

BOUTEILLER Pierre



ÉVALUATION DE RÉPONSES BIOLOGIQUES MÉDIÉES PAR PXR DANS LE MODÈLE POISSON-ZÈBRE

Mémoire de fin d'étude de Master sous la direction de Selim Aït-Aïssa
et François Brion, chargés d'études à l'INERIS

Président de jury : Pr. Hervé Hubert

Directeurs de mémoire : Dr. Selim Aït-Aïssa et Dr. François Brion

2^{ème} membre de jury : Dr. Ludivine Canivet



Université de Lille

Faculté Ingénierie et Management de la santé (ILIS)

Master Ingénierie de la santé parcours Qualité, Environnement, Santé, Toxicologie option recherche

Année universitaire 2018 - 2019

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier, toute l'équipe enseignante et les intervenants professionnels de l'ILIS pour avoir assuré la partie théorique de cette deuxième année de Master Ingénierie de la Santé, QEST recherche.

Je tiens également à remercier Eric Thybaud et Jean Marc Porcher de m'avoir accueilli dans l'unité ECOT (Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*) de l'INERIS ainsi que toute l'équipe pour leur accueil et leur sympathie tout au long de mon stage : merci à Anne, Sandrine, Nathalie, Edith, Olivier et Cyril

Un grand merci à Sélim ainsi qu'à François pour m'avoir fait confiance en me confiant ce travail, et surtout pour avoir enrichi ma réflexion scientifique sur ce sujet par vos nombreux conseils et votre disponibilité.

Un grand merci à Manu pour ses conseils et son aide en culture cellulaire mais également pour sa bonne humeur !

Je remercie également Benjamin pour son aide et ses conseils sur la partie *vivo* de ce travail que j'ai découvert lors de ce stage.

Enfin je souhaite saluer tous les stagiaires et doctorants avec qui j'ai pu passer de très bon moment. J'espère qu'on se recroisera ! Merci à Audrey, Clémence, Armelle, Julie, Sana, Chloé, Alexandrine, Nina, Camille, Arnaud, Alexandre, Grazia et Lei.

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|--|
| AF-1 : <i>Activation Function 1</i> | PCB : polychlorobiphényles |
| AhR : <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> | PCDD/F : <i>Polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans</i> |
| AR : <i>Androgen Receptor</i> | PCN : prégnénolone-16 α -carbonitrile |
| ARNT : <i>AhR Nuclear Translocator</i> | PE : perturbateur endocrinien |
| BPA : bisphénol A | PestR : <i>Pesticides activation of human and zebrafish Pregnan X Receptor</i> |
| CAR : <i>Constitutive Androstane Receptor</i> | PNRPE : programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens |
| CTZ : clotrimazole | PPAR : <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor1</i> |
| CYP : cytochrome P 450 | PXR : <i>pregnane X receptor (hPXR : human PXR / zfPXR : zebrafish PXR)</i> |
| DBD : <i>DNA Binding Domain</i> | qsp : « quantité suffisante pour » |
| DES : diéthylstilbestrol | RAR : <i>Retinoic Acid Receptor</i> |
| DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène | ROR : <i>Retinoid related orphan receptor</i> |
| DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane | RN : récepteur nucléaire |
| DMENO : dose minimale pour laquelle un effet nocif a été observé | RXR : <i>Retinoid X Receptor</i> |
| EE2 : 17 α -éthynylœstradiol | Transporteur ABC : <i>ATP-binding-cassette</i> |
| ER : récepteurs nucléaires œstrogéniques | TNC : trans-nonachlor |
| FET : <i>Fish embryo test</i> | TR : <i>Thyroid Receptor</i> |
| FRET : fluorescence resonance energy transfer | US EPA : <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| gst : glutathion S-transférase | VDR : <i>Vitamin D Receptor</i> |
| HAT : <i>histone acetyl transferase</i> | XRE : <i>xenobiotic response element</i> |
| hpf : <i>heures post-fécondation</i> | ZFL : <i>ZebraFish Liver</i> |
| HRE : <i>Hormone Response Element</i> | ZXLH : <i>ZebraFish Liver XRE Luciferase Hygromycin</i> |
| INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques | μ M : micromolaire |
| kDa : kiloDalton | |
| LBD : <i>Ligand Binding Domain</i> | |
| NLS : <i>Nuclear Localisation Signal</i> | |
| nM : nanomolaire | |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 2 |
| TABLE DES FIGURES | 5 |
| INDEX DES TABLEAUX | 6 |
| INTRODUCTION | 7 |
| A. LE SYSTEME ENDOCRINIEN..... | 8 |
| B. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS | 10 |
| 1. <i>Définitions</i> | 10 |
| 2. <i>Origines et natures chimiques des PE</i> | 10 |
| 3. <i>Effets adverses provoqués par le PE</i> | 12 |
| 4. <i>Modes d'actions des PE</i> | 13 |
| C. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES..... | 14 |
| 1. <i>Définition et structure</i> | 14 |
| 2. <i>Classifications et modes d'actions des RN</i> | 15 |
| 3. <i>Interactions croisées (« crosstalk ») entre des voies de signalisations de RN</i> | 17 |
| D. PREGNANE X RECEPTOR | 17 |
| 1. <i>Fonction</i> | 18 |
| 2. <i>Rôle du récepteur PXR</i> | 20 |
| 3. <i>Action synergique de PE sur le récepteur PXR</i> | 20 |
| 4. <i>Différences inter-espèces</i> | 21 |
| E. LE POISSON-ZEBRE..... | 22 |
| 1. <i>Généralités</i> | 22 |
| 2. <i>Avantages du modèle poisson-zèbre pour l'expérimentation</i> | 23 |
| 3. <i>Le clotrimazole : un ligand de PXR chez l'Homme et le poisson-zèbre</i> | 23 |
| OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE | 25 |
| MATERIELS ET METHODES | 27 |
| A. MODELES IN VITRO | 27 |
| 1. <i>Lignées cellulaire ZFL et ZXLH</i> | 27 |
| 2. <i>Cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre</i> | 27 |
| a. <i>Conditions d'élevages des poissons-zèbre</i> | 27 |
| b. <i>Dissections et mises en cultures des hépatocytes</i> | 28 |
| 3. <i>Test de viabilité cellulaire « MTT »</i> | 28 |
| 4. <i>Activité EROD</i> | 28 |
| 5. <i>Activité luciférase</i> | 29 |
| B. MODELES IN VIVO | 29 |
| 1. <i>Modèle embryonnaire</i> | 29 |

| | | |
|----------------------------|--|-----------|
| 2. | <i>Fish Embryo acute Toxicity (FET) Test (OCDE 236)</i> | 29 |
| 3. | <i>Expositions des modèles in vivo et in vitro</i> | 32 |
| C. | ANALYSE GENES CIBLES..... | 33 |
| 1. | <i>Extraction des ARN totaux</i> | 33 |
| 2. | <i>RT-PCR</i> | 34 |
| 3. | <i>PCR quantitative en temps réel (qPCR)</i> | 34 |
| RÉSULTATS | | 37 |
| A. | MISES AU POINT METHODOLOGIQUES..... | 37 |
| 1. | <i>Mise en place de la culture primaire</i> | 37 |
| 2. | <i>Détermination de la densité cellulaire optimale</i> | 38 |
| 3. | <i>Détermination du nombre d'embryons de poissons-zèbre nécessaires à l'extraction d'ARN totaux</i> | 38 |
| B. | DETERMINATION DE LA TOXICITE AIGÛE DU CLOTRIMAZOLE IN VITRO ET IN VIVO | 39 |
| C. | ANALYSES DE L'EXPRESSION DE GENES CIBLES DE PXR ET AHR IN VITRO ET IN VIVO | 40 |
| 1. | <i>Expression basale chez les embryons de poisson-zèbre au cours du développement et dans les hépatocytes en culture</i> | 40 |
| 2. | <i>Effet de la dioxine (TCDD) sur l'expression des gènes cibles in vivo</i> | 42 |
| 3. | <i>Effet du clotrimazole sur l'expression des gènes cibles in vivo</i> | 44 |
| 4. | <i>Expression des gènes cibles in vitro</i> | 45 |
| DISCUSSION | | 47 |
| 1. | <i>Analyse de l'expression constitutive des gènes codant pour les récepteurs zfAhR, zfPXR et des cytochromes P450 (phases 1, 2 et 3)</i> | 47 |
| 2. | <i>Effet de la dioxine (TCDD) sur l'expression des gènes cibles in vivo et in vitro</i> | 49 |
| 3. | <i>Effets du clotrimazole (CTZ) sur l'expression des gènes cibles in vivo et in vitro</i> | 50 |
| CONCLUSION | | 53 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 54 |
| ANNEXES | | I |

TABLE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Le système endocrinien chez le poisson-zèbre (Le Fol, 2015)..... | 9 |
| Figure 2 : Quelques exemples de la diversité structurale des perturbateurs endocriniens (Balaguer et al., 2017)..... | 11 |
| Figure 3 : Modes d’actions des perturbateurs endocriniens (d’après Brion, Comm. Pers.)..... | 14 |
| Figure 4 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires (Creusot, 2011)..... | 14 |
| Figure 5 : Mécanisme d'action général des récepteurs nucléaires (Janosek et al., 2006)..... | 16 |
| Figure 6 : Modes d’actions des récepteurs nucléaires en monomères ou dimères (Brion, Comm. Pers.)..... | 16 |
| Figure 7 : Fonctionnement d’un RN « xénocapteur » en réponse à la liaison d’un xénobiotique (d’après Nakata et al., 2006)..... | 18 |
| Figure 8 : Comparaison des séquences d'acides aminés DBD/LBD du PXR et CAR humains et de leurs orthologues correspondants chez onze autres espèces de vertébrés (d’après Zhao et al., 2015)..... | 21 |
| Figure 9 : Deux poissons-zèbre de souches AB (Smit, 2013)..... | 22 |
| Figure 10 : Structure chimique du clotrimazole (Crowley and Gallagher, 2014)..... | 24 |
| Figure 11 : Démarche expérimentale..... | 25 |
| Figure 12 : Principe du Fish Embryo Test (d’après OCDE 2013)..... | 31 |
| Figure 13 : Observations considérées comme léthales lors du Fish Embryo Test (d’après OCDE 2013)..... | 31 |
| Figure 14 : Cinétiques d'expositions testées sur les cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre..... | 33 |
| Figure 15 : Représentation schématique de la PCR basé sur TaqMan (D'après Thermo-Fischer Scientific)..... | 35 |
| Figure 16 : Évolution au cours du temps (3 à 96h) des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre (densité cellulaire : 500 000 cellules par puits). Visualisation au microscope inversé à différents grossissements..... | 37 |
| Figure 17 : Détermination de la densité cellulaire optimale pour l'extraction d'ARN totaux..... | 38 |
| Figure 18 : Détermination du nombre d'embryons de poissons-zèbre nécessaires pour l'extraction d'ARN totaux en fonction du stade de développement exprimé en heures post-fertilisation (hpf). Les chiffres sur les histogrammes représentent le nombre d'individus poolé (n = 1-10)..... | 39 |
| Figure 19 : Absence d'effet du clotrimazole sur la viabilité cellulaire (test au MTT) dans la lignée cellulaire ZFL après une exposition de 24h (n = 6)..... | 39 |
| Figure 20 : Expression basale des gènes : cyp1a ; cyp2aa12 ; ahr2 ; cyp3a65 ; cyp3c1 et nr1i2 au cours du développement embryonnaire (ANOVA et post-hoc de Tuckey, * = p <0,05 ; n=4)..... | 41 |

Figure 21 : Expression des gènes cibles après expositions d'embryons de poisson-zèbre à une concentration de dioxine (0,05 nM, orange) à différents stades développementaux (ANOVA et post-hoc de Tuckey, * = p <0,05 ; n=4). Pour le gène cyp1a, les expressions chez les témoins (noir) et les embryons exposés à la TCDD sont représentées sur des échelles différentes par soucis de clarté (échelle de gauche TCDD ; échelle de droite : témoins)..... 43

Figure 22 : Expression géniques après expositions d'embryons de poissons-zèbre à une gamme de clotrimazole à différents stades développementaux (n=4). 44

Figure 23 : Expression géniques après expositions de cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre à la TCDD et au clotrimazole (CTZ) à différents temps d'expositions (n=2). Pour le gène cyp1a, les expressions chez les témoins (noir), les embryons exposés au CTZ (bleu) et à la TCDD sont représentées sur des échelles différentes par soucis de clarté (échelle de gauche TCDD ; échelle de droite : témoins et CTZ)..... 46

Figure 24 : Proposition d'activation par la dioxine de voies de signalisations zfAhR directe et zfPXR via un crosstalk positif zfAhR-zfPXR (modifié d'après Tseng et al., 2005) (ARNT : AhR Nuclear Translocator, DRE : Dioxin Response Element)..... 50

Figure 25 : Proposition d'activation par le clotrimazole de voies de signalisations zfPXR directe et zfAhR via un crosstalk positif zfPXR-zfAhR (modifié d'après Tseng et al., 2005) (ARNT : AhR Nuclear Translocator , DRE : Dioxin Response Element)..... 52

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Origines et natures des substances PE (Creusot, 2011 ; Diamanti-Kandarakis et al., 2009)..... 11

Tableau 2 : Exemples historiques d'effets de perturbations endocrines (d'après Creusot, 2011).. 12

Tableau 3 : Ligands du RN PXR chez l'homme et les poissons téléostéens..... 19

INTRODUCTION

De nombreuses activités anthropiques entraînent le rejet croissant dans les différents compartiments de l'environnement d'une grande diversité de substances préoccupantes aux niveaux sanitaire et environnemental. Parmi ces substances, de plus en plus de composés ont été décrits comme étant des perturbateurs endocriniens (PE) (De Coster and van Larebeke, 2012 ; Kortenkamp, 2014). Le caractère PE d'une substance correspond à sa capacité à altérer le développement, la reproduction et l'homéostasie des organismes exposés à travers de multiples mécanismes d'action (Kavlock et al., 1996). Face au risque associé à l'exposition des populations à la fois humaines mais aussi animales, une attention particulière a été donnée, ces dernières années, à l'étude de ces molécules (Hotchkiss et al., 2008) et notamment à leurs mécanismes d'actions. Cette prise de conscience des risques posés par les PE s'est également traduite au niveau réglementaire avec l'ajout de la notion de PE au cœur du règlement REACH (*i.e.* règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques) ou plus récemment avec l'adoption depuis le 13 décembre 2017 par les pays membres de l'Union Européenne d'un accord sur une définition commune du terme perturbateurs endocriniens comme « substance qui aurait un mode d'action endocrinien et serait connue pour exercer des effets adverses pour la santé humaine comme conséquence de son mode d'action hormonale » (Parance, 2018). D'autant plus que le risque associé au PE s'accompagne d'un coût non négligeable pour la société qui pourrait attendre, selon une étude publiée en 2015, 157 milliards d'euros par an rien que pour l'Europe (Trasande et al., 2015).

En réponse à ces interrogations sur la problématique des PE et face aux risques sanitaires et environnementaux, un programme national de recherche axé sur la thématique des PE (PNRPE) à vue le jour en France dès 2005. Parmi les projets en cours en lien avec ce programme national de recherche, le projet PestR (*Pesticides activation of human and zebrafish Pregnane X Receptor*) dans lequel s'intègre mes travaux, coordonné par le Dr. Balaguer (IRCM INSERM U1194, Montpellier), correspond à une collaboration entre différents laboratoires à savoir, l'Institut de Recherche en Cancérologie (IRCM, INSERM U1194), le Centre de Biochimie Structurale de Montpellier (INSERM U1054), le laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux de l'Université de Bordeaux (UMR CNRS 5805 EPOC) et l'unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo* de l'INERIS. Ce projet vise notamment à étudier l'effet de pesticides sur le *Pregnane X Receptor* (PXR) humain mais également de poisson-zèbre afin d'une part de mieux comprendre son rôle dans la régulation de la détoxification et d'autre part mieux appréhender la toxicité des pesticides pour ces espèces (Balaguer, Comm. Pers).

Plus précisément, l'objectif des travaux menés au cours de ce stage correspond à évaluer les réponses biologiques médiées par le récepteur PXR lors de l'exposition de différents modèles *in vitro* et *in vivo* dérivés du poisson-zèbre à un perturbateur endocrinien d'intérêt, le clotrimazole (CTZ). Pour répondre à la question scientifique, une première partie bibliographique vise à décrire de manière

générale les PE, leur nature ainsi que leurs modes d'actions, dont leurs interactions avec les récepteurs nucléaires et le récepteur PXR, en s'intéressant également au modèle expérimental utilisé : le poisson-zèbre et à la substance étudiée : le clotrimazole. Par la suite, sera développée la démarche expérimentale et les choix méthodologiques liés à ce projet pour finalement présenter puis discuter les résultats scientifiques issus des différentes expérimentations mises en œuvre.

A. Le système endocrinien

Le système endocrinien correspond à l'un des principaux systèmes de communication de l'organisme avec le système nerveux et le système immunitaire. Le système endocrinien est composé de glandes et de cellules endocrines présentes dans différents organes qui vont pouvoir communiquer entre-elles par le moyen d'hormones. Les hormones correspondent ainsi à des messagers chimiques du système endocrinien mais également à des régulateurs qui vont notamment permettre le maintien de l'homéostasie en participant à la régulation des grandes fonctions de l'organisme comme la nutrition, le sommeil, le stress, la reproduction, le comportement, la croissance ou encore le métabolisme énergétique ou phosphocalcique (Figure 1 ; Le Fol, 2015). Actives même à de faibles concentrations, les hormones vont être libérées dans le sang par une glande ou une cellule endocrine et vont pouvoir agir sur des cibles proches ou à distances. La fixation de l'hormone sur son récepteur spécifique va induire une réponse proportionnelle à la quantité d'hormone sécrétée par le biais d'une cascade de réactions au niveau intracellulaire pouvant notamment conduire à des modifications de l'activité cellulaire (Le Fol, 2015).

Le système endocrinien des poissons téléostéens dont fait partie le poisson-zèbre, présente quelques spécificités par rapport à celui des mammifères (Eide et al., 2018). Ses glandes endocrines sont l'hypophyse, la thyroïde, la glande pinéale, les îlots pancréatiques, le corpuscule de Stannieux, l'urophyse, la glande interrénale, l'ovaire et le testicule. Des cellules endocrines sont également retrouvées dans le foie et l'estomac (Figure 1).

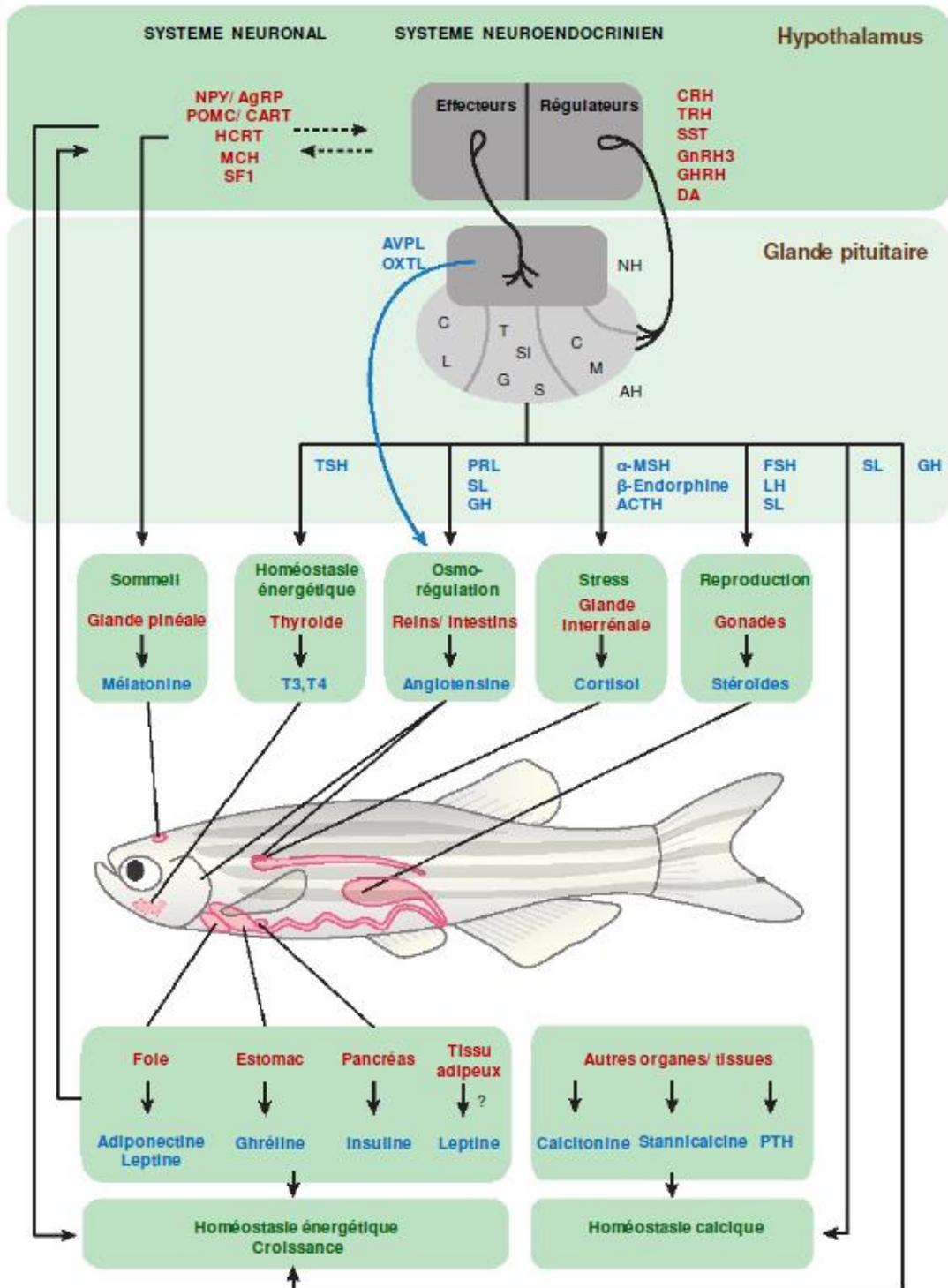


Figure 1 : Le système endocrinien chez le poisson-zèbre (Le Fol, 2015)

B. Les perturbateurs endocriniens

1. Définitions

Il existe différentes définitions des PE ajoutant chacune des notions essentielles pour leur caractérisation. Tout d'abord il s'agit de substances qui : « interfèrent avec les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du comportement » (Kavlock et al., 1996).

Une seconde définition vient compléter cette la première en ajoutant la notion d'effet néfaste : « substances exogènes qui provoquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance, secondairement à des changements de la fonction endocrine » (OCDE, 1997).

Par la suite, l'OMS repris ces différentes notions dans la définition suivante : « substance ou mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations » (World Health Organization, 2002).

Les PE constituent donc une famille de composés définis non pas par leur nature chimique mais bien par leur effet biologique (Creusot, 2011).

2. Origines et natures chimiques des PE

Avant de détailler les effets adverses que les PE peuvent engendrer, il convient de s'intéresser à la diversité de molécules PE et notamment à leurs origines et leurs natures chimiques.

Une première distinction peut être réalisée sur l'origine des PE. Il existe aussi bien des substances synthétiques que naturelles présentant un caractère PE. Les phyto-œstrogènes, par exemple, sont présents naturellement dans des végétaux et vont alors pouvoir être consommés à la fois par des animaux mais également par l'Homme et du fait de leur homologie de structure avec l'œstradiol, ils vont pouvoir entrer en compétition avec celui-ci. D'autres composés classés comme PE seront de nature synthétique (De Coster and van Larebeke, 2012). Ces substances synthétiques constituent la majorité des PE connue actuellement. Il existe une grande diversité dans les composés de synthèses présentant un caractère PE (Figure 2). Parmi ces substances d'origines anthropiques, sont retrouvés des substances de classes chimiques diverses. En Tableau 1 est synthétisée cette seconde distinction pouvant être réalisées sur les origines et les classes chimiques diverses des PE.

Tableau 1 : Origines et natures des perturbateurs endocriniens (Creusot, 2011 ; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

| Origines | | Classes chimiques | Exemples |
|------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---|
| Substances naturelles | | Phyto-oestrogènes | Isoflavones (génistéine, coumestans, lignans) |
| | | Hormones naturelles | Oestradiol, testostérone |
| Substances d'origines anthropiques | Agricoles | Fongicides | Vinclozolin, mancozèbe |
| | | Insecticides | Lindane, chlordécone, DDT |
| | | Herbicides | Atrazine, glyphosate |
| | Industrielles et urbaines | Métaux | Cadmium |
| | | Produits pharmaceutiques | Clotrimazole, DES, tamoxifène |
| | | Surfactants | Alkyphénols |
| | | Plastifiants | Bisphénol A, phtalates |
| | | Hormones de synthèse | 17a-éthinylestadiol (EE2) |
| | | Composés halogénés persistants | Dioxines, furanes, PBDE, HAP |
| | | Produits cosmétiques | Benzophénones, parabène |

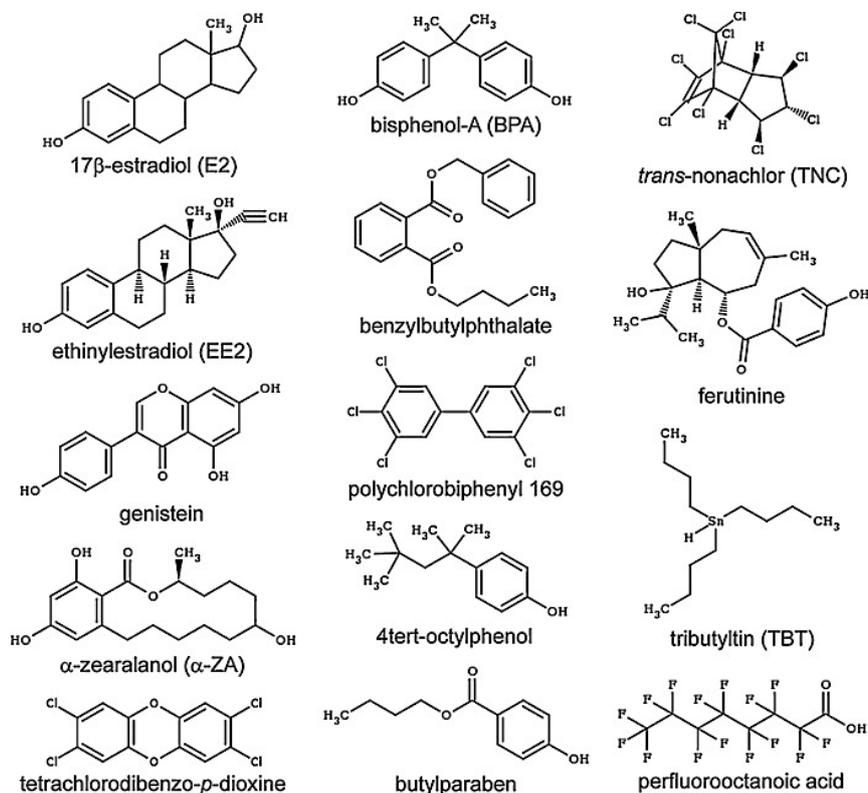


Figure 2 : Quelques exemples de la diversité structurale des perturbateurs endocriniens (Balaguer et al., 2017).

Tandis que les phyto-œstrogènes seront, facilement métabolisables par les organismes exposés en raison de leur hydrophilie et leur faible bioaccumulation dans l'organisme (Fénichel and Brucker-Davis, 2008 ; Le Fol, 2015), la plupart de ces PE d'origine synthétique présente un fort caractère lipophile leur permettant de se bioaccumuler dans les tissus adipeux et d'être difficile à éliminer par les organismes vivants (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

3. Effets adverses provoqués par le PE

Historiquement, les premiers exemples de perturbations endocrines ont été rapportés depuis les années 1980 dans l'environnement sur des espèces animales. Depuis, de nombreuses molécules ont pu être identifiées. La tableau 2 reprend quelques-uns de ces exemples observés sur différentes espèces et les substances incriminées associées (revue par Hotchkiss et al., 2008).

