PNRPE

PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Détection et évaluation des effets endocrines de composés médicamenteux anti-inflammatoires sur les récepteurs aux corticostéroïdes chez le Médaka

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

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

Introduction

Responsable scientifique

- Patrick Prunet, INRA SCRIBE, Campus Universitaire de Beaulieu, Rennes

Partenaires

- Vincent Laudet, UMR CNRS 5242, ENS, Institut de Génomique Fonctionnelle, Lyon.
- Gregory Lemkine, WatchFrog S.A.S., Paris

Collaboration

- Marcel SCHAAF, Institute for Biology, Leiden University, Leiden, Pays-Bas

Budget : Participation demandée au PNRPE : 130 k€

Durée : 24 mois

les glucocorticoïdes

Le cortisol : glucocorticoïde naturel

Chez l'homme : intervient dans la réponse à l'inflammation, l'infection, la production d'énergie, etc...

Chez les poissons téléostéens : agit comme glucocorticoïde ou minéralocorticoïde et intervient dans la régulation du développement, du métabolisme, de la reproduction, de l'osmorégulation, de l'immunité mais aussi dans la réponse au stress.

Existence de Corticoïdes de synthèse

utilisés pour divers traitements (insuffisance surrénalienne, allergies, anti-inflammatoire, immunosuppresseurs) mais aussi dans l'élevage bovin (accroissement musculaire).

Récemment : Mise en évidence de glucocorticoïdes dans les eaux usées

(notamment hospitalières) et les milieux aquatiques à la sortie des stations d'épuration. Ces glucocorticoïdes pourraient interagir avec les récepteurs au glucocorticoïdes GR et perturber le système endocrine

- La présence de glucocorticoïdes issus de produits pharmaceutiques et de produits de soin personnel dans le milieu naturel fait l'objet d'une attention de plus en plus importante du fait des risques associés à ces molécules

- Il devient urgent d'analyser ces effets de perturbateurs endocriniens sur les GR afin de pouvoir détecter la présence et les effets de ces composés contaminants de l'environnement aquatique.

Objectifs

- Caractériser les effets perturbateurs de molécules chimiques d'origine médicamenteuse présentes dans l'environnement sur les voies de signalisation des récepteurs aux hormones corticoïdes

- Mettre au point un test *in vivo* pour faciliter la détection de ces résidus médicamenteux

Stratégie

- Création de lignées de Médaka transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur GR-sensible (GRE-luciférase et GRE-GFP)

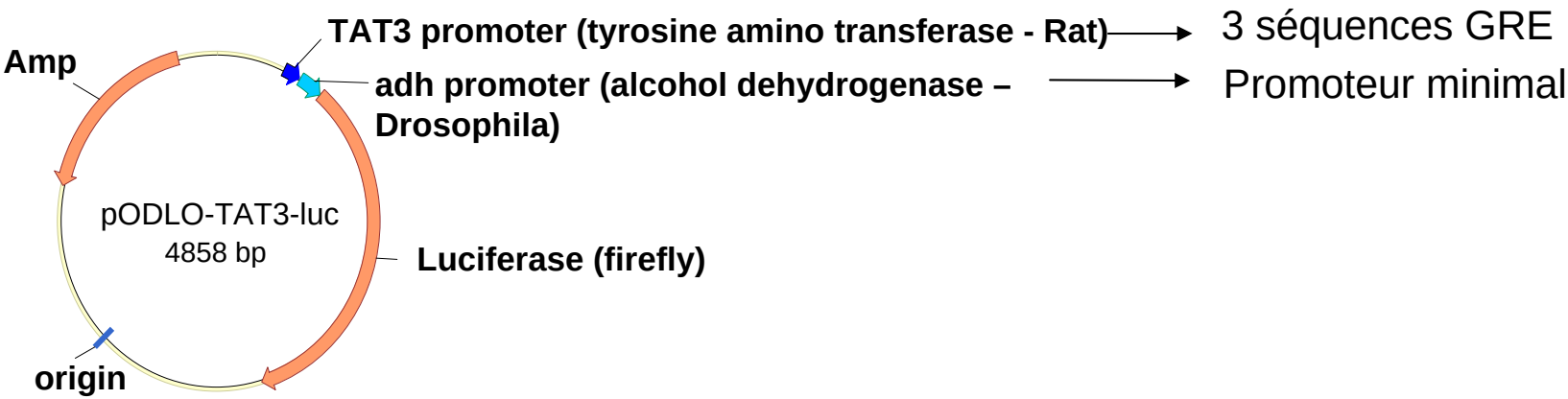
Outils

Medaka (Oryzias latipes)

