HAL
open science

Le modèle embryonnaire de poisson zèbre transgénique cyp19a1b-GFP

Cléo Tebby, François Brion, Nathalie Hinfray

To cite this version:

Cléo Tebby, François Brion, Nathalie Hinfray. Le modèle embryonnaire de poisson zèbre transgénique cyp19a1b-GFP. Rapport Scientifique INERIS, 2014, 2013-2014, pp.32-33. ineris-01869498

HAL Id: ineris-01869498

https://ineris.hal.science/ineris-01869498

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.

LE MODÈLE EMBRYONNAIRE DE POISSON ZÈBRE TRANSGÉNIQUE cyp19a1b-GFP

Cléo TEBBY
François BRION
Nathalie HINFRAY

Les perturbateurs endocriniens et en particulier les agonistes des récepteurs des œstrogènes (ou œstrogènes mimétiques) ont été largement étudiés au cours de ces dernières années en raison de leurs effets sur la reproduction et le développement des organismes aquatiques tels que les poissons. Face aux préoccupations que posent ces composés pour les espèces et les milieux aquatiques, il est important de disposer d'outils aptes à caractériser les effets des substances seules vis-à-vis du système endocrinien des poissons dans une démarche d'évaluation du risque a priori, c'est-à-dire avant que les substances ne contaminent les milieux. Il convient aussi de considérer que, dans l'environnement, les poissons sont le plus souvent exposés simultanément à des mélanges de différents produits chimiques pouvant agir comme des œstrogènes mimétiques. Présents généralement à des concentrations faibles, ils peuvent néanmoins induire des réponses biologiques et ce, même si chacune des substances du mélange est présente à une concentration inférieure à celle conduisant à un effet. Ce constat a stimulé ces dernières années de nombreux travaux visant à évaluer les effets combinés de substances en mélange pour s'assurer *in fine* que les risques associés aux mélanges de composés chimiques puissent être correctement pris en compte. Cependant, les études sur la toxicité combinée des substances requièrent des plans d'expériences complexes et sont demandeuses en ressources expérimentales ce qui explique probablement qu'elles se soient majoritairement basées jusqu'à présent sur l'utilisation de modèles *in vitro*.

Test EASZY : quantifier le potentiel œstrogénique des substances seules

Récemment, l'INERIS a développé un bioessai *in vivo* sur embryon de poisson zèbre transgénique cyp19a1b-GFP permettant de cribler rapidement les composés œstrogéniques *[1]*. Ce test dénommé EASZY (Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embrYos) se base sur la mesure d'un rapporteur fluorescent, la GFP (Green Fluorescent Protein) qui mime parfaitement l'expression du gène cyp19a1b *[2]*. L'expression du gène de l'aromatase cérébrale cyp19a1b est strictement régulée par les œstrogènes et rapidement et fortement induite dans le cerveau des embryons lorsqu'ils sont exposés à des

Références

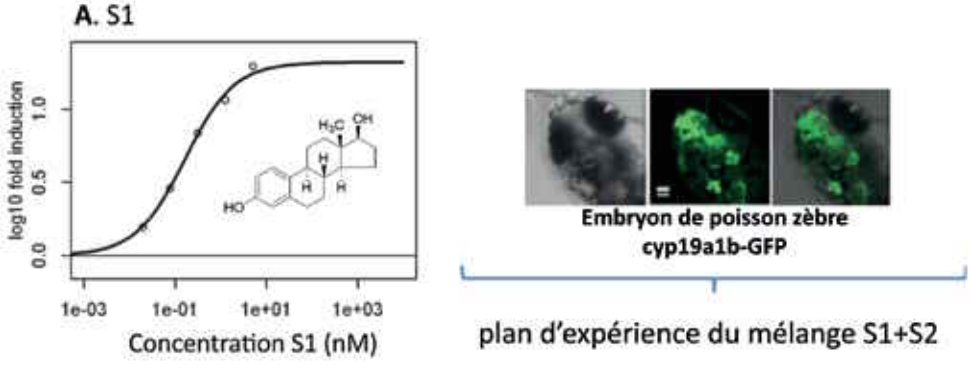
[1] *Brion F., Le Page Y., Piccini B., Cardoso O., Tong SK., Chung BC., Kah O. (2012). Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. PLoS One, 2012; 7(5):e36069.*

[2] *Tong SK., Mouriec K., Kuo MW., Pellegrini E., Gueguen MM., Brion F., Kah O., Chung BC. (2009) A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis. 2009 Feb; 47(2):67-73.*

[3] *Petersen K., Fetter E., Kah O., Brion F., Scholz S., Tollefsen KE. (2013). Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. Aquatic Toxicology, 15; 138-139:88-97.*