Tableau 2 : Exemples historiques d'effets de perturbations endocrines (d'après Creusot, 2011).

| Organismes | Effets biologiques | Molécules incriminées |
|---------------------|---|--|
| Poissons | Féminisation intersexe | Effluents de stations d'épurations (EE2, alkylphénols) (Desbrow et al., 1998 ; Sanchez et al., 2011) |
| | Masculinisation | Effluents industriel (trenbolone) (Parks et al., 2001) |
| Gastéropodes | Imposex (apparition d'un pénis chez la femelle) | Tributylétain (Matthiessen and Gibbs, 1998) |
| Alligators | Anomalie du développement | DDT (Guillette et al., 1994) |
| Oiseaux | Amincissement de la coquille d'œuf | Dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) (Blus et al., 1972) |
| | Modification du comportement | DDE et PCB (McArthur et al., 1983) |
| Otarie | Reproduction (succès reproducteur) | PCB (Reijnders, 1986) |
| Homme | Neurologique, immunitaire | PCB, PCDD/F (Guo et al., 1995) |
| | Comportemental, reproduction (réduction spermatozoïdes) | DES (Colborn et al., 1993) |

Chez le poisson, l'exposition à des effluents de stations d'épurations contenant notamment des xéno-œstrogènes (EE2, alkylphénols) va entraîner une féminisation dont le biomarqueur est une synthèse anormale de la vitellogénine chez les mâles. Physiologiquement la vitellogénine est une phospholipoprotéine produite chez les femelles par les cellules hépatiques sous le contrôle hormonal de l'œstradiol.

Cette féminisation progressive d'une population de vairon (*Pimephales promelas*) exposée à des faibles concentrations d'EE2 (5 à 6 ng/L) intervient du fait d'altération gonadique chez les mâles notamment sur la spermatogenèse entraînant une intersexualité. Ces phénomènes d'altérations gonadiques sont également observés chez les femelles avec des retards de développement ovarien (Kidd et al., 2007). Des phénomènes d'intersexualité ont été également observé sur des populations de goujons (*Gobio gobio*) exposées à un effluent à proximité d'une industrie pharmaceutique (Sanchez et al., 2011). Là aussi des taux de vitellogénine élevés ont été relevés chez les mâles accompagnés d'une hypertrophie gonadique. A la différence près, que dans cette étude l'effluent ne présentait pas d'activité œstrogénique mais « *steroid-like* » du fait de la présence de différents produits pharmaceutiques dont des corticostéroïdes (e.g. dexaméhtasone) ou des progestatifs (e.g. levonorgestrel) (Creusot et al., 2014). Il pourrait néanmoins s'agir d'actions indirectes de ces composés sur les voies de signalisations du récepteur des œstrogènes. La conséquence de l'exposition de ces populations de poissons dans ces deux exemples correspond à un effondrement progressif de l'effectif de la population.

4. Modes d'actions des PE

L'importante diversité d'effets adverses provoqués par le PE s'accompagne par de multiples modes d'actions des PE. Ces derniers sont donc capables d'agir à différentes étapes du cycle de vie des hormones : dès leur biosynthèse, lors de leur transport, lorsqu'elles se lient aux récepteurs, en interférant avec leurs actions physiologiques ou encore lors de leur catabolisme (Figure 3).

La liaison des PE sur les récepteurs nucléaires constitue un mode d'action essentiel des PE. Certaines substances, comme la génistéine, ou le bisphénol A (Figure 2), vont posséder une analogie de structure chimique avec le ligand naturel du récepteur. Pour revenir à l'exemple précédent, le bisphénol A possède une analogie de structure chimique avec le ligand naturel des récepteurs œstrogéniques (ERs) : l'œstradiol (E2) et va agir comme un composé œstrogène-mimétique (Delfosse et al., 2012 ; N'Tumba-Byn, 2013).

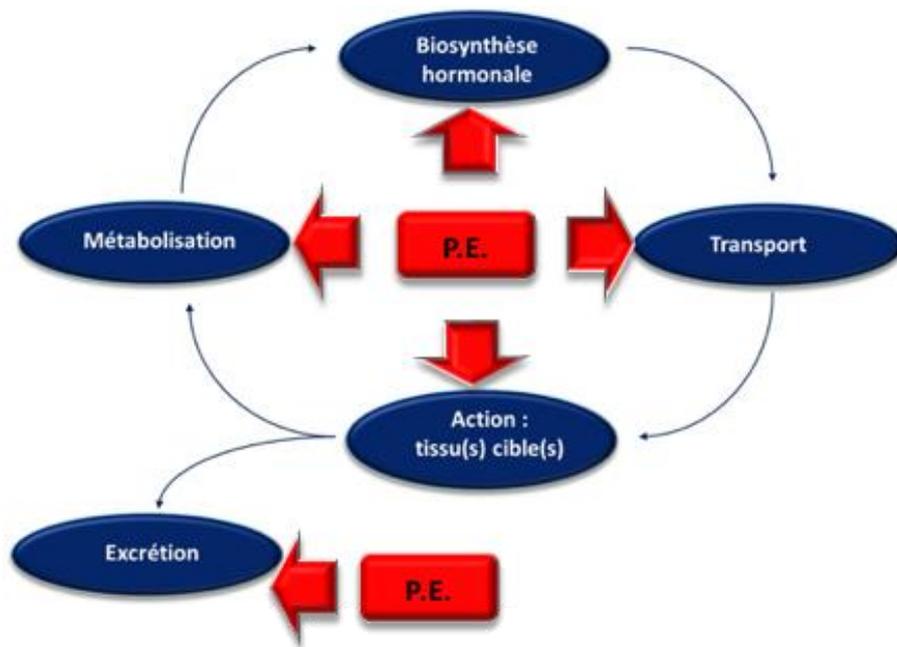


Figure 3 : Modes d'actions des perturbateurs endocriniens (d'après Brion, Comm. Pers.).

C. Les récepteurs nucléaires

L'interaction des composés PE avec les récepteurs nucléaires (RN) sera étudié expérimentalement dans la suite de ce travail. C'est pourquoi une attention particulière leur sera consacrée

1. Définition et structure

Les récepteurs nucléaires sont regroupés au sein d'une superfamille de récepteurs intracellulaires impliqués dans la régulation d'un large panel de fonctions physiologiques tel que la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire ou encore le maintien de l'homéostasie (Janosek et al., 2006). Les RN sont comme des facteurs de transcription (Nakata et al., 2006), la liaison d'un ligand de nature lipophile va stimuler l'action du RN qui en réponse va pouvoir moduler l'expression de gènes cibles (Gronemeyer, 1993 ; Sberna, 2011).

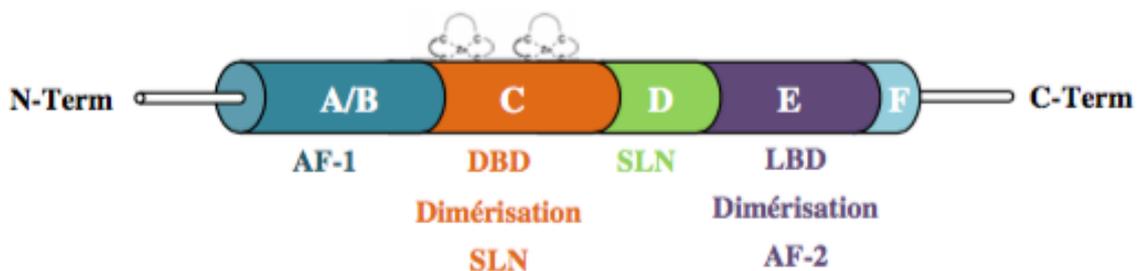


Figure 4 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires (Creusot, 2011).

La taille des récepteurs nucléaires varie de 40 à 100 kDa. Ils présentent une structure générale commune (Figure 4) comprenant quatre domaines fonctionnels notés de A à E avec la présence potentielle d'un domaine supplémentaire noté F pour certains RN (Aranda and Pascual, 2001 ; Sberna, 2011). Le domaine A/B situé à l'extrémité N-terminale contient une fonction activatrice de la transcription indépendante du ligand AF-1 (*Activation Function 1*) (Nakata et al., 2006). Le domaine A/B est la région la plus variable du RN, que ce soit en termes de taille et de séquence, déterminant la diversité des isoformes de récepteurs. La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), il va permettre la liaison du RN avec la molécule de l'ADN au niveau des séquences spécifiques, les éléments de réponses (HRE, *Hormone Response Element*). Le DBD va présenter une forte homologie de séquence entre les différents RN. Le domaine D appelé domaine charnière est faiblement conservée entre les RN et donne sa flexibilité au récepteur permettant sa fixation sur l'ADN. L'existence d'un motif de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localisation Signal*) au sein du domaine D permet sa détection. Le domaine E, situé en extrémité C-terminale, correspond au domaine de liaison des ligands (LBD, *Ligand Binding Domain*). La taille de la poche de liaison du ligand est spécifique aux différents RN et va déterminer l'affinité des RN avec leurs ligands (Sberna, 2011).

2. Classifications et modes d'actions des RN

Il existe différentes classifications des RN dans la littérature scientifique. La principale est basée sur la nature de leurs ligands respectifs, donnant lieu à 3 sous classes de RN (Janosek et al., 2006) : les récepteurs de type I (e.g. récepteurs des hormones stéroïdes), de type II (e.g. récepteur thyroïdien (TR), des hydrocarbures aromatiques (AhR : « *Aryl hydrocarbon receptor* »), de la vitamine D (VDR), de l'acide rétinoïque (RAR), le RXR (*Retinoid X receptor*) et le PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), et de type III correspondant aux récepteurs orphelins (e.g. PXR, *Pregnane X Receptor*).

Illustré en Figure 5, le mode d'action général des RN correspond à un mécanisme de facteurs de transcriptions. Les RN vont d'abord être ciblés par des ligands spécifiques que ce soit dans le cytoplasme ou dans le noyau. A la suite de la fixation du ligand au niveau du LBD du RN, un changement de conformation va avoir lieu et le RN souvent accompagné d'un co-régulateur va rejoindre le noyau de la cellule pour se lier sur une séquence spécifique de la molécule d'ADN au niveau de l'HRE. Cette liaison va permettre l'expression (ou la répression) de gènes cibles par transcription de la séquence spécifique de l'ADN (Janosek et al., 2006). Les co-régulateurs vont permettre de moduler l'activité transcriptionnelle des RN que ce soit par une activité positive (co-activateur) ou par une activité négative (co-represseurs) sur le récepteur (Hermanson et al., 2002).

Certains récepteurs comme le récepteur ROR (*retinoid related orphan receptor*) vont fonctionner en monomères tandis que d'autres comme les récepteurs stéroïdiens ou RXR (*Retinoid X Receptor*) vont

fonctionner en homodimères. C'est à dire que pour se lier aux éléments de réponses de l'ADN, deux récepteurs identiques vont s'associer. A l'inverse, d'autres récepteurs comme PXR vont agir en hétérodimères en se liant avec un récepteur RXR pour exercer leurs actions (Figure 6).

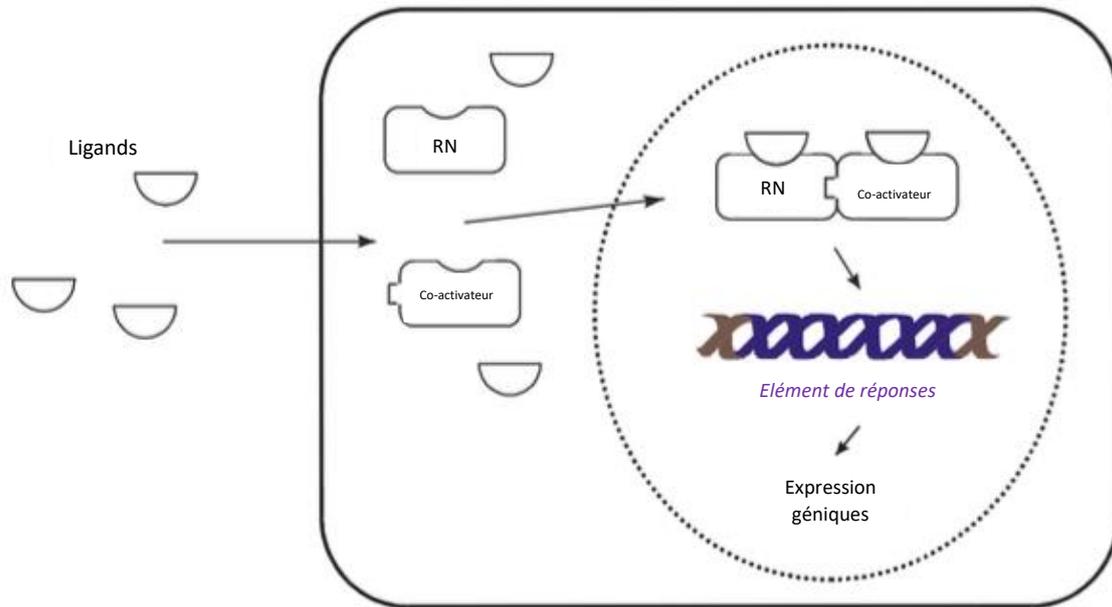


Figure 5 : Mécanisme d'action général des récepteurs nucléaires (Janosek et al., 2006).



Figure 6 : Modes d'actions des récepteurs nucléaires en monomères ou dimères (Brion, Comm. Pers.).

3. Interactions croisées (« crosstalk ») entre des voies de signalisations de RN

Il existe également d'autres voies de signalisations, dites indirectes, de certains récepteurs. C'est notamment le cas d'AhR, récepteur cytoplasmique, qui intervient dans le métabolisme de certains xénobiotiques principalement les hydrocarbures aromatiques polycycliques et des dioxines par la régulation de gènes comme *cyp1a*, *cyp1b* ou les *gst* (glutathion S -transférase) (Nakata et al., 2006). Il a ainsi été démontré que le récepteur AhR, activé par un de ces agonistes comme la TCDD (2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine) (Navas et al., 2004) pouvait interagir avec les récepteurs aux œstrogènes (ER) et entraîner la formation d'un complexe ER/AhR/ARNT. La conséquence de cette interaction diffère selon les espèces et selon la présence ou l'absence de liaison des RN à des ligands au sein de ce complexe. Chez l'Homme, lorsque le récepteur ER est lié à un agoniste comme l'E2 et AhR (e.g. TCDD) à un de ces agonistes, il y aura dégradation du complexe par le protéasome et donc induction d'un effet anti-œstrogénique. A l'inverse, la présence d'un ligand d'AhR mais pas d'ER au sein du complexe aura pour conséquence l'activation de la voie de signalisation œstrogénique. Il a également été démontré la possibilité pour le récepteur ER α de moduler à son tour la transcription dépendante d'AhR (Matthews and Gustafsson, 2006). Chez le poisson et notamment le poisson-zèbre, la présence d'un ligand AhR n'induit, à l'inverse, pas d'effet œstrogénique (Cheshenko et al., 2007). Le « crosstalk » reste un mécanisme complexe et dépendant fortement du contexte cellulaire, du tissu-cible mais également du stade développemental (juvénile, adulte) et du sexe de l'individu.

D. Pregnane X Receptor

Suite à la découverte progressive de ces RN, de nombreuses études ont été mené pour approfondir leur voies de signalisations mais également pour mieux connaître leurs ligands spécifiques en particulier sur les composés susceptibles d'entraîner une perturbation du fonctionnement des récepteurs stéroïdiens comme les récepteurs œstrogéniques ou androgéniques (AR) que ce soit chez l'Homme (Baravalle et al., 2018 ; Brucker-Davis et al., 2001 ; Li et al., 2006 ; N'Tumba-Byn, 2013) ou chez d'autres sujets d'études comme le poisson-zèbre (Baudiffier, 2012 ; Hinfray et al., 2011 ; Le Fol et al., 2015). Toutefois, de plus en plus d'études se sont par la suite intéressées à d'autres RN moins connus tel que le récepteur PXR dans le cadre du projet PestR. Les raisons de l'intérêt pour ce récepteur nucléaire sont nombreuses. Le récepteur PXR s'avère être la cible moléculaire de nombreuses substances pharmaceutiques mais également d'autres xénobiotiques (Bresolin et al., 2005 ; Nakata et al., 2006). De plus, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la détoxification et le métabolisme de composés endogènes est notamment régulée par le récepteur PXR (Kliwer, 2003). L'implication du récepteur PXR dans certains cancers chez l'Homme (e.g., cancer du côlon) a également été démontré (Raynal et al., 2010). Enfin il s'agit, pour l'instant, du seul RN pour lequel une action synergique des composés chimiques a été démontrée (Delfosse et al., 2015) et qui témoigne de fortes différences inter-espèces (Küblbeck et al., 2016 ; Zhao et al., 2015).

1. Fonction

Le récepteur PXR fait partie de la sous-famille 1, groupe I, membre 2 (NR112) des RN (« *A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily*, » 1999). Dans la suite de ce travail, le récepteur PXR humain sera désigné hPXR et celui du poisson zèbre zfPXR. Les gènes correspondants seront quant à eux inscrits en minuscule.

De fortes homologies de séquence entre le récepteur PXR et le récepteur de la vitamine D (VDR, NR111) mais également avec le récepteur CAR (NR113, *constitutive androstane receptor*) ont été montrées (Hitchcock, 2014). Le gène *nr1i2* s'exprime particulièrement dans le foie et l'intestin et dans une moindre mesure dans les reins et les poumons (LeCluyse, 2001). Plus précisément, le récepteur PXR est souvent qualifié de xénocapteur. Le mécanisme d'action du RN PXR est illustré en Figure 7. La liaison d'un ligand au niveau du LBD de PXR va entraîner sa liaison aux histones permettant le recrutement de l'HAT (*histone acetyl transferase*). L'acétylation des histones va avoir pour conséquence la décondensation de l'euchromatine. Le complexe hétérodimérique formé de RXR et de PXR lié avec son ligand et un co-régulateur va se fixer au niveau de son élément de réponse XRE (pour *Xenobiotic response element*) et provoquer la transcription des gènes cibles (Eide et al., 2018 ; Nakata al., 2006).

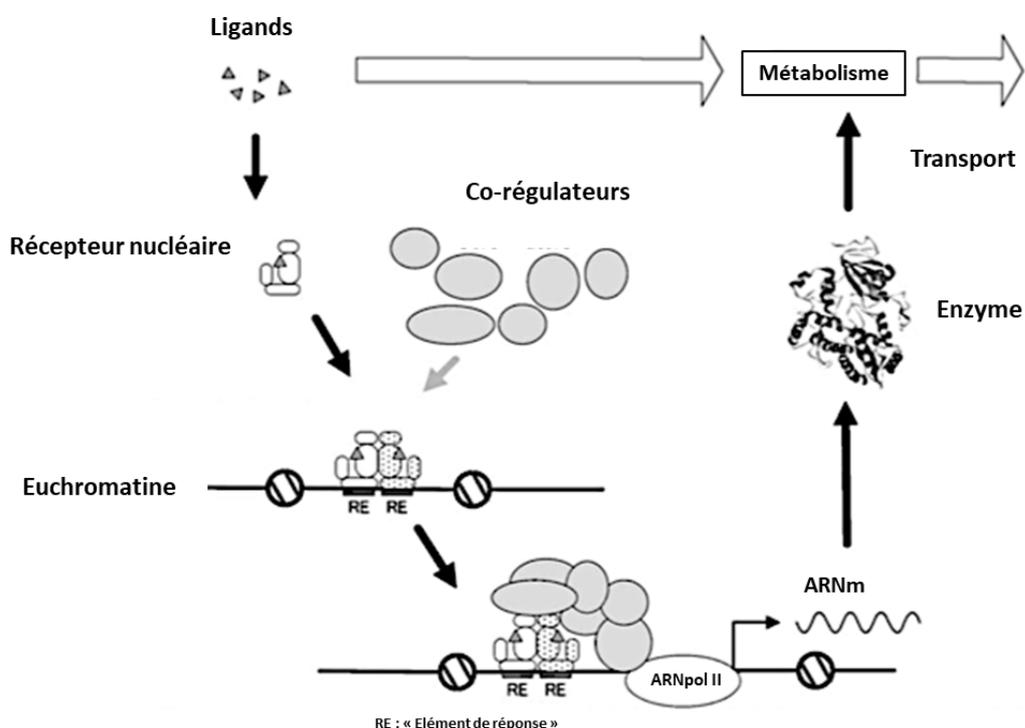


Figure 7 : Fonctionnement d'un RN « xénocapteur » en réponse à la liaison d'un xénobiotique (d'après Nakata et al., 2006).

Une gamme structurellement diversifiée de médicaments et de polluants environnementaux vont pouvoir se lier au récepteur PXR et l'activer. Le Tableau 3 rassemble des ligands typiques du PXR humain et de poisson.

Tableau 3 : Ligands du RN PXR chez l'homme et les poissons téléostéens.

| | Classes | Composés | Références | |
|---------------------------|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------|
| Agoniste humain | Pesticides | Chlordane, dieldrine, endosulfan | Coumoul et al., 2002 | |
| | | Transnonachlor, triclosan | Jacobs et al., 2005 | |
| | | Prétilachlor, fenvalérate, bupirimate, cyperméthryn, métolachlor, oxadiazon, o,p'DDT, propiconazole, oxadiazon, diuron, azimsulfuron, mercoprop, fipronil, diflubenzuron, thiabendazole | Lemaire et al., 2004, 2006 | |
| | | Terbutylazine, linuron, chlorotoluron, chloresulfuron, nicsulfuron | Creusot, 2011 | |
| | | Butamifos, chlorpyrifos, thénylchlor, dymuron, bromopropylate, indanofan, pypérophos, bifenox, oxyfluorfen, fenamiphos, toldofos-methyl, primiphos-methyl, ethoprophos, pyrethrin, deltaméthryn, fluvalinate, terfuthrin, etofenprox, diethofencarb, chlorpropham, flutolanil, propzamide, metalaxyl, pencycuron, pendimethalin, 2-phénylphenol | Kojima et al., 2011 | |
| | Composés pharmaceutiques | Hyperforin, clotrimazole, rifampicin, déxaméthasone, lovastatin, phénobarbital, spironolactone | Vignati et al., 2004 | |
| | | SR12813, ICI, tamoxifen | Jacobs et al., 2005 | |
| | | Clomiphène, raloxifène | Mnif et al., 2007 | |
| | | Diclofénac, forskolin, ritonavir, mévastatin, mifépristone, diazépam, triazolam, bergamotin | Sinz et al., 2006 | |
| | | Oméprazole, terbinafine, rifabutin, nicardipine | Cui et al., 2008 | |
| | Surfactants / plastifiants | Amoxicilline, dicloxacilline, céphradine, tétracycline, troléandomycine | Yasuda et al., 2008 | |
| | | cindamycin, érythromycine | | |
| | | Phtalates | Milnes et al. 2008 | |
| | Stéroïdes | 4-t-OP, m-NP, BPA | Mnif et al., 2007 | |
| | | PBDE | Pacyniak et al., 2007 | |
| | | Pregnénolone, cortisone, corticostérone | Vignati et al., 2004 | |
| | Autres | EE2, hexestriol, 4-OHT | Mnif et al., 2007 | |
| | | Cortexone, corticostérone, métabolites de l'oestrone progestérone et métabolites | Ekins et al., 2008 | |
| | | Phyto/myco-oestrogènes, Filtres UV | Mnif et al., 2007 | |
| | | Diphényls ether, carbamates | Kojima et al., 2011 | |
| | Agoniste poisson-zèbre | Pesticides | TCDD | Reschly et al., 2007 |
| | | | TPP | Honkakoski et al., 2004 |
| Composés pharmaceutiques | | Méthoxychlor, toxaphène, endosulfan, chlordane, fenvalérate | Milnes et al. 2008 | |
| | | Chlorpyrifos | Ekins et al., 2008 | |
| | | Nifédipine, phénobarbital, rifampicine | Moore et al., 2002 | |
| | | Clotrimazole | Eide et al., 2014 | |
| Surfactants/ plastifiants | | Phénobarbital | Kubota et al., 2015 | |
| | | Simvastatine | Cunha et al., 2016, 2017 | |
| Stéroïdes | | n-dipropyl-phtalate, 4-t-OP, bisphenol A | Milnes et al. 2008 | |
| | | Pregnénolone, androstènedione, testostérone, DHT, androstérone, métabolites de l'oestrone | Ekins et al., 2008 | |
| Antagoniste humain | Autres | TCDD | Tseng et al., 2005 | |
| | Phyto-oestrogènes | Coumestrol | Wang et al., 2008 | |
| | Composés pharmaceutiques | Sulforaphane | Zhou et al., 2007 | |
| Divers | Imidazole (kétoconazole) | Ekins et al., 2008 | | |
| | Azoles | Venkatesh et al., 2011 | | |

2. Rôle du récepteur PXR

Le récepteur PXR est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes impliqués aussi bien dans les mécanismes de métabolisme, de transport ou encore d'excrétion de composés exogènes, des hormones stéroïdes, des vitamines, des sels biliaires et des xénobiotiques (Bresolin et al., 2005 ; Ekins et al., 2008).

L'implication des RN dont PXR dans le métabolisme des xénobiotiques intervient aussi bien lors des réactions de phase I (oxydation), de phase II (conjugaison) ou même de phase III (transporteur ABC « *ATP-binding-cassette* ») par la régulation d'une batterie de gènes (Kliwer, 2005 ; Nakata et al., 2006). Ainsi, la présence d'un activateur de PXR tel que la prégnénolone-16 α -carbonitrile (PCN) active un certain nombre de gènes dont les cytochromes P 450 (CYP) 1, 2 et 3 impliqués dans les réactions de phase I (e.g. *cyp1a*, *cyp2aa12*, *cyp3c1*, *cyp3a65*) aussi bien chez l'homme que chez le poisson (Kliwer, 2003 ; Kubota et al., 2015). Il a également été démontré l'action du zfPXR, activé par la simvastatine, sur des gènes codant pour des glutathion S-transférases (e.g. *gst*), enzyme essentielle des réactions de conjugaison (métabolisme de phase II) (Cunha et al., 2016). PXR assure la régulation de l'efflux des médicaments *via* le gène *multidrug resistance 1 (mdr1)* qui code pour la glycoprotéine-P-protéine (*mdr1/abcb1*). Il a aussi été montré l'influence du zfPXR sur d'autres gènes impliqués dans les réactions de phase III du métabolisme notamment *abcb4*, *abcc1*, *abcc2*, *abcg2a* (Cunha et al., 2016).

Le récepteur PXR régule également l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse, le transport et le métabolisme des acides biliaires comme le gène *cyp7a1* ou le gène *cyp2c8* (Nakata et al., 2006).

PXR est un détecteur de xénobiotique à large spectre jouant un rôle central dans la régulation du métabolisme hépatique des médicaments afin de protéger l'organisme des produits chimiques dangereux (Bresolin et al., 2005). Il a d'ailleurs été identifié par le programme TOXCAST de l'US EPA comme étant une cible en première ligne des xénobiotiques et un régulateur clé de la défense de l'organisme contre les substances étrangères (Delfosse et al., 2015).

3. Action synergique de PE sur le récepteur PXR

Le mécanisme d'additivité des mélanges de PE sur les RN, notamment stéroïdiens, est aujourd'hui très étudié (Backhaus et al., 2000 ; Faust et al., 2001). Une exposition à un mélange complexe de substances PE à de faibles concentrations peut conduire à une exacerbation de leurs potentiels toxique (Kortenkamp, 2014). Toutefois, une étude menée en 2015 a montré que deux composés : le principe actif d'une pilule contraceptive (EE2) et un pesticide organochloré (trans-nonachlor, TNC) pouvaient se lier coopérativement au récepteur PXR et entraîner une activation synergique de ce récepteur (Delfosse et al., 2015). L'étude révèle qu'une exposition combinée, à des concentrations

où ces substances prisent individuellement ne produisaient qu'une faible activation du récepteur, a démultiplié le potentiel des substances entrainant une induction du récepteur de l'ordre de 90%.

