THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. VINCENT LE FOL

le jeudi 17 décembre 2015

Titre :

APPROCHE IN VIVO / IN VITRO DU METABOLISME DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CHEZ LE POISSON ZEBRE (DANIO RERIO)

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. DANIEL ZALKO

M. FRANÇOIS BRION

Rapporteurs :

M. ADRIAN COVACI, UNIVERSITE INSTELLING ANTWERPEN

M. JOSE MARIA NAVAS, INIA MADRID

Membre(s) du jury :

M. JEAN-PIERRE CRAVEDI, INRA TOULOUSE, Président

M. CINTA PORTE, CSIC BARCELONE, Membre

M. DANIEL ZALKO, INRA TOULOUSE, Membre

M. FRANÇOIS BRION, INERIS, Membre

Mme ANA SOTO, TUFTS UNIVERSITY, Membre

M. SELIM AIT-AISSA, INERIS, Membre

« Le petit prince s'assit sur une pierre et leva les yeux vers le ciel:
-Je me demande, dit-il, si les étoiles sont éclairées afin que chacun puisse un jour retrouver la sienne. »

Le Petit Prince
Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des examinateurs et rapporteurs, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.

Ce travail de thèse a débuté à l'INERIS dans l'unité ECOT pour se poursuivre à l'INRA ToxAlim dans l'équipe MeX. Je remercie Jean-Marc Porcher, responsable de l'unité ECOT, et Daniel Zalko, responsable de l'équipe MeX, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe respective.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Daniel Zalko, pour la direction et l'encadrement de ce travail. Je vous suis profondément reconnaissant pour tous vos conseils précieux et pour toutes les discussions qu'elles aient été scientifiques ou non, au laboratoire et lors de congrès. Merci pour avoir partagé un peu de votre connaissance et de votre expérience ce qui, notamment, m'a permis de mieux apprécier la valeur de mon travail. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos encouragements notamment dans la période particulière qui a été celle de la rédaction du manuscrit. Merci également pour m'avoir transmis à travers ce travail de thèse, des valeurs scientifiques et une vision sur le monde de la recherche. Enfin je tiens à exprimer ma grande satisfaction et gratitude à avoir réalisé ce travail de thèse sous votre direction qui je pense a été caractérisée, certes, par votre professionnalisme, mais aussi par vos qualités humaines et managériales.

Mes remerciements s'adressent également à mes encadrants de l'INERIS, François Brion, codirecteur de ce travail, et Selim Aït-Aïssa. Merci pour l'énergie que vous m'avez transmise dès le début de ce travail. Le temps était en effet déjà compté avant même d'avoir commencé la thèse pour que je puisse me rendre, par la suite, à l'INRA ! Je tiens à vous remercier pour avoir partagé vos compétences notamment sur le poisson zèbre que je découvrais. Merci pour vos conseils et votre soutien. Merci pour avoir répondu à mes doutes et questionnements. Merci aussi pour les discussions enrichissantes qui m'ont été utiles afin de mieux appréhender les contours de ce travail.

Je tiens également à remercier Jean-Pierre Cravedi que j'ai eu l'honneur de côtoyer au cours de ce travail. Merci pour l'ensemble de vos conseils avisés !

J'adresse aussi mes remerciements à Laurent Debrauwer, responsable de la plateforme AXIOM MetaToul, pour toute l'aide apportée et le temps consacré aux analyses de spectrométrie de Masse.

Je remercie également Patrick Balaguer pour avoir participé aux comités de thèse ainsi que pour avoir contribué à ce travail par l'analyse de l'activité œstrogénique de métabolites.

Je tiens également à remercier Marie-Hélène Piquereau, gestionnaire à l'INRA, qui, je le sais, a œuvré administrativement au bon déroulement de ma thèse.

Beaucoup d'autres personnes précieuses m'ont apporté leur aide et leur soutien. Je tiens à remercier chaleureusement Elisabeth Perdu, Anne Hillenweck et Nicolas Cabaton. Un grand merci pour vos conseils, pour l'aide que vous m'avez apportée lors des expérimentations, ainsi que pour avoir été présents lors de mes questionnements techniques (voire plus philosophiques !), mes agacements,

doutes et incompréhensions ! Et vous savez combien ils ont été nombreux ! Je tiens aussi particulièrement à vous remercier pour nos discussions toujours plaisantes et nos échanges amicaux. Je souhaite également adresser mes remerciements à Adeline Cabaton qui a eu la lourde tâche de m'initier aux joies des analyses CLHP à mon arrivée dans l'équipe MeX. Merci pour tes explications, tes conseils et ta patience. Je garde des souvenirs précieux de mes premiers pas en CLHP et colonnes récepteurs… Je remercie Marc Audebert, notamment pour avoir partagé avec les bureaux voisins ses interprétations vocales de chansons cultes ! Laurence Dolo, Sandrine Bruel, Florence Blas-y-Estrada, merci à vous pour l'aide que vous m'avez apportée et pour nos échanges toujours sympathiques ! Je remercie vivement Nathalie Hinfray, Olivier Palluel, Benjamin Piccini, Emmanuelle Maillot-Maréchal et Cyril Turiès. Les premiers temps dans une thèse sont importants et vous m'avez fait découvrir ce monde piscicole qui m'était inconnu et les particularités des cultures cellulaires de poisson. Merci pour avoir partagé avec moi vos compétences ainsi que pour toute votre aide. Je remercie sincèrement chacune des personnes des deux équipes, ECOT pour l'INERIS et MeX pour l'INRA.

J'exprime aussi mes remerciements envers Roselyne Gautier, Marie Tremblay-Franco et Cécile Canlet, d'AXIOM, pour leur aide mais aussi pour tous les bons moments de convivialité ! J'y associe également Nicolas Cabaton car nos déjeuners à l'INRA sont pour moi mémorables ! C'était un moment important de détente qui, il faut bien le dire, était souvent marqué par de nombreux éclats de rire… ! Merci aussi à toutes les personnes qui avaient l'habitude de prendre un café ou un thé dans la salle de pause et qui contribuaient à poursuivre ce moment de détente. Je suis obligé, avec plaisir, de remercier Jean-Philippe Jaeg de l'école vétérinaire pour son humour si singulier !

Nicolas Creusot et Damien Baudiffier, j'ai été ravi d'être votre collègue de bureau à l'INERIS. J'en garde des souvenirs « indélébiles » ! Je vous remercie pour votre aide, vos conseils et votre soutien sans faille! Nicolas, merci d'avoir eu l'habitude de travailler tard, cela m'a motivé pour en faire autant ! Merci à toi pour avoir pris des nouvelles et m'avoir soutenu même une fois à l'INRA et ensuite à Tours.

Tous mes remerciements vont aussi à mes collègues de bureau de l'INRA, aux collègues d'autres bureaux, aux autres doctorants, et aux derniers arrivés dans l'équipe quand j'étais encore à l'INRA: Laure Khoury, Aurélien Amiel, Marianne Chopard-Lallier, Vanessa Graillot, Clarisse Létondor, Shanu Shameer, Clément Frainay, Benjamin Merlet et Nathalie Poupin. Elodie, nous nous sommes croisés rapidement et je te souhaite un bel avenir dans l'équipe ! Je remercie particulièrement Laure pour m'avoir supporté ! Merci pour ton dynamisme, ta bonne volonté, ta bienveillance, ton écoute, ton soutien et tes encouragements ! Merci pour ton aide avec les poissons quand une baisse de régime se faisait ressentir ! Merci pour avoir pris en charge l'organisation de bons nombres de soirées… ! Merci pour les discussions, les fous rires, les délires… Ah il y en a des petits papiers sur le mur qui font écho à ces bons moments… !

J'exprime aussi mes remerciements à mes enseignants de la faculté de pharmacie et de la faculté des sciences de Nantes qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche et qui m'ont conforté dans mon envie de poursuivre dans cette voie. Un merci particulier à Karina Petit, Delphine Carbonnelle, Agnès Moreau-Aubry, Laurent Lescaudron et François Lang, mon directeur de thèse de pharmacie.

Avant même d'avoir terminé ma thèse et la rédaction du manuscrit, j'ai dû faire un choix professionnel qui m'a éloigné de Toulouse et du monde de la toxicologie, et m'a rapproché d'une nouvelle équipe, celle du Laboratoire d'Ingénierie cellulaire et tissulaire (LICT) de l'Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique (EFS-CA), à Tours. Je tiens à remercier vivement Monsieur

Frédéric Dehaut, directeur général de l'EFS-CA, pour m'avoir proposé de candidater à ce poste. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien à la fois mon travail rédactionnel de thèse et mon travail au sein de votre établissement. J'adresse mes sincères remerciements à Madame Marie Prat-Lepesant, directeur du LICT, pour sa confiance, ses conseils et sa compréhension. Merci pour m'avoir permis de prendre un certain nombre de congés afin de terminer ma thèse, et ce malgré une charge de travail conséquente. Je remercie également tous les membres de l'équipe du LICT pour leur accueil.
Je remercie profondément toutes les personnes (famille, amis, collègues, encadrants…) qui m'ont apporté leur soutien pendant cette période assez difficile.

Mes remerciements vont également à mes ami(e)s de pharmacie : Anne, Coralie, Anna, Aurélie, Jonathan et Altan. Merci pour m'avoir encouragé et soutenu dans mes projets ! Je vous ai fait un peu faux bon pendant cette période de thèse. Le temps me manquait pour tout faire. Je vais maintenant pourvoir répondre présent à vos invitations et vous rendre la pareille !

J'adresse aussi un grand merci à Martine et Guy qui ont suivi mon parcours depuis tout petit ! Merci pour votre soutien et vos encouragements, ainsi que pour tous les moments partagés notamment pendant cette période de thèse.

Pour terminer, j'adresse mes plus profonds remerciements à toute ma famille qui a participé, parfois sans s'en rendre compte, à cette thèse, que ce soit par vos témoignages d'affection, votre soutien et votre aide dans la vie de tous les jours.
…A mon frère et à ma belle sœur, merci pour votre soutien. Il s'en est passé aussi des rebondissements professionnels et de beaux événements pour vous pendant cette période !
…A mes grands parents, merci pour tout ce que vous avez fait ! Je pense particulièrement à mes grand-mères qui auraient aimé me savoir travailler sur une thèse. Je pense aussi à mon grand-père qui a toujours été fier de mon travail et avec qui je ne pourrai partager la fin de cette aventure. Et je remercie chaleureusement mon papi pour son soutien, pour son aide à la maison à Saint Laurent, et pour les bons œufs frais !
…A mes parents, un merci infini pour tout. Vous m'avez toujours encouragé, soutenu, aidé, écouté. Vous m'avez toujours montré le sens de l'effort et du travail, et ce que ces valeurs représentent. Vous m'avez aussi montré que quelques soient les difficultés, elles seront surmontées d'une manière ou d'une autre. Vous m'avez appris à avoir confiance en moi. Je vous suis infiniment reconnaissant pour tout ce que vous m'avez transmis. Merci pour tous vos efforts et je sais combien vous en avez fait notamment pour que tous les à côtés de la thèse soient simples et faciles. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble ; ils sont importants. Merci pour avoir continuellement fait en sorte que tout soit toujours le mieux possible pour moi. Merci. Il faut maintenant prendre soin de vous.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 11

TABLE DES FIGURES 12

TABLE DES TABLEAUX 15

INTRODUCTION GENERALE 17

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 22

I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS 23

I.1. Le système endocrinien 23

I.1.1. Nature, organisation et fonctions 23

I.1.2. Les hormones: messagers chimiques du système endocrinien 25

I.1.3. Stéroïdogenèse et biomarqueurs œstrogéniques chez le poisson 26

I.1.3.1. La stéroïdogenèse chez le poisson 26

I.1.3.2. Des protéines œstrogéno-régulées, biomarqueurs d'une activité œstrogénique des xénobiotiques chez le poisson zèbre 27

I.1.3.2.1. Les vitellogénines 27

I.1.3.2.2. L'aromatase B 27

I.2. Perturbateurs endocriniens 28

I.2.1. Principes généraux 28

I.2.1.1. Définition, nature et origine 28

I.2.1.2. Modes d'action 31

I.2.1.3. Effets faibles doses et relations effet-dose 32

I.2.2. Les xéno-œstrogènes 33

I.2.2.1. Effets médiés par les récepteurs des œstrogènes 34

I.2.2.1.1. Les récepteurs nucléaires des œstrogènes 34

I.2.2.1.2. Les récepteurs membranaires des œstrogènes 37

I.2.2.1.3. Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes 38

I.2.2.1.4. Modes d'action des PE impliquant les récepteurs des œstrogènes 38

I.2.2.1.5. Variété des ligands des récepteurs des œstrogènes 40

I.2.2.2. Effets non médiés par les récepteurs des œstrogènes 41

I.2.2.2.1. Perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes 41

I.2.2.2.2. Perturbation du transport des hormones endogènes 41

I.2.2.2.3. Perturbation de la régulation des enzymes de biotransformation des hormones endogènes 42

I.2.2.3. Exemples d'effets biologiques de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes 42