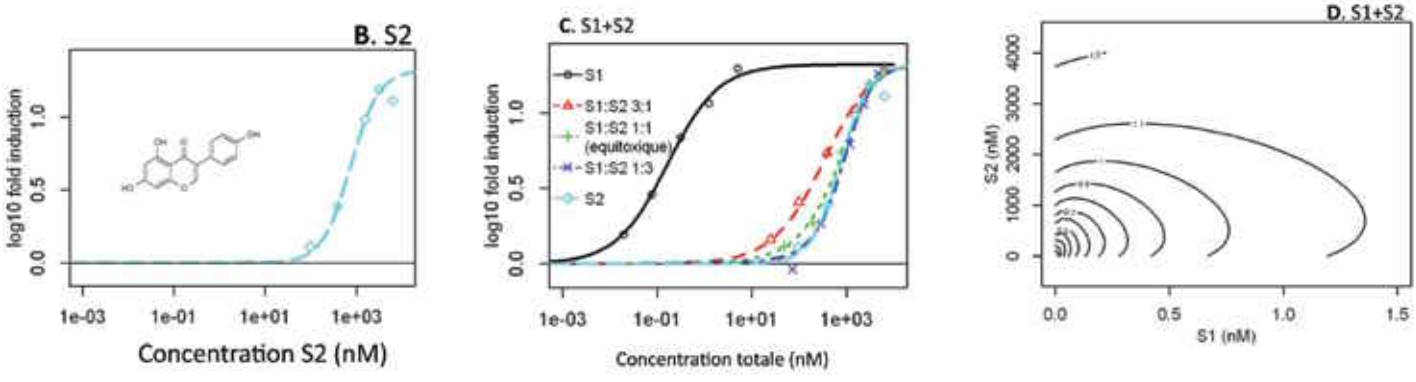
Figure 1

Effets œstrogéniques de substances (S1, S2) et en mélange (S1+S2). A-B Les plans d'expériences pour tester les mélanges sont construits à partir des données pour les substances seules. C La simplicité du modèle embryonnaire cyp19a1b-GFP permet de tester plusieurs ratios de mélanges (ex. 1:3, 1:1, 3:1) sur des gammes de concentrations étendues, avec des plans d'expériences en rayon. Les données expérimentales S1 + S2 (courbes rouge, vert, bleu ciel) sont confrontées à celles prédites par les modèles d'additivité (courbes en pointillés mélange [S1 + S2]) prédites selon le modèle de concentration addition). D L'analyse des données par le modèle de Jonker montre que le mélange S1 (œstradiol) et S2 (génistéine) a un effet antagoniste sur l'expression de la GFP.



Agonist ligands of estrogen receptors have been extensively studied in recent years because of their effects on reproduction and development of aquatic organisms such as fish. While there is a need to develop fish-specific mechanism-based bioassays to screen estrogenic potency of chemicals alone, it is also important to consider that organisms are often exposed to mixtures of endocrine disruptors (EDs) that are able to produce significant effects, even when each chemical is present at low doses that individually do not induce observable effects. We recently developed an in vivo *mechanism-based assay called EASZY that uses transgenic zebrafish cyp19a1b-GFP embryos expressing GFP under the control of the cyp19a1b promoter. EASZY is a rapid and cost-effective assay allowing to screen estrogenic activity of chemicals and was further used to explore combined effect of ED. The tested mixtures of estrogenic compounds acted predominantly in an additive manner on the expression of GFP demonstrating that combined effects of estrogenic compounds can be predicted by using dose addition, although in some cases deviations were observed. The effects of combinations of EDs from different categories were also explored by testing a binary mixture of estradiol and testosterone. Overall, we show that the use of cyp19a1b-GFP zebrafish embryo assay combined with predictive modelling is relevant to further explore the effect of complex mixture of EDs.*

substances œstrogéniques. Le bio-essai sur embryon cyp19a1b-GFP offre de nombreux avantages puisqu'il conjugue des expositions courtes (4 jours), des volumes d'eau faibles et des acquisitions simples et non invasives de la fluorescence tout en tenant compte de la biodisponibilité et de la pharmacodynamique des composés testés. Ainsi, le potentiel œstrogénique de plus d'une soixantaine de substances seules a pu être quantifié *[1]* démontrant que de nombreuses substances sont capables d'agir, directement ou indirectement, dans le cerveau des poissons en développement en modulant l'expression de l'aromatase cérébrale.

Programme MIXEZ : évaluer les effets des substances en mélange

En raison des flexibilités expérimentales qu'offre le modèle embryonnaire cyp19a1b-GFP, la question des effets des substances en mélange a été évaluée à l'aide de deux modèles d'additivité : le modèle d'addition des concentrations et le modèle d'indépendance d'action *Figure 1*. Les effets de mélanges plus ou moins complexes de deux, trois ou quatre substances œstrogéniques ont été évalués. Dans la majorité des cas, les composés agissent de manière additive sur l'expression de l'aromatase cérébrale, les modèles d'additivité permettant de prédire les effets combinés de substances agissant par un même mécanisme *[1]*. Cependant, dans certains cas des déviations par rapport aux modèles d'additivité ont pu être notées. Ainsi, les modèles d'additivité sous-estiment les effets combinés d'un mélange d'éthinylœstradiol, d'œstradiol et d'œstriol et surestiment les effets additifs d'un mélange de bisphenol A, octylphenol, éthinylœstradiol et œstriol à des concentrations élevées *[3]*. Dans le cadre de travaux engagés dans le programme MIXEZ (Effect of Mixture of Endocrine Disruptors in Zebrafish) financé par le Programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens, un antagonisme sur l'expression de l'aromatase a été mis en évidence dans le cas d'un mélange binaire d'œstradiol et de génistéine. De manière originale, l'étude s'intéresse aux effets combinés de composés appartenant à des catégories différentes en testant par exemple des mélanges binaires d'un œstrogène (l'œstradiol) et d'un androgène aromatisable (la testostérone).
L'ensemble de ces travaux démontre l'intérêt de tests biologiques simples et rapides pour le criblage de l'activité œstrogénique de substances seules et en mélanges tels que le modèle embryonnaire de poisson zèbre cyp19a1b-GFP. Combiné à de la modélisation prédictive, ce modèle permet d'appréhender la problématique des effets combinés de substances pour en comprendre et en évaluer les effets.