4. Différences inter-espèces

Une gamme remarquablement diversifiée de composés active le récepteur PXR humain (en général seulement à des concentrations micromolaires et moins souvent à des concentrations nanomolaires élevées), ce qui correspond à une fonction hypothétique du PXR comme capteur de composés toxiques (Eide et al., 2018 ; Ekins et al., 2008).

Il existe néanmoins d'importantes différences inter-espèces entre le PXR humain et le PXR d'autres espèces de vertébrés dont le poisson-zèbre. Ces différences ont été observées (Figure 8) à la fois au niveau des DBD (e.g. 73% d'identité entre le zfPXR (zf pour « zebrafish ») et l'hPXR (h pour « human »), mais aussi au niveau des LBD du récepteur humain et celui d'autres espèces de vertébrés et particulièrement chez les espèces aquatiques (e.g. 57% d'identité entre zfPXR et hPXR) (Zhao et al., 2015). Ces différences dans la séquence du DBD témoignent de différences potentielles dans les gènes cibles de ces récepteurs orthologues. En ce qui concerne les domaines de liaisons des ligands (LBD), diverses études ont montré la sélectivité des ligands par rapport au RN PXR en fonction des espèces (Bainy et al., 2013 ; Moore et al., 2002). Ainsi, le récepteur PXR humain est fortement activé par la rifampicine mais pas par le prégnénolone-16 α -carbonitrile (PCN), alors que le récepteur PXR des rongeurs est fortement activée par le PCN mais pas par la rifampicine. De même, le clotrimazole est un agoniste du PXR humain et du PXR de poisson-zèbre mais pas de la souris.

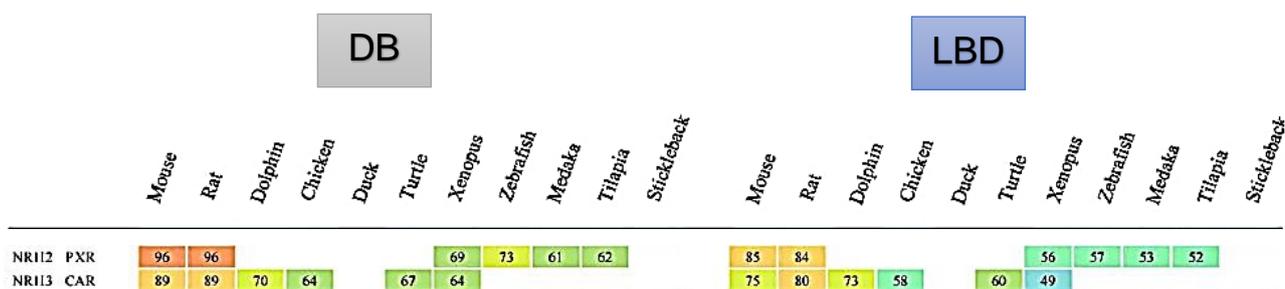


Figure 8 : Comparaison des séquences d'acides aminés DBD/LBD du PXR et CAR humains et de leurs orthologues correspondants chez onze autres espèces de vertébrés (d'après Zhao et al., 2015).

Les similitudes de séquence sont présentées sous forme de pourcentages (%).

Une autre différence a été constatée entre l'Homme et le poisson-zèbre en s'intéressant aux récepteurs PXR et CAR. Ce sont des RN majeurs du métabolisme des xénobiotiques mais également des modulateurs du métabolisme de composés endogènes (Küblbeck et al., 2016). Les récepteurs CAR et PXR sont considérés comme des récepteurs sentinelles hautement sensibles à la présence des xénobiotiques. Toutefois, à ce jour, il semble que chez le poisson, CAR soit absent chez la plupart des espèces (Figure 8). Sa fonction serait assurée par un récepteur CAR/PXR provenant d'un gène

ancestral. Les CAR et PXR humains présentent une grande redondance de ligands. Chez le poisson-zèbre, un plus faible nombre de ligands est capable d'activer le PXR du fait d'une structure plus restrictive de la poche de liaison aux ligands de ce récepteur (Ekins et al. 2008). Le poisson zèbre n'est doté d'un seul locus du gène *nr1i2* mais différentes variantes génétiques ont été identifiées chez le poisson-zèbre (Lille-Langøy et al., 2019).

Il existe donc des différences non négligeables entre le récepteur PXR humain et celui de modèles d'études biologiques tel que le rat ou la souris. Ces différences existent autant en observant les séquences comparatives des récepteurs qu'en s'intéressant aux ligands espèces-spécifiques. Ces modèles classiques ne sont ainsi pas forcément les plus pertinents dans l'étude du RN hPXR. Cela oriente de plus en plus de recherches sur d'autres modèles biologiques vertébrés dont les poissons.

E. Le poisson-zèbre

En raison de ces fortes différences inter-espèces, le projet PestR a donc été initié pour étudier à la fois les mécanismes d'action de PE sur le récepteur PXR humain mais également sur le récepteur zfPXR.

1. Généralités

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un poisson d'eau douce appartenant à la famille des Cyprinidés (*Cyprinidae*). Retrouvés à l'état sauvage dans toute la région Himalayenne, ils sont largement utilisés en tant que modèles expérimentaux dans de nombreux laboratoires (Stegeman et al., 2010). Pouvant atteindre une taille adulte jusqu'à 4 cm en captivité, les poissons-zèbre peuvent vivre généralement de 2 à 3 ans en captivité. Omnivore, leur régime alimentaire consiste avant tout de phyto- et de zooplancton (Hitchcock, 2014). Une trentaine de souches sauvages existent dont la souche AB utilisée au sein du laboratoire de l'INERIS.



Figure 9 : Deux poissons-zèbre de souches AB (Smit, 2013).

2. Avantages du modèle poisson-zèbre pour l'expérimentation

L'utilisation de poissons-zèbre en laboratoire s'explique principalement par leur développement rapide, même en captivité, où les individus peuvent se reproduire dès 3 à 4 mois.

De plus, le développement des embryons est rapide et peut s'effectuer par un suivi à la loupe binoculaire, les œufs étant transparent. Le recours à des embryons de moins de 120 hpf (heures post-fécondations) pour des expérimentations n'est d'ailleurs pas classé comme stades protégés selon la directive européenne 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Braunbeck et al., 2015).

Un autre avantage réside dans la quantité d'œufs pouvant être pondue par une femelle par accouplement pouvant aller jusqu'à une centaine avec la possibilité de pondre plusieurs fois par semaine. Depuis 2013, le génome des poissons-zèbre a été séquencé permettant d'étudier les similitudes entre humains et poissons (Hitchcock, 2014).

Il a également été démontré que le poisson zèbre réagit aux composés de la même manière que les mammifères et les humains dans les essais de toxicité, ce qui signifie que les embryons et les adultes servent de modèles idéaux (Driessen et al., 2013).

L'utilisation du poisson-zèbre comme organisme modèle en toxicologie en fait une espèce précieuse pour la recherche et le développement de médicaments (Barros et al., 2008). Pour cette raison, une multitude de modèles biologiques ont été développés à partir du poisson-zèbre notamment *in vivo* avec l'utilisation d'organismes adultes sauvages ou transgéniques (Brion et al., 2012), d'embryons à différents stades développementaux (Cunha et al., 2016), ou *in vitro* avec le développement d'une lignée cellulaire dérivée d'hépatocytes de poisson-zèbre : la lignée ZFL (Ghosh et al., 1994 ; Miranda et al., 1993) et l'utilisation de cultures primaires d'organes comme les gonades (Leal et al., 2009) ou le foie (Le Fol et al., 2015).

Le poisson-zèbre constitue donc un modèle de choix dans l'étude des composés PE aussi bien dans l'identification des nouveaux composés PE que dans l'étude des mécanismes d'action (Segner, 2009).

3. Le clotrimazole : un ligand de PXR chez l'Homme et le poisson-zèbre

Le clotrimazole (CAS : 23593-75-1,) est un fongicide azolé, utilisé principalement pour le traitement des infections fongiques dermatologiques et gynécologiques en médecine humaine et vétérinaire. En inhibant l'activité de la cytochrome P450 14 α -déméthylase, ces fongicides vont permettre l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol entraînant une altération structurelle et fonctionnelle de la membrane cytoplasmique (Hinfrey et al., 2011 ; OSPAR Commission, 2013).

Inscrit sur la liste OSPAR des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires, le clotrimazole est principalement rejeté dans l'environnement par les rejets des stations municipales d'épuration des eaux. N'étant pas considéré comme biodégradable, des concentrations de clotrimazole allant du ng/L au µg/L peuvent être retrouvées dans les eaux de surfaces des rivières, lacs et estuaires de plusieurs pays (Peschka et al., 2007 ; Roberts and Thomas, 2006 ; Thomas and Hilton, 2004).

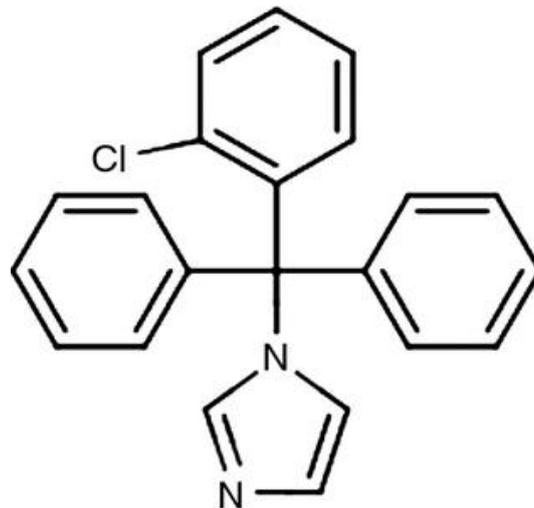


Figure 10 : Structure chimique du clotrimazole (Crowley and Gallagher, 2014).

Le clotrimazole est décrit dans la littérature scientifique comme étant une substance perturbatrice endocrinienne pouvant modifier les niveaux d'hormones impliquées dans la stéroïdogénèse (Baudiffier et al., 2012). Cette substance est également considérée comme un agoniste de référence du récepteur zfPXR (Bresolin et al., 2005 ; Eide et al., 2018 ; Milnes et al., 2008). L'exposition de cultures primaires d'hépatocytes ou d'embryons de poisson-zèbre au clotrimazole a conduit à l'induction d'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques dont par exemple le gène *cyp3a65* (Cunha et al., 2017 ; Eide et al., 2014).

Le clotrimazole est également considéré comme un ligand atypique de la voie AhR (Navas et al., 2004).

OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Ce travail, s'inscrivant dans le projet PestR a pour objectif de mieux connaître les voies de signalisation du récepteur zfPXR et particulièrement les gènes régulés par ce récepteur chez le poisson-zèbre. Une double approche combinant des modèles *in vitro* et *in vivo*, a alors été envisagée se basant sur des expositions au clotrimazole, choisi pour sa capacité à activer le récepteur zfPXR. Le recours à ces deux modèles permet ainsi d'avoir un reflet différentiel des mécanismes se déroulant à l'échelle cellulaire mais aussi à l'échelle d'un organisme. L'utilisation de la TCDD en tant que témoin positif a été choisie pour sa capacité à activer le récepteur AhR et donc permettre de différencier les gènes PXR-régulés, AhR régulés ou co-régulés par ces deux récepteurs.

Après une première phase de mises au point méthodologiques (cultures primaires, qPCR), le travail réalisé a été mené en plusieurs étapes (Figure 11).

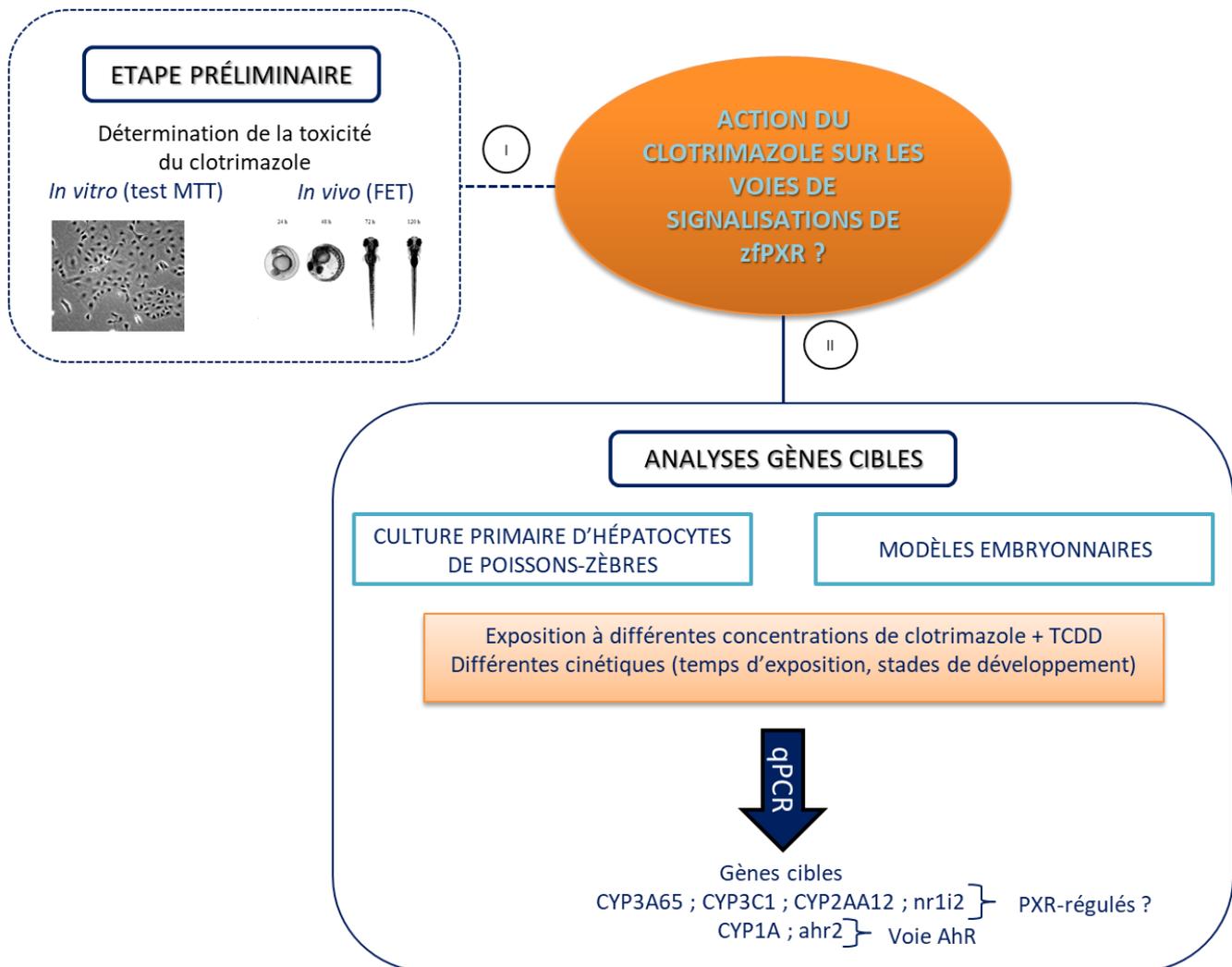


Figure 11 : Démarche expérimentale

Le choix des gènes cibles étudiés dans les différents modèles a été basé sur la littérature (Bresolin et al., 2005 ; Creusot, Comm. Pers. ; Cunha et al., 2016, 2017 ; Eide et al., 2014 ; Kubota et al., 2015) et a permis de dresser une liste de 6 gènes étudiés par la suite.

- Les gènes codant pour les récepteurs zfPXR et zfAhR (respectivement *nr1i2* et *ahr2*). Le gène *nr1i2* va notamment permettre d'identifier les stades développementaux où le récepteur est le plus exprimé. Le gène *ahr2* permettra de montrer une interaction potentielle des voies de signalisations de deux récepteurs.
- Des gènes codant pour trois grandes familles d'enzymes cytochrome P 450 (CYP1A, CYP2A, CYP3) impliquées dans les mécanismes de métabolisme, notamment de phase 1, des xénobiotiques (Nakata et al., 2006 ; Saad et al., 2016) :
 - o *cyp1a* (cytochrome P 450, famille 1, sous-famille a) principalement exprimé dans le foie du poisson-zèbre et impliqué dans le métabolisme de xénobiotiques (Nakata et al., 2006) et régulé par zfAhR (Goksøyr, 1995) et indirectement par zfPXR par le biais d'une interaction croisée avec la voie de signalisation de zfAhR (Kubota et al., 2015).
 - o *cyp2aa12* (cytochrome P 450, famille 2, sous-famille aa, peptide 12), gène spécifique au poisson-zèbre et potentiellement régulé par zfPXR (Kubota et al., 2013).
 - o *cyp3a65* (cytochrome P 450, famille 3, sous-famille a, peptide 65), il s'agit d'une isoforme de *cyp3a* chez le poisson-zèbre exprimé notamment dans le foie (Tseng et al., 2005) et codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes de détoxification de xénobiotiques notamment les hépatotoxines ou la testostérone (Saad et al., 2016).
 - o *cyp3c1* (cytochrome P 450, famille 3, sous-famille c, peptide 1), fortement exprimé chez le poisson-zèbre adulte au niveau du foie et de l'intestin, ce gène pourrait être en partie régulé par zfPXR (Shaya et al., 2019 ; Kubota et al., 2013).

MATERIELS ET METHODES

A. Modèles in vitro

1. Lignées cellulaire ZFL et ZXLH

Des lignées hépatiques de poissons-zèbre ont été utilisées pour 1) définir la cytotoxicité du clotrimazole et 2) déterminer son action potentielle sur le récepteur AhR dans un contexte hépatique. La lignée cellulaire ZFL (ATCC CRL-2643) dérivée de cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre (Ghosh et al., 1994 ; Miranda et al., 1993). Les cellules ZXLH (non publiées) correspondent à des cellules ZFL transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse du récepteur AhR (XRE). Ces deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu LDF composé de 50% de milieu L-15 (Gibco), 35% DMEM HG (Invitrogen), 15% de milieu Ham's F12 (Invitrogen), 0,15 g/L de bicarbonate de sodium, 15 mM de tampon HEPES, 0,01 mg/mL d'insuline, 50 ng/mL d'*Epidermal growth factor* (EGF), 5% de SVF et des antibiotiques (5 unités/ mL de pénicilline, 5 µg/mL streptomycine et 0,5 mg/mL d'hygromycine B seulement pour les ZFL-ZXLH).

2. Cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre

La culture primaire d'hépatocytes issue du foie de poisson zèbre adulte mâle (PZFH) a fait l'objet d'un travail de développement au sein du laboratoire INERIS dans le cadre de la thèse de Vincent Le Fol (Le Fol, 2015). Cette mise au point a été réalisée sur la base de protocoles précédemment décrits chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Björkblom et al., 2007) et le poisson-zèbre (Ibabe et al., 2005). Les différentes modifications de la procédure de mise en culture des hépatocytes ont été publiées sous la forme d'un protocole détaillé dans Le Fol et al. (2015).

a. Conditions d'élevages des poissons-zèbre

Provenant de l'élevage interne de l'INERIS, les poissons-zèbre utilisés au cours des expérimentations étaient âgés d'au moins 1 an. Les poissons étaient nourris 2 fois par jour à satiété, par des granulés SDS 400 (*Scientific Fish Food, Special Diets Services*) et des artémies vivantes. Durant toute la durée de l'expérience la photopériode était de 14 heures d'éclairage et 10 heures d'obscurité. Les paramètres physico-chimiques ont été contrôlés en continu par un automate permettant la régulation du pH, et de la conductivité en faisant varier le mélange d'eau osmosée et d'eau du réseau alimentant l'élevage. Ce mélange d'eau est préalablement filtré sur charbon actif et est entièrement renouvelé 8 fois par jour.

b. Dissections et mises en cultures des hépatocytes

Les poissons-zèbre ont été euthanasiés dans de l'eau refroidi à 4°C, puis lavés dans de l'éthanol à 70%. Les foies ont alors été prélevés puis placés dans un tamis cellulaire (70 µM, BD Falcon) trempant dans une solution de lavage contenant 150 mL de DPBS (Gibco), de l'EGTA (0,5 mM, Sigma Aldrich), du tampon HEPES (25 mM), des antibiotiques (pénicilline : 50 U/mL et streptomycine : 50 µg/mL). Une fois rincés, les morceaux de foies ont été plongés dans une solution stérile de digestion contenant 30 mL de DPBS (Gibco), du tampon HEPES (0,05 M), du CaCl₂ (0,05 mM, Sigma Aldrich), de la collagénase de type I (0,25 mg/mL, Gibco), des antibiotiques (pénicilline : 50 U/mL et streptomycine : 50 µg/mL, PS), puis découpés en fin morceaux avant d'être incubés 20 min à 37°C tout en agitant régulièrement la solution. La suspension cellulaire a ensuite été filtrée à travers un tamis cellulaire de 70 µM puis centrifugée à 180 rcf pendant 5 min. Le surnageant a alors été vidé et le culot de cellules repris dans du milieu de culture LDF sans rouge de phénol contenant du SVF décomplémenté et déstéroïdé (5% v/v, Sigma Aldrich). Les cellules ont été comptées et ensemencées en plaque 96 puits (Primaria™, Corning®) avant d'être exposées. Les cultures primaires ont été maintenues à 28°C pendant 96 heures en étuve sans CO₂.

3. Test de viabilité cellulaire « MTT »

Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a été utilisé pour évaluer l'effet du clotrimazole et de la TCDD sur les différents modèles *in vitro* utilisés. Après exposition, le milieu de culture a été retiré par retournement et remplacé par 100 µL par puit de PBS (Gibco) contenant 0,5 mg/ml de MTT (Sigma Aldrich). Dans des cellules métaboliquement actives, le MTT est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules en précipité de bleu de formazan. Après 2 à 3h d'incubation en étuve, le milieu a été retiré lentement (retournement des plaques sur du papier absorbant). Les cristaux de formazan ont été dissous dans 100 µL de DMSO par puit et les plaques placées sous agitation pendant 10 minutes. Elles ont été ensuite lues à 570 nm et 640 nm successivement par un lecteur de microplaque (Synergy H4, BioTek). Les résultats sont exprimés en pourcentage (640 nm-570nm) relatif aux cellules contrôles.

4. Activité EROD

La mesure de l'activité EROD permet de refléter l'activité enzymatique de cytochrome P450 1A. Ce dosage repose sur la détection de la fluorescence de la résorufine correspondant au produit de la transformation de la 7-éthoxyrésorufine par l'activité enzymatique du CYP1A.

Les plaques de culture ont été vidées par retournement, puis 100 µL de 7-ERF (5 µM, Sigma) préparée dans du milieu sans rouge de phénol sont ajoutés dans les puits. L'activité EROD est mesurée au cours d'une cinétique de 15 minutes à l'aide d'un spectrofluorimètre (Biotek, Synergy H4 Hybrid

Reader) à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La fluorescence mesurée est exprimée en RFU (relative fluorescence unit).

5. Activité luciférase

L'analyse de l'activité luciférase a été réalisée dans les cellules ZXLH qui ont été transfectées de manière stable par un promoteur contenant des éléments de réponse au xénobiotiques (XRE) couplé au gène de la luciférase de luciole. L'exposition des cellules à une substance agoniste de AhR va entraîner son activation et sa liaison aux XRE et ainsi activer la transcription du gène de la luciférase. Cette enzyme catalyse la transformation de luciférine en oxyluciférine et de photons, détectés par mesure de luminescence.

En pratique, après exposition des lignées aux différents substances, les plaques de 96 puits sont vidées par retournement, puis sont ajoutés 50 µL par puits de milieu contenant 0,3 nM de luciférine (799-xenolight D-luciferin, potassium salt, Sigma). Le signal de luminescence est mesuré avec un luminomètre (Synergy H4, BioTek) et le résultat est exprimé en unité de luminescence.

B. Modèles in vivo

1. Modèle embryonnaire

Les embryons utilisés aussi bien pour les tests FET que pour les expositions destinées par la suite à des analyses gènes cibles provenaient de l'élevage interne de l'INERIS (c.f. iii. Conditions d'élevages des poissons-zèbre, p24). Les œufs ont été recueilli le lundi matin provenant de quatre bacs différents puis triés sous loupe-binoculaire afin de distinguer les œufs viables, des œufs non-fécondés ou non-viables. Parmi les œufs viables, 25 ont été ajoutés par cristallisoir avec quatre cristallisoirs par condition.

2. Fish Embryo acute Toxicity (FET) Test (OCDE 236)

Ce test a été créé pour déterminer la toxicité aiguë d'une substance chimique sur le développement embryonnaire du poisson. Il s'agit d'une alternative au test OCDE n°203 : *Fish Acute Toxicity Test* qui possède à la fois une excellente corrélation avec ce dernier mais permet également d'avoir recours à des stades de développement des poissons qui ne sont pas classés comme stades protégés selon la directive européenne 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Braunbeck et al., 2015 ; OCDE, 2013). En 2014, ce test a fait l'objet d'une validation intra- et inter-laboratoires supervisé par l'ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) sur une vingtaine de substances.

Le principe du test est le suivant (Figure 12) : les œufs fraîchement pondus sont recueillis et transférés dans des boîtes de pétri en verre. Sous loupe-binoculaire, les œufs fécondés sont différenciés des œufs non-fécondés ou non-viables qui ont été jetés. Les œufs fécondés sont transférés dans des plaques 24 puits (Corning) pré-incubés avec la solution à tester afin de pré-saturer les sites potentiels de liaison dans les matériaux plastiques. Toutes les 24 heures, les solutions d'essais sont remplacées par des solutions fraîches (exposition semi-statique). Le développement embryonnaire est suivi régulièrement (8, 24, 48, 72 et 96 hpf) notamment à partir de 4 critères considérés comme létaux pour l'individu (Figure 13) à savoir la coagulation des ovules fécondés, l'absence de formation de somites, le non-détachement de la queue du sac vitellin et le manque de battements cardiaques (OCDE 2013). Au-delà de ces observations léthales, des observations subléthales et tératogènes ont également été réalisées à l'image de celles réalisées par Fraysse et al. (2006) parmi lesquels la présence d'œdèmes péricardiques ou vitellins, le manque (voire même l'absence) de mouvements spontanés, le stade de développement où intervient l'éclosion ou la dépigmentation (liste complète des observations journalières réalisées en Annexe I).

Durant le test, chacune des plaques correspond à une concentration testée (20 répliques) avec systématiquement 4 témoins internes à la plaque exposés dans de l'eau de dilution. L'eau de dilution utilisée lors du test doit être préparée à partir d'eau reconstituée selon la norme ISO 7346-3:1996 (ISO, 1996). Une plaque de test exposée à l'eau de dilution et une autre exposée à l'eau de dilution et le solvant utilisé (si besoin d'un solvant pour diluer la substance) font office respectivement de témoin négatif et de témoin solvant.

Afin que le test soit considéré comme valide un certain nombre de conditions doivent être respectées :

- Le taux de fécondation du total des œufs collectés doit être d'au moins 70%.
- La température de l'eau doit être maintenue à 26 +/- 1°C dans l'étuve tout au long du test.
- La survie des embryons dans la plaque « témoin négatif » doit être supérieure à 90% pendant les 96 heures du test.
- Le taux d'éclosion dans les plaques « témoin négatif » et « témoin solvant » doit être supérieur à 80% à la fin des 96 heures du test.
- A la fin des 96 heures d'expositions, la concentration en oxygène dissous dans la plaque « témoin négatif » et dans la plaque correspondant à la plus haute concentration doit être supérieure à 80% de saturation.

