

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. 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 éthinyl 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 picro-indigocarmin et étudiées sur un microscope Leica DMR à caméra numérique et système logiciel Histolab (Microsystem).

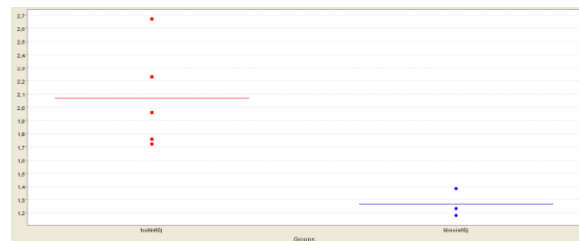
La vitellogénine a été dosée à 60 jpe grâce au kit *Medaka Vitellogenin ELISA Kit (Prod. No. V01013403; Biosense)* selon les indications du fournisseur.

Résultats

L'étude DIGE a permis la mise en évidence de 22 protéines différentiellement 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, émolase 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.