II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES 45
II.1. Place du métabolisme dans le devenir des xénobiotiques 45
II.1.1. Les organes de biotransformation des xénobiotiques 45
II.1.2. Effets de premiers passages 46
II.2. Les enzymes de biotransformation 47
II.2.1. Les enzymes de phase I : réactions de fonctionnalisation 48
II.2.1.1. Les cytochromes P450 49
II.2.1.2. Flavine-monooxygénases 53
II.2.2. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison 54
II.2.2.1. Les UDP-glucuronyltransférases 55
II.2.2.2. Les sulfotransférases 57
II.2.2.3. Les N-acétyltransférases 59
II.2.2.4. Les Glutathion-S-transférases 61
II.3. Capacités de biotransformation des xénobiotiques chez les poissons téléostéens 64
II.3.1. Les capacités de biotransformation de phase I 65
II.3.1.1. Les enzymes de phase I chez le poisson zèbre 65
II.3.1.1.1. Les monoamines oxydases (MAO) 65
II.3.1.1.2. Les flavines monooxygénases (FMO) 65
II.3.1.1.3. Les cytochromes P450 (CYPs) 65
II.3.1.2. Capacités de biotransformation liées aux CYP dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme 69
II.3.2. Les capacités de biotransformation de phase II 71
II.3.2.1. Glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison chez le poisson zèbre 71
II.3.2.1.1. Les UGTs 71
II.3.2.1.2. Les SULTs 72
II.3.2.2. Capacités de biotransformation liées aux UGTs et aux SULTs dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme. 74
II.3.3. Exemples de biotransformation chez le poisson zèbre par les EMX de phase I et II 75
II.4. Mécanismes de régulation de l'expression des enzymes de biotransformation 78
III.CONTEXTE REGLEMENTAIRE ET OUTILS BIOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS 81
III.1. Etude des PE : des modèles intégratifs aux modèles de criblage 81
III.2. Cadre et problématique réglementaires relatifs aux perturbateurs endocriniens 83
III.2.1. La question de la définition des perturbateurs endocriniens : un enjeu scientifique et réglementaire .. 84
III.2.2. Le cadre de l'évaluation réglementaire des PE par l'OCDE 87
III.2.3. Les capacités de biotransformation des tests biologiques appliqués aux PE : une priorité scientifique et réglementaire ? 88
III.3. Place des modèles issus du poisson zèbre dans l'étude des perturbateurs endocriniens œstrogéniques 91

DEMARCHE EXPERIMENTALE ET CHOIX METHODOLOGIQUES 94

I. OBJECTIFS 95

II. DEMARCHE EXPERIMENTALE 96

II.1. Stratégie expérimentale 96

II.2. Modèles biologiques 98

II.2.1. Modèles cellulaires 98

II.2.1.1. Evaluation du potentiel œstrogénique des PE 98

II.2.1.2. Etude du devenir des PE d'intérêt 99

II.2.2. Modèles animaux 100

II.2.2.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE 100

II.2.2.2. Etude du devenir des PE d'intérêt 101

II.3. Choix des xénobiotiques 102

II.3.1. 17 -œstradiol et éthinylestradiol 103

II.3.2. Benzophénone 2 103

II.3.3. Bisphénols A, F et S 104

II.3.4. Molécules retenues pour les études de biotransformation 106

II.4. Modalités d'exposition des modèles biologiques aux xénobiotiques 107

II.4.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE 107

II.4.1.1. Cultures cellulaires 107

II.4.1.1.1. Culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre 107

II.4.1.1.2. Lignées cellulaires ZELH-zfERs 108

II.4.1.2. Larve transgénique *cyp19a1b*-GFP et larves sauvages de poissons zèbres 109

II.4.1.3. Poisson zèbre adulte 109

II.4.2. Etudes de biotransformation 111

II.4.2.1. Cultures cellulaires 111

II.4.2.2. Larves sauvages 113

II.4.2.3. Poisson zèbre adulte 114

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité œstrogénique 116

II.5.1. Concentration en vitellogénine dans les milieux de culture et dans le sang 116

II.5.2. Activité EROD 118

II.5.3. Taux relatifs de transcrits 119

II.5.4. Activité luciférase 120

II.5.5. Induction de l'expression de la GFP 121

II.6. Méthodes d'évaluation de la biotransformation des xénobiotiques 122

II.6.1. Synthèse des approches utilisées pour les études de métabolisme 122

II.6.2. Traitement des échantillons liquides et solides en vue de leur profilage métabolique 123

II.6.2.1. Les modèles cellulaires 123

II.6.2.2. Le modèle larve 123

II.6.2.3. Le modèle poisson adulte 124

II.6.3. Quantification de la radioactivité 126

II.6.3.1. Brûlage des échantillons tritiés à l'oxidizer 126

II.6.3.2. Compteur à scintillation liquide 127

II.6.4. Profilage métabolique et identification des métabolites 127

II.6.4.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur de radioactivité 127
II.6.4.2. Hydrolyses enzymatiques 129
II.6.4.3. Spectrométrie de masse haute résolution 130

RESULTATS 132
I. EFFETS ŒSTROGENIQUES DE BENZOPHENONES CHEZ LE POISSON ZEBRE 133
I.1. Article 1 133
I.2. Effet œstrogénique de la Benzophénone-2 chez la larve : données complémentaires à l'article 1 156
II. ACTIVITE ŒSTROGENIQUE DES BISPHENOLS A, F ET S CHEZ LE POISSON ZEBRE 158
Article 2 158
III. REPONSE ŒSTROGENIQUE ET EXPRESSION DE L'ACTIVITE CYP1A DANS LES HEPATOCYTES DE POISSON ZEBRE EN CULTURE PRIMAIRE 179
IV. METABOLISME DE LA BP2 ET DU BPS DANS DES MODELES *IN VITRO* ISSUS DE L'HOMME ET DU POISSON ZEBRE UTILISES DANS L'EVALUATION TOXICOLOGIQUE ET LE CRIBLAGE DES SUBSTANCES A ACTIVITE ŒSTROGENIQUE 185
Article 3 185
V. METABOLISME DE LA BENZOPHENONE-2 ET DU BISPHENOL S CHEZ LE POISSON ZEBRE AUX STADES LARVAIRES ET ADULTES 199
Article 4 199
VI. SYNTHESE DES RESULTATS 220

DISCUSSION GENERALE 221

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 237

ANNEXE 1 240
ANNEXE 2 242
BIBLIOGRAPHIE 246

Liste des abréviations

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

ADN : acide désoxyribonucléique

AhR: récepteur des hydrocarbures aromatiques

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

BP2 : benzophénone-2

BPA : bisphénol A

BPF : bisphénol F

BPS : bisphénol S

CLHP : chromatographie liquide haute performance

cpm : coup par minute

CYP : cytochrome P450

dpf : (*day post fertilization)* jour après fécondation

dpm : désintégration par minute

E2 : 17 -œstradiol

EC50 : concentration efficace médiane

EE2 : éthinylestradiol

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMX : enzymes du métabolisme des xénobiotiques

ER : récepteur des œstrogènes

ERE : *estrogen responsive elements* ou élément de réponse des œstrogènes

EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase

GFP : *Green Fluorescent Protein*

hpf: *hour post fertilization* ou heure après fécondation

HepaRG : lignée cellulaire hépatique humaine, bipotente

HepG2 : lignée cellulaire hépatique humaine

MELN : lignée cellulaire humaine (MCF-7) transfectées (ERE-Luc) issue des glandes mammaires

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : (*Polymerase Chain Reaction)* réaction en chaîne par polymérase

PE : perturbateurs endocriniens

PZFH : culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (primary culture of zebrafish hepatocytes)

RN : récepteurs nucléaires

SMHR : spectrométrie de masse haute résolution

SULT: sulfotransférases

T47D-KBLuc : lignée cellulaire humaine (T47D) transfectée (ERE-Luc) issue des glandes mammaires

UE : Union Européenne

UGT : Glucuronyltransférase

Vtg : vitellogénine

ZELH-zfERs : lignées cellulaires hépatiques du poisson zèbre (ZFL) doublement transfectées (zfER , zfER 1 ou zfER 2 + ERE-Luc)

ZFL : lignée cellulaire hépatique du poisson zèbre

Table des figures

Figure 1. Organisation du système endocrinien chez le poisson zèbre. 24
Figure 2. La stéroïdogenèse gonadique chez le poisson adulte 26
Figure 3. Modes d'action des PE sur la dynanique hormonale 32
Figure 4. Effets monotones et non-monotones. 33
Figure 5. Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires 35
Figure 6. Homologie de séquences (%) de la totalité de la région codante des récepteurs des œstrogènes (régions A/B, C, D, E, F) 37
Figure 7. Altération par des PE de la synthèse, du devenir et de l'action du 17 -œstradiol sur une cellule cible 39
Figure 8. Effets de premiers passages après absorption par voie digestive, pulmonaire ou branchiale d'un xénobiotique chez l'Homme et le poisson zèbre 47
Figure 9. Biotransformations d'un xénobiotique dans un hépatocyte. 48
Figure 10. Exemple de la prise en charge d'un substrat endogène par un cytochrome P450 49
Figure 11. Structure 3D d'un cytochrome P450 et du noyau porphyrique 50
Figure 12. Localisation cellulaire et couplage aux protéines de transfert d'électrons des cytochromes P450 réductases 50
Figure 13. Cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase 51
Figure 14. Exemples de réactions chimiques catalysées par les CYPs 52
Figure 15. Exemples de bioactivation métabolique par des CYPs 52
Figure 16. Mécanisme général d'oxydation d'un substrat (X) par les FMO 53
Figure 17. Réaction de conjugaison d'un substrat nucléophile avec l'UDPGA par l'UGT 55
Figure 18. Fonctionnement général et localisation des UDP-glucuronyltransférases 55
Figure 19. Formation de métabolites glucuronoconjugués réactifs. A. Cas d'acyl glucuronides. B. Cas de l'ion nitrénium issu de la 2-naphthylamine. 57
Figure 20. Formation du PAPS et réaction de sulfoconjugaison 58
Figure 21. Voies de bioactivation et de détoxication du tamoxifène 59
Figure 22. Réaction de *N*-acétylation des arylamines par les *N*-acétyltransférases 60
Figure 23. Etape de bioactivation de la benzidine par *N*-acétylation 61
Figure 24. Réaction de conjugaison du glutathion 61
Figure 25. Activation métabolique de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde et détoxication par hydrolyse et conjugaison au glutathion 63
Figure 26. Voies de bioactivation du 1,2-dibromoéthane par les CYP et la GST 64

Figure 27. Principe de la régulation de l'expression des EMX de phase I et II et des protéines d'efflux (phase III) par l'interaction des xénobiotiques avec les récepteurs nucléaires..... 78
Figure 28. Paradigme des analyses en toxicologie 82
Figure 29. Démarche expérimentale générale 97
Figure 30. Principe de la mesure du potentiel œstrogénique d'un xénobiotique dans les modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre doublement transfecté, par l'émission de lumière suite à l'activation des ER. 99
Figure 31. Expression de la GFP dans les cellules gliales radiaires du modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) 101
Figure 32. Formule chimique développée des molécules utilisées..... 102
Figure 34. Exposition des cellules ZELH-zfERs en vue de la mesure de l'activité luciférase..... 108
Figure 33. Exposition d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire en vue du dosage de la vitellogénine et de la mesure de l'activité EROD 108
Figure 35. Exposition des larves cyp19a1b-GFP et larves sauvages en vue de mesures de fluorescence et d'analyses d'expression de transcrits 109
Figure 36. Exposition de poissons zèbres adultes mâles en vue du dosage de la vitellogénine 110
Figure 37. Exposition des hépatocytes de poisson zèbre mâle en culture primaire pour l'étude du devenir des xénobiotiques 112
Figure 38. Exposition des lignées cellulaires humaines et des lignées de poisson zèbre pour l'étude du devenir des xénobiotiques 112
Figure 39. Exposition des larves pour l'étude du devenir des xénobiotiques..... 114
Figure 40. Exposition des poissons zèbres adultes pour l'étude du devenir des xénobiotiques..... 116
Figure 41. Principe du dosage ELISA compétitif et indirect de la vitellogénine du poisson zèbre ... 117
Figure 42. Dosage ELISA du standard de vitellogénine (zf-Vtg) 118
Figure 43. Courbe dose-réponse de l'activité luciférase du 17 -œstradiol (E2) et de la benzophénone-2 (BP2) dans les cellules ZELH-zfER 121
Figure 44. Tête d'une larve en vue dorsale exprimant la GFP 121
Figure 45. Vue d'ensemble des étapes mises en œuvre pour l'analyse de la biotransformation de la ^{3}H-BP2 et du ^{3}H-BPS dans les différents modèles *in vitro* et utilisés au cours de ce travail..... 122
Figure 46. Broyeur vibrant (MM400, Retsch) et les pôts à billes dans lesquels sont placés les échantillons à broyer 125
Figure 47. Gradients analytiques développés pour les analyses respectives de la BP2 et du BPS..... 129
Figure 48. Effet de la BP2 sur l'expression des transcrits des gènes vtg1 et vtg2 chez la larve 156
Figure 49. Effet de la BP2 sur l'expression du gène cyp19a1b chez la larve..... 157
Figure 50. Evolution de la culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre au cours du temps 180
Figure 51. Réponse œstrogénique des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire après une exposition à l'E2..... 181