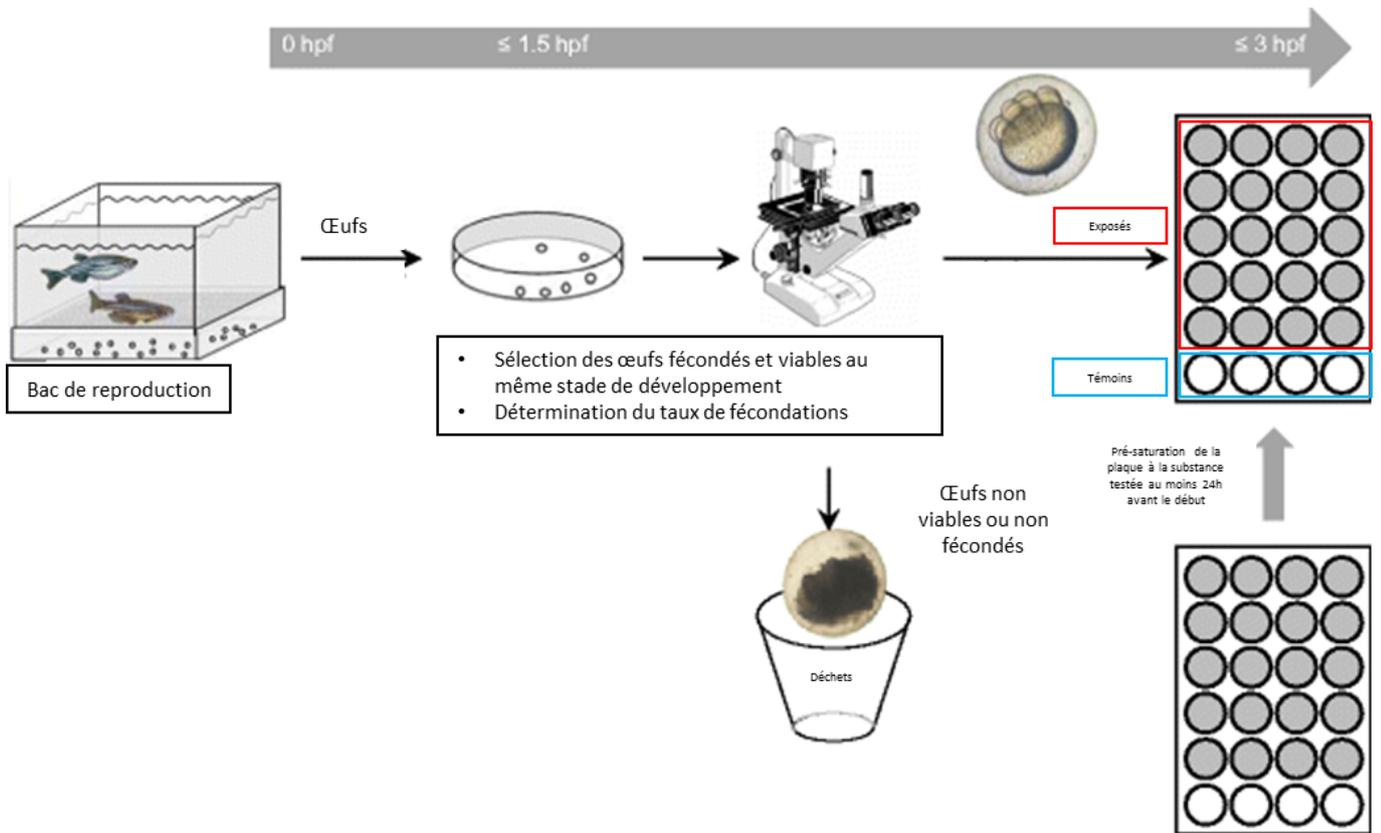


Figure 12 : Principe du Fish Embryo Test (d'après OCDE 2013).

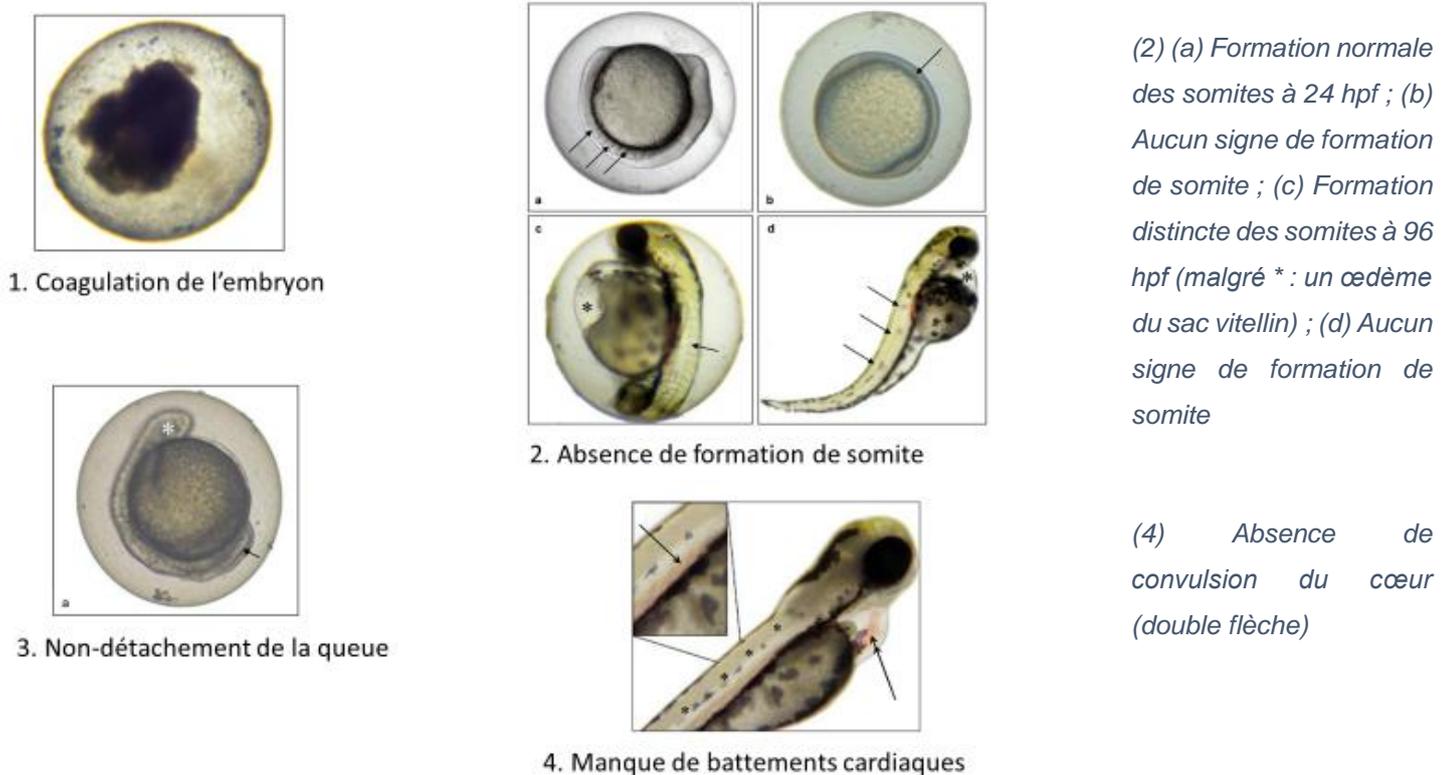


Figure 13 : Observations considérées comme léthales lors du Fish Embryo Test (d'après OCDE 2013).

3. Expositions des modèles in vivo et in vitro

Le recours dans ce travail à une double approche *in vivo* et *in vitro* nécessite une homogénéisation des unités utilisées. En effet, les concentrations utilisées *in vitro* sont régulièrement exprimée en g/L tandis qu'*in vivo* le mol/L (ou molaire « M ») est davantage utilisé. Pour faciliter l'interopérabilité de deux modèles, les concentrations seront par la suite exprimées en molaire.

Les embryons de poissons-zèbre ont été exposé en plaques 24 puits pour la réalisation des tests FET et en cristallisoirs pour les expositions en vue des analyses gènes cibles. Les solutions mères de clotrimazole (Sigma Aldrich) et de TCDD (Sigma Aldrich) ont été dilué dans un solvant, le DMSO (diméthylsulfoxyde, CAS n°67-68-5, Sigma Aldrich) afin d'arriver à une concentration finale en solvant à 0,01% (pour les expositions *in vivo*) et 0,1% (pour les expositions *in vitro*).

Pour les tests ayant pour but d'évaluer la mortalité ou l'activité enzymatique des molécules (test FET ; MTT ; EROD et luciférase), les concentrations choisies furent volontairement relativement élevées tout en tenant compte de la limite de solubilité du clotrimazole à 0,49 mg/L. Les concentrations choisies pour réaliser les analyses gènes cibles ont ensuite été adapté en fonction des résultats des tests de mortalité et des activités enzymatique.

Les temps d'exposition *in vivo* ont été adapté à partir des expérimentations menées par Cunha et al. (2016 ; 2017). Cinq temps d'expositions associés à quatre stades de développement du poisson zèbre ont été choisi : 24h ; 48h ; 72h, 96h et 120h. Des essais préliminaires ont permis de déterminer le nombre minimal d'embryons ou de larves de poissons-zèbre suffisante à la réalisation d'analyses gènes cibles.

In vitro, différents tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer d'une part la densité cellulaire optimale mais également le temps d'exposition le plus adéquat en vue des analyses gènes cibles (Figure 14). Dans le premier cas, le protocole d'exposition décrit par Eide et al. (2014) a été suivi à savoir une mise en culture à J0 suivie d'un repos de 24h puis d'une exposition aux substances de 24h et 48h. Dans le second cas, les expositions ont été réalisés à rebours à partir d'une heure après l'ensemencement des cellules (Le Fol et al., 2015). Quatre temps d'expositions ont été retenus : 24h ; 28h ; 72h et 96h et l'ensemble des hépatocytes a été récolté 96h après l'ensemencement. A la suite des différentes expositions les cellules ont été conservées dans du *RNAlater* (Sigma) en vue d'analyses gènes cibles.

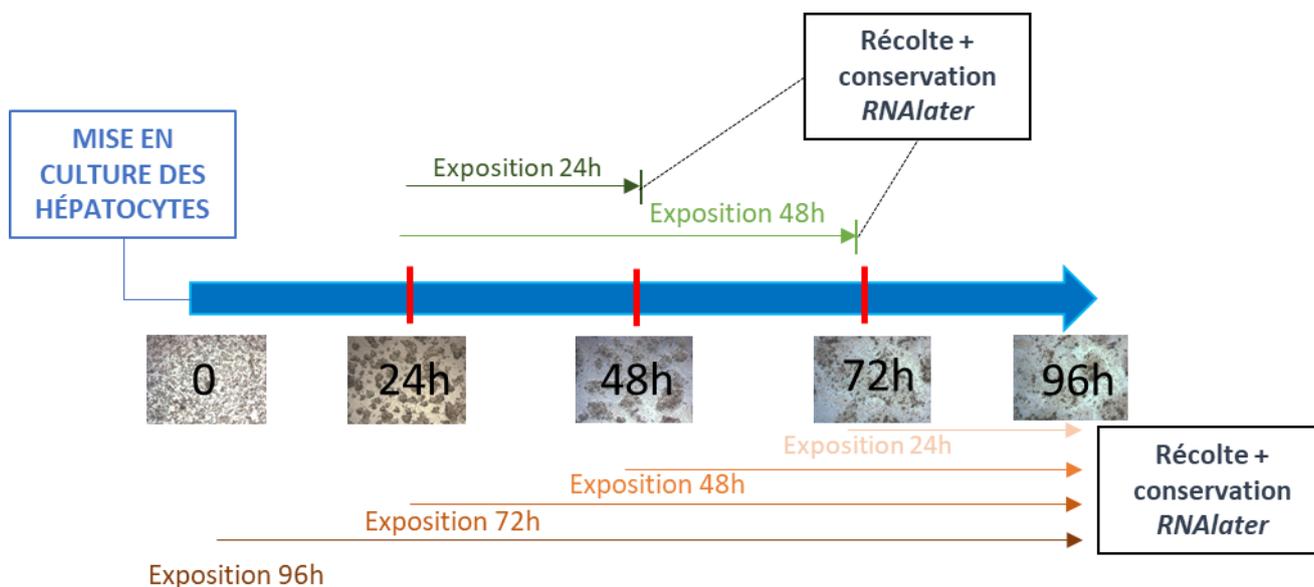


Figure 14 : Cinétiques d'expositions testées sur les cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre.

C. Analyse gènes cibles

1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des embryons de poissons-zèbre et des culture primaire d'hépatocytes de poissons-zèbre ont été extraits en utilisant le kit *MagMAX mirVana™* total RNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific). Le principe de ce kit consiste à purifier les ARN totaux à l'aide de billes aimantées en silice ayant la capacité d'adsorber l'ARN.

Concernant l'extraction d'ARN d'embryons, le *RNA later* (Sigma-Aldrich) présent dans les tubes à billes (250) a été retiré et remplacé par du tampon de lyse à 0,7% de 2-mercaptoethanol (200 µL). Les tissus ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur 2 fois pendant 10 sec. D'autre part, concernant les cultures primaires d'hépatocytes, le *RNA later* (100 µL) a été dilué dans 100 µL de PBS froid (Gibco). Les microtubes ont alors été centrifugé (180 rcf, 5 min à 4°C) puis vidé et 200 µL de tampon de lyse (50% d'isopropanol, 49,5% de tampon de lyse, 0.5% de 2-mercaptoethanol) a été ajouté dans chacun des échantillons. Le protocole d'extraction décrit par la suite a été appliqué à la fois aux embryons et aux cultures primaires d'hépatocytes. Les lysats ont donc été transféré dans une plaque de traitement 96 puits et agitée 5 min à 900 rpm. 100 µL d'isopropanol et 20 µL de *Binding Beads Mix* (10µl *RNA binding Beads* et 10 µl de *binding enhancer*) ont été ajouté dans chaque échantillon avant une agitation de 2 et 5 min à 700 rpm respectivement. La plaque a ensuite été placée sur un support magnétique 96 pendant 5 min. Les ARN totaux étant liés aux billes, le surnageant a soigneusement été aspiré et jeté. Les billes ont été nettoyé successivement avec 150 µL de *Wash solution 1 et 2* et agité 1 min. Le surnageant a de nouveau été jeté et la plaque non couverte agitée 2 min à 900 rpm afin de sécher les *RNA binding beads*. Pour éliminer l'ADN, les

échantillons ont été incubé 15 min avec une solution de *turbo DNase* (50µl par puit dans 48µl de tampon *MagMAX Turbo DNase* et 2µl de *TURBO DNase*) à 900 rpm. La DNase pouvant potentiellement décoller les ARN des billes, la plaque a été mise à incuber 5 min à 700 rpm avec 50 µL de *rebinding buffer* et 100 µL d'isopropanol. Puis la plaque a été placée 5 min sur le support magnétique. Le surnageant a été aspiré soigneusement. Les échantillons ont été rincés à 2 reprises avec 150µL de *Wash solution 2* et centrifugés 1 min à 700 rpm puis la plaque a de nouveau été déposée sur support magnétique 1 min pour permettre de vider la solution de lavage restante. L'élution des ARN a été réalisée après avoir séché la plaque 2 min à 900 rpm en incubant la plaque 2 min avec 30 µL de tampon d'élution préchauffé à 37°C. La plaque a été centrifugée 2 min à 900 rpm et redéposée sur support magnétique 3 min. Les ARN, se trouvant dorénavant dans le surnageant, ont été transférés dans une plaque d'élution en veillant à ne pas prélever de billes.

La quantité et la qualité des ARN totaux ont été déterminées via spectrophotométrie en utilisant un NanoDrop (Thermo Fischer) et les ARN purifiés conservés au -80°C.

2. RT-PCR.

Les ARNm ont été rétro-transcrits en utilisant le kit *Maxima H Minus Reverse Transcriptase™* (Thermo Fischer Scientific) selon les instructions du fournisseur. Pour normaliser la concentration en ADN complémentaire (ADNc), la concentration en ARN totaux des échantillons a été ajustée à 200 ng/ puit. Pour une réaction de synthèse d'ADNc, la matrice ARN, 1 µl d'oligo d(T) 100 pM, 1 µl de dNTP (10mM chacun) et de l'eau *nuclease free* qsp 15µL ont été déposés par puit dans une plaque stérile *nuclease-free*. Ensuite le mélange réactionnel composé de 4 µl de tampon RT 5X, 0,5µl de *RiboLock™ RNase Inhibitor* et 0,5 µl de *Maxima H Minus Reverse Transcriptase* (200U/µl) a été déposé dans chaque puit. Centrifugé brièvement, la plaque a ensuite été incubée 30 min à 50°C puis 15 min à 85°C afin de stopper la réaction.

La quantité en ADNc a été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop) pour chaque échantillon. Les échantillons d'ADNc ont alors été, soit directement utilisés pour amplification qPCR, soit conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

3. PCR quantitative en temps réel (qPCR).

Les qPCR ont été effectués en microplaques 96-puits stériles avec le thermocycleur LightCycler® (*Roche Applied Science*).

Selon le type d'amorce, le mélange réactionnel ajouté dans chaque puit (18µL) fut le suivant. Pour les amorces *Thermo Fischer Scientific* (*nr1i2*, *ahr2*, *cyp1a*, *cyp2aa12* et *cyp3c1*), 10 µl de tampon *2X Fast TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 2 µL d'amorces (la sonde TaqMan correspondante est dans ce cas déjà mélangée aux amorces) et 7 µL d'eau *nuclease-free*.

Pour le gène *cyp3a65* les *primers* ont été désigné sur le site internet de Sigma-Aldrich à partir de la séquence complète du gène et des sondes complémentaires disponibles, le mélange réactionnel était composé de 3 µl d'amorces sens et anti-sens (1,5 µl chacun), 1,5 µL de sonde TaqMan, 3 µL d'eau *nuclease-free*, de 10 µL de tampon 2X *Fast TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) et de 2 µL d'ADNc.

Dans les deux cas, les plaques ont été centrifugé 30 sec à 1000 g puis incubé 2 min à 50°C puis 95°C pendant 20 secondes. A la suite de cette incubation, 40 cycles d'amplifications ont été appliqué avec à chaque cycle une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes puis une phase d'hybridation/élongation pendant 30 secondes, à 60°C. La quantité d'ADN amplifiée est mesurée grâce aux sondes TaqMan (Figure 15).

La sonde TaqMan est un oligonucléotide spécifique du fragment d'ADN d'intérêt, il y a donc une sonde spécifique à chacun des gènes d'intérêts cités précédemment. Le mode d'action des sondes TaqMan est illustré en Figure 15. La sonde contient un fluorochrome rapporteur en son extrémité 5' et un fluorochrome absorbeur en son extrémité 3', tant que la sonde est intacte aucune fluorescence n'est émise par le rapporteur du fait de la proximité de l'absorbeur qui réduit la fluorescence émise lors du transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Si la sonde est au contact d'une séquence complémentaire, elle va alors s'hybrider en aval de l'un des sites d'amorce. Au fur et à mesure de l'élongation de l'amorce, la sonde est clivée par l'activité des nucléases 5' de l'ADN polymérase *Taq*. Le clivage entraîne ainsi la séparation des deux fluorochromes, ayant pour conséquence l'augmentation de l'intensité de fluorescence émise par le rapporteur. A chaque cycle, l'opération se répète, si bien que l'intensité de fluorescence va être proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

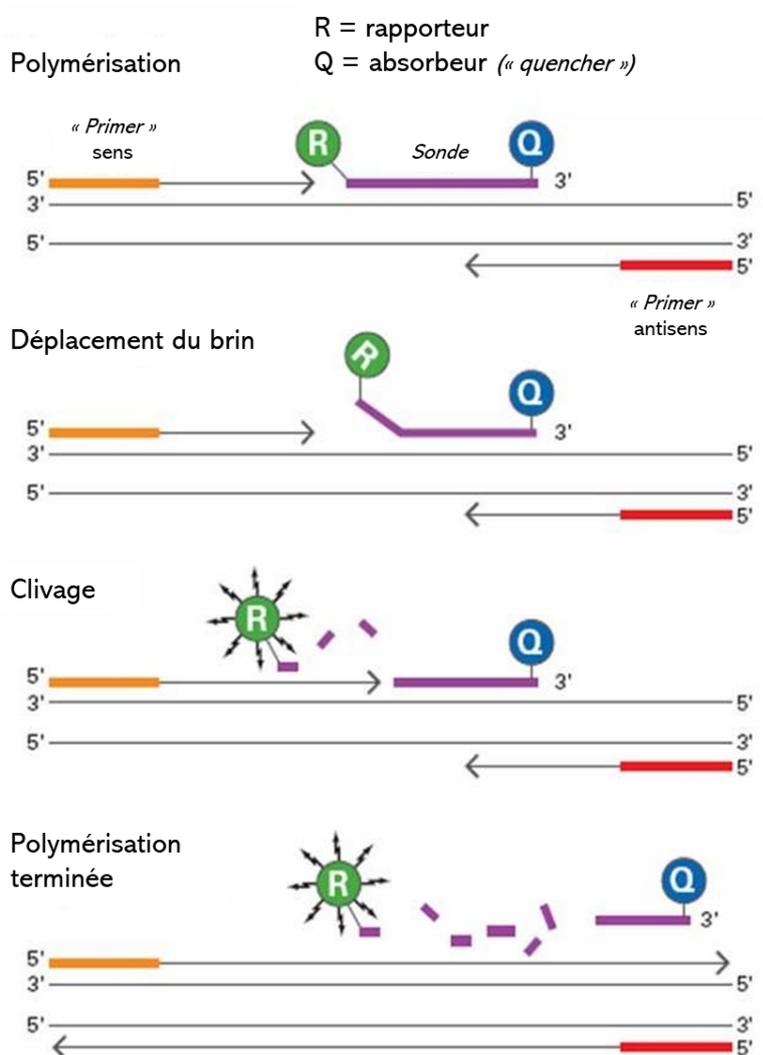


Figure 15 : Représentation schématique de la PCR basé sur TaqMan (D'après Thermo-Fischer Scientific).

Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler® 96. À partir du nombre de cycles seuils CT « Cycle Threshold » obtenu pour chaque individu et à l'aide d'une gamme étalon, réalisé au préalable, le taux d'expression génique des différents gènes cibles ont été déterminés par quantification absolue. Les CT correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent émis soit significativement supérieur au bruit de fond, et donc détecté.

RÉSULTATS

A. Mises au point méthodologiques

1. Mise en place de la culture primaire

Lors du lancement des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre, un suivi régulier a été réalisé au microscope inversé (illustré en Figure 16). Les cellules sont bien individualisées le premier jour, puis elles forment rapidement des agrégats dès 48h, lesquels se maintiennent et ont tendance à s'étaler jusqu'à 96h. Ces structures cellulaires sont typiques des cultures primaires d'hépatocytes de poisson (Le Fol et al., 2015), ce qui atteste de la qualité des cultures mises en place. Un test de viabilité cellulaire a été réalisé à 96h montrant une viabilité supérieure à 90%.

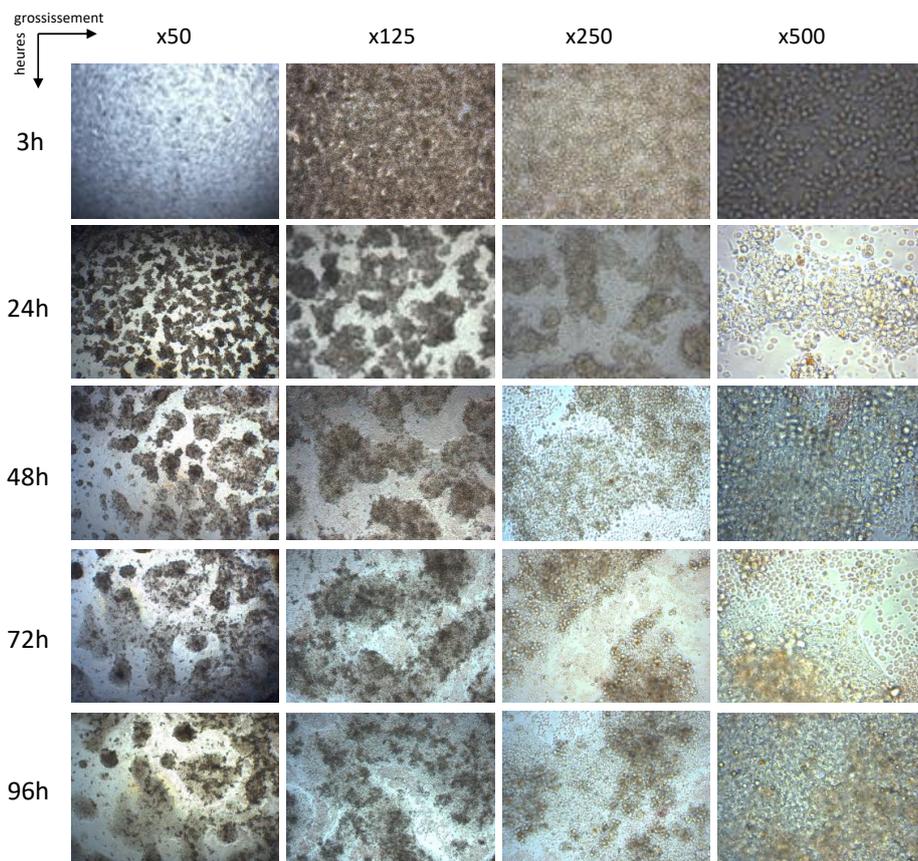


Figure 16 : Évolution au cours du temps (3 à 96h) des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre (densité cellulaire : 500 000 cellules par puits). Visualisation au microscope inversé à différents grossissements.

2. Détermination de la densité cellulaire optimale

Dans l'optique de réaliser des extractions d'ARN totaux à partir de cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre, la première étape a été de déterminer la densité cellulaire optimale permettant une extraction d'une quantité suffisante d'ARN totaux. Une série d'expérimentations a donc visé à déterminer la quantité d'ARN totaux extraite en fonction de la quantité de cellulesensemencée. Pour la réalisation d'une RT-PCR, une concentration autour de 30 à 50 ng/ μ L en ARN totaux est requise. Les résultats, présentés en Figure 17, montrent qu'une densité de 500 000 cellules par puits permet d'obtenir une concentration autour de 30 ng/ μ L.

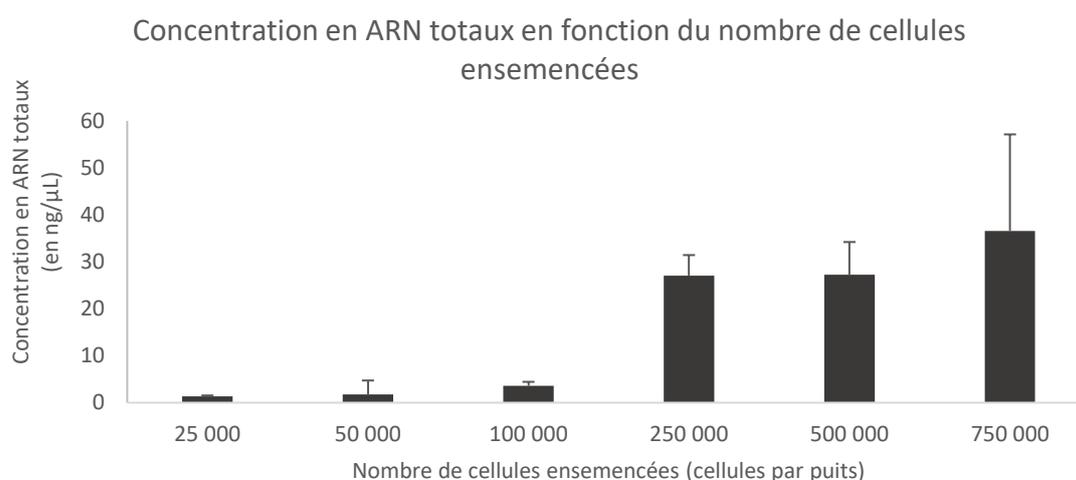


Figure 17 : Détermination de la densité cellulaire optimale pour l'extraction d'ARN totaux

3. Détermination du nombre d'embryons de poissons-zèbre nécessaires à l'extraction d'ARN totaux

De même que pour les cultures cellulaires, il a fallu déterminer le nombre d'embryons nécessaires pour obtenir une concentration suffisante d'ARN totaux en vue de l'analyse de l'expression des gènes par RT-PCR. Des *pools* de 1 à 10 individus, selon le stade de développement, ont été extraits et les ARN totaux quantifiés. Le résultat de cette expérimentation est présenté en Figure 18. Il a alors été choisi de regrouper 7 individus pour les stades de développement de 24 et 48 hpf et 4 pour les stades 72 et 96 hpf pour disposer d'au moins 50 ng/ μ L d'ARN totaux.