- Elevage facile, Développement rapide et externe, Embryons transparents
- Nombreux outils de transgénèse disponibles
- L'un des modèles référencé par l'OCDE pour la détection des perturbateurs endocriniens (notamment oestrogéniques)

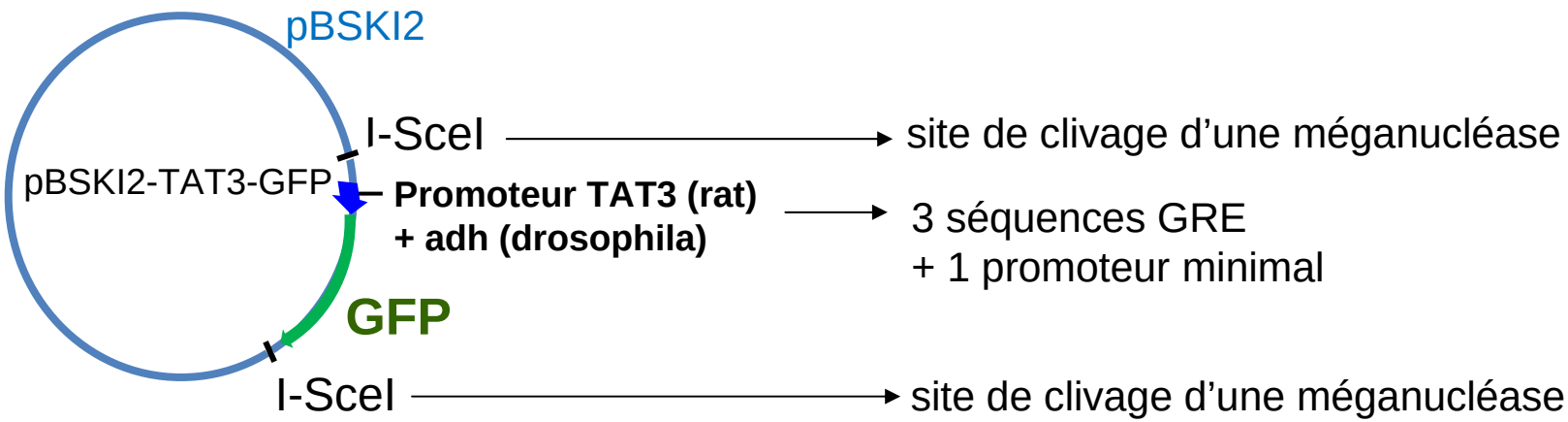
Constructions GR sensibles :

- *pODLO-TAT3-luc* :



⊙ Différentes constructions GR sensibles (suite) :

- *pBSKi2-TAT3-GFP* :



- *FKBP5-GFP* : utilisation du promoteur de l'HSP « FKBP5 » de zebrafish pour étudier l'activité de transactivation du GR. Le récepteur se lie au promoteur de FKBP5 pour stimuler l'expression du gène rapporteur GFP.

- *IL8-GFP* : utilisation du promoteur de l'Interleukine 8 de zebrafish pour étudier l'activité de transrépression du GR. Le complexe « GR/sous-unité p65 de NFkB » se lie au promoteur de l'IL8 pour inhiber l'expression du gène rapporteur GFP.