Figure 52. Effet de la BP2 (A) et du BPF (B) sur la production de vitellogénine par les hépatoctes de poissons zèbres en culture primaire..... 182
Figure 53. Fonctionnalité du crosstalk AhR/ER dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire 183
Figure 54. Activité EROD des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire..... 184

Table des tableaux

Tableau 1. Exemples d'effets biologiques de perturbateurs endocriniens sur des animaux sauvages, des animaux de laboratoire et sur l'Homme 29
Tableau 2. Exemples de familles chimiques et de sources de perturbateurs endocriniens..... 30
Tableau 3. Place des récepteurs nucléaires des œstrogènes dans la classification phylogénétique des RNs..... 35
Tableau 4. Classification des RNs basée sur la nature des ligands 36
Tableau 5. Exemples de ligands endogènes et environnementaux des récepteurs des œstrogènes chez les vertébrés..... 40
Tableau 6. Exemples de PE modifiant la stéroïdogenèse chez les mammifères et les poissons téléostéens 41
Tableau 7. Exemples d'effets biologiques de xéno-œstrogènes..... 43
Tableau 8. Familles et fonctions des EMX de phase I 48
Tableau 9. Exemples de substrats des FMO..... 54
Tableau 10. Principales familles des EMX de phase II..... 54
Tableau 11. Caractérisation des activités catalytiques d'enzymes de phase I chez le poisson 68
Tableau 12. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux CYPs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson..... 70
Tableau 13. Taux d'expression des gènes UGTs (ARNm) dans différents tissus issus du poisson zèbre adulte âgé de 6 mois 72
Tableau 14. Exemples de substrats endogènes et exogènes des SULTs du poisson zèbre 73
Tableau 15. Taux d'ARNm des SULTs selon le stade de développement du poisson zèbre..... 74
Tableau 16. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux UGTs et SULTs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson..... 75
Tableau 17. Exemples d'interactions ligand/ récepteur et de leurs effets sur l'expression des enzymes de phase I et II, et des transporteurs, chez l'Homme..... 79
Tableau 18. Exemples de substrats (inducteurs ou répresseurs) des EMX de phase I et II chez les mammifères et le poisson 80
Tableau 19. Avantages et inconvénients des modèles *in vivo* et *in vitro* dans les analyses toxicologiques 82
Tableau 20. Lignes directrices des tests spécialement développés ou actualisés pour l'identification ou l'évaluation de propriétés endocriniennes de substances chimiques..... 87
Tableau 21. Tests non validés actuellement en cours d'étude pour l'identification des perturbateurs endocriniens..... 88

Tableau 22. Liste non exhaustive de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle biologique destiné à l'étude des perturbations du système endocrinien 91
Tableau 23. Bioessais in vitro basés sur l'expression de gènes naturels ou transfectés pour l'étude des propriétés œstrogéniques des produits chimiques 93
Tableau 24. Modèles cellulaires et animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique de PE et leur devenir 101
Tableau 25. Caractéristiques des molécules utilisées au cours des expositions des modèles biologiques 102
Tableau 26. Caractéristiques des gènes cibles et du gène de référence 119
Tableau 27. Ensemble des paramètres des expérimentations menées dans les modèles biologiques *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre et d'Homme pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques et de leur biotransformation 131
Tableau 28. Bilan des réponses œstrogéniques obtenues après exposition des différents modèles du poisson zèbre à la benzophénone-2 (BP2) et aux bisphénols (BPA, BPS et BPF) 220
Tableau 29. Bilan des biotransformations de la BP2 et du BPS dans les modèles poissons zèbres et humains 220

Introduction générale

Les activités anthropiques conduisent à l'émission dans l'environnement de composés chimiques dont la diversité et la quantité ne cessent d'augmenter. Un nombre croissant de ces composés est identifié comme étant des perturbateurs endocriniens (PE). L'OMS à définit en 2002 un perturbateur endocrinien potentiel comme étant « une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)- populations » (OMS 2002). Ces PE ont également été définis d'après la variété de leurs mécanismes d'action comme étant des composés exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones endogènes responsables du maintien de l'homéostasie et des processus de régulation du développement (Kavlock et al. 1996). Les PE regroupent des substances aux structures chimiques variées appartenant à de très nombreuses classes chimiques dont les stéroïdes de synthèse, les phyto- et myco-œstrogènes, les alkylphénols, les bisphénols, les phtalates, les polybromodiphényléthers (PBDE), des pesticides, des dioxines et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH).

De part leur processus de fabrication et leurs utilisations ces substances sont largement retrouvées dans l'environnement aquatique et peuvent ainsi affecter l'ensemble des chaines trophiques. De nombreuses espèces animales et en particulier les espèces aquatiques, exposés à des PE, ont développé des pathologies et des altérations telles que des perturbations du développement et de la reproduction (Colborn et al. 1993; Ankley et al. 2009). Chez l'Homme, des études épidémiologiques confortées par des études menées chez les mammifères mettent en avant des données inquiétantes quant aux effets possibles de l'exposition aux PE (Vandenberg et al. 2012). Les préoccupations sanitaires et environnementales qui en découlent concernent notamment des PE œstrogéno-mimétiques qui agissent en mimant l'action d'hormones œstrogéniques endogènes.

Afin de mesurer les dangers que représentent ces PE pour l'Homme et l'environnement, le développement de nouveaux outils biologiques s'est avéré nécessaire. Ce besoin a été renforcé par l'évolution de la réglementation relative aux produits chimiques avec la mise en place, en 2007, de la réglementation REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques). Le défi a donc consisté à développer de nouveaux tests biologiques permettant de détecter les PE et de caractériser leur(s) activité(s) biologique(s). Ce développement s'est également inscrit dans un contexte favorisant la mise en œuvre de méthodes alternatives à celles employant un grand nombre d'animaux (règles des 3R : réduire, remplacer, raffiner). Ces efforts ont conduit à l'évaluation et à la validation par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) de certains de ces tests *in vitro* ou *in vivo* à court terme. Toutefois, alors que certaines lacunes ont été identifiées, des développements complémentaires se doivent d'être entrepris afin d'améliorer notre capacité à mieux cerner et maîtriser les dangers représentés par les PE. Celles-ci concernent en particulier les points suivants:

(1) Spécificité des modèles cellulaires pour la mesure des effets œstrogéniques des PE.

Plusieurs modèles *in vitro* mammaliens en particulier basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs ont été développés. Toutefois, des différences d'affinité de liaison pour des PE entre des récepteurs des œstrogènes humains et de poisson ont été mises en évidence. De fait, l'espèce d'origine, le type cellulaire, le type de récepteur nucléaire et la machinerie moléculaire d'une cellule sont autant de facteurs pouvant moduler la réponse biologique d'un PE (Matthews et al. 2000; Milnes et al. 2008). Des efforts sont ainsi menés afin de mettre à jour les différences d'effets œstrogéniques mesurées de PE entre des modèles *in vitro* issus d'espèces différentes, comme par exemple l'Homme et le poisson. Le développement de modèles cellulaires spécifiquement issus du poisson apparait dès lors comme pouvant permettre de mieux appréhender les spécificités des ces modèles cellulaires afin d'améliorer l'efficacité et la fiabilité de l'évaluation des activités biologiques des PE parmi les espèces aquatiques.

(2) Des modèles *in vivo* issus du poisson peu adaptés au criblage des PE.

In vivo, deux principaux tests ont été développés chez le poisson. Il s'agit du test de 21 jours (OCDE TG230) et du test du développement sexuel (OCDE TG234). Ces tests sont longs, nécessitent un nombre assez important d'animaux et sont relativement couteux. Ils sont basés sur la mesure de paramètres révélant une activité œstrogénique comme la concentration plasmatique en vitellogénine ainsi que sur l'analyse histopathologique des gonades. Ces bioessais *in vivo* ne sont que peu adaptés et adaptables au criblage de l'activité d'un nombre important de PE. Pour cette raison, il s'avère nécessaire de développer des tests poissons alternatifs, moins couteux et plus rapides, notamment au stade embryo-larvaire, et basés sur une mise en évidence simple, efficace et sensible de gènes œstrogéno-régulés. L'utilisation de la transgénèse chez le poisson est l'une des techniques pouvant permettre d'atteindre cet objectif.

(3) Absence de stratégie combinant des tests *in vitro* et *in vivo* court terme

Les méthodes actuelles d'évaluation des PE ne proposent pas de stratégies combinant des tests *in vitro* et *in vivo* à court terme et à partir d'une même espèce. Or, une telle approche basée sur des modèles reflétant différents niveaux de complexité biologique permettrait d'améliorer la fiabilité de l'évaluation de l'activité des PE pour faciliter l'extrapolation des données d'un contexte *in vitro* à un contexte *in vivo*.

(4) Des capacités de biotransformation des modèles biologiques insuffisamment prises en compte pour la mesure des effets des PE.

Bien que pouvant influencer la réponse biologique aux PE, les capacités de biotransformation (métabolisme) des modèles biologiques ne sont que très peu souvent prises en compte. Les processus de détoxication et de bioactivation déterminent en grande partie la fraction de molécules actives atteignant leur(s) cible(s) moléculaire(s). Or l'expression aussi bien qualitative que quantitative des systèmes enzymatiques impliqués dans la biotransformation des composés chimiques diffère selon les niveaux de complexité des modèles biologiques (organisme entier, explants d'organes, culture primaire, lignée cellulaire, stades de développement). Même s'il est bien identifié que la

caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés dans l'objectif d'évaluer l'activité des PE est indispensable pour pouvoir interpréter les réponses biologiques observées (Jacobs et al. 2013), les études prenant en compte la biotransformation des composés testés sont rares.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un modèle biologique qui rassemblent les caractéristiques nécessaires afin de répondre aux besoins de développement de tests de criblage *in vitro* et *in vivo* à court terme, rapides et peu couteux. Le poisson zèbre est un vertébré appartenant à la famille des cyprinidés ayant pour habitat originel les eaux douces et chaudes d'Asie. Ce poisson présente de nombreux avantages : son génome est entièrement séquencé, son coût d'élevage est assez faible par rapport à celui des rongeurs et son élevage est assez facile. Ses autres avantages sont un cycle de vie assez court associé à une maturité sexuelle rapide (75-100 jours), une reproduction continue en laboratoire et un nombre élevé d'œufs par ponte, ainsi qu'un développement embryonnaire externe et facilement observable en raison de la transparence du chorion. Ces avantages ont permis à ce poisson de devenir dans un premier temps un modèle de référence en toxicologie environnementale et en biologie du développement, et par la suite un modèle de plus en plus étudié et utilisé dans le domaine biomédical.

Le poisson zèbre est un modèle très largement utilisé dans l'évaluation de l'activité des PE et dans l'étude de leurs mécanismes d'action (Segner 2009). Afin de caractériser le potentiel œstrogénique de composés chimiques dans une démarche globale intégrant des modèles *in vitro* et *in vivo*, plusieurs modèles expérimentaux de poisson zèbre ont été développés à l'INERIS. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL (ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012) ainsi que de tests *in vivo* basés sur l'expression d'un rapporteur fluorescent, la Green Fluorescent Protein (GFP), qui est sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* régulé par les œstrogènes dans le cerveau (EASZY assay : detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos) (Brion et al. 2012). Enfin, le poisson zèbre adulte est également utilisé comme modèle permettant la caractérisation de PE œstrogénique par une méthode plus classiquement utilisée, à savoir la détermination de la concentration plasmatique en vitellogénine. Toutefois, pour utiliser ces modèles dans une démarche intégrée, la prise en compte du métabolisme des xénobiotiques dans ces différents systèmes d'essai est nécessaire. En effet, le devenir des PE dans les modèles étudiés peut influencer la réponse biologique observée. C'est pourquoi la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques, qui permet de s'intéresser aux processus de bioactivation et de détoxication, est un des paramètres clefs à considérer dans l'évaluation des effets biologiques des xénobiotiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche de caractérisation des modèles biologiques tant sur leur capacité à rendre compte d'un effet œstrogénique que sur leur capacité de biotransformation des xénobiotiques. Plus précisément ce travail a consisté, d'une part, en l'étude du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux émergeants à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre et, d'autre part, en l'étude du métabolisme de ces contaminants dans les différents systèmes d'essai *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre, complétée par une étude de métabolisme comparée avec des modèles cellulaires d'origine humaine.

Les objectifs principaux étant :
(1) l'amélioration de la caractérisation des modèles du poisson zèbre à rendre compte d'une activité œstrogénique de contaminants environnementaux et alimentaires
(2) la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles de poisson zèbre utilisés en toxicologie
(3) la compréhension et l'interprétation des réponses biologiques observées dans ces modèles
(4) l'évaluation de leur intérêt en termes de changement d'échelle

La présentation de ces travaux s'organise dans ce manuscrit en quatre grandes parties :

- Une première partie bibliographique permet de développer les différentes thématiques au carrefour desquelles s'inscrit ce travail de thèse. Après s'être intéressé aux perturbateurs endocriniens et à leurs modes d'action, un état des lieux non exhaustif des capacités métaboliques connues chez le poisson zèbre est présenté. La question scientifique et réglementaire de la place des modèles œstrogéniques du poisson zèbre et celle de l'évaluation des capacités de biotransformation en toxicologie endocrinienne sont ensuite développées.
- Une seconde partie présente la démarche expérimentale mise en œuvre avec une description des choix méthodologiques permettant d'atteindre les objectifs fixés.
- La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats, et ceci majoritairement sous forme d'articles
- Enfin une dernière partie a pour objectif de discuter l'ensemble des données obtenues dans le cadre de ce travail en les replaçant dans la problématique générale de la thèse pour mettre en perspective l'ensemble des travaux réalisés, et pour identifier les points qui pourraient faire l'objet de travaux complémentaires dans la suite de ce travail.