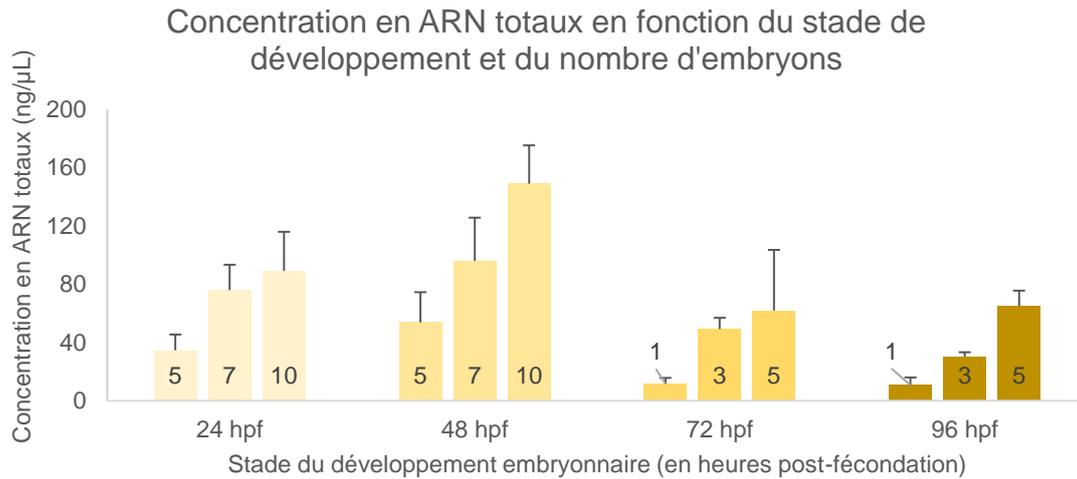


Figure 18 : Détermination du nombre d'embryons de poissons-zèbre nécessaires pour l'extraction d'ARN totaux en fonction du stade de développement exprimé en heures post-fertilisation (hpf). Les chiffres sur les histogrammes représentent le nombre d'individus poolé ($n = 1-10$)

B. Détermination de la toxicité aiguë du clotrimazole in vitro et in vivo

Afin de déterminer les concentrations en clotrimazole à utiliser pour évaluer ses effets sur l'expression de gènes cibles, il convenait au préalable d'évaluer sa toxicité sur les modèles d'étude. *In vitro*, l'effet du clotrimazole sur la viabilité cellulaire a été évaluée avec le test MTT sur la lignée hépatique de poisson-zèbre ZFL. En Figure 19 sont représentés les résultats des tests MTT menés à 24h. D'autres temps d'expositions (6h ; 48 et 72h) ont également été testés mais ne sont pas représentés ici. Par ailleurs, des comptages au bleu de Trypan ont été réalisés sur cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre après des expositions 96h afin d'estimer la mortalité cellulaire. Dans l'ensemble des tests, une faible mortalité (inférieure à 20%) a été relevée mettant en évidence l'absence de toxicité *in vitro* de la molécule jusqu'à 100 μM , quel que soit le temps d'exposition ou le modèle cellulaire.

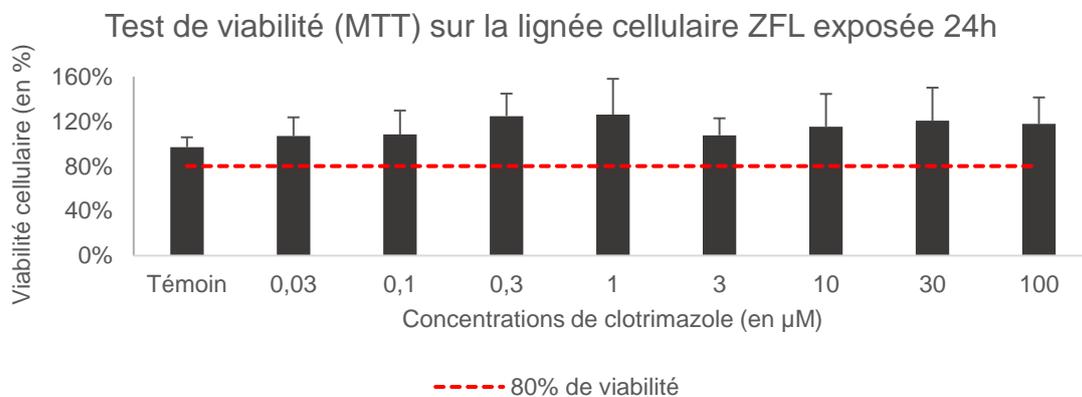


Figure 19 : Absence d'effet du clotrimazole sur la viabilité cellulaire (test au MTT) dans la lignée cellulaire ZFL après une exposition de 24h ($n = 6$).

In vivo, le test FET (*Fish Embryo Toxicity*) a permis de déterminer la toxicité du clotrimazole. Les différentes plaques d'embryons ont été exposé pendant 4 jours à des concentrations croissantes de clotrimazole (0,17 ; 0,5 ; 1,45 ; 4,35 et 13 μM). Les observations quotidiennes d'un ensemble de paramètres ont permis d'évaluer l'effet de la molécule sur la mortalité embryonnaire mais également sur le développement. A 96 hpf, la mortalité de l'ensemble des embryons exposées à la plus haute concentration de clotrimazole (13 μM) a été de 100%. Pour le groupe exposé à 4,35 μM , la mortalité cumulée était de 5%. Pour les autres concentrations testées, aucune mortalité n'a été relevé. A la concentration de 13 μM , des anomalies de développement ont été observées rapidement. Dès 24 hpf un manque de mouvement spontané a été observé. A 48 hpf, l'ensemble des embryons de ce groupe présentaient un défaut de pigmentation, une absence de circulation sanguine dans la queue, une malformation de la queue ainsi qu'une malformation du sac vitellin. Par ailleurs, 50% des individus de ce groupe présentaient une lordose ou une cyphose, 40% une scoliose et 30% une absence de développement des yeux. Pour le groupe exposé à 4,35 μM , 100% des individus présentaient une pigmentation moindre que les témoins à 48 hpf et 5% une absence de développement des yeux. Dans ce même groupe à 96 hpf, l'ensemble des individus présentaient un retard de développement et 5% des œdèmes. Pour le reste des concentrations testées (0,17 ; 0,5 et 1,45 μM), le nombre de malformations observées était modéré (1 à 2 maximum par groupe de 20 individus). Le rapport complet des malformations réalisées est représenté en Annexe II.

Sur la base de ces résultats, les concentrations retenues pour la suite de l'étude étaient comprises entre 0,045 μM et 1,45 μM , *i.e.* concentrations n'entraînant ni mortalité, ni anomalie du développement.

C. Analyses de l'expression de gènes cibles de PXR et AhR in vitro et in vivo

1. Expression basale chez les embryons de poisson-zèbre au cours du développement et dans les hépatocytes en culture

L'expression basale des gènes a été suivi au cours du développement embryonnaire du poisson-zèbre avec des relevés à 24, 48, 72 et 96 hpf. Globalement, les résultats montrent une dynamique d'expression en fonction des gènes et du stade de développement (Figure 20).

Pour les deux gènes codant pour les récepteurs zfAhR et zfPXR (*i.e.* *ahr2* et *nr1i2*), une cinétique similaire est observée. Concernant *ahr2* (zfAhR), une augmentation progressive de son expression est relevée de 24 à 72 hpf suivie d'une diminution significative de l'expression basale à 96 hpf. Concernant *nr1i2* (PXR), une augmentation de l'expression intervient entre 48 et 72 hpf puis une baisse semblable à celle observée sur *ahr2* mais non significative intervient entre 72 et 96 hpf.

L'expression basale des quatre gènes (*cyp1a*, *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1*) correspondant aux 3 familles de cytochrome P450 montre que celle-ci est dépendant du stade de développement. En effet, l'expression basale des différents gènes est détectée très tôt (dès 24 hpf) à un niveau faible qui persiste jusqu'à 72 hpf. Puis elle augmente nettement à 96 hpf. Cette hausse est significative pour les gènes *cyp2aa12* et *cyp3a65* mais pas pour les gènes *cyp1a* et *cyp3c1* du fait d'une forte variabilité biologique entre les groupes.

Dans les hépatocytes primaires non exposés, l'ensemble des gènes ciblés ont été quantifiés après 72 et 96 heures de culture. Ce constat confirme l'expression connue de ces gènes dans les cellules hépatiques de poisson mâles adultes.

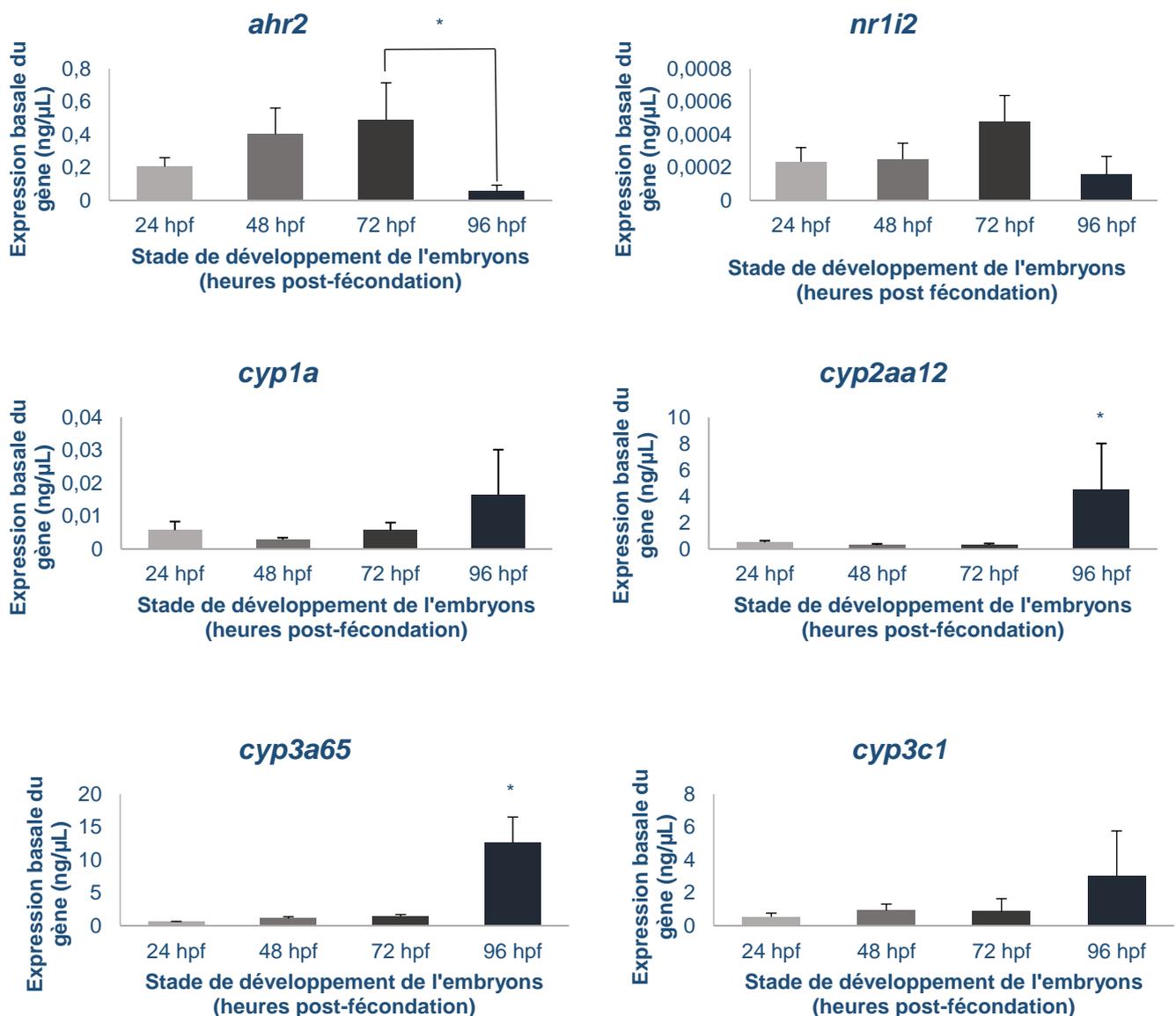


Figure 20 : Expression basale des gènes : *cyp1a* ; *cyp2aa12* ; *ahr2* ; *cyp3a65* ; *cyp3c1* et *nr1i2* au cours du développement embryonnaire (ANOVA et post-hoc de Tuckey, * = $p < 0,05$; $n=4$).

2. Effet de la dioxine (TCDD) sur l'expression des gènes cibles in vivo

Les résultats des qPCR sur des embryons de poissons-zèbre exposés à une concentration de dioxine (0,05 nM TCDD) à différents stades de développements sont présentés en Figure 21.

Une première série d'expérimentations a été réalisé entre 0 et 96 hpf, montrant un effet différentiel de la dioxine selon le gène étudié et le temps d'exposition. Les résultats montrent une induction significative du gène *cyp1a*, gène cible de AhR, dès 24 hpf jusque 96 hpf avec des valeurs de taux d'induction par rapport au témoin très important (allant de 33 à 24 hpf à 530 à 72 hpf). On constate que la TCDD est également capable d'induire les gènes *cyp2aa12* et *cyp3a65* de manière moins forte que *cyp1a* et seulement à partir de 72 hpf. Aucun effet de la TCDD n'était observé sur les gènes *cyp3c1* et *nr1i2* quel que soit le stade de développement.

Une deuxième série d'expérimentations (Annexe III) a été réalisée pour évaluer l'influence de la période d'exposition (72 hpf et 120 hpf) des embryons à la TCDD sur l'expression de ces gènes. Après 72 hpf et 120 hpf, nous confirmons l'induction des gènes *cyp1a*, *cyp3a65* et *cyp2aa12* par la TCDD et l'absence d'induction de *nr1i2*. Concernant le *cyp3a65*, l'induction observée est cependant moins importante que dans la première série d'expérimentations (1,9 contre 5,4 fois le témoin à 72 hpf). Cette induction n'était pas observée à 120 hpf. Les résultats liés au gène *cyp3c1* ne confirment pas la première série d'exposition puisqu'une induction significative par la TCDD a été cette fois constatée à 72 hpf et 120 hpf.

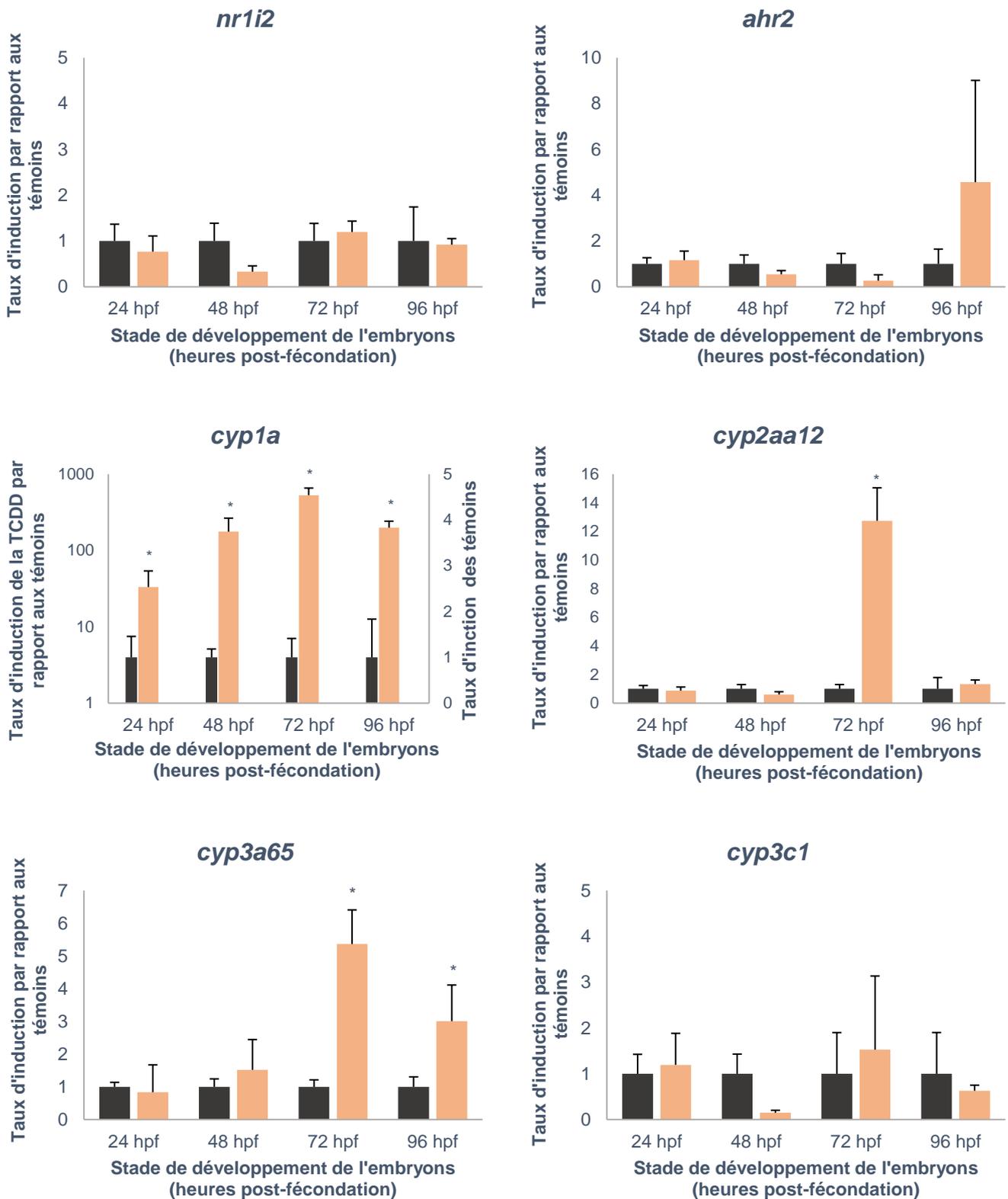


Figure 21 : Expression des gènes cibles après expositions d'embryons de poisson-zèbre à une concentration de dioxine (0,05 nM, orange) à différents stades développementaux (ANOVA et post-hoc de Tuckey, * = $p < 0,05$; $n=4$). Pour le gène *cyp1a*, les expressions chez les témoins (noir) et les embryons exposés à la TCDD sont représentées sur des échelles différentes par soucis de clarté (échelle de gauche TCDD ; échelle de droite : témoins).

3. Effet du clotrimazole sur l'expression des gènes cibles in vivo

Les résultats présentés en Figure 22 correspondent à l'expression des gènes cibles chez des embryons de poissons-zèbre exposés à une gamme de clotrimazole (0,045 ; 0,145 ; 0,435 et 1,45 μM et 0,054 ; 0,109 ; 0,217 et 0,435 μM) à différents stades de développements.

La première série d'exposition a été réalisée entre 0 et 96 hpf. Il ressort que la majorité des gènes induits de manière statistiquement significative le sont à 72 hpf. Il est ainsi relevé une induction significative de *cyp1a*, *cyp2aa12*, *cyp3c1* et *cyp3a65* aux concentrations les plus faibles de clotrimazole. Les gènes *nr1i2* et *ahr2* ne sont pas induits par le clotrimazole à ces stades développementaux (graphiques correspondants en Annexe IV).

Dans la deuxième série d'exposition menée entre 0 et 72 hpf, on ne confirme pas l'effet du clotrimazole sur l'induction de ces gènes à 72 hpf. Toutefois, à 120 hpf, trois gènes sont induits de façon significative aux deux plus fortes concentrations : *cyp1a*, *cyp2aa12* et *cyp3c1*. C'est également le cas du gène *nr1i2* induit de façon significative à la concentration la plus élevée. A l'inverse les gènes *cyp3a65* et *ahr2* sont également induits par le clotrimazole mais uniquement aux deux concentrations les plus faibles.

1^{ère} série d'expositions *in vivo*

| Gènes cibles | 24 hpf | | | | 48 hpf | | | | 72 hpf | | | | 96 hpf | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 0,045 μM | 0,145 μM | 0,435 μM | 1,45 μM | 0,045 μM | 0,145 μM | 0,435 μM | 1,45 μM | 0,045 μM | 0,145 μM | 0,217 μM | 1,45 μM | 0,045 μM | 0,145 μM | 0,435 μM | 1,45 μM |
| <i>cyp1a</i> | | | | | | | | | * | * | | | | | | |
| <i>cyp2aa12</i> | | | | | | | | | * | * | | | | | | |
| <i>cyp3c1</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>cyp3a65</i> | | | | | | | | | * | * | | | | | | |
| <i>nr1i2</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>ahr2</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |

2^e série d'expositions : 0-72 hpf et 72-120 hpf

| Gènes cibles | 72 hpf | | | | 120 hpf | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 0,054 μM | 0,109 μM | 0,217 μM | 0,435 μM | 0,054 μM | 0,109 μM | 0,217 μM | 0,435 μM |
| <i>cyp1a</i> | | | | | | | * | |
| <i>cyp2aa12</i> | | | | | | | * | * |
| <i>cyp3c1</i> | | | | | | | * | * |
| <i>cyp3a65</i> | | | | | * | * | | |
| <i>nr1i2</i> | | | | | | | | * |
| <i>ahr2</i> | | | | | * | * | | |

| Légende | |
|----------------------------|---|
| fold change < 0,5 | |
| 0,5 ≤ fold change ≤ 1,5 | |
| 1,5 < fold change < 3 | |
| fold change > 3 | |
| fold change > 15 | |
| ANOVA et Tuckey, p < 0,05) | * |

Figure 22 : Expression géniques après expositions d'embryons de poissons-zèbre à une gamme de clotrimazole à différents stades développementaux (n=4).

4. Expression des gènes cibles in vitro

Les résultats des qPCR menés sur des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre exposées à une concentration de dioxine (1 nM) et une dose de clotrimazole (1 µM) à plusieurs temps d'expositions sont présentés en Figure 23.

La TCDD induit le gène *cyp1a* quel que soit le temps d'exposition. Le *cyp2aa12* est induit à 24h et 72h mais de façon plus importante à 96h (taux d'induction par rapport au témoin = 42). Les deux autres gènes analysés ici (*cyp3a65* et *nr1i2*) ne sont pas induits avant 96h. Le gène *cyp3a65* est induit de façon significative par la TCDD après 96h d'exposition. Le gène *nr1i2* est faiblement induit par la TCDD à 96h.

Un traitement au clotrimazole entraîne une induction des gènes investigués uniquement après 96h d'exposition. Les gènes *cyp1a* et *cyp3a65* sont induits de manière significative tandis que les résultats pour *cyp2aa12* et *nr1i2* n'ont pu être testés statistiquement du fait d'un manque de réplicas sur cette expérience.

A la suite de cette série d'expositions, une seconde exposition de cultures primaires d'hépatocytes a été réalisée avec un temps d'exposition unique de 96h, une dose de TCDD et une gamme de clotrimazole allant de 0,3 à 30 µM. Toutefois, du fait d'une suspicion de contamination des cellules, les données d'expressions des gènes n'ont pas été présentées. Cependant, malgré une importante variabilité sur cette série d'expérience, une même tendance en ressort avec une induction des gènes *cyp1a* et *cyp3a65* par la TCDD et une induction de l'ensemble des gènes analysés (*cyp1a*, *cyp2aa12*, *cyp3c1*, *cyp3a65*, *nr1i2* et *ahr2*) à 1 µM de clotrimazole. Il ne s'agit que de tendances mais elles confortent les données acquises précédemment sur les cellules hépatiques en culture primaire.

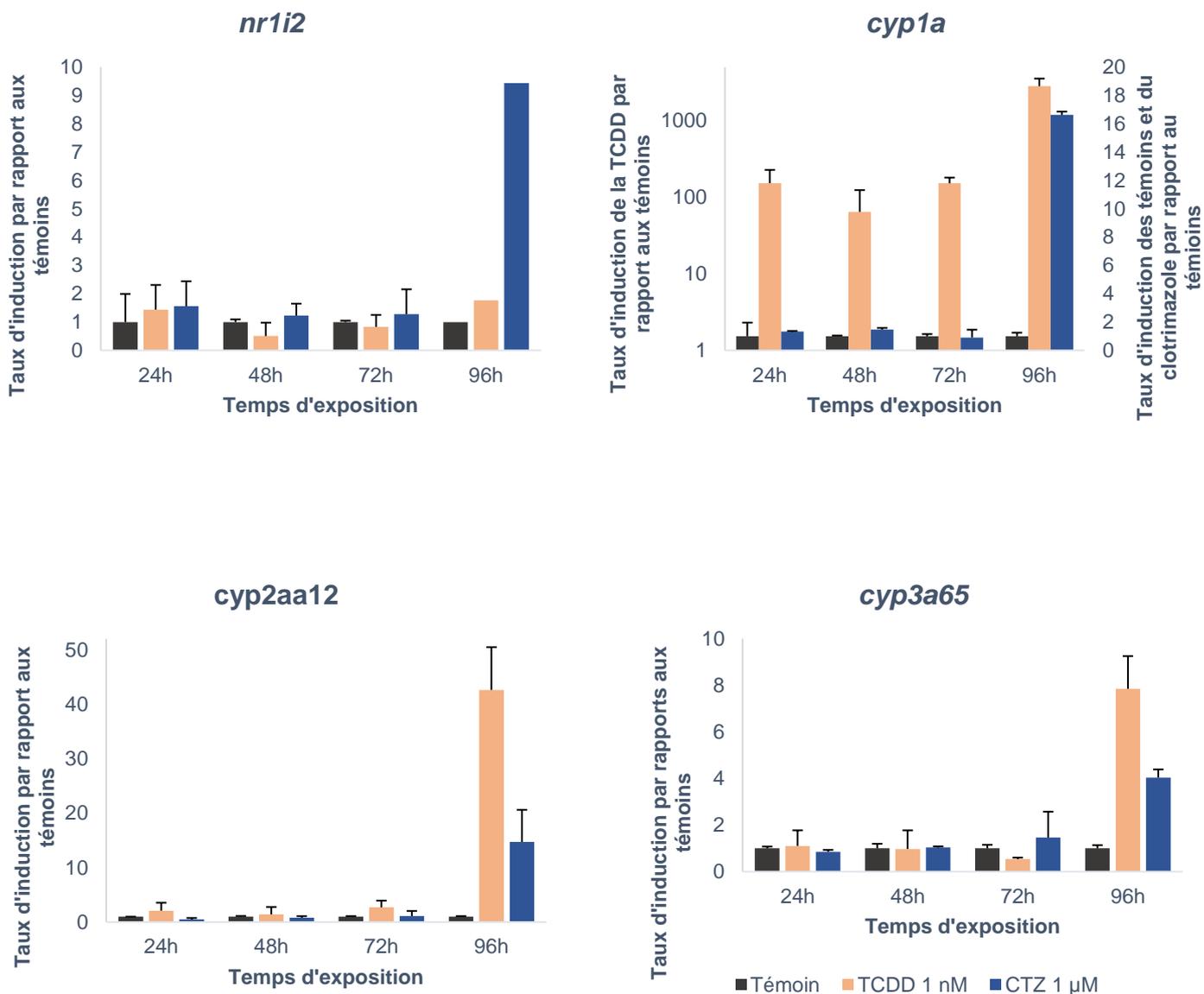


Figure 23 : Expression géniques après expositions de cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre à la TCDD et au clotrimazole (CTZ) à différents temps d'expositions (n=2). Pour le gène *cyp1a*, les expressions chez les témoins (noir), les embryons exposés au CTZ (bleu) et à la TCDD sont représentées sur des échelles différentes par soucis de clarté (échelle de gauche TCDD ; échelle de droite : témoins et CTZ).

DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à un ligand spécifique du récepteur zfPXR, le clotrimazole et un ligand spécifique du récepteur zfAhR, la dioxine sur un ensemble de gènes zfAhR régulés (*cyp1a*) ou zfPXR-régulés (*cyp2aa12* ; *cyp3a65* ; *cyp3c1*) dans deux modèles biologiques : la culture primaire d'hépatocytes de poissons-zèbre et les embryons de poissons-zèbre à différents stades de développement.

Les résultats montrent :

- une expression de ces gènes cibles dans les deux modèles ;
- une dérégulation de ces gènes dans les différents modèles biologiques qui est dépendante du temps d'exposition, du stade de développement et de la substance considérée.

1. Analyse de l'expression constitutive des gènes codant pour les récepteurs zfAhR, zfPXR et des cytochromes P450 (phases 1, 2 et 3)

L'analyse de l'expression constitutive des gènes chez le poisson-zèbre montre une expression précoce des gènes et dépendante du stade de développement pour certains des gènes étudiés (Figure 20).

Concernant *ahr2* gène codant pour le récepteur zfAhR, différentes études se sont intéressées à la cinétique de l'expression de ce gène au cours du développement embryonnaire chez le poisson-zèbre et rapportent une expression très précoce (dès 24 hpf), une augmentation progressive de son expression au cours du développement jusqu'à 72 hpf, ce qui est comparable aux données rapportées dans ce travail (Cunha et al., 2017). D'autres études rapportent cette augmentation précoce avec une augmentation progressive jusqu'à 120 hpf (Glisic et al., 2016).

Un nombre beaucoup plus réduit d'études se sont intéressées à l'expression constitutive du gène *nr1i2* codant pour le récepteur zfPXR. Comme pour le zfAhR, le récepteur zfPXR s'exprime très tôt dès 24 hpf et atteint un pic d'expression à 72 hpf (Cunha et al., 2017). En revanche, dans notre étude on observe une diminution de l'expression après 72 hpf, ce que Cunha et al., (2017) ne retrouve pas.

Il est intéressant de noter que la comparaison des quantités d'ADNc mesuré par qPCR montre que le récepteur zfAhR est exprimée à des niveaux plus importants que le zfPXR, ce qui laisse suggérer une importance particulière des voies de signalisations zfAhR-dépendantes dans les mécanismes de détoxification chez l'embryon de poisson-zèbre.

Outre l'analyse de l'expression constitutive des gènes codant pour les récepteurs zfAhR et zfPXR, a été étudié l'expression des gènes codant pour quatre enzymes de la famille des CYP. Globalement, on constate des profils similaires présentant une expression précoce (détectée dès 24 hpf) avec une variation au cours du développement embryonnaire avec une hausse marquée entre 72 et 96 hpf. La littérature semble en accord avec ces résultats, notamment les travaux de Andreasen et al. (2002) et Bräunig et al. (2015) sur l'expression du *cyp1a* chez le poisson-zèbre. De même, l'expression constitutive relevée pour *cyp3c1* et *cyp3a65* est confirmée dans la littérature par différentes techniques comme la RT-PCR (*cyp3c1* : Corley-Smith et al., 2006), l'imagerie sur des lignées transgéniques de poissons-zèbres Tg(*CYP3A65S:EGFP*) et Tg(*CYP3A65L:EGFP*) (*cyp3a65* : Chang et al., 2013) ou encore l'hybridation *in situ* (*cyp3c1* : Corley-Smith et al., 2006 ; *cyp3a65* : Tseng et al., 2005). L'utilisation de l'hybridation *in situ* permet ainsi de montrer une forte expression locale de ces gènes au niveau du foie et de l'intestin du poisson-zèbre. Aucune étude n'a été relevée concernant l'expression du gène *cyp2aa12*, ne permettant pas de confronter nos résultats mais l'expression de ce gène présente un profil similaire avec les autres gènes codant pour des CYP.

L'induction des différents CYP s'opérant à 96 hpf pourrait intervenir à la suite d'une forte expression des gènes codant pour les récepteurs à 72 hpf. Cela confirme la criticité de la période de développement 72/96 hpf. Ces gènes codant pour des enzymes impliqués dans les réactions du métabolisme, il est également intéressant de voir que des activités enzymatiques EROD (*cyp1a*) et BFCOD (*cyp3a*) existent à ces stades de développement et notamment à 96 hpf (Creusot et al., 2015). Ce stade correspond notamment à la période d'éclosion des œufs de poisson-zèbre et à l'ouverture de la bouche et donc à une période où les individus vont avoir leur premier contact avec le milieu extérieur, nécessitant ainsi l'activation des systèmes de détoxification, notamment enzymatique.

In vitro, une expression constitutive de l'ensemble des gènes analysés a été observée (Figure 23). Cette expression constitutive s'accompagne d'une activité enzymatique de ce modèle comme en témoigne les travaux de Le Fol et al. (2015) sur l'activité métabolique des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre.

Ces données confirment que l'embryon possède dès 24 hpf, l'ensemble du matériel génétique qui suggère des capacités de détoxification et de métabolisme des xénobiotiques (Verbueken et al., 2018). L'embryon de poisson-zèbre et les cultures primaires constituent des modèles métaboliquement compétent pertinents dans l'étude de l'activation de voies zfAhR- et zfPXR-dépendantes.

2. Effet de la dioxine (TCDD) sur l'expression des gènes cibles *in vivo* et *in vitro*

La dioxine constitue un ligand de référence de la voie zfAhR (Beischlag et al., 2008 ; Nguyen and Bradfield, 2008) présentant une forte affinité pour ce récepteur (comme en témoigne l'activité luciférase dans la lignée ZXLH après un traitement à la dioxine : Annexe VII). Dans les différents modèles utilisés dans ce travail, l'induction du gène *cyp1a* par la TCDD (Figure 21 ; Figure 23), quel que soit le temps d'exposition des cellules ou du stade de développement des embryons de poissons-zèbre, confirme la capacité de la TCDD à induire des gènes zfAhR-régulés. Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de Kim et al. (2013) sur de l'imagerie chez une lignée transgénique de poissons-zèbre, où l'induction du gène *cyp1a* est associée à de la fluorescence ou encore aux résultats de Andreasen et al. (2002) sur des embryons de poissons-zèbre exposés notamment à la dioxine. Ces inductions du gène *cyp1a* s'accompagnent d'une induction de l'activité enzymatique EROD (Annexe VI).

Ces inductions rapides (dès 24h d'exposition), non-transitoires et très importantes en termes d'induction du *cyp1a* que ce soit *in vitro* ou *in vivo* témoignent donc d'un modèle d'activation directe de la voie zfAhR par fixation de la TCDD sur le récepteur AhR.

Dans le cadre de ce travail, on note que l'induction par la dioxine du gène *cyp1a* s'accompagne de gènes appartenant à la famille des *cyp 2* et *3*. Les gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* ont ainsi été induits significativement par 0,05 nM de TCDD à 72 hpf (Figure 21) et *in vitro* par 1 nM TCDD après 96h d'exposition (Figure 23). Peu d'informations sont présentes dans la littérature au sujet de l'induction par le TCDD du gène *cyp2aa12* mises à part celles de Kubota et al. (2015) montrant une induction du gène *cyp2aa12* par un composé « *dioxin-like* », le PCB126, et des données internes au laboratoire montrant une induction du *cyp2aa12* chez des embryons de poissons-zèbre exposés à 200 µg/L de TCDD entre 96 et 120 hpf. A l'inverse de nombreuses études s'intéressent à l'induction des gènes *cyp3a65* et *cyp3c1* par des ligands zfAhR. Ainsi Chang et al. (2013) et Tseng et al. (2005) rapportent la dérégulation du gène *cyp3a65* par la TCDD et Shaya et al. (2019) celle du gène *cyp3c1* par un ligand prototypique de la voie zfAhR (la β-naphthoflavone) dans le foie ou l'intestin de poisson-zèbre. Un élément de la littérature permet de conclure quant à la régulation de ces gènes par la voie zfAhR, lorsque Kubota et al. (2015) expose des embryons de poissons-zèbre à du PCB126 tout en bloquant la voie zfAhR par des morpholinos *ahr2*, une diminution de l'expression des gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* est constatée. Par ailleurs, la co-exposition d'embryons ou de lignées cellulaires hépatiques de poissons-zèbres à des composés HAP « *dioxin-like* » et à un antagoniste de la voie zfAhR, l'α-naphtoflavone, a montré une diminution de l'activité enzymatique EROD et BFCOD (Creusot et al., 2015).

L'induction de l'ensemble de ces gènes est dépendante de la voie zfAhR et nécessite un récepteur AhR fonctionnel. Contrairement à *cyp1a*, l'induction par la TCDD des gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* s'opère plus tardivement avec des taux d'induction plus faibles. La régulation de ces gènes par la voie zfAhR ne semble pas correspondre à une activation directe par zfAhR mais davantage à une interaction croisée de zfAhR vers zfPXR (schématisé en Figure 24) comme en témoigne les travaux de Tseng et al. (2005). Il serait néanmoins nécessaire d'évaluer l'affinité de la TCDD pour le récepteur zfPXR et ainsi s'assurer de l'absence d'interférence entre la TCDD et la voie de signalisation de zfPXR.

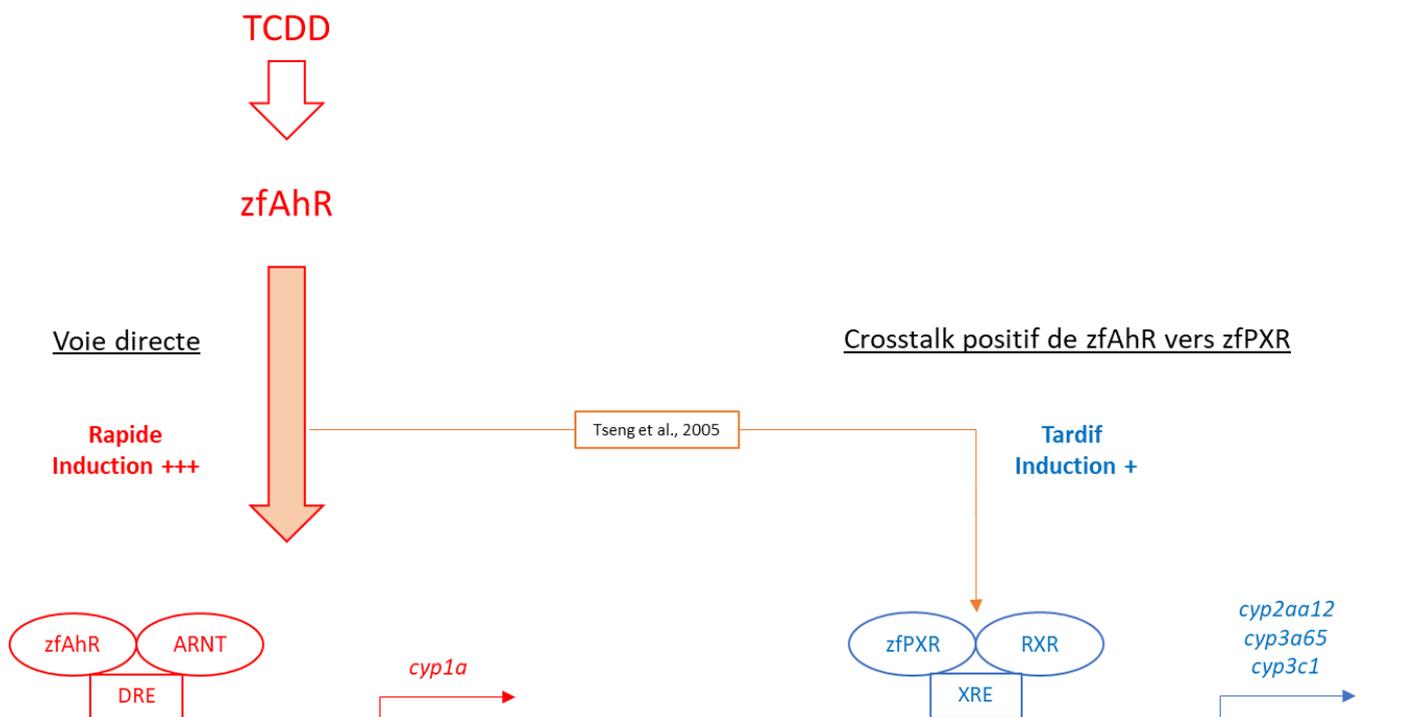


Figure 24 : Proposition d'activation par la dioxine de voies de signalisations zfAhR directe et zfPXR via un crosstalk positif zfAhR-zfPXR (modifié d'après Tseng et al., 2005) (ARNT : AhR Nuclear Translocator, DRE : Dioxin Response Element).

3. Effets du clotrimazole (CTZ) sur l'expression des gènes cibles *in vivo* et *in vitro*

Le clotrimazole constitue un ligand de référence de la voie zfPXR (Eide et al., 2018 ; Moore et al., 2002). Il s'agit également d'un ligand du PXR humain ($EC_{50} = 0,88 \mu\text{M}$; Lange et al., 2017) mais l'affinité du clotrimazole est bien supérieure pour le PXR de poisson (Corcoran et al., 2014 ; Milnes et al., 2008) notamment celui de la carpe (*Cyprinus carpio*) ($EC_{50} = 0,024 \mu\text{M}$; Lange et al., 2017).

De plus, certains auteurs ont rapporté que le clotrimazole était capable d'activer le récepteur zfAhR. Navas et al. (2004) a suggéré que le clotrimazole pouvait être un ligand atypique de la voie AhR induisant une augmentation de l'activité EROD dans des cultures primaires d'hépatocytes de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Cette induction n'était pas affectée par l'ajout d'un antagoniste du récepteur AhR (α -naphthoflavone). Chez le poisson-zèbre, nous avons cherché si le clotrimazole était capable d'agir directement sur le récepteur zfAhR. Les données sur l'activité EROD de la lignée hépatique ZFL (Annexe VI) ainsi que les données de l'activité luciférase sur la lignée ZXLH (Annexe VII) témoignent de l'absence d'affinité du clotrimazole pour le récepteur zfAhR. Des travaux menés dans le cadre du projet PestR ont en revanche montré l'affinité de cette molécule pour zfPXR (Ballaguer, Comm. Pers.). Il n'y a donc pas d'interférence direct du clotrimazole vers la voie zfAhR.

Dans nos travaux, les gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* ont tous été induits par le clotrimazole *in vivo* à 72 hpf à faibles concentrations qu'à 120 hpf (à faibles concentrations pour le gène *cyp3a65* et à fortes concentrations pour les gènes *cyp2aa12* et *cyp3c1*) (Figure 22). Ces données sont en accord avec les résultats de Kubota et al. (2015) notant une induction de ces trois gènes à de fortes concentrations d'un ligand de zfPXR (la prégnénolone). De plus, Kubota et al. (2015) notaient une répression de ce même gène lors du blocage de la voie zfPXR par un morpholino spécifique à zfPXR. Ces résultats témoignent de la nécessité d'avoir un récepteur PXR fonctionnel pour induire l'expression de ces gènes. Concernant les inductions non-concentrations dépendantes du gène *cyp3a65*, une étude rapporte une cinétique d'induction semblable à la notre à savoir une induction plus importante à une concentration de 10 μ M de dexaméthasone qu'à 100 μ M (Tseng et al., 2005)

In vitro, les gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* ont été induits après 96h de traitement à 1 μ M de clotrimazole (Figure 23). Cette induction du gène *cyp3a65 in vitro* est en accord avec les travaux de Eide et al. (2018) montrant une induction du même gène sur des hépatocytes en culture après seulement 24h d'exposition à 20 μ M de clotrimazole. Très peu de données de la littérature s'intéressent à l'expression des deux autres gènes dans des hépatocytes en culture toutefois nos données sont en accord avec des données internes au laboratoires montrant une induction du *cyp2aa12* chez des poissons-zèbre adultes exposés à 200 μ g/L de clotrimazole (à la fois après 2 et 7 jours).

L'induction des gènes *cyp2aa12*, *cyp3a65* et *cyp3c1* n'intervient qu'à partir de 72 hpf et pas avant. Ce résultat suggère que le récepteur zfPXR n'est pas fonctionnel à 24 et 48 hpf. Aucune expression constitutive du gène *nr1i2* n'avait d'ailleurs été constatée avant 72 hpf (Figure 20). Cette induction directe de la voie zfPXR, caractérisée par ces trois gènes, semble ainsi plus transitoire, moins importante en termes de taux d'induction (que l'activation directe par la TCDD de la voie zfAhR) et surtout dépendante du stade de développement pour l'embryon et du temps d'exposition pour les hépatocytes et les embryons. De plus, les réponses induites sont parfois non-concentrations-dépendantes (Annexe IV).

Parallèlement à ces inductions directes de gène par la voie zfPXR par le clotrimazole, a été observé *in vivo* et *in vitro* une activation atypique du gène *cyp1a*. En effet, *cyp1a* gène régulé par la voie zfAhR, a été induit par le clotrimazole, agoniste de la voie zfPXR *in vivo*, à 120 hpf et *in vitro* après 96 heures de traitement à 1 µM de clotrimazole. Dans le cadre de ce stage, nous avons montré que le clotrimazole n'avait pas d'effet direct sur l'activité enzymatique de *cyp1a* dans la lignée ZFL (activité EROD, Annexe VI) et sur le promoteur XRE-Luc dans un système rapporteur de la lignée ZXLH (activité luciférase, Annexe VII), ce qui suggère que le clotrimazole n'est pas capable d'activer directement zfAhR mais pouvait l'induire *in vivo* via sa liaison à zfPXR.

Ces observations pourraient témoigner d'une activation indirecte des voies de signalisation zfAhR lors de l'exposition à de fortes concentrations d'un ligand modèle de zfPXR. Une action indirecte pourrait également expliquer l'absence d'effet *in vitro* du clotrimazole sur l'activité enzymatique *cyp1a* et donc sur la voie zfAhR. Cette action indirecte pourrait correspondre à une interaction croisée entre la voie zfPXR vers la voie zfAhR (schématisée en Figure 25). Ce « *crosstalk* » positif a également été décrit par Kubota et al. (2015) observant une induction des gènes *ahr2* et *cyp1a* par un agoniste de zfPXR : la prégénolone.

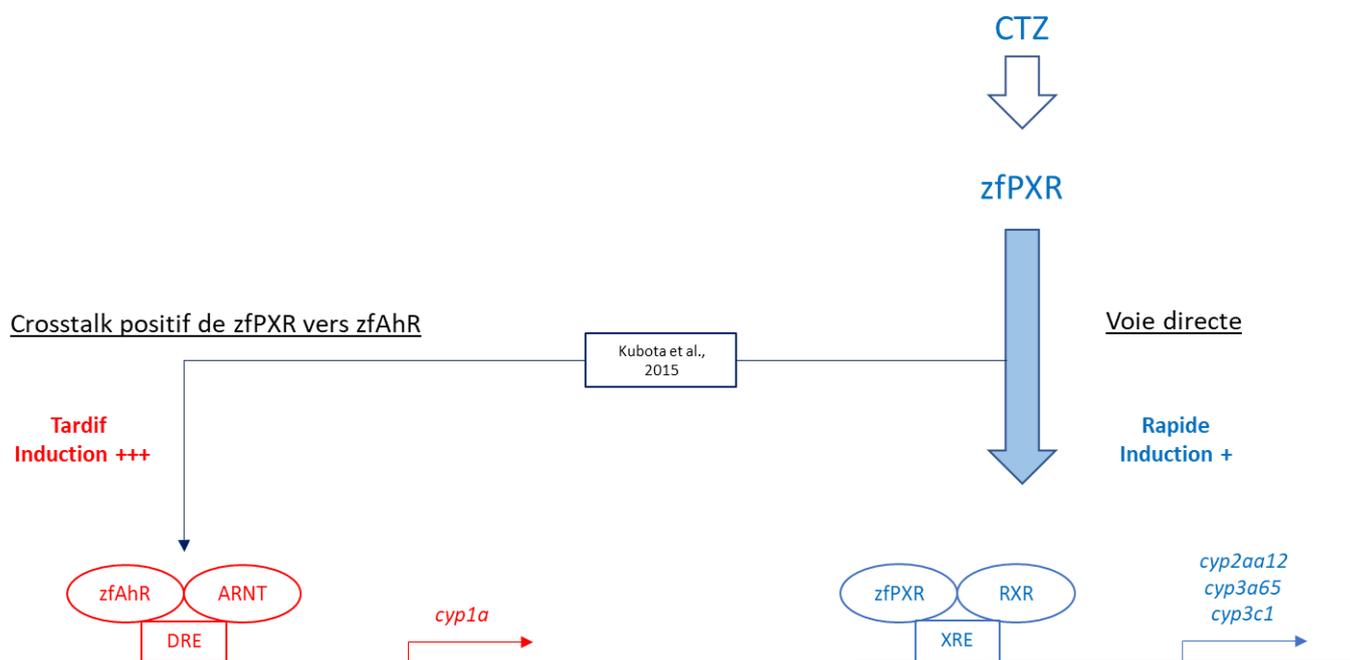


Figure 25 : Proposition d'activation par le clotrimazole de voies de signalisations zfPXR directe et zfAhR via un crosstalk positif zfPXR-zfAhR (modifié d'après Tseng et al., 2005) (ARNT : AhR Nuclear Translocator , DRE : Dioxin Response Element).

CONCLUSION

L'étude de la dynamique de l'expression de gènes codant pour les récepteurs zfPXR et zfAhR ou pour des enzymes du métabolisme de phase 1 a montré une variation de l'expression en fonction du stade de développement du poisson-zèbre dans les premiers jours après la fertilisation de l'œuf.

L'utilisation d'une double approche mêlant étude *in vivo* sur des embryons de poissons-zèbre et *in vitro* sur des cultures primaires d'hépatocytes de poissons-zèbre a montré des résultats complémentaires en ce qui concerne l'étude de l'expression des différents gènes cibles après expositions à des ligands typiques des voies zfPXR (clotrimazole) et zfAhR (TCDD). Les analyses menées par qPCR suggèrent l'existence de gènes propres aux voies de régulation (*cyp1a* pour zfAhR et *cyp2aa12*, *cyp3c1* et *cyp3a65* pour zfPXR). Par ailleurs, les résultats vont dans le sens d'une possibilité pour certains ligands comme la TCDD ou le clotrimazole d'activer, probablement par le biais d'interactions croisées bidirectionnelles entre récepteurs, un gène de la voie de signalisation opposé (schématisé en Figure 24 et Figure 25).

Le caractère dynamique (voire transitoire) de l'induction de gènes par un ligand de la voie zfPXR a montré l'importance de la période d'exposition mais également du stade de développement pendant lequel est réalisé l'exposition. Une approche cinétique plus approfondie autour de 72 à 120 hpf pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la dynamique d'expression de ces gènes. De même, *in vitro*, les résultats des analyses gènes cibles menées sur cultures primaires d'hépatocytes ont pu mettre en avant les capacités métaboliques de ces cellules mais également une certaine variabilité biologique de ce modèle. Le développement de lignées cellulaires hépatiques transfectées avec zfPXR pourrait également devenir une alternative. De plus, l'utilisation d'autres ligands spécifiques à zfPXR et notamment des antagonistes pourraient permettre d'appuyer ces résultats. S'agissant d'un des objectifs du projet PestR, aucun antagoniste spécifique à zfPXR n'a encore été identifié. D'autres approches sont également prévues dans ce projet d'étude, notamment des analyses transcriptomiques permettant une approche plus globale en termes de gènes investigués. Finalement, le développement de nouveaux outils au sein du laboratoire tel que des souches de poissons-zèbre transgéniques (CYP3A65-GFP et PXRE-RFP) pourrait également permettre d'appuyer et d'approfondir les données de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily, 1999. *Cell* 97, 161–163. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80726-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80726-6)
- Andreasen, E.A., Spitsbergen, J.M., Tanguay, R.L., Stegeman, J.J., Heideman, W., Peterson, R.E., 2002. Tissue-Specific Expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in Zebrafish Embryos and Larvae: Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure. *Toxicol Sci* 68, 403–419. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.403>
- Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269–1304. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
- Balaguer, P., Delfosse, V., Grimaldi, M., Bourguet, W., 2017. Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *Comptes Rendus Biologies, Endocrine disruptors / Les perturbateurs endocriniens* 340, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.08.002>
- Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of The Total Environment* 233, 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00178-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00178-3)
- Baravalle, R., Ciaramella, A., Baj, F., Di Nardo, G., Gilardi, G., 2018. Identification of endocrine disrupting chemicals acting on human aromatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, Cytochrome P450 biodiversity and biotechnology* 1866, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.013>
- Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., 2008. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1400–1413. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.249>
- Baudiffier, D., 2012. Modes de perturbation de la stéroïdogénèse testiculaire et de la spermatogénèse chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) par des fongicides azolés. Université de Rennes 1, France.
- Beischlag, T.V., Luis Morales, J., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H., 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 207–250. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v18.i3.20>
- Björkblom, C., Olsson, P.-E., Katsiadaki, I., Wiklund, T., 2007. Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.05.004>

- Blus, L.J., Gish, C.D., Belisle, A.A., Prouty, R.M., 1972. Further Analysis of the Logarithmic Relationship of DDE Residues to Eggshell Thinning. *Nature* 240, 164–166. <https://doi.org/10.1038/240164b0>
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R., 2015. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 16247–16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
- Bräunig, J., Schiwy, S., Broedel, O., Müller, Y., Frohme, M., Hollert, H., Keiter, S.H., 2015. Time-dependent expression and activity of cytochrome P450 1s in early life-stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res* 22, 16319–16328. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4673-6>
- Bresolin, T., de Freitas Rebelo, M., Celso Dias Bainy, A., 2005. Expression of PXR, CYP3A and MDR1 genes in liver of zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 140, 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.04.003>
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) Zebrafish Embryos. *PLOS ONE* 7, e36069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>
- Brucker-Davis, F., Thayer, K., Colborn, T., 2001. Significant effects of mild endogenous hormonal changes in humans: considerations for low-dose testing. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 1, 21–26. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s121>
- Chang, C.-T., Chung, H.-Y., Su, H.-T., Tseng, H.-P., Tzou, W.-S., Hu, C.-H., 2013. Regulation of zebrafish CYP3A65 transcription by AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.04.010>
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfrey, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I.L., 2007. Expression of Zebra Fish Aromatase *cyp19a* and *cyp19b* Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol Sci* 96, 255–267. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm003>
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378–384. <https://doi.org/10.1289/ehp.93101378>
- Corcoran, J., Lange, A., Cumming, R.I., Owen, S.F., Ball, J.S., Tyler, C.R., Winter, M.J., 2014. Bioavailability of the imidazole antifungal agent clotrimazole and its effects on key biotransformation genes in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 152, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.016>
- Corley-Smith, G.E., Su, H.-T., Wang-Buhler, J.-L., Tseng, H.-P., Hu, C.-H., Hoang, T., Chung, W.-G., Buhler, D.R., 2006. CYP3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 1039–1046. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.110>