Programme de travail (1)

- Mettre au point les différents modèles de médaka transgéniques contenant les constructions GFP sous contrôle d'un promoteur régulé par le GR (INRA SCRIBE - Rennes).

  le GR reconnaît aussi des séquences « ARE » proches des séquences GRE

- D'où la nécessité de mettre au point un modèle de médaka transgénique exprimant la GFP sous contrôle d'un promoteur régulé par le récepteur aux androgènes AR pour bien discriminer les molécules à activité cortico-mimétiques des molécules à effets androgéno-mimétiques (CNRS - Lyon)

Programme de travail (2)

- Valider la spécificité des modèles transgéniques vis-à-vis du GR par l'étude de l'expression de gènes candidats régulés par le GR après exposition à des cortico-mimétiques (cortisol, dexamethasone…).

- Cribler différentes molécules et différents milieux présentant une activité potentielle de type glucocorticoide (Watchfrog - Paris).

  - Etude de l'effet de doses croissantes de substances de référence sur l'expression du transgène
  - Pour chaque substance 3 concentrations seront testées
  - Pour chaque concentration 15 alevins seront utilisés par lot et la fluorescence quantifiée après 72h
  - Afin de mettre en place un outil de surveillance continue de la qualité de l'eau, des mesures seront réalisées avec le prototype WatchFrog de lecture en flux des biomarqueurs fluorescents au sein des organismes aquatiques dans un circuit d'eau contenant les substances perturbatrices de références.

Difficultés préssenties

Choix du promoteur GR-sensible

Le projet envisage de tester plusieurs constructions régulées par le GR de manière à multiplier les chances d'avoir une construction fonctionnelle chez le medaka.

Production des lignées stables

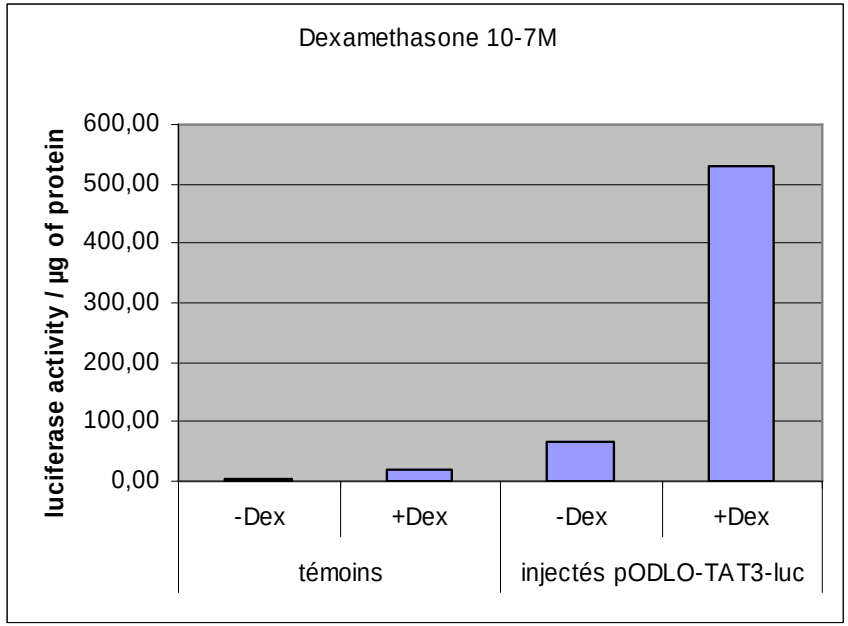
Il sera possible de travailler sur des individus F0 issus d'œufs microinjectés (stratégie appliquée chez le zebrafish avec succès dans le cadre du projet européen CASCADE avec une construction GFP-promoteur sensible aux hormones thyroïdiennes).

Résultats attendus

- L'ensemble du travail proposé devrait permettre la détection d'activité cortico-mimétique dans des milieux aquatiques contaminés par des déchets médicamenteux et plus particulièrement par une molécule à activité anti-inflammatoire (ex : diclofenac)

- Les premiers tests sur des individus de la génération F0 sont encourageants

  - construction pODLO-TAT3-luc
  - injection d'embryons au stade 1 cellule
  - sélection des survivants à 24h post-injection
  - traitement à la Dexamethasone (10^{-7}M, 24h)
  - lecture de l'activité luciférase



Induction de l'activité luciférase par la Dex10^{-7}M chez les embryons injectés pODLO-TAT3-luc