Synthèse bibliographique

I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Afin de mieux appréhender les conséquences de l'exposition des organismes à des perturbateurs endocriniens, il convient dans un premier temps de présenter brièvement le système endocrinien en focalisant notre attention sur les particularités relatives aux poissons.

I.1. Le système endocrinien

Avec le système nerveux et le système immunitaire, le système endocrinien est l'un des systèmes majeurs d'intégration des informations et de régulation de l'organisme. Le système endocrinien est composé de glandes endocrines et de cellules endocrines présentent dans différents organes. Les hormones produites par le système endocrinien jouent un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie en participant à la régulation des grandes fonctions de l'organisme.

I.1.1. Nature, organisation et fonctions

Le système endocrinien est impliqué dans le maintien de l'homéostasie à l'échelle de l'organisme en contrôlant et en régulant diverses fonctions, comme par exemple le comportement, la nutrition, la reproduction, la croissance, le métabolisme énergétique, le métabolisme phosphocalcique ou encore l'équilibre hydro-électrique.

Le système endocrinien du poisson téléostéen présente quelques différences avec celui des mammifères. Les glandes endocrines du poisson 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).
Les poissons ne possèdent pas de glandes parathyroïdes ni de glandes surrénales. Toutefois, la glande interrénale du poisson est l'équivalent de la corticosurrénale des mammifères (Hsu et al. 2003). Par ailleurs, chez le poisson téléostéen, un ensemble de neurones situé à l'extrémité caudale de la moelle épinière, projette leurs axones dans un organe richement vascularisé appelé urophyse. L'urophyse sécrète des urotensines (I et II) impliquées dans l'osmorégulation et dans la vasoactivation de

différents organes (intestins, vésicule biliaire, oviducte). Actuellement, des hormones proches de l'urotensine II des poissons, les urotensin II-related peptides (URP), mises en évidence également chez de nombreux mammifères, sont impliquées dans différents effets biologiques dont la régulation des sécrétions hormonales (Vaudry et al. 2010). Les poissons téléostéens possèdent également une glande endocrine appelée le corpuscule de Stannieux, située généralement sur la face ventrale des reins. Cette glande produit une hormone glyco-protéique appelée la stanniocalcine, impliquée dans la régulation phosphocalcique. L'expression de transcrits de deux stanniocalcines (STC1 et STC2) a également été mise en évidence dans différents organes chez les mammifères (Yeung et al. 2012). Enfin, le corps ultimobranchial, situé entre le plancher de l'œsophage et le sinus veineux du cœur des poissons téléostéens, renferme des cellules productrices de calcitonine participant également à l'homéostasie phosphocalcique (Pang 1971).

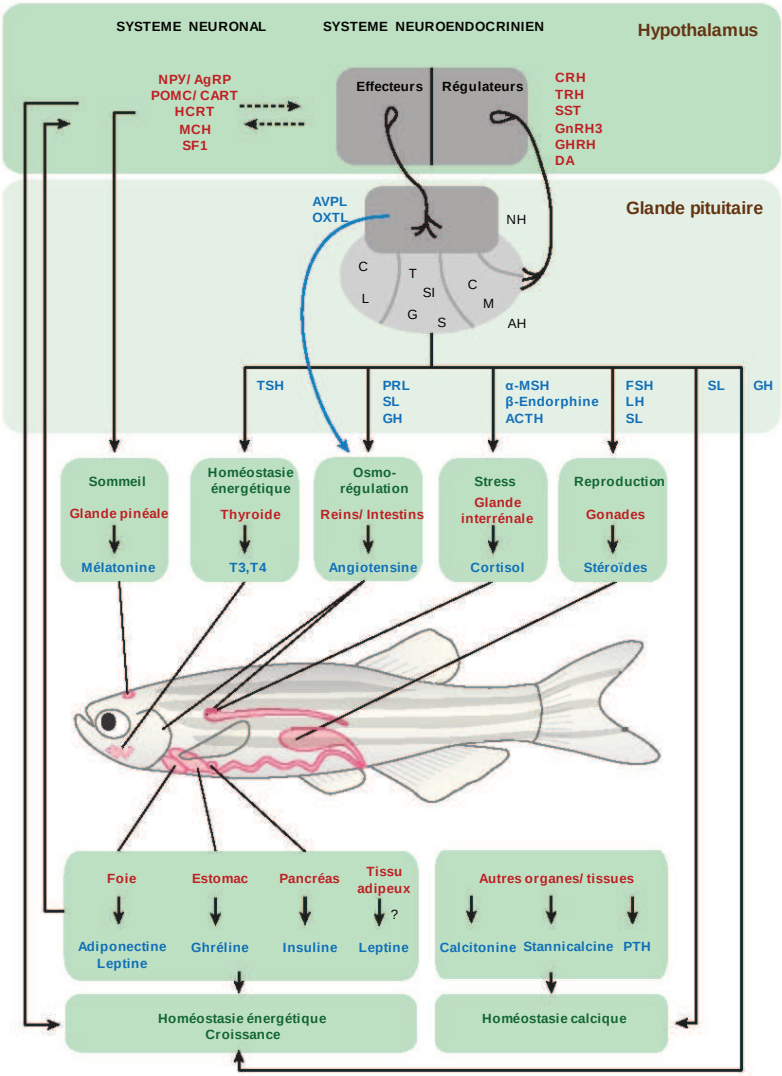


Figure 1. Organisation du système endocrinien chez le poisson zèbre.

ACTH :adrénocorticotrophine, **AgRP** : agouti-related peptide, **AH :** adénohypophyse, **AVPL** : arginine vasopressin like, **CART :** cocaine- and amphetamine-regulated transcript, **CRH** : corticotropin releasing

hormone ou corticolibérine, **DA** : dopamine, **FSH** : Follicle Stimulating Hormone ou hormone folliculo-stimulant, **GH** : growth hormone ou hormone de croissance, **GnRH** : gonadotropin-releasing hormone ou gonadolibérine, **GnRH3** : gonadotropin-releasing hormone 3, **HCRT :** hypocretine, **LH** : luteinizing hormone ou hormone lutéïnisante, **MCH** : melanin-concentrating hormone, **αMSH** : α melanocyte-stimulating hormone, **NH** : neurohypophyse, **NPY** : neuropeptide Y, **OXTL** : oxytocin like, **POMC** : pro-opiomélanocortine, **PRL** : prolactine, **PTH** : parathyroïd hormone ou hormone parathyroïdienne, **SF1** : Steroidogenic factor-1, **SL** : somatolactin, **SST :** somatostatine, **TRH** : thyrotropin-releasing hormone ou hormone thyréotrope, **TSH** : thyréostimuline, **T3** : triiodothyronine, **T4** : thyroxine. D'après (Lohr et Hammerschmidt 2011)

I.1.2. Les hormones: messagers chimiques du système endocrinien

La nature chimique des hormones est variée. Certaines hormones sont des composés plutôt hydrosolubles, comme les amines biogènes (catécholamines, tyrosine) et les hormones peptidiques (hormone thyréotrope). D'autres sont davantage liposolubles. C'est le cas des hormones stéroïdes qui dérivent du cholestérol (œstradiol, progestérone, testostérone, cortisol…), des hormones dérivant de lipides (acide linoléique) et de phospholipides (acide arachidonique) telles que les eicosanoïdes dont les prostaglandines, les leucotriènes ou encore les thromboxanes. Les hormones peuvent agir sur des cellules à distance (après un transport sanguin), sur des cellules voisines (mode d'action paracrine) ou bien sur elles-mêmes (mode d'action autocrine).

La fraction d'hormones circulant sous forme libre est très faible. Les hormones sont transportées par des protéines de transport non spécifiques comme l'albumine, ou spécifiques comme la Sex Binding Globulin (SBG) pour la testostérone, la Cortisone Binding Globulin (CBG) pour le cortisol ou la Thyroid Binding Globulin (TBG) pour la thyroxine.

L'action des hormones sur une cellule cible est déterminée par la présence d'un récepteur spécifique. Certains récepteurs sont localisés dans la cellule cible (récepteur intracellulaire) comme pour les récepteurs d'hormones liposolubles telles que les hormones stéroïdes et thyroïdiennes. En revanche, les récepteurs d'hormones peptidiques et des catécholamines sont situés dans la membrane plasmique de la cellule cible (récepteur membranaire). Une fois fixées à leur récepteur, les hormones entrainent une cascade de réactions intracellulaires conduisant à des modifications de l'activité cellulaire. Les réponses cellulaires peuvent se traduire par exemple par une modification de la perméabilité ou du potentiel de repos de la membrane plasmique, de la synthèse de protéines et d'enzymes, le déclenchement d'une activité sécrétrice ou encore l'activation de la division cellulaire.

I.1.3. Stéroïdogenèse et biomarqueurs œstrogéniques chez le poisson

Afin de mieux comprendre l'intérêt du développement de modèles biologiques ichthyens dont l'objectif est d'évaluer l'activité œstrogénique des perturbateurs endocriniens, certaines particularités de gènes œstrogéno-régulés chez le poisson nécessitent d'être explicitées.

I.1.3.1. La stéroïdogenèse chez le poisson

La stéroïdogenèse est un processus impliquant de nombreuses voies biochimiques permettant la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol. On répertorie chez les vertébrés, parmi les hormones stéroïdes, les stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes et progestagènes) et les corticoïdes tels que les glucocorticoïdes (cortisol) et les minéralocorticoïdes (aldostérone). Chez le poisson téléostéen, les principales hormones œstrogéniques sont l'estrone (E1) et le 17 -œstradiol (E2), et les principales hormones androgéniques sont la testostérone et la 11-kétotestostérone (Figure 2). Les principales enzymes mises en jeu dans la stéroïdogenèse sont des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) (Figure 2). Chaque enzyme impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdiennes représente une cible potentielle pour les PE, en plus de la possibilité pour ces PE d'être eux-mêmes des molécules biologiquement actives.

Chez les poissons la stéroïdogenèse se déroule principalement dans les gonades (Figure 2) mais aussi dans le cerveau et les glandes inter-rénales. Les hormones stéroïdiennes sexuelles jouent un rôle majeur dans la régulation de la reproduction (gamétogenèse, caractères sexuels secondaires, comportement …) mais aussi dans l'homéostasie osseuse et cardio-vasculaire.

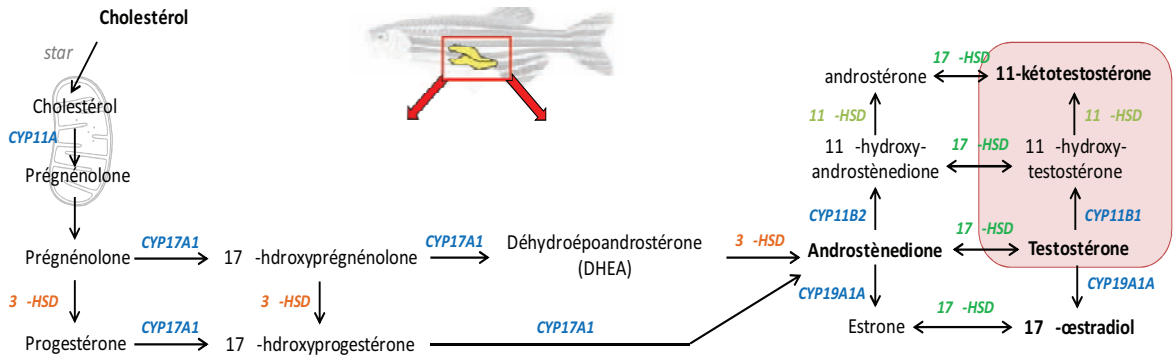


Figure 2. La stéroïdogenèse gonadique chez le poisson adulte

CYP : cytochrome P450, HSD = hydroxystéroïdes déshydrogénase. Cadre orange : Réactions spécifiques au poisson. D'après (Beaudiffier 2012; Villeneuve et al. 2007)

I.1.3.2. Des protéines œstrogéno-régulées, biomarqueurs d'une activité œstrogénique des xénobiotiques chez le poisson zèbre

I.1.3.2.1. Les vitellogénines

Chez les vertébrés ovipares, dont les poissons, l'embryon et la larve puisent pendant leurs premiers jours leur nourriture depuis le sac vitellin. Ce sac est composé de nutriments issus de protéines dont les précurseurs sont des phospholipoprotéines : les vitellogénines (Vtg) (Wang et al. 2005). Les Vtg sont codés par plusieurs gènes (*vtg*) et produites chez la femelle par les cellules hépatiques sous le contrôle hormonal de l'œstradiol (E2). L'expression des Vtg dépend du tissu, du sexe et du stade de développement. La synthèse des Vtg est un processus physiologique normal chez la femelle. Chez le mâle, une très faible quantité de Vtg est synthétisée. Toutefois, cette production de Vtg peut être induite chez le mâle de manière non physiologique sous l'effet de composés dotés de propriétés œstrogéniques. L'interaction de composés exogènes avec les récepteurs des œstrogènes peut par conséquent conduire à l'induction de la production de Vtg chez le mâle. De ce fait, la Vtg constitue un biomarqueur d'effet œstrogénique de composés exogènes pour certains modèles biologiques aquatiques, notamment des poissons (Segner 2009).