- Coumoul, X., Diry, M., Barouki, R., 2002. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical Pharmacology* 64, 1513–1519. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01298-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01298-4)
- Creusot, N., 2011. Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Université de Bordeaux I, France.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3649–3657. <https://doi.org/10.1021/es405313r>
- Creusot, N., Brion, F., Piccini, B., Budzinski, H., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2015. BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 16393–16404. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3882-8>
- Cui, X., Thomas, A., Gerlach, V., White, R.E., Morrison, R.A., Cheng, K.-C., 2008. Application and interpretation of hPXR screening data: Validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers. *Biochemical Pharmacology* 76, 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.016>
- Cunha, V., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Castro, L.F.C., Ferreira, M., 2017. Simvastatin modulates gene expression of key receptors in zebrafish embryos. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 80, 465–476. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1335258>
- Cunha, V., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M., 2016. Simvastatin effects on detoxification mechanisms in *Danio rerio* embryos. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 10615–10629. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6547-y>
- De Coster, S., van Larebeke, N., 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012, 713696. <https://doi.org/10.1155/2012/713696>
- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavailles, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9089>
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J.-L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W., Balaguer, P., 2012. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14930–14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203574109>

- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558. <https://doi.org/10.1021/es9707973>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Driessen, M., Kienhuis, A.S., Pennings, J.L.A., Pronk, T.E., van de Brandhof, E.-J., Roodbergen, M., Spaik, H.P., van de Water, B., van der Ven, L.T.M., 2013. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Arch Toxicol* 87, 807–823. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1039-z>
- Eide, M., Rusten, M., Male, R., Jensen, K.H.M., Goksøyr, A., 2014. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 147, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.023>
- Eide, M., Rydbeck, H., Tørresen, O.K., Lille-Langøy, R., Puntervoll, P., Goldstone, J.V., Jakobsen, K.S., Stegeman, J., Goksøyr, A., Karlsen, O.A., 2018. Independent losses of a xenobiotic receptor across teleost evolution. *Sci Rep* 8, 10404. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28498-4>
- Ekins, S., Reschly, E.J., Hagey, L.R., Krasowski, M.D., 2008. Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor. *BMC Evol. Biol.* 8, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-103>
- Fénichel, P., Brucker-Davis, F., 2008. Perturbateurs endocriniens environnementaux et cancer du sein : de nouveaux facteurs de risque ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36, 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.05.006>
- Ghosh, C., Zhou, Y.L., Collodi, P., 1994. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biol Toxicol* 10, 167–176. <https://doi.org/10.1007/BF00757560>
- Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N., 2016. Transcriptional profiles of glutathione-S-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. *Environ. Toxicol.* 31, 233–244. <https://doi.org/10.1002/tox.22038>
- Goksøyr, A., 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution, in: Degen, G.H., Seiler, J.P., Bentley, P. (Eds.), *Toxicology in Transition*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 80–95.
- Gronemeyer, H., 1993. Transcription activation by nuclear receptors. *J. Recept. Res.* 13, 667–691.
- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102, 680–688. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.94102680>

- Guo, Y.L., Lambert, G.H., Hsu, C.C., 1995. Growth abnormalities in the population exposed in utero and early postnatally to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Environmental Health Perspectives* 103, 117–122. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s6117>
- Hermanson, O., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2002. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 55–60. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00527-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00527-6)
- Hinfray, N., Baudiffier, D., Leal, M.C., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., Le Gac, F., Schulz, R.W., Brion, F., 2011. Characterization of testicular expression of P450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.09.008>
- Hitchcock, D.J., 2014. Studies on the promiscuous xenobiotic receptor (PXR, NR112) in zebrafish: antibody characterisation and genetic variation in zebrafish embryos. University of Bergen, Norway.
- Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen Years after “Wingspread”—Environmental Endocrine Disruptors and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicological Sciences* 105, 235–259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn030>
- Ibabe, A., Herrero, A., Cajaraville, M.P., 2005. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPAR(alpha)- and PPAR(gamma)-specific ligands and by 17beta-estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 19, 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.03.019>
- ISO, 1996. ISO 7346-3:1996 - Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 3: Flow-through method [En ligne]. <https://www.iso.org/standard/14030.html>
- Jacobs, M.N., Nolan, G.T., Hood, S.R., 2005. Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicology and Applied Pharmacology* 209, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.03.015>
- Janosek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors-interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol In Vitro* 20, 18–37. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.001>
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104, 715–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>

- Kim, K.-H., Park, H.-J., Kim, J.H., Kim, S., Williams, D.R., Kim, M.-K., Jung, Y.D., Teraoka, H., Park, H.-C., Choy, H.E., Shin, B.A., Choi, S.-Y., 2013. Cyp1a reporter zebrafish reveals target tissues for dioxin. *Aquat. Toxicol.* 134–135, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.010>
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS* 104, 8897–8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>
- Kliwer, S.A., 2003. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J. Nutr.* 133, 2444S–2447S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2444S>
- Kojima, H., Sata, F., Takeuchi, S., Sueyoshi, T., Nagai, T., 2011. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology* 280, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.008>
- Kortenkamp, A., 2014. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Current Opinion in Pharmacology* 19, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.08.006>
- Küblbeck, J., Zancanella, V., Prantner, V., Molnár, F., Squires, E.J., Dacasto, M., Honkakoski, P., Giantin, M., 2016. Characterization of ligand-dependent activation of bovine and pig constitutive androstane (CAR) and pregnane X receptors (PXR) with interspecies comparisons. *Xenobiotica* 46, 200–210. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1060374>
- Kubota, A., Bainy, A.C.D., Woodin, B.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2013. The cytochrome P450 2AA gene cluster in zebrafish (*Danio rerio*): expression of CYP2AA1 and CYP2AA2 and response to phenobarbital-type inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.017>
- Kubota, A., Goldstone, J.V., Lemaire, B., Takata, M., Woodin, B.R., Stegeman, J.J., 2015. Role of pregnane X receptor and aryl hydrocarbon receptor in transcriptional regulation of pxr, CYP2, and CYP3 genes in developing zebrafish. *Toxicol. Sci.* 143, 398–407. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu240>
- Lange, A., Corcoran, J., Miyagawa, S., Iguchi, T., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2017. Development of a common carp (*Cyprinus carpio*) pregnane X receptor (cPXR) transactivation reporter assay and its activation by azole fungicides and pharmaceutical chemicals. *Toxicology in Vitro* 41, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.023>
- Le Fol, V., 2015. Approche in vivo/in vitro du métabolisme de perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*danio rerio*). Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868. <https://doi.org/10.1021/es505302c>

- Leal, M.C., de Waal, P.P., García-López, Á., Chen, S.X., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2009. Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. *General and Comparative Endocrinology* 162, 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.003>
- LeCluyse, E.L., 2001. Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 134, 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00163-6)
- Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R., 2004. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical Pharmacology* 68, 2347–2358. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.041>
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2006. Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicol Sci* 91, 501–509. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj173>
- Li, X., Zhang, S., Safe, S., 2006. Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17 β -estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 98, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.08.018>
- Lille-Langøy, R., Karlsen, O.A., Myklebust, L.M., Goldstone, J.V., Mork-Jansson, A., Male, R., Blumberg, B., Stegeman, J.J., Goksøyr, A., 2019. Sequence Variations in pxr (nr1i2) From Zebrafish (*Danio rerio*) Strains Affect Nuclear Receptor Function. *Toxicol. Sci.* 168, 28–39. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy269>
- Matthews, J., Gustafsson, J.-Å., 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4. <https://doi.org/10.1621/nrs.04016>
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 37–43. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170106>
- McArthur, M.L.B., Fox, G.A., Peakall, D.B., Philogène, B.J.R., 1983. Ecological significance of behavioral and hormonal abnormalities in breeding ring doves fed an organochlorine chemical mixture. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 343–353. <https://doi.org/10.1007/BF01059412>
- Milnes, M.R., Garcia, A., Grossman, E., Grün, F., Shiotsugu, J., Tabb, M.M., Kawashima, Y., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T., Blumberg, B., 2008. Activation of Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR, NR1I2) and Its Orthologs in Laboratory, Toxicologic, and Genome Model Species. *Environ Health Perspect* 116, 880–885. <https://doi.org/10.1289/ehp.10853>
- Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R., 1993. Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 320–327. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1429>

- Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Escande, A., Bartegi, A., Nicolas, J.-C., Cavailles, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2007. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicology Letters* 170, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.016>
- Moore, L.B., Maglich, J.M., McKee, D.D., Wisely, B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Lambert, M.H., Moore, J.T., 2002. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 16, 977–986. <https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0828>
- Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T., 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 437–457. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.437>
- Navas, J.M., Chana, A., Herradón, B., Segner, H., 2004. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci.* 76, 699–714. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.015>
- Nguyen, L.P., Bradfield, C.A., 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 102–116. <https://doi.org/10.1021/tx7001965>
- N'Tumba-Byn, T., 2013. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens bisphénol A et phtalates sur le développement du testicule fœtal. Université Paris-Sud 11, France.
- OCDE, 2013. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OCDE n°236. [Document électronique]. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203709-en.pdf?expires=1568713938&id=id&accname=guest&checksum=62D8A61F4BD1E357CF794C3AA105B913>
- OCDE, 1997. Endocrine disrupting chemicals [Document électronique]. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/OECD%20Work%20on%20Endocrine%20Disrupting%20Chemicals.pdf>
- OSPAR Commission, 2013. OSPAR background document on clotrimazole, Hazardous Substances Series. OSPAR Commission. [Document électronique]. URL : < <https://www.ospar.org/documents?d=7012>>.
- Pacyniak, E.K., Cheng, X., Cunningham, M.L., Crofton, K., Klaassen, C.D., Guo, G.L., 2007. The Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, Are Pregnane X Receptor Activators. *Toxicol Sci* 97, 94–102. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm025>
- Parance, B., 2018. La réglementation des perturbateurs endocriniens en pleine mutation : adoption de la définition européenne et nouvelle stratégie nationale à venir ! *Journal de Droit de la Santé et de l'Assurance Maladie*.

- Parks, L.G., Lambright, C.S., Orlando, E.F., Guillette, L.J., Ankley, G.T., Gray, L.E., 2001. Masculinization of Female Mosquitofish in Kraft Mill Effluent-Contaminated Fenholloway River Water Is Associated with Androgen Receptor Agonist Activity. *Toxicol Sci* 62, 257–267. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.257>
- Peschka, M., Roberts, P.H., Knepper, T.P., 2007. Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem* 389, 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1480-z>
- Reijnders, P.J.H., 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324, 456–457. <https://doi.org/10.1038/324456a0>
- Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment* 356, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.031>
- Saad, M., Cavanaugh, K., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Van Ginneken, C., Van Cruchten, S., 2016. Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. *The Journal of Toxicological Sciences* 41, 1–11. <https://doi.org/10.2131/jts.41.1>
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Ait-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, N., Porcher, J.-M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37, 1342–1348. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.002>
- Sberna, A.-L., 2011. Etude du rôle du récepteur nucléaire CAR, Constitutive Androstane Receptor, dans le métabolisme des lipides et la susceptibilité à l'athérosclérose. Université de Bourgogne, France.
- Segner, H., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>
- Shaya, L., Jones, D.E., Wilson, J.Y., 2019. CYP3C gene regulation by the aryl hydrocarbon and estrogen receptors in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 362, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.10.021>
- Sinz, M., Kim, S., Zhu, Z., Chen, T., Anthony, M., Dickinson, K., Rodrigues, A.D., 2006. Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 7, 375–388. <https://doi.org/10.2174/138920006776873535>
- Stegeman, J.J., Goldstone, J.V., Hahn, M.E., 2010. 10 - Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology, in: Perry, S.F., Ekker, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology, Zebrafish*. Academic Press, pp. 367–439. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)02910-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)02910-9)
- Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.028>

- Trasande, L., Zoeller, R.T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J.P., DiGangi, J., Bellanger, M., Hauser, R., Legler, J., Skakkebaek, N.E., Heindel, J.J., 2015. Estimating Burden and Disease Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100, 1245–1255. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4324>
- Tseng, H., Hseu, T., Buhler, D., Wang, W., Hu, C., 2005. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.019>
- Venkatesh, M., Wang, H., Cayer, J., Leroux, M., Salvail, D., Das, B., Wrobel, J.E., Mani, S., 2011. In Vivo and In Vitro Characterization of a First-in-Class Novel Azole Analog That Targets Pregnane X Receptor Activation. *Molecular Pharmacology* 80, 124. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071787>
- Verbueken, E., Bars, C., Ball, J.S., Periz-Stanacev, J., Marei, W.F.A., Tochwin, A., Gabriëls, I.J., Michiels, E.D.G., Stinckens, E., Vergauwen, L., Knapen, D., Van Ginneken, C.J., Van Cruchten, S.J., 2018. From mRNA Expression of Drug Disposition Genes to In Vivo Assessment of CYP-Mediated Biotransformation during Zebrafish Embryonic and Larval Development. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3976. <https://doi.org/10.3390/ijms19123976>
- Vignati, L.A., Bogni, A., Grossi, P., Monshouwer, M., 2004. A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction. *Toxicology* 199, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.12.018>
- Wang, H., Li, H., Moore, L.B., Johnson, M.D.L., Maglich, J.M., Goodwin, B., Ittoop, O.R.R., Wisely, B., Creech, K., Parks, D.J., Collins, J.L., Willson, T.M., Kalpana, G.V., Venkatesh, M., Xie, W., Cho, S.Y., Roboz, J., Redinbo, M., Moore, J.T., Mani, S., 2008. The phytoestrogen coumestrol is a naturally occurring antagonist of the human pregnane X receptor. *Mol. Endocrinol.* 22, 838–857. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0218>
- World Health Organization, 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors [Disponibile sur internet]. https://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
- Yasuda, K., Ranade, A., Venkataramanan, R., Strom, S., Chupka, J., Ekins, S., Schuetz, E., Bachmann, K., 2008. A comprehensive in vitro and in silico analysis of antibiotics that activate pregnane X receptor and induce CYP3A4 in liver and intestine. *Drug Metab Dispos* 36, 1689–1697. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.020701>
- Zhao, Y., Zhang, K., Giesy, J.P., Hu, J., 2015. Families of Nuclear Receptors in Vertebrate Models: Characteristic and Comparative Toxicological Perspective. *Scientific Reports* 5, 8554. <https://doi.org/10.1038/srep08554>
- Zhou, C., Poulton, E.-J., Grün, F., Bammler, T.K., Blumberg, B., Thummel, K.E., Eaton, D.L., 2007. The Dietary Isothiocyanate Sulforaphane Is an Antagonist of the Human Steroid and Xenobiotic Nuclear Receptor. *Mol Pharmacol* 71, 220–229. <https://doi.org/10.1124/mol.106.029264>

ANNEXES

| | |
|--|------|
| Annexe I : Feuille d'observation des effets léthaux, sublétaux et tératogènes utilisés lors des FET (Garoche, Comm. Pers.) | II |
| Annexe II : Malformations observées pendant le test FET sur le clotrimazole (en μM) | IV |
| Annexe III : Deuxième série d'exposition d'embryons (entre 0 et 72 hpf et entre 72 et 120 hpf) à la TCDD et au CTZ..... | V |
| Annexe IV : Exposition 0 96 hpf d'embryons de poissons-zèbres à une gamme de concentration de CTZ. | VII |
| Annexe V Activité EROD mesurée sur des embryons à 72 hpf exposés à la TCDD (EC 50 =0,01 nM). | X |
| Annexe VI : Activité EROD dans la lignée ZXLH exposée 24 et 48h à une gamme de concentrations de TCDD et de CTZ (EC 50 TCDD à 24h = 1,4 nM ; à 48h = 2,7 nM) | XII |
| Annexe VII : Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 24 et 48h à une gamme de concentrations de TCDD et de CTZ (EC 50 TCDD à 24h = 0,4 nM ; à 48h = 0,25 nM) | XIII |

Annexe I : Feuille d'observation des effets léthaux, sublétaux et tératogènes utilisés lors des FET (Garoche, Comm. Pers.)

Table : zFET observation criteria (lethal, sub-lethal and teratogenic effect)

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| File No. | Plate No. | Sample: | Concentration: | |
| Check pt. 1 : 8 h | Checkpt. 2 : 24 h | Check pt. 3 : 48 h | Check pt. 4 : 72 h | Check pt. 5 : 96 h |

| Time | Criteria | Wells | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total /20 | Control | | | | Total /4 |
|------------|---------------------|-------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|--------------|---------|-----|-----|-----|-------------|
| | | A 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | B 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | C 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | A 6 | B 6 | C 6 | D 6 | |
| 8/24/48/96 | Coagulation | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Tail detachment | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | No somite formation | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | No heart beat | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Time | Sub-lethal | Wells | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | /20 | A 6 | B 6 | C 6 | D 6 | /4 |
|------------|------------------------------|-------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | | A 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | B 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | C 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | | | |
| 8/24/48/96 | Developmental delay | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Development of the eyes | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Spontaneous movement | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | Oedema (Pericardial) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | Oedema- yolk sac (vitellous) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | Blood tail circulation | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | Heart rate | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/96 | Hatching | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pigmentation | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | Teratogenic | A 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | B 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | C 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | /20 | A 6 | B 6 | C 6 | D 6 | /4 |
|----------|--|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 24/48/96 | Malformation of head | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Malformation of otoliths | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Malformation of tail | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Malformation of heart | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Malformation of vertabrate column (lordosis) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Malformation of vertabrate column (cyphosis) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Scoliosis | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Growth retardation | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Deformity of yolk | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/48/96 | Hemorrhage | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Time : Observation time to see effects after exposure

Wells : Number 1 starts from top left corner of the 24-well plate, i.e. A1, A2, A3 represents well number 1,2, 3 respectively

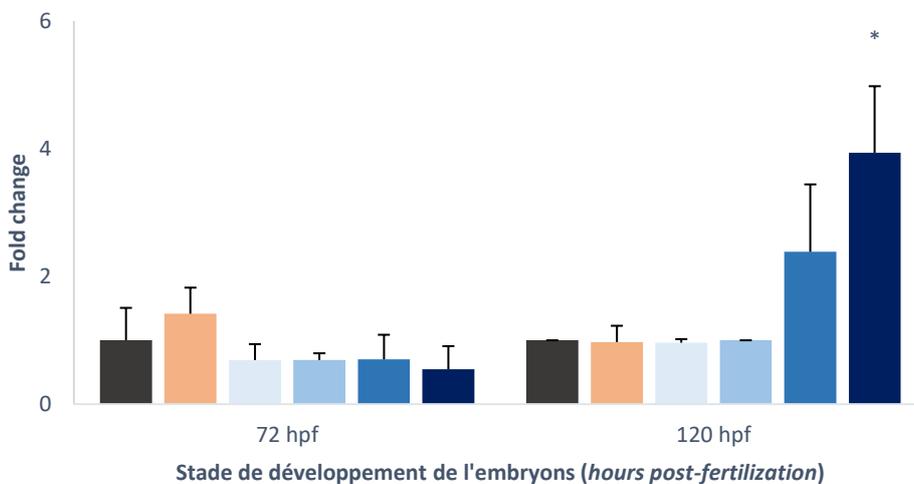
Annexe II : Malformations observées pendant le test FET sur le clotrimazole (en μM)

| % de malformations | WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | 0,17 | | | | | 0,5 | | | | | 1,45 | | | | | 4,35 | | | | | 13 | | | | | | |
| | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h | | |
| Deformity of yolk | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | |
| Growth retardation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| No spontaneous movement | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | | | | |
| No eye development | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | | | |
| Scoliosis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | | | |
| Lordosis/Cyphosis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| Head malformation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | | | |
| Otoliths malformation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| Nageoires pectorales | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| Tail malformation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | |
| No blood tail circulation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 90 | | | | |
| Hemorrhage | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| Heart rate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | | |
| Less pigmentation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 26 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| No pigmentation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | | |

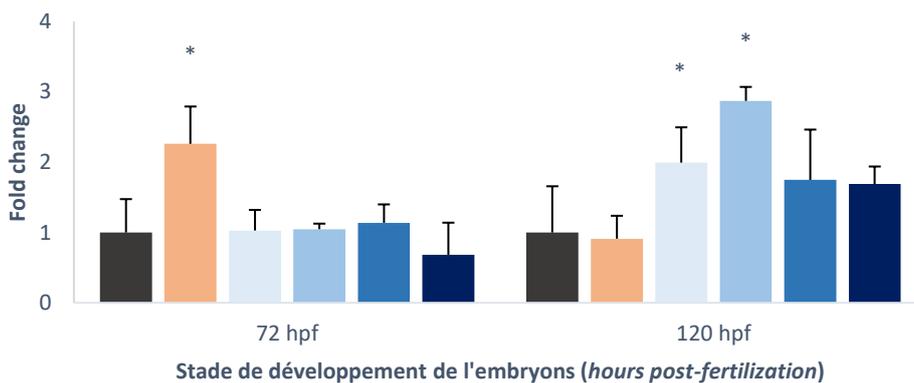
| |
|-----------|
| Mortalité |
| 70-90% |
| 90-100% |

Annexe III : Deuxième série d'exposition d'embryons (entre 0 et 72 hpf et entre 72 et 120 hpf) à la TCDD et au CTZ

nr1i2

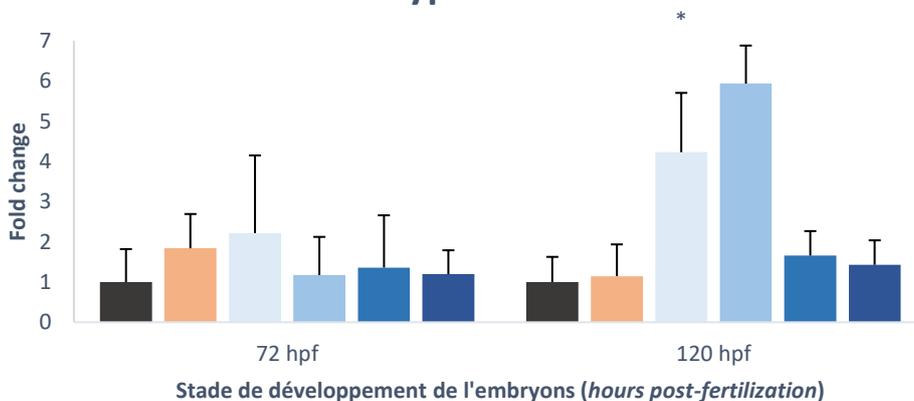


ahr2



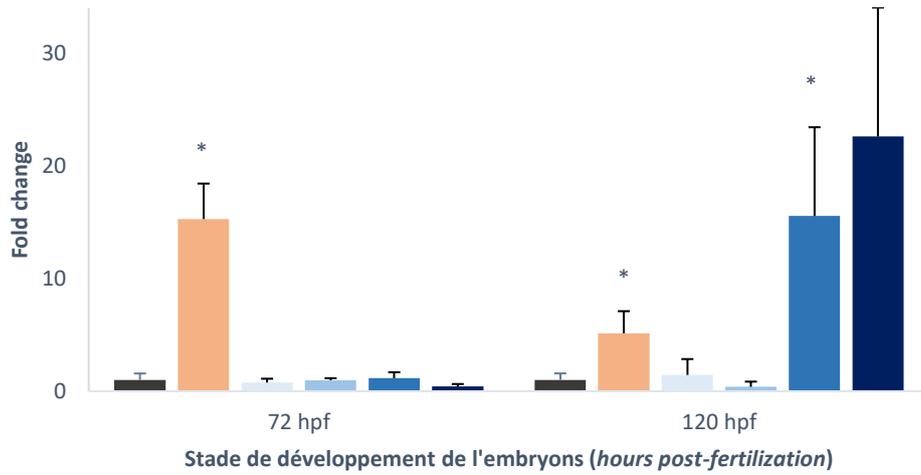
Témoin
 TCDD 0,05 nM
 CTZ 0,054 µM
 CTZ 0,109 µM
 CTZ 0,217 µM
 CTZ 0,435 µM

cyp3a65

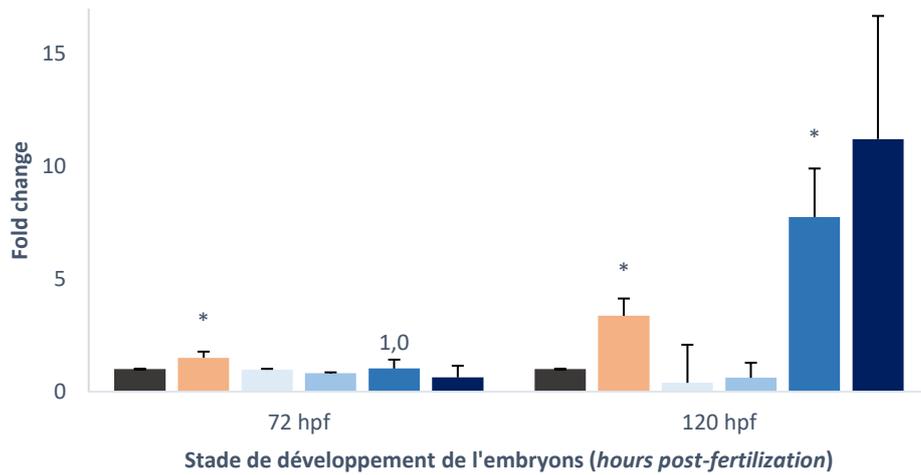


Témoin
 TCDD 0,05 nM
 CTZ 0,054 µM
 CTZ 0,109 µM
 CTZ 0,217 µM
 CTZ 0,435 µM

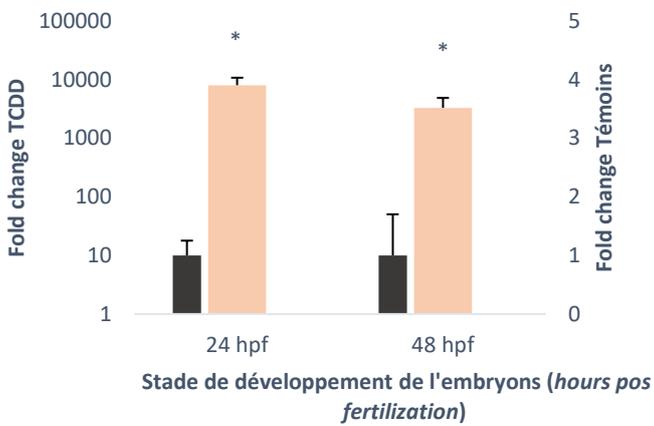
cyp2aa12



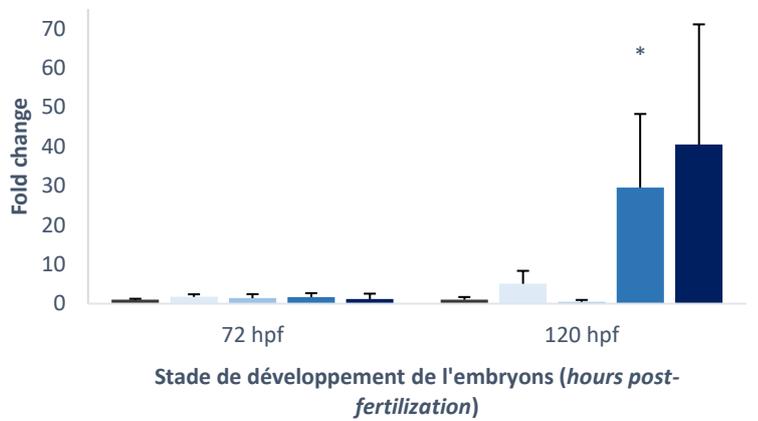
cyp3c1



cyp1a



cyp1a

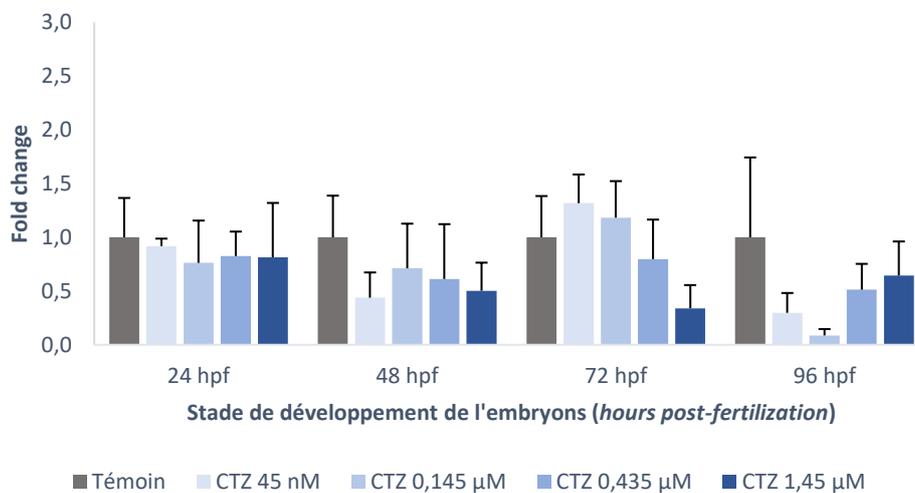


■ TCDD ■ Témoin

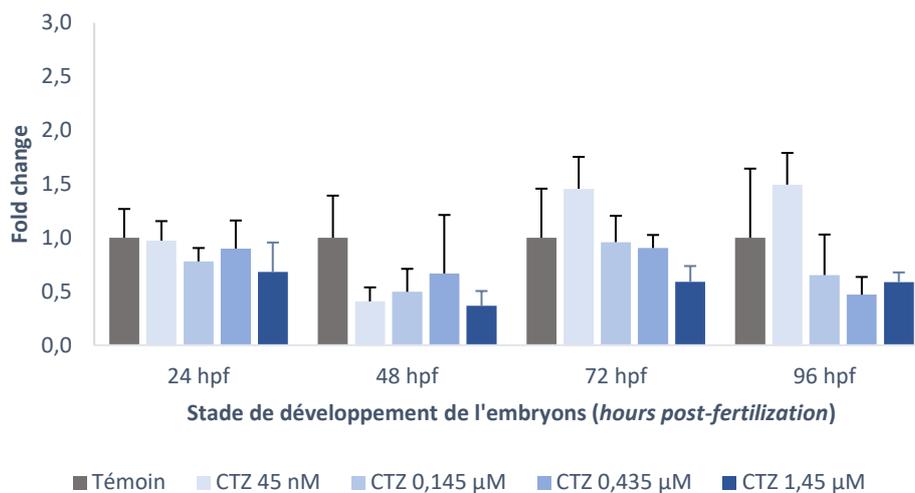
■ Témoin ■ CTZ 0,054 µM ■ CTZ 0,109 µM ■ CTZ 0,217 µM ■ CTZ 0,435 µM

Annexe IV : Exposition 0 96 hpf d'embryons de poissons-zèbres à une gamme de concentration de CTZ.

