *cyp19a1a-GFP* (Auteurs : Julie De Oliveira et nathalie Hinfray)

Le projet de recherche : AIDEZ

Ce projet s'inscrit dans une optique d'amélioration des tests réglementaires de criblage des PE (OCDE TG 229 et 230) à l'aide de modèles de poissons zèbres transgéniques originaux : *cyp19a1a-GFP* et *cyp11c1-GFP*. Dans ces lignées, une analyse quantitative de la fluorescence de la protéine rapportrice (GFP⁷³) *via* l'imagerie de l'animal, si possible *in vivo*, permettrait d'apporter une réponse directe quant aux potentielles perturbations des voies de biosynthèse des oestrogènes (inducteur/inhibiteur d'aromatase) et des androgènes 11-oxygénés, ce qui n'est pas envisageable avec les tests actuels.

Méthodologie

Au cours de ce projet, nous proposons de :

- Optimiser l'imagerie de la fluorescence dans les lignées de poissons zèbres pour favoriser une acquisition rapide des données et si possible *in vivo*. De plus, la pigmentation des poissons étant un frein aux mesures de fluorescence *in vivo*, les lignées transgéniques seront croisées avec une lignée mutante (casper) qui présente une absence de la pigmentation de la

peau. Ces poissons permettraient d'envisager un suivi *in vivo* de la fluorescence de la GFP au cours du temps et une visualisation des effets PE dès leur apparition et donc, une diminution de la durée du test réglementaire de détection du potentiel PE des substances.

- Étudier les effets de molécules modèles (un oestrogène de référence : l'oestradiol et un inhibiteur de la stéroïdogénèse : le prochloraz) afin de valider l'utilisation de ces lignées transgéniques pour l'étude des PE.
- Étudier les effets de substances d'intérêt environnemental pour lesquelles les dangers et les risques vis-à-vis du caractère PE sont encore peu caractérisés.

Les expositions seront réalisées en continu et par voie aqueuse pendant 21 jours. À la fin de celles-ci, les substances d'intérêt seront quantifiées dans l'eau et si possible dans les gonades permettant ainsi de faire le lien entre les concentrations d'exposition, les quantités accumulées et les effets (concentration en vitellogénine, reproduction), pour générer des données utiles dans le contexte réglementaire.

Résultats préliminaires

Les travaux réalisés jusqu'à maintenant ont permis de :

- Montrer que les paramètres physiologiques (expression de gènes, capacités de ponte, survie de la descendance) et comportementaux sont similaires dans les différentes lignées ;
- Mettre au point un protocole de mesure de la fluorescence *in vivo* dans les lignées *cyp19a1a-GFP* casper ou non, les casper permettant une meilleure détection de la fluorescence de la GFP ;
- Démontrer l'intérêt des lignées transgéniques pour l'étude des PE, et notamment la lignée *cyp19a1a-GFP* casper ou non. En effet, les expositions aux substances modèles nous ont permis

⁷³ De l'anglais "green fluorescent protein", protéine fluorescente verte issue de la méduse *Aequorea victoria*.

de réaliser un suivi *in vivo* de la fluorescence en fonction du temps et des concentrations d'exposition, sans induire de mortalité et sans perturber les capacités de reproduction des individus. De plus, les résultats obtenus sur les concentrations en vitellogénine et sur les capacités de reproduction des individus sont cohérents avec ce qui est rapporté dans la littérature pour les lignées sauvages.

Nous poursuivons ce travail en étudiant les effets PE de substances pour lesquelles les dangers et les risques sont encore peu caractérisés.

Publications :

Hinfray N., Sohm F., Caulier M., Chadili E., Piccini B., Torchy C., Porcher JM., Guiguen Y., Brion F. 2018. *Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line*. General and Comparative Endocrinology, 261, 179-189.