I.1.3.2.2. L'aromatase B

Les aromatases (CYP19) sont les enzymes limitantes de la conversion des androgènes en œstrogènes. Chez l'Homme, il existe un gène de l'aromatase qui s'exprime dans de nombreux tissus tels que les ovaires, les testicules, les glandes surrénales et le placenta mais aussi le muscle, le foie, le cœur, le tissu adipeux et le cerveau. La régulation du gène de l'aromatase est tissu-spécifique, impliquant des épissages alternatifs (Simpson 2004). Contrairement à l'Homme, deux formes d'aromatases ont été identifiées chez la majorité des téléostéens et notamment le poisson zèbre. Il s'agit de deux protéines structurellement différentes dénommées P450 aromatase A et P450 aromatase B codées par deux gènes distincts : le gène cyp19a1a code pour l'aromatase A qui est principalement exprimée dans les gonades, et le gène cypa19a1b code pour l'aromatase B principalement exprimée dans le cerveau (Tchoudakova et Callard 1998). Au niveau cérébral, l'aromatase B est fortement exprimée dans les cellules gliales radiaires, qui sont des cellules progénitrices de neurones, jouant ainsi un rôle clef dans la neurogenèse durant toute la vie des poissons, y compris au stade adulte. De telles cellules sont retrouvées dans le cerveau au stade embryonnaire chez les autres vertébrés, mais disparaissent progressivement à la naissance pour laisser place à des astrocytes (Pinto et Gotz 2007; Kriegstein et Alvarez-Buylla 2009; Malatesta et Gotz 2013). Chez les rongeurs, l'expression et l'activité de l'aromatase au niveau cérébral est maximale durant le développement embryonnaire, puis diminue chez l'adulte (George et Ojeda 1982; Lephart et al. 1992). Cette activité est probablement liée à la période de différentiation sexuelle du cerveau basée sur l'aromatisation de l'œstradiol en testostérone.

Chez le poisson zèbre et d'autres espèces de téléostéens, l'activité et l'expression de l'aromatase B débute très tôt pendant la période embryonnaire et augmente durant le développement pour atteindre une expression et une activité très forte à l'âge adulte (Hinfray et al. 2006; Vosges et al. 2010). Chez les espèces présentant des cycles reproducteurs bien définis, des pics d'activités durant la période de maturation sexuelle coïncidant avec des taux circulants élevés d'hormones stéroïdiennes sexuelles sont observés (Borg et al. 1987; Mayer et al. 1991). Chez les embryons, de faibles doses de composés chimiques dotés de propriétés œstrogéniques sont capables de fortement augmenter l'expression de l'aromatase B (Menuet et al. 2005; Tong et al. 2009; Brion et al. 2012). De part sa grande sensibilité aux composés œstrogéniques, le gène cyp19a1b constitue un nouveau biomarqueur d'exposition aux perturbateurs endocriniens aux propriétés œstrogéniques.

I.2. Perturbateurs endocriniens

En règle générale, la plupart des hormones agit à de très faibles concentrations. De très faibles variations des concentrations en hormones entrainent une régulation fine des fonctions biologiques. Par conséquent, toute substance chimique exogène pouvant entrer en interaction avec le système endocrinien peut potentiellement entrainer des altérations des processus physiologiques mis en jeu. C'est le cas des perturbateurs endocriniens (PE).

I.2.1. Principes généraux

I.2.1.1. Définition, nature et origine

La problématique scientifique et sociétale que posent les perturbateurs endocriniens est apparue à la fin des années 1980. De nombreuses études ont montrés les effets délétères de substances chimiques, contaminants de l'environnement, sur les écosystèmes, l'Homme et les modèles animaux. Les dangers et les risques que représentent ces contaminants ont été progressivement pris en considération par les institutions réglementaires et politiques de différents Etats. L'enjeu est de pouvoir évaluer les dangers et les risques pour l'environnement et l'Homme, que représentent des substances chimiques déjà sur le marché ou en développement, et ainsi de garantir la sécurité sanitaire.

Plusieurs définitions des perturbateurs endocriniens ont été données. Celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) émise en 2002 est la plus communément admise : *« une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance »*. (OMS 2002). Une autre définit les perturbateurs endocriniens (PE) comme des substances chimiques exogènes d'origine naturelle ou artificielle pouvant altérer le système endocrinien en modifiant la synthèse, le stockage, le transport,

l'action ou l'élimination des hormones naturelles de l'organisme et ainsi, entrainer des effets nocifs sur la santé des organismes exposés et/ou de leurs descendants (Kavlock et al. 1996). Ainsi les PE sont définis d'après leur mode d'action potentiel vis-à-vis du système endocrinien mais aussi d'après la nature des effets biologiques dont ils sont responsables, même s'il convient de constater que la définition de l'OMS reste relativement vague, puisqu'elle mentionne des effets sur la santé pris au sens large tout en soulignant d'éventuels effets trans-générationnels.

Le tableau 1 illustre la diversité des effets biologiques pour les PE, révélant également une problématique à la fois en santé humaine et environnementale.

Tableau 1. Exemples d'effets biologiques de perturbateurs endocriniens sur des animaux sauvages, des animaux de laboratoire et sur l'Homme

4-MBC : 4-methylbenzylidène camphre, NP : nonylphénol, DEHP : Di-(2-éthylhexyl) phtalate, PCBs : polychlorobiphényles, PCDF : Polychlorodibenzofurane, DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

Organisme	Effets biologiques	Molécules incriminées	Références
Homme	**Diminution de la fertilité**	Diéthylstilbestrol	(Colborn et al. 1993)
	Comportement **Capacités immunitaires**	PCB, PCDF	(Guo et al. 1995)
Rat	**Perturbation thyroïdienne** (mâle : ↓ taux de T4)	Benzophénone 2	(Schmutzler et al. 2007)
	Modification de taux circulants d'hormones (mâle : ↓ taux de testostérone, ↑ LH)	DEHP, NP	(Akingbemi et al. 2004) (Laurenzana et al. 2002)
	Modification de taux de neuromédiateurs (mâle : GABA, aspartate, glutamate) **Augmentation du poids utérin**	4-MBC	(Carou et al. 2009) (Schlumpf et al. 2001)
	Anomalies du développement (↓ distance ano-génitale, altérations histologiques des testicules)	DEHP	(Andrade et al. 2006)
Oiseau	**Perturbations du comportement sexuel mâle**	Vinclozoline, Atrazine	(Ottinger et al. 2008)
Alligator	**Anomalies du développement**	DTT et dérivés	(Guillette et al. 1994)
Dauphin	**Diminution des capacités immunitaires** (corrélation)	PCBs, DDT	(Lahvis et al. 1995)
Poisson	**Masculinisation**	Spironolactone	(Raut et al. 2011)
	Intersexe (ovo-testicules)	4-nonylphénol	(El-Sayed Ali et al. 2014)
Gastéropode	**Imposex**	Tributyltine	(Giraud-Billoud et al. 2013)

Les PE peuvent être d'origine naturelle ou synthétique (Tableau 2). Les PE produits par les plantes et les champignons sont appelés phyto- et myco-œstrogènes, respectivement. Les phyto-œstrogènes peuvent être des isoflavones, des coumestanes, des lignanes ou des stilbènes. Les Fabacées (légumineuses) comme le soja produisent des substances chimiques appartenant à la famille des flavonoïdes (isoflavones telles que la génistéine et la daidzéine), et des coumestanes (telles que le coumestrol). De nombreuses familles de plantes supérieures sont à l'origine de stilbènes et de

lignanes. Tout comme les isoflavones et les coumestanes, les lignanes et les stilbènes semblent être produits notamment en réponse à des infections par des micro-organismes. Ils représentent alors des molécules de défense appelées des phytoalexines. Certaines espèces de champignons du sol, les fusariums, peuvent coloniser des végétaux, notamment les graminées, et sont à l'origine de mycotoxines comme la zéaralénone. Ces substances chimiques d'origine naturelle sont capables de mimer l'action d'hormones œstrogéniques endogènes des animaux. Toutefois, les activités humaines à l'origine de la production de substances chimiques, constituent une source d'exposition majeure des animaux et de l'Homme aux PE.

Tableau 2. Exemples de familles chimiques et de sources de perturbateurs endocriniens

Origine	Substance chimique	Famille chimique	Source
Naturelle	Génistéine Daidzéine Coumestrol	Phyto-œstrogène	Végétaux
	Zéaralénone	Mycotoxine	Champignons
	17 -œstradiol Œstrone	Stéroïdes sexuels	Hormones animales naturelles
Synthétique	17α-éthinyloestradiol, Diéthylstibestrol, Tamoxifène	Hormones de synthèse	Industrie pharmaceutique
	Benzophénones 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC) 3-benzylidène camphre	Filtres ultraviolets	Industries cosmétique, plastique et alimentaire
	Bisphénol A, F, S	Bisphénols	Industrie plastique
	Propylparabène Butylparabène Tert-butylhydroxyanisole (BHA)	Conservateurs et/ou anti-oxydants	Industries cosmétique et alimentaire
	Atrazine Lindane Endosulfan Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) Thirame Zinèbe	Biocides (phytosanitaires et pesticides)	Industries de la chimie et de l'agriculture
	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) Phtalate de dibutyle (DBP) Phtalate de diéthyle (DEP) Phtalate de dicyclohexyle, (DCHP)	Phtalates	Industries plastique, de la chimie et cosmétique
	Nonylphénol Octylphénol	Alkylphénols	Industries de la chimie (biocide), du textile, et de la cosmétique
	2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PeCDD	Dioxines	Sous-produit industriel
	Polybromodiphényléthers (PBDE) Tétrabromobisphénol A (TBBPA) Polybromobiphényles (PBB)	Retardateurs de flamme	Industries du textile, du plastique, de l'informatique et de l'électroménager

Les sources d'exposition des animaux et de l'Homme sont étroitement liées à la nature des contaminations environnementales et des usages de ces PE. Ces contaminants se retrouvent aussi bien dans les sols, sous-sols, rivières, lacs, nappes phréatiques mais aussi dans l'air intérieur (mobilier, matériel informatique, literie, revêtements) et extérieur (pesticides), ainsi que dans les aliments. Par conséquent, l'ensemble des chaines trophiques peut être touché après une exposition des organismes par voie digestive, respiratoire ou cutanée.

I.2.1.2. Modes d'action

Les modes d'action des PE sont complexes. De nombreuses communications croisées existent entre les différentes composantes du système endocrinien (axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, axe thyroïdien, métabolisme énergétique, régulation de la synthèse des stéroïdes, métabolisme phosphocalcique…). Chaque axe endocrinien interagit à différents niveaux avec d'autres axes, permettant une intégration et une régulation de l'ensemble des fonctions de l'organisme. Par conséquent, l'impact d'un PE sur l'une de ces composantes peut entrainer une dérégulation plus globale du système endocrinien. La connaissance et la compréhension partielle de ces communications croisées et des systèmes de régulation en jeu rend la prédiction des effets des PE plus difficile.

En agissant sur des cibles moléculaires, les PE vont altérer la communication assurée par les hormones au sein du système endocrinien. Les PE peuvent ainsi avoir un impact sur la synthèse des hormones au sein des cellules productrices, sur leur transport, sur leur action au niveau de la cellule cible, ou encore sur leur élimination/bioactivation par l'interaction avec le système de biotransformation des xénobiotiques (Figure 3). L'effet d'un PE sur une cellule cible peut résulter de plusieurs mécanismes d'action. Le mieux décrit et le plus connu consiste en l'interaction des PE avec des récepteurs nucléaires. L'interaction des PE avec des récepteurs nucléaires (voie génomique) tels que les récepteurs des œstrogènes (ER), les récepteurs des androgènes (AR), les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), les récepteurs de la progestérone (PR), les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR), entraine une modification de la transcription des gènes régulés par ces récepteurs nucléaires. Les PE peuvent également interagir avec des récepteurs membranaires (voie non génomique) entrainant une modification rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, du taux de protéines. La variation des taux de protéines codées par les gènes dont l'expression a été modifiée, peut alors aboutir à une dérégulation des fonctions biologiques qui sont sous la dépendance de ces protéines.