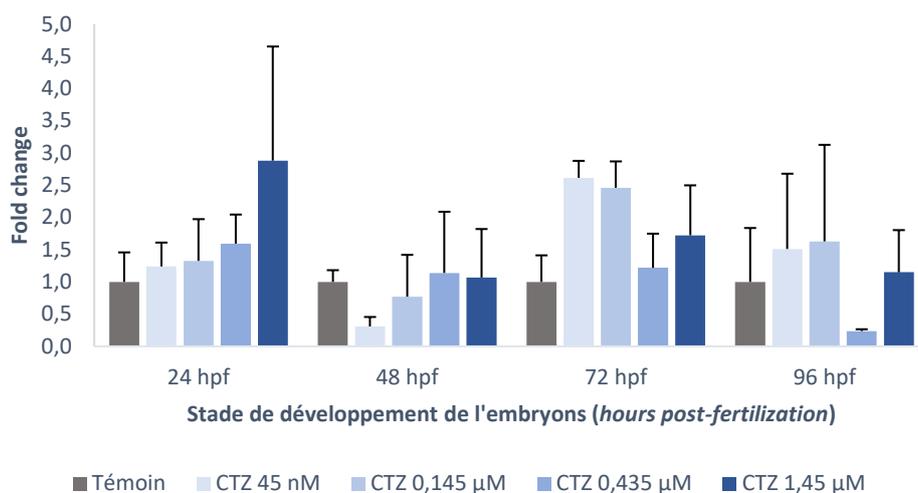
nr1i2



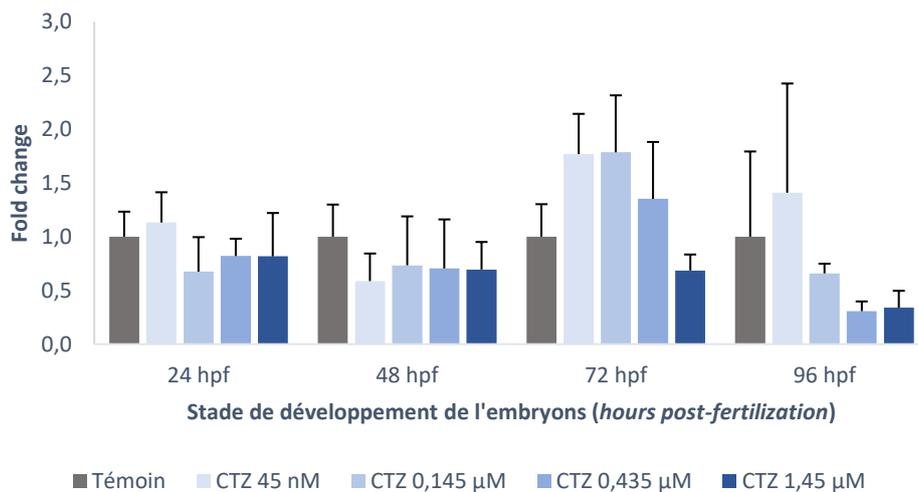
ahr2



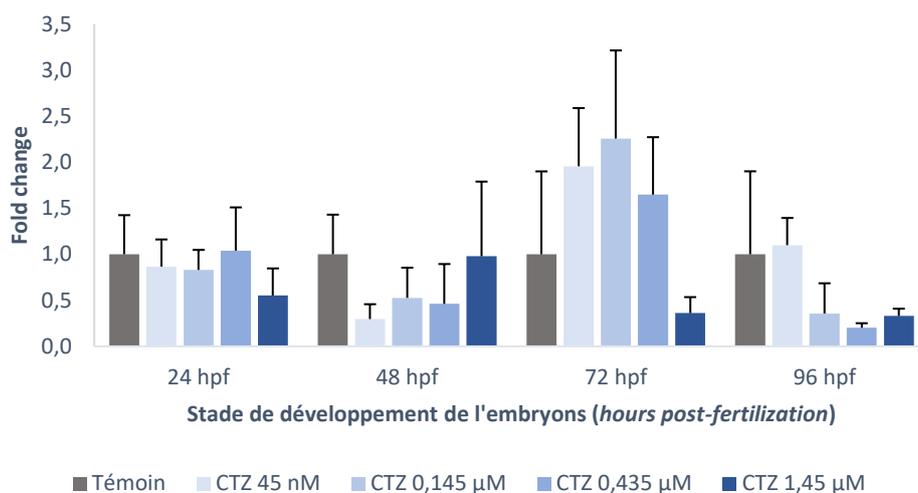
CYP1A



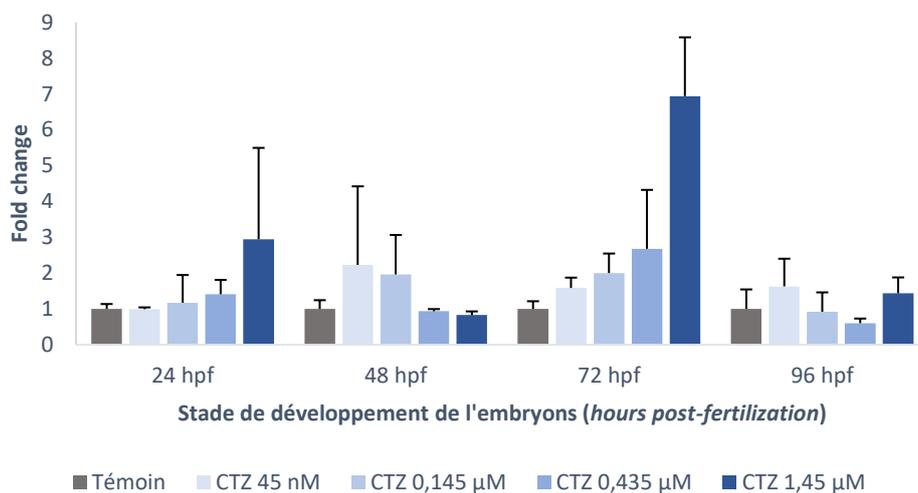
CYP2AA12



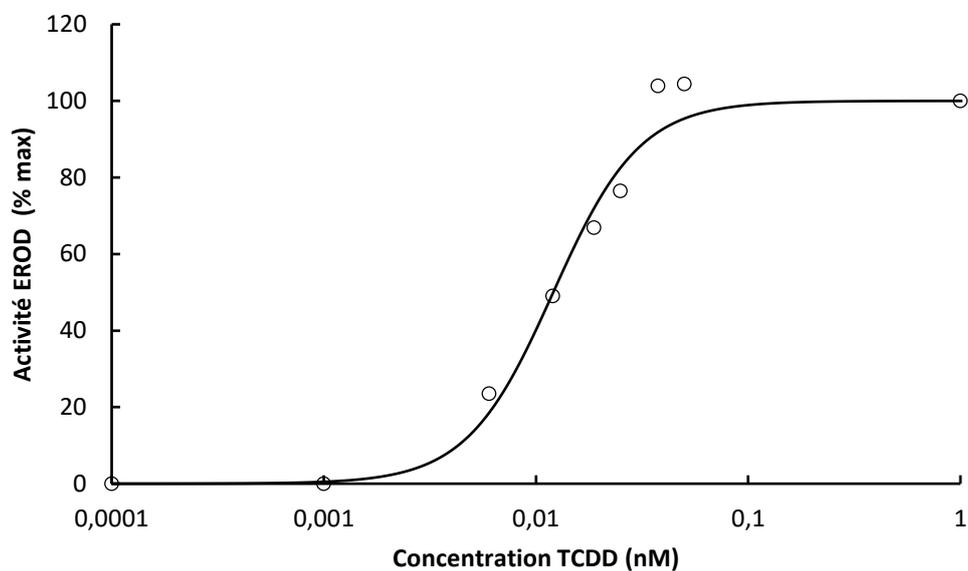
CYP3C1



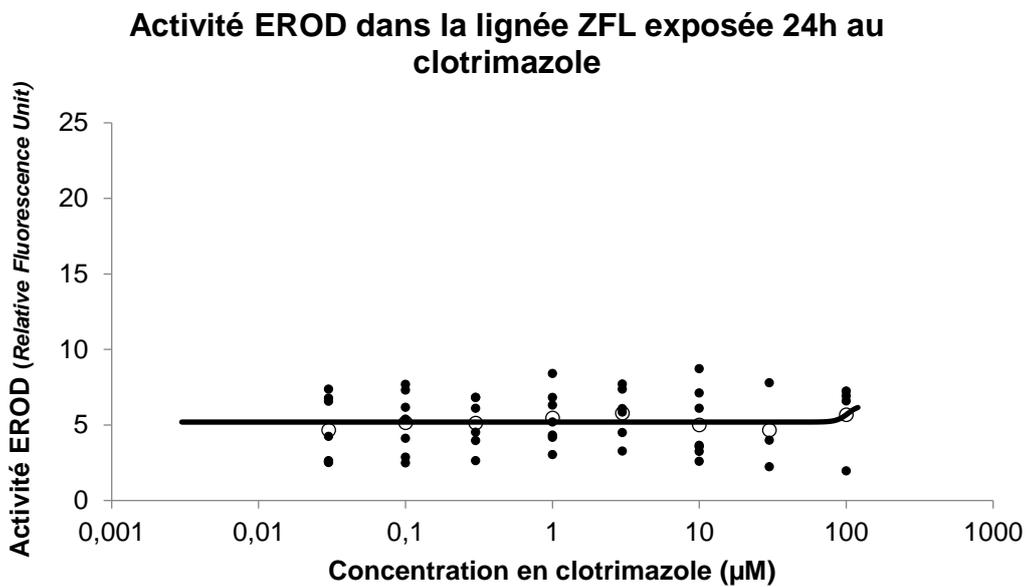
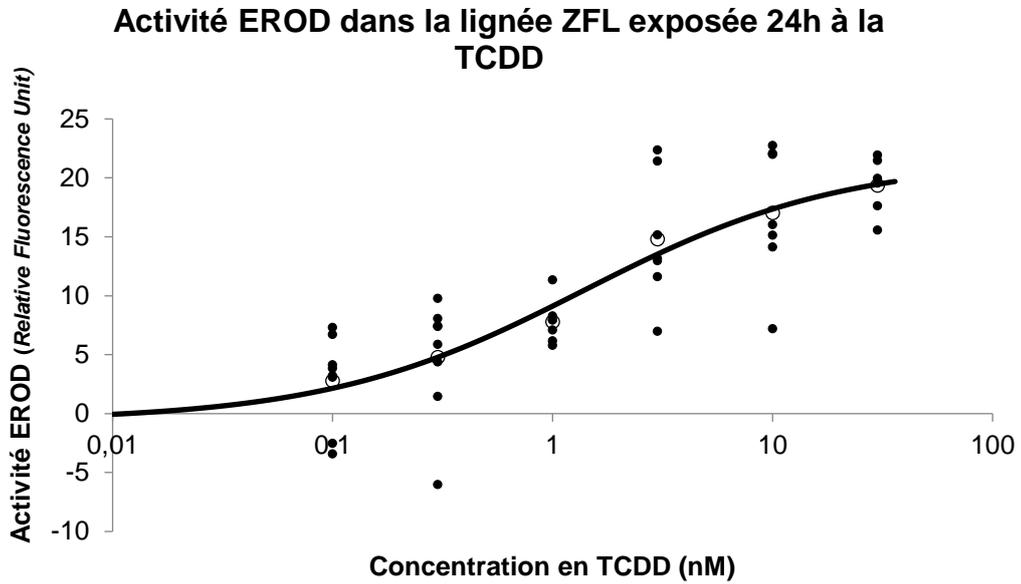
CYP3A65



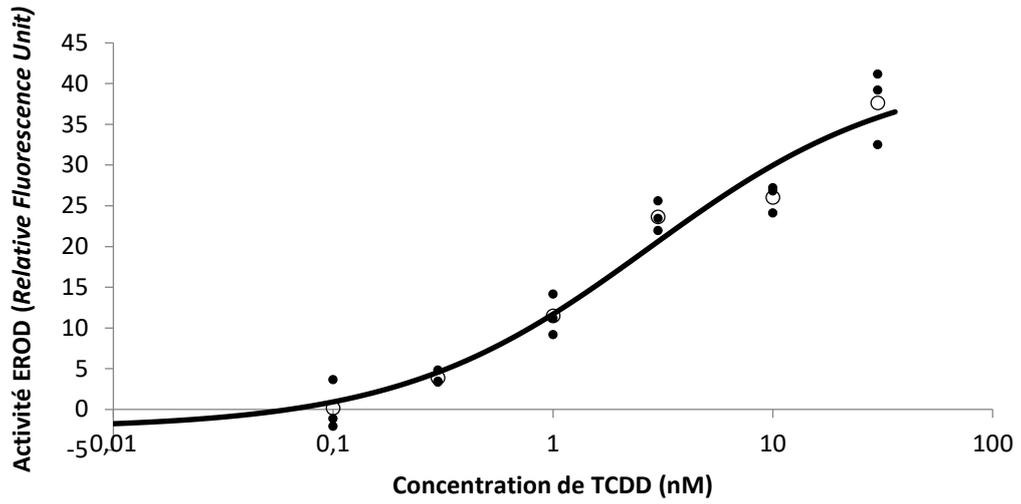
Annexe V Activité EROD mesurée sur des embryons à 72 hpf exposés à la TCDD (EC 50 =0,01 nM).



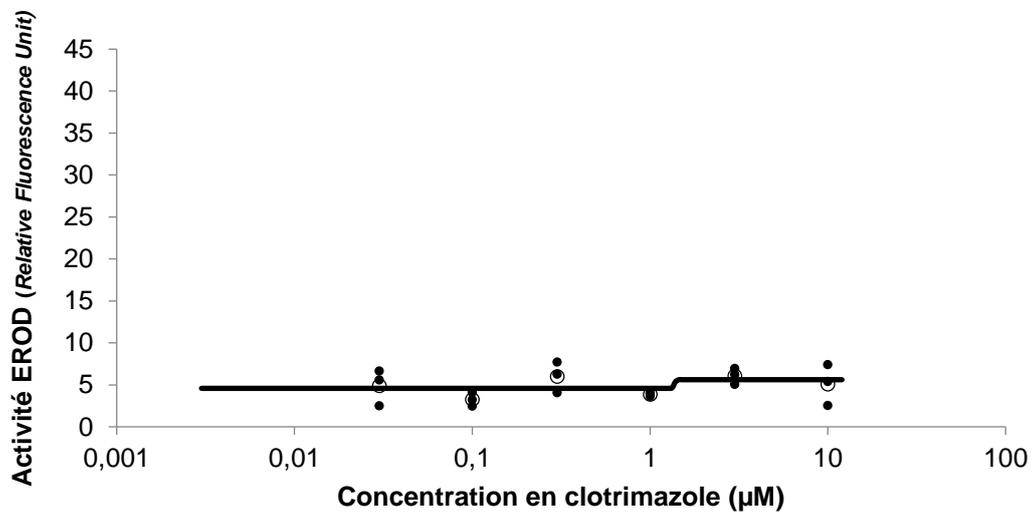
Annexe VI : Activité EROD dans la lignée ZXLH exposée 24 et 48h à une gamme de concentrations de TCDD et de CTZ (EC 50 TCDD à 24h = 1,4 nM ; à 48h = 2,7 nM)



Activité EROD dans la lignée ZFL exposée 48h à la TCDD

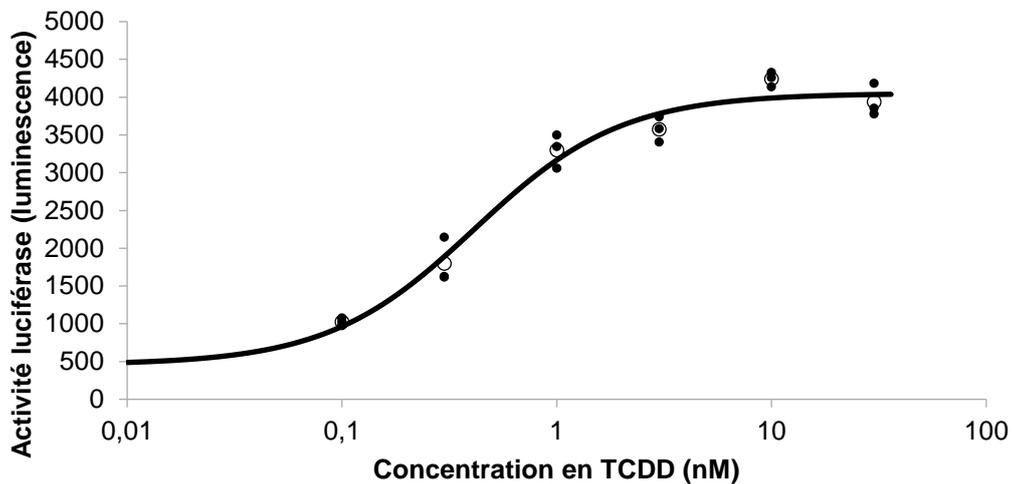


Activité EROD dans la lignée ZFL exposée 48h au clotrimazole

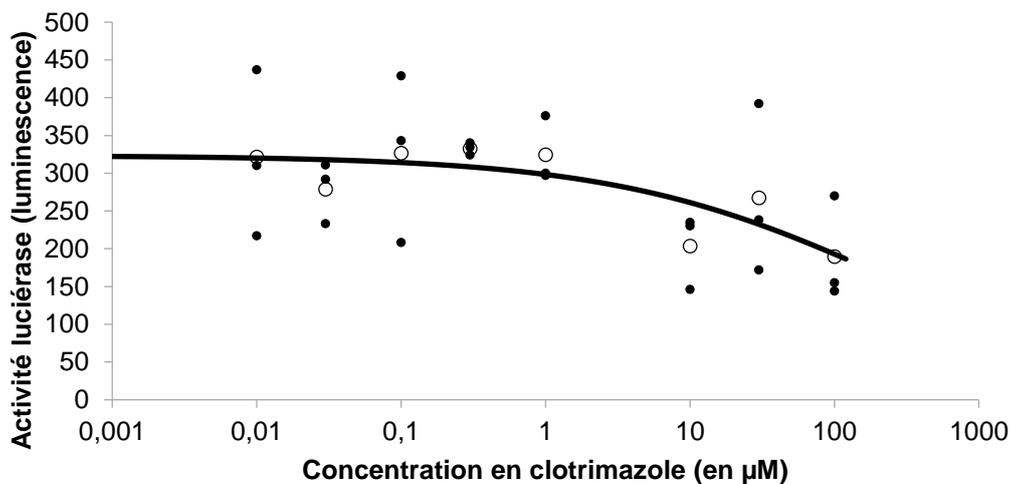


Annexe VII : Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 24 et 48h à une gamme de concentrations de TCDD et de CTZ (EC 50 TCDD à 24h = 0,4 nM ; à 48h = 0,25 nM)

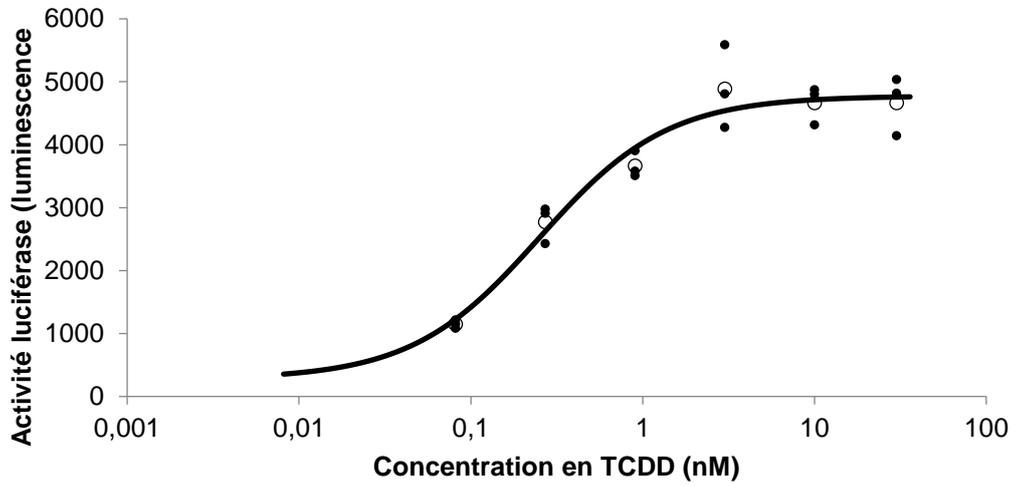
Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 24h à la TCDD



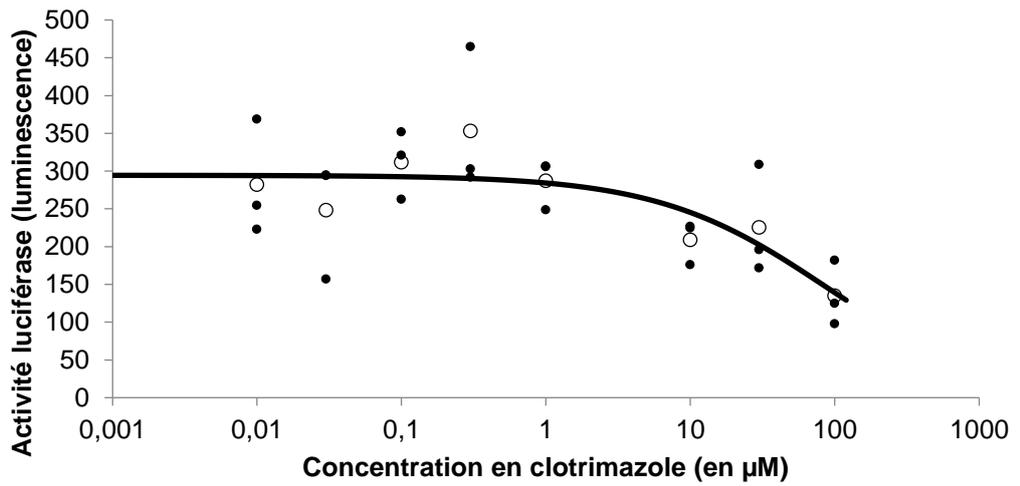
Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 24h au clotrimazole



Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 48h à la TCDD



Activité luciférase dans la lignée ZXLH exposée 48h au clotrimazole



ÉVALUATION DE RÉPONSES BIOLOGIQUES MÉDIÉES PAR PXR DANS LE MODÈLE POISSON-ZÈBRE

Le récepteur nucléaire PXR (**Pregnane X Receptor**) est un acteur important de la régulation des mécanismes de détoxification en régulant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme. Ce travail a pour objectif de mieux connaître les voies de signalisation du récepteur PXR chez le poisson-zèbre (zf). Dans ce but, nous nous sommes intéressés à un ligand spécifique du récepteur zfPXR, le **clotrimazole** et un ensemble de gènes PXR régulés (*cyp2aa12* ; *cyp3a65* ; *cyp3c1* ; *nr1i2*). Parallèlement, un ligand spécifique du récepteur zfAhR, la **dioxine** et un ensemble de gènes zfAhR régulés (*cyp1a* ; *ahr2*) ont été choisis, des travaux ayant montré des interactions entre voies zfAhR- et zfPXR-régulés. Une double approche *in vitro* / *in vivo* a été développée, comportant **culture primaire d'hépatocytes de poissons-zèbre** et **embryons de poissons-zèbre** à différents stades de développement. Les résultats obtenus par **qPCR** ont permis de montrer une expression constitutive de **gènes cibles** dans les deux modèles biologiques et une dérégulation des gènes par la TCDD et le clotrimazole dépendantes du temps d'exposition, de la période du développement ou de la concentration. Les résultats vont dans le sens d'une **interactions croisés bidirectionnelles** entre les voies zfAhR- et zfPXR-régulés

Mot clefs : *Pregnane X Receptor*, clotrimazole, dioxine, culture primaire d'hépatocytes de poissons-zèbres, embryons de poissons-zèbre, qPCR, gènes cibles, interactions croisées bidirectionnelles.

EVALUATION OF PXR-MEDIATED BIOLOGICAL RESPONSES IN THE ZEBRAFISH MODEL

The **Pregnane X Receptor** (PXR) nuclear receptor is an important protagonist in the regulation of detoxification mechanisms by regulating the expression of genes involved in metabolism. The objective of this work is to better understand the signalling pathways of the PXR receptor in zebrafish (zf). To this end, we have focused on a specific ligand of the zfPXR receptor, **clotrimazole** and a set of regulated PXR genes (*cyp2aa12*; *cyp3a65*; *cyp3c1*; *nr1i2*). In parallel, a specific ligand of the zfAhR receptor, **dioxin** and a set of regulated zfAhR genes (*cyp1a*; *ahr2*) were selected, due to the presence of studies showing interactions between zfAhR- and zfPXR-regulated pathways. A dual *in vitro* / *in vivo* approach was developed involving primary culture of zebrafish hepatocytes and zebrafish embryos at different stages of development. The results obtained by **qPCR** showed constitutive expression of **target genes** in both biological models and gene deregulation by TCDD and clotrimazole depending on exposure time, developmental period or concentration. The results point in the direction of a **bidirectional crosstalk** between the zfAhR- and zfPXR-regulated pathways

Keywords: *Pregnane X Receptor*, clotrimazole, dioxin, primary culture of zebrafish hepatocytes, zebrafish embryos, qPCR, target genes, bidirectional crosstalk.