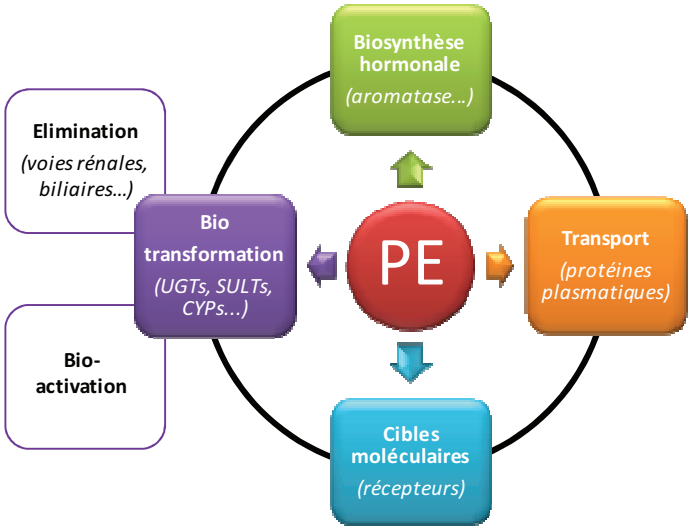


Figure 3. Modes d'action des PE sur la dynanique hormonale

I.2.1.3. Effets faibles doses et relations effet-dose

Les hormones endogènes sont actives à des doses très faibles, de l'ordre du picomolaire ou du nanomolaire. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les PE pouvaient agir à des doses qualifiées de faibles, à savoir de l'ordre du nanomolaire et du micromolaire (Vandenberg et al. 2012). Cette notion de faible dose peut recouvrir différents aspects, et différentes définitions de cette notion existent actuellement. Un effet peut être qualifié d' « effet à faible dose » lorsque (1) la dose se situe dans la gamme de doses d'exposition que l'on retrouve chez l'Homme, ou (2) la dose est inférieure à celle habituellement testée dans les études toxicologiques traditionnelles, ou (3) la dose est inférieure à la DMENO (Dose Minimale pour laquelle un Effet Nocif a été Observé), ou (4) la dose administrée à un animal qui conduit à une concentration plasmatique se situant dans la gamme de concentrations généralement mesurées dans la population humaine ou de l'organisme considéré (également appelée dose environnementale) (Brucker-Davis et al. 2001; Vandenberg et al. 2007). Cette dernière définition du concept à l'avantage de tenir compte des paramètres pharmacocinétiques (ADME : absorption, distribution, métabolisme, éxcrétion). La comparaison et l'interprétation des résultats peuvent s'avérer d'autant plus complexes que les études expérimentales ne se basent pas nécessairement sur la même définition de ces faibles doses. Outre les études toxicologiques à faibles doses des PE, des études récentes de métabolomique ont montré que des faibles doses de PE peuvent engendrer des modifications des réseaux métaboliques endogènes et donc des paramètres physiologiques des organismes exposés (Cabaton et al. 2013; Teng et al. 2013). L'enjeu est notamment de savoir si la modification de ces réseaux métaboliques peut être la conséquence d'un

simple phénomène adaptatif non délétère, ou bien si elle est le reflet d'une perturbation néfaste occasionnant une toxicité avérée.

La toxicologie étudie de manière classique les effets délétères des xénobiotiques selon leur dose. Plus la dose (ou concentration) est élevée, plus l'effet mesuré est important. On parle d'une relation monotone (sans changement de signe de la pente) linaire ou non linéaire entre la dose (ou concentration) et le paramètre biologique mesuré (Figure 4). Toutefois, les PE peuvent être à l'origine d'effets biologiques non-monotones (NMDRC : non monotonic dose response curve) pour lesquels on observe un changement de signe de la pente de la courbe dans le domaine de doses (ou concentrations) testées. La plupart des NMDRC ont une forme en U (effet maximal à la dose la plus faible et la plus forte) ou en U inversé (effet maximal pour des doses intermédiaires). Ces effets non-monotones représentent un défi important pour l'évaluation du risque et la toxicologie réglementaire. En effet, jusqu'à présent, l'établissement de doses acceptables sans effet néfaste pour les populations se basait sur des relations effet-doses monotones. Dans le cas des effet-doses non-monotones l'utilisation de fortes doses afin d'évaluer les doses plus faibles pour lesquels l'effet disparait n'est alors plus suffisante (Vandenberg et al. 2012).

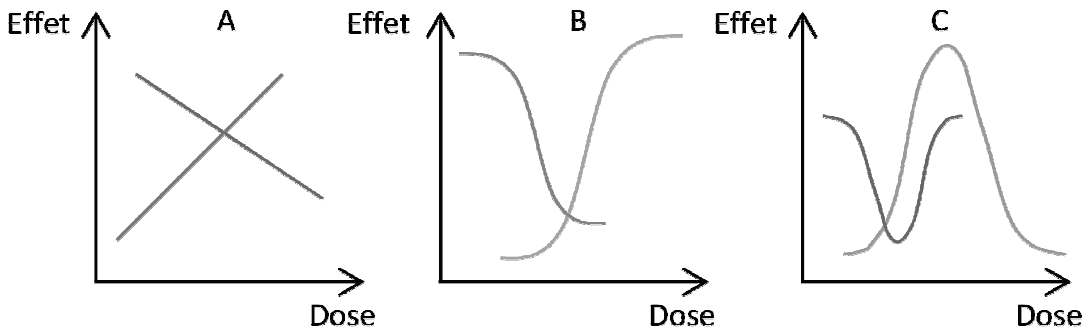


Figure 4. Effets monotones et non-monotones.

Effets monotones : A (effet-dose linéaire), B (effet-dose de type sigmoïdal). Effets non-monotones : C (effet-dose en U ou U inversé). D'après (Vandenberg et al. 2012).

I.2.2. Les xéno-œstrogènes

Les xéno-œstrogènes ou composé œstrogéno-mimétiques sont des PE qui peuvent mimer l'action d'hormones œstrogéniques endogènes. Cette classe de PE est de loin la plus étudiée jusqu'à aujourd'hui. Il a été démontré que ces xéno-œstrogènes ont été responsables d'effets biologiques chez l'Homme et les animaux, conséquence de leur interaction avec des récepteurs (nucléaires ou membranaires) ou de leur interaction avec des systèmes impliqués dans la synthèse, le transport et la biotransformation des hormones stéroïdes.

I.2.2.1. Effets médiés par les récepteurs des œstrogènes

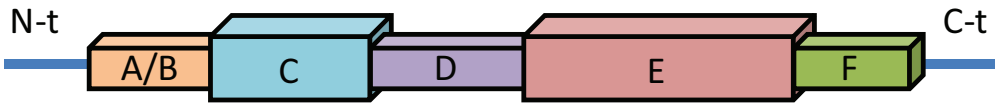
Il existe deux grands types de récepteurs des œstrogènes : les récepteurs nucléaires et les récepteurs membranaires.

I.2.2.1.1. *Les récepteurs nucléaires des œstrogènes*

- *Organisation des récepteurs nucléaires*

Les récepteurs nucléaires des œstrogènes (ER) de type nucléaire appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RNs). Ils jouent le rôle de facteurs de transcription modulant l'expression de gènes cibles en recrutant des complexes de régulation sur des sites spécifiques de l'ADN. Ces protéines assurent un contrôle de l'expression de gènes cibles en réponse à des signaux cellulaires. Les RN sont impliqués dans la régulation de la croissance, du développement, de la reproduction, du métabolisme endogène et exogène. Au niveau cellulaire, ces RNs participent à différents processus comme la prolifération, l'apoptose, ou la différentiation.

La structure générale des RNs inclut six régions ou domaines nommés de A à F (Nilsson et al. 2001) ; Figure 5). La région N-terminale (**régions A/B**) est celle qui présente la plus grande variabilité inter-espèce. Cette région contient le domaine d'activation indépendant de la fixation du ligand (domaine AF-1) avec lequel vont interagir des cofacteurs. La région de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain ; **région C**) est caractérisée par la présence de deux doigts de zinc qui forment une structure tridimensionnelle compacte permettant au récepteur de se lier aux éléments de réponse de l'ADN. La reconnaissance de l'ADN est notamment assurée par un motif appelé boite P présent dans le premier doigt de zinc. La boite D, présente dans le second doigt de zinc, est impliquée dans la dimérisation du récepteur. Cette région contient également la séquence de localisation nucléaire (SLN) impliquée dans la translocation du récepteur. La région charnière (**région D**), variable selon les RNs, peut également contenir des séquences de localisation nucléaire. Cette région serait également le site d'interaction avec des co-represseurs. Le domaine de liaison au ligand (**région E**) est composé d'un ensemble d'hélices alpha reliées par un feuillet beta formant une poche hydrophobe dans laquelle vient se loger le ligand. Outre les séquences essentielles à l'interaction du ligand, la région E contient le domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand (domaine AF-2), mais aussi des séquences d'interaction avec les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins) et des co-régulateurs, ainsi que le domaine de dimérisation. Aucune fonction n'a, à ce jour, été mise en évidence pour la région (**F**) à l'extrémité C-terminale.



AF-1	DBD	SLN	LBD	
	Dimérisation	Co-répresseurs	AF-2	
	SLN		Dimérisation	
			Protéines de choc thermique	
			Co-régulateurs	

Figure 5. Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

- *Classification des récepteurs nucléaires des œstrogènes*

La nomenclature internationale des RNs provient d'une classification en 6 groupes basée sur des critères phylogénétiques (Tableau 3) (Laudet 1997). Une seconde classification a été fondée sur la nature des ligands respectifs des RN donnant lieu à 3 sous classes de récepteurs (Tableau 4) (Janosek et al. 2006). Dans cette dernière classification, l'une des sous-classes correspond aux RNs orphelins pour lesquels leurs ligands n'ont, à ce jour, pas été identifiés.

Tableau 3. Place des récepteurs nucléaires des œstrogènes dans la classification phylogénétique des RNs

M : monodimère, D : homodimère, H : hétérodimère. (Laudet 1997; Aranda et Pascual 2001; Gronemeyer et al. 2004; Germain et al. 2006; Maltais 2006)

Sous-famille	Groupe	Nom (isotype)	Code	Dimérisation
1	A (récepteurs des hormones thyroïdiennes)	TR (,)	NR1A1, A2	H
	B (récepteurs de l'acide rétinoïque)	RAR (, ,)	NRB1, B2, B3	H
	C (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes)	PPAR (, / ,)	NR1C1, C2, C3	H
	D	Rev-ErbA (,)	NR1D1, D2	M, D
	F (récepteurs apparentés aux récepteurs des rétinoïdes)	ROR (, ,)	NRAF1, F2, F3	M
	H (récepteurs des oxystérols)	LXR (,)/ FXR	NRH1, H2, H3, H4, H5	H
	I (récepteurs orphelins)	VDR/PXR/CAR	NR1I1/ I2/ I3	H
	X	RN avec 2DBD (, ,)		H
2	A (Facteur nucléaire hépatocytaire)	HNF-4 (,)	NR2A1, A2	D
	B (récepteurs de l'acide rétinoïque)	RXR (, ,)	NR2B1, B2, B3	D
	C (récepteurs testiculaires)	TR (2, 4)	NR2C1, C2	D, H
	E	TLX/PNR	NR2E1, E2	M, D
	F	COUP-TF (I, II)/EAR-2	NR2F1, F2, F6	D,H /M
3	A (récepteurs des œstrogènes)	ER (,)	NR3A1, A2	D
	B (récepteurs apparentés aux récepteurs des œstrogènes)	ERR (, ,)	NR3B1, B2, B3	M, D
	C (récepteurs des 3-cétostéroïdes)	GR/MR/PR/AR	NR3C1, C2, C3, C4	D
4	A	NGFIB/NURR1/NOR1	NR4A1, A2, A3	M,D,H /M,H/M
5	A	SF1/LRH1	NR5A1, A2	M
6	A	GCNF	NR6A1	D
0	A	DAX/SHP	NR0B1, B2	H

Tableau 4. Classification des RNs basée sur la nature des ligands

D'après (Janosek et al. 2006).

Sous classes de récepteurs	Dénomination des récepteurs	Nature des ligands
I	PR ER AR GR MR	Hormones stéroïdes, dont - Progestatifs - Œstrogènes - Androgènes - Glucocorticoïdes - Minéralocorticoïdes
II	TR AhR VDR RXR (récepteurs de l'acide rétinoïque) RAR PPAR (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes)	Hormones thyroïdiennes Hydrocarbures aromatiques Vitamine D Acides rétinoïques (en général) Acides rétinoïques *trans* Proliférateurs de peroxysomes
III	Récepteurs orphelins	Sans ligands connus à ce jour

- *Les sous-types de récepteurs nucléaires des œstrogènes*

Chez les mammifères, deux formes de récepteurs nucléaires des œstrogènes ER (NR3A1) et ER (NR3A2) ont été identifiées. Contrairement aux mammifères, les poissons actinoptérygiens (dont le poisson zèbre) expriment trois isoformes des ERs : ER , ER 1 (aussi appelé ER) et ER 2 (Tchoudakova et al. 1999; Hawkins et al. 2000; Menuet et al. 2002). ER présente une grande homologie de séquence chez tous les vertébrés. Le récepteur ER 2 des poissons partage une grande grande homologie avec le récepteur ER des mammifères, contrairement à ER 1 qui n'a pas d'homologue mammalien (Hawkins et al. 2000; Hawkins et Thomas 2004) (Figure 6). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une seconde forme d'ER a été décrite (ER 2). Il est probable que cette seconde forme d'ER existe également chez d'autres espèces de téléostéens tétrapodes (Nagler et al. 2007).

	zfER	zfER 1	zfER 2	hER
zfER	100			
zfER 1	40,5	100		
zfER 2	39,4	51,5	100	
hER	47,1	39,0	37,8	100
hER	40,9	44,4	46,8	37,6

Figure 6. Homologie de séquences (%) de la totalité de la région codante des récepteurs des œstrogènes (régions A/B, C, D, E, F)

h : human, zf : poisson zèbre (zebrafish). D'après (Menuet et al. 2002).

I.2.2.1.2. *Les récepteurs membranaires des œstrogènes*

Des formes membranaires de récepteurs des œstrogènes ont été pendant longtemps suspectés d'être impliqués dans des effets hormonaux survenant plus rapidement (de l'ordre de la minute) que ceux nécessitant des étapes de transcription et de traduction après l'activation de gènes cibles (de l'ordre de quelques heures). C'est à la suite de l'observation d'une augmentation du taux d'adénosine monosphosphate cyclique (AMPc) dans des cellules utérines de rat 15 secondes après une exposition au 17 -œstradiol que l'hypothèse de récepteurs des stéroïdes à localisation membranaire a été posée (Szego et Davis 1967). Alors que la preuve directe de l'existence de récepteurs des œstrogènes membranaires (mER) a été établie en 1977 par Pietras et Szego (Pietras et Szego 1977), l'implication de telles voies d'action non génomiques des stéroïdes fut globalement peu prise en compte pendant la décade suivante. Il semble que les mER possèdent une structure identique à celles de ER nucléaires. Il a été montré que la masse, la mobilité électrophorétique et l'affinité à l'œstradiol étaient identiques entre les ER membranaires et nucléaires (Razandi et al. 1999; Razandi et al. 2003). Des expérimentations ont montré que les affinités d'anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre les ERs nucléaires et les ER membranaires sont du même ordre (Pappas et al. 1995). Comme pour les ER nucléaires, la dimérisation des mER en présence du ligand hormonal est nécessaire à leur fonctionnalité. Il a été montré que le récepteur couplé à la protéine G, GPR30, pouvait se lier à l'œstradiol et entrainer une cascade d'activations (Thomas et al. 2010). Ce récepteur GPR30 ou GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) serait donc un mER. Actuellement, de tels mER ont également été mise en évidence au niveau des gonades chez le poisson (Thomas 2012).

En 2002, Torran-Allerand et al. ont mis en évidence un nouveau récepteur œstrogénique membranaire dans le néocortex et l'utérus, nommé ER-X (Toran-Allerand et al. 2002). Alors que les ER présentent une grande affinité pour le 17 -œstradiol, l'ER-X serait affin pour le 17 -œstradiol. Cet ER-X serait un variant obtenu par épissage alternatif d'ER . La structure et les rôles physiologiques de cet ER-X sont encore peu connus.

I.2.2.1.3. *Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes*

Chez les mammifères adultes, les ER sont exprimés dans l'ensemble des cellules des différents organes et tissus, alors que les ER sont davantage exprimés dans les ovaires, les poumons et la prostate (Couse et al. 1997). Chez le poisson zèbre adulte le nombre de transcrits des zfER semble être plus important dans le foie et la glande pituitaire (notamment par rapport au reste du cerveau) et les testicules. Les zfER 1 semblent être davantage réparti de manière homogène entre le cerveau, le foie, les intestins, les testicules et les ovaires. Concernant les transcrits du zfER 2, leur nombre est plus important dans le cerveau (excepté la glande pituitaire), le foie, les intestins, les testicules et les ovaires (Menuet et al. 2002). La répartition tissulaire peut varier selon le sexe. Par exemple, chez le carassin (*Carassius auratus*), l'expression du récepteur ER est plus importante dans le foie des femelles que des mâles, alors que l'expression des récepteurs ER 1 et 2 est similaire entre mâles et femelles (Nelson et Habibi 2010).

Chez le poisson zèbre, il a été montré que le gène esr2b, codant pour le zfER 1 était déjà exprimé dans le foie aux stades embryonnaires et larvaires (Bertrand et al. 2007; Gorelick et Halpern 2011). L'expression de esr1 codant pour le zfER a été retrouvée de manière spécifique au niveau des valves cardiaques chez la larve âgée de 3 à 5 jours après fécondation. A ce même stade de développement larvaire, l'expression de esr2a codant pour le zfER 2 n'a été retrouvée ni dans le foie ni dans le cœur (Gorelick et al. 2014).

I.2.2.1.4. *Modes d'action des PE impliquant les récepteurs des œstrogènes*

En l'absence de ligand, les ER sont présents dans le noyau et sont liés à des protéines chaperonnes (hsp). En présence d'un ligand (17β-œstradiol ou xéno-œstrogène), le complexe hsp est libéré et des homodimères ou hétérodimères d'ER ou ER se forment. Après une translocation nucléaire, deux voies d'action génomique sont possibles (Figure 7): (1) une voie dite classique correspondant à la liaison du complexe E2-ER dimérisé sur l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE), (2) et une voie indépendante de l'ERE dans laquelle le complexe E2-ER dimérisé entraine l'activation de gènes sous le contrôle de promoteurs différents de l'ERE tels que AP1, NF-kB, Sp1 (Bjornstrom et Sjoberg 2005). Il existe une troisième voie génomique indépendante de l'E2 dans laquelle l'expression de gènes sous le contrôle de l'ERE est modifiée après l'interaction de facteurs de croissance ou de PE (EGF : epidermal growth factor, IGF-1 : insulin-like growth factor-1 par exemple) avec leur récepteur membranaire (Figure 7). Actuellement jusqu'à 300 cofacteurs ont été identifiés comme pouvant participer à l'activation de la transcription de gènes. La nature des cofacteurs exprimés selon les types cellulaires conditionne pour partie l'effet du ligand sur l'ER (Lonard et O'Malley 2012). Enfin, après interaction avec son récepteur membranaire, l'E2 peut entrainer l'activation d'une voie non

génomique conduisant à une réponse cellulaire plus rapide que celle résultante des voies génomiques (Figure 7).

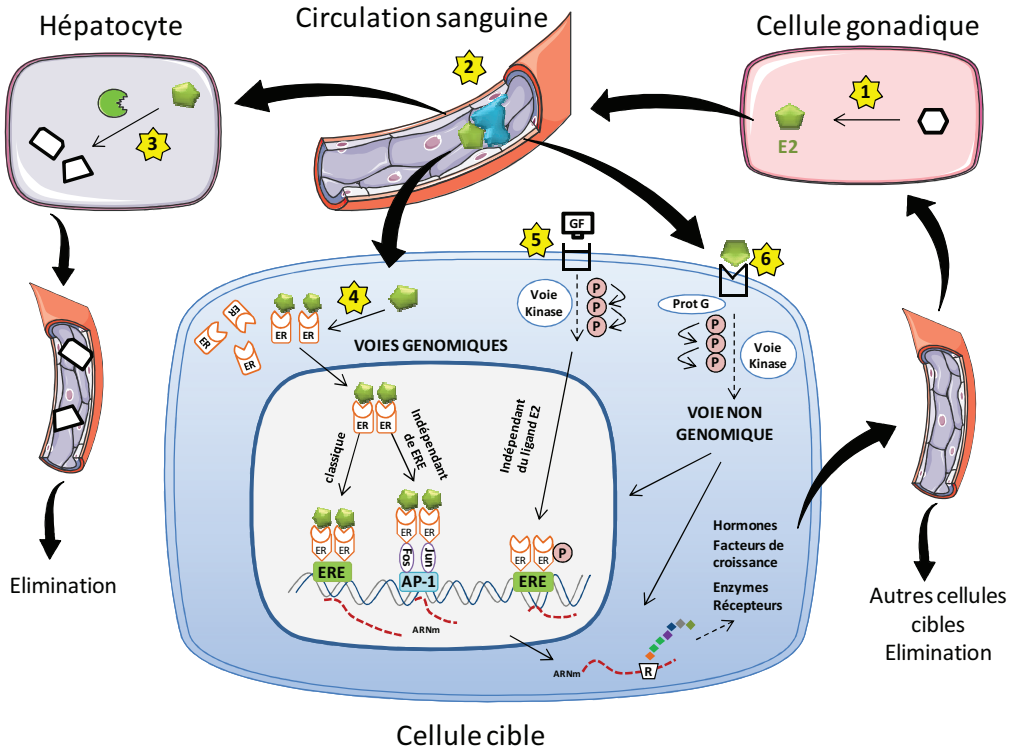


Figure 7. Altération par des PE de la synthèse, du devenir et de l'action du 17 -œstradiol sur une cellule cible

Les étoiles jaunes représentent les principaux sites d'action des PE. **1** : synthèse de l'hormone stéroïdienne. **2** : transport de l'hormone dans la circulation sanguine, liaison avec une protéine de transport. **3** : biotransformation de l'hormone dans les cellules hépatiques. **4** : interaction avec le récepteur nucléaire des œstrogènes. **5** : interaction avec des récepteurs de facteurs de croissance. **6** : interaction avec le récepteur membranaire des œstrogènes. **AP-1** : protéine activatrice 1, **ER** : récepteurs des œstrogènes, **ERE** : élément de réponse des œstrogènes, **E2** : 17β-œstradiol, **GF** : facteur de croissance, **HS** : hormone stéroïdienne, **Prot G** : protéine G, **P** : phosphorylation, **R** : complexe ribosomal. D'après (Hall et al. 2001; OMS 2002; Lee et al. 2013). Des éléments iconographiques proviennent de la banque d'images Servier MedicalArt.

Plusieurs facteurs conditionnent l'effet biologique d'un xéno-œstrogène : l'organisme lui-même, la période de vie durant laquelle intervient l'exposition, les paramètres pharmacocinétiques, la susceptibilité génomique, la dose et la nature du ligand (Tableau 5). Pour un même ligand, l'effet résultant de son interaction avec un ER peut aussi varier selon le contexte cellulaire. En effet, les fonctions de transactivation des domaines AF-1 et AF-2 des ER sont dépendants du type cellulaire et du contexte moléculaire du promoteur (Berry et al. 1990). Cette importance du contexte cellulaire a notamment été montrée au travers d'études portant sur la nature agoniste ou antagoniste du tamoxifène vis-à-vis des ER selon la nature de la cellule. De telles xéno-œstrogènes sont appelés des SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator). Ces changements de comportements des xénobiotiques sont

liés aux différences de nature et d'abondance des cofacteurs exprimés par les différents types cellulaires (Hall et McDonnell 2005; McDonnell et Wardell 2010). Par exemple, le changement d'un seul cofacteur est suffisant pour modifier totalement l'activité du tamoxifène (Onate et al. 1995; Smith et al. 1997). Par conséquent, l'interprétation des résultats obtenus peut dépendre du modèle et du contexte dans lequel l'activité du xénobiotique est évaluée. Il est donc essentiel de porter une attention particulière au choix du modèle biologique.

I.2.2.1.5. *Variété des ligands des récepteurs des œstrogènes*

De nombreuses études ont mis en évidence qu'un nombre important de composés chimiques (xéno-œstrogènes) étaient susceptibles de jouer le rôle de ligands des récepteurs des œstrogènes (Tableau 5).

Tableau 5. Exemples de ligands endogènes et environnementaux des récepteurs des œstrogènes chez les vertébrés

Classes	Composés	Références
Stéroïdes endogènes	E1, E2, E3	(Schreurs et al. 2005) (Lange et al. 2012)
Phyto- et myco-œstrogènes	Zéaralénone -zéaralanol et -zéaralénol Génistéine Coumestrol	(Sanseverino et al. 2009) (Cosnefroy et al. 2009)
Composés pharmaceutiques	DES, EE2, Tamoxifène	(Berry et al. 1990) (Lange et al. 2012)
Filtres ultraviolets	Benzophénone 1 (BP1) Benzophénone 2 (BP2) Benzophénone 3 (BP3) Benzophénone 4 (BP4) 4'-hydroxybenzophénone (4-HB) Trihydroxybenzophenone (THB) 4,4'-dihydroxybenzophéone (4-DHB) Benzylsalicylate (BS) Phenylsalicylate (PS) Octylsalicylate (OS) 3-benzylidène camphre (3-BC) 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC) Acide octyl-dimethyl-*p*-aminobenzoique (OD-PABA) Homosalate (HMS)	(Schreurs et al. 2005) (Kunz et al. 2006) (Molina-Molina et al. 2008) (Cosnefroy et al. 2009)
Plastifiants	Bisphénol A (BPA) Bisphénol S (BPS) Bisphénol F (BPF)	(Chen et al. 2002) (Kuruto-Niwa et al. 2005) (Cosnefroy et al. 2009) (Molina-Molina et al. 2013)
Pesticides	Endosulfan Methoxychlore Heptachlore Nonachlore Fenarimol Fenitrothion o,p'DDT, p,p'DDE Dicofol	(McKinlay et al. 2008) (Sanseverino et al. 2009)
Surfactants	Nonylphénols, Octylphénols 2-chloro-4-nonylphénol 2,6-dichloro-4-nonylphénol	(Kuruto-Niwa et al. 2005)

I.2.2.2. Effets non médiés par les récepteurs des œstrogènes

Le système hormonal œstrogénique peut être modulé par des composés exogènes sans pour autant interagir avec les ER. En effet, les PE peuvent perturber la biosynthèse hormonale stéroïdienne, le transport des hormones endogènes et leur biotransformation.

I.2.2.2.1. *Perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes*

La perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes est le résultat d'une modification de l'expression et/ou de l'activité des enzymes impliquées dans ces voies de biosynthèse (Tableau 6).

Tableau 6. Exemples de PE modifiant la stéroïdogenèse chez les mammifères et les poissons téléostéens (↑:augmentation, ↓: diminution).

Enzymes	PE (effet)	Espèces/Modèles	Références
17 -hydroxylase 17,20-lyase	Clotrimazole	Poisson zèbre	(Hinfray et al. 2011)
StAR	Methoxychlor (↓ expression) Benzophénone-2 (↑ expression)	Achigan à grande bouche ; Cellules de Leydig humaines MA-10	(Blum et al. 2008) (Kim et al. 2011)
Aromatase(s)	TCDD (↓ expression) Aminogluthétimide (inhibition activité) Imidazoles (inhibition activité) Triazoles (inhibition activité) Fenarimol (inhibition activité) Methylmercure (inhibition activité) Toxaphène (inhibition activité) Heptachlore (inhibition activité) Aldrine (↑ activité et expression) Chlordane (↑ activité et expression) Cyperméthrine (↑ activité) Méthylparathion (↑ activité) Endosulfan (↑ activité) Methoxychlore (↑ activité et expression) Oxadiazon (↑ activité) Metolachlore (↑ activité) Atrazine (↑ activité) Tributyltine (↑ activité et expression)	Poisson zèbre ; Truite arc-en-ciel ; Cellules de choriocarcinomes humains JEG-3	(Hinfray et al. 2006) (Laville et al. 2006) (Arukwe et al. 2008)
P450scc, P540c17	Benzophénone-2 (diminution expression)	Cellules de Leydig humaines MA-10	(Kim et al. 2011)

I.2.2.2.2. *Perturbation du transport des hormones endogènes*

Les perturbations hormonales notamment de type œstrogénique peuvent aussi résulter de l'interaction des PE avec les protéines plasmatiques de transport des hormones endogènes. Chez les vertébrés, les hormones endogènes sont majoritairement liées à des protéines plasmatiques de haute affinité appelées sex-steroid-binding protein (SBP) ou sex-hormone-binding globulin (SHBP), et de plus faible affinité telles que l'albumine sérique (serum albumin, SA) et les cortico-steroid-binding protein (CSBP) (Siiteri et al. 1982). Dans le sang, 97 à 99% des œstrogènes (et des androgènes) sont transportés sous forme liée. Les liaisons à la SBP représentent entre 40 et 70% de la totalité des liaisons aux protéines

de transport plasmatique (Dunn et al. 1981). En plus du rôle de transport, ces protéines protègent les hormones de la dégradation enzymatique et d'une élimination trop rapide, modulant ainsi leur distribution tissulaire et leur biodisponibilité cellulaire (Westphal 1986). Par conséquent, des phénomènes de compétition pour la liaison à ces protéines de transport entre des PE et les hormones endogènes peuvent conduire à une élévation anormale du taux d'hormones libres dans le sang. Les travaux de Tollefsen et al. ont montré que des PE connues pour interagir avec les ER, se liaient avec les SBP du saumon atlantique (*Salmo solar*), de l'omble chevalier (*Salvelinus alp*inus L.) ou de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'éthynylestradiol (EE2), le diéthylstilbestrol (DES), le 4-hydroxytamoxifen, la génisteine, la zéaralénone, le 4-t-octylphénol, le bisphenol A et l'o,p'-DDT sont capables de déplacer la liaison de l'œstradiol avec les SBP de manière compétitive et dose-dépendante. De plus, ces auteurs ont montré que le di-n-butyl-phtalate et l'éthynylestradiol (EE2) pouvaient induire une régulation positive du taux circulant de SBP *in vivo* (Tollefsen 2002; Tollefsen et al. 2002; Tollefsen et al. 2004).

I.2.2.2.3. *Perturbation de la régulation des enzymes de biotransformation des hormones endogènes*

L'homéostasie des hormones stéroïdiennes est particulièrement dépendante de l'activité et donc de l'expression des enzymes impliquées dans les voies biochimiques de la stéroïdogenèse. Une augmentation ou une diminution de l'expression ou de l'activité des enzymes (CYPs, UGTs, SULTs,…) impliquées dans la biotransformation des hormones stéroïdiennes, sous l'effet de l'action de PE, peut altérer l'homéostasie des hormones endogènes et par conséquent perturber les fonctions physiologiques qui en dépendent. Ces perturbations seront traitées dans le chapitre consacré à la perturbation de la régulation de l'expression des enzymes de biotransformation.

I.2.2.3. Exemples d'effets biologiques de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes

L'une des premières espèces chez laquelle une altération du système reproducteur par des composés œstrogéniques a été observée fut l'alligator (Guillette et al. 1994). Il est aujourd'hui démontré qu'une grande diversité d'espèces animales est affectée par la présence environnementale des xéno-œstrogènes (Tableau 7). La contamination des espèces animales par des xéno-œstrogènes conduit à une altération du système hormonal œstrogénique et par conséquent affecte la fonction de reproduction aussi bien que le développement des juvéniles. On peut citer par exemple des cas de cryptorchidie, d'altération de la motilité des spermatozoïdes, d'une diminution des capacités de synthèse hormonale des testicules, une diminution de la production d'œufs chez les poissons, qui conduit *in fine* à une diminution de la fécondité et de la fertilité. Bien qu'identifiés comme xéno-

œstrogènes, certains contaminants chimiques perturbent, directement ou indirectement, d'autres voies hormonales ne dépendant pas exclusivement et nécessairement des ER. Ainsi, ces xéno-œstrogènes peuvent également être responsables de troubles du métabolisme énergétique, du système immunitaire ou du système neuroendocrinien (Tableau 7). Les PE sont en effet capables d'interagir avec des cibles moléculaires de nature variée (ER, AR, TR, PPAR, PXR, CAR, transporteurs plasmatiques, pompes d'efflux…) conduisant à des conséquences physiologiques multiples.

Tableau 7. Exemples d'effets biologiques de xéno-œstrogènes

D'après (Casals-Casas et Desvergne 2011; Chighizola et Meroni 2012; Frye et al. 2012; Meeker 2012; Jeng 2014).

Classe d'effets biologiques	Molécule incriminée	Effet	Organisme	Mécanisme d'action	Etude épidémiologique	Références
Altération de la reproduction	PCB	hermaphrodisme	Beluga	-	-	(De Guise et al. 1994)
	Organochlorines PCB	↓ taux de testostérone	Ours polaire	-	-	(Oskam et al. 2003)
	p,p'DDE PCB	- Cryptorchidie - ↓ motilité des spermatozoïdes	Panthère	-	-	(Facemire et al. 1995) (Mansfield et Land 2002)
	Atrazine	- Dysgénésie gonadique - Hermaphrodisme	Grenouille léopard	-	-	(Hayes et al. 2003)
	p-nonylphénol	Intersexe	Poisson chat	-	-	(Barnhoorn et al. 2004)
	DES	↓ production de testostérone par des explants de testicules en culture	Rat	-	-	(Lassurguere et al. 2003)
	BPA	- ↓ poids de la vésicule séminale et des testicules - ↓ production de testostérone par les cellules de Leydig - ↓ taux plasmatique de testostérone et de LH - ↑ expression des ER dans la glande pituitaire	Rat	-	-	(Akingbemi et al. 2004)
		- ↓ taille de l'épididyme - ↓ de la production journalière de sperme - ↓ fertilité et fécondité	Souris	-	-	(vom Saal et al. 1998) (Cabaton et al. 2011)
	BPS	- ↓ production d'œufs - ↓ indice gonadosomatique - ↑ taux de malformation (génération F1)	Poisson zèbre	-	-	(Ji et al. 2013)
	BP2	- ↑ taux de vitellogénine (mâle) - inhibition du développement des spermatocytes et oocytes - ↓ production d'œufs	Poisson tête de boule	-		(Weisbrod et al. 2007)
Troubles métaboliques	Organochlorines (DDT)	-	-	ER AR	- Diabète - Surpoids	(Smink et al. 2008) (Turyk et al. 2009) (Park et al. 2010)
	BPA	- ↑ adipogénèse - ↑ taux insuline - ↑ poids corporel (souris et rat, étude développementale)	Souris Rat	ER AR TR GR	- Diabète - Anormalités tissulaires hépatiques	(Rubin 2007) (Alonso-Magdalena et al. 2008) (Hugo et al. 2008) (Lang et al. 2008)
	PFOA, PFOS	- Perte de poids, effet anorexigène - Gain de poids, ↑ insulinémie et leptinémie (étude développementale)	Souris	ER AR PPARs	↑ taux cholestérol	(Xie et al. 2003) (Apelberg et al. 2007) (Nelson et Habibi 2010) (Asakawa et al. 2008) (Hines et al. 2009)
	PBDE	↑ lipolyse ↓ Oxydation glucose		PXR ER	Diabète	(Lin et al. 2002) (Hoppe et Carey

				AR		2007) (Swedenborg et al. 2009)
Perturbation des réponses immunitaires	BPA	Altération du phénotype de cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T CD4+, T reg, B)	Rat Souris Poisson rouge Homme	ERs AhR PPARs	-	(Rogers et al. 2013)
	DDT	-	-	-	- ↑ taux d'asthme (enfant) - ↓ des fonctions des PNN	(Vine et al. 2000) (Sunyer et al. 2006)
	Methoxychlore	- ↑ du poids de la rate - ↓ du taux de CFU-GM, CFU-M et IL3	Rat	-	-	(Blyler et al. 1994) (Ahmed 2000)
	Hexa chlorobenzène	↓ des fonctions des lymphocytes T et B	Souris	-	- ↓ des fonctions des PNN - ↑ taux d'IgG et d'IgM	(Michielsen et al. 1997) (Queiroz et al. 1997) (Queiroz et al. 1998)
Troubles du comportement et perturbations des systèmes neuroendocriniens	Phtalates	-	-	-	- Déficit d'attention et hyperactivité - Troubles de type autistique	(Engel et al. 2010) (Miodovnik et al. 2011)
	BPA	- ↑ tremblements de souriceaux issus de mères exposées - ↑ troubles du comportement	Souris	-	Anxiété, hyperactivité, et perturbation du control émotionnel	(Braun et al. 2011) (Viberg et al. 2011) (Nagao et al. 2014)
	PBDE 209	↑ anxiété, hyperactivité	Souris	Système cholinergique	-	(Johansson et al. 2008)
	Octyl Methoxycinnamate (OMC)	↓ activité motrice des jeunes femelles issues de mères exposées	Rat			(Axelstad et al. 2011)

En conclusion, il existe aujourd'hui beaucoup de preuves que l'hémostasie des organismes peut être impactée par une grande variété de substances interférant avec le système endocrinien. De nombreuses espèces, dont l'Homme, sont affectées par leur environnement chimique (eau, air, nourriture). La variété des mécanismes moléculaires en jeux rend complexe la caractérisation de leurs effets biologiques. Toutefois, l'effet biologique des xénobiotiques n'est pas seulement lié à une interaction directe avec des cibles moléculaires. Le devenir des xénobiotiques dans l'organisme, et notamment ses biotransformations, conditionnent également la nature, la durée et l'intensité des effets biologiques.

II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES

Le métabolisme des xénobiotiques se définit comme la modification chimique d'un xénobiotique par une enzyme en un produit. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) sont quantitativement retrouvées en majorité dans le foie mais peuvent également l'être dans d'autres tissus et organes. Certaines de ces enzymes interviennent spécifiquement dans la transformation chimique des xénobiotiques alors que d'autres peuvent également être impliquées dans les voies biochimiques du métabolisme endogène.

Ces EMX constituent dans la majorité des cas un système de défense de l'organisme face à des composés étrangers. La transformation chimique d'un xénobiotique conduit généralement à des molécules (métabolites) plus hydrophiles et donc plus facilement éliminables par l'organisme. Le plus souvent les métabolites ont perdu l'activité pharmacologique ou toxique que pouvaient posséder la molécule mère. A l'inverse de ce processus de détoxication, certaines réactions de bioactivation conduisent à la formation de métabolites biologiquement actifs dont l'effet peut être recherché (effet pharmacologique dans le cas d'une prodrogue) ou délétère (effet toxique). C'est par exemple le cas de la codéine transformée *in vivo* en morphine ou d'amines aromatiques transformées en ion nitrénium très réactif. Selon les espèces, il peut exister un devenir différent pour un même xénobiotique selon la nature et la quantité d'enzymes exprimées par les différents types cellulaires impliqués dans ces réactions.

II.1. Place du métabolisme dans le devenir des xénobiotiques

Le devenir d'un xénobiotique dans un organisme dépend non seulement de sa biotransformation (Métabolisme) mais également d'autres phénomènes tels que son Absorption, sa Distribution et son Excrétion. Ces quatre processus (ADME) conditionnent le comportement pharmacocinétique des xénobiotiques. Certains paramètres développés ci-après comme la capacité métabolique des organes et les effets de premier passage influencent notablement le degré de biotransformation des xénobiotiques.

II.1.1. Les organes de biotransformation des xénobiotiques

Tous les organes ne sont pas équivalents en termes de capacité de biotransformation. Le foie (hépatocytes), la paroi intestinale (entérocytes) et la flore bactérienne sont les trois principales sources de biotransformation des xénobiotiques. A celles-ci, il faut rajouter les branchies pour les poissons. Ces organes possèdent des types cellulaires exprimant un grand nombre (qualitativement et

quantitativement) d'EMX. Il ne faut pas écarter la possibilité d'une biotransformation, parfois plus spécifique, par d'autres types cellulaires comme les pneumocytes de type II de l'épithélium des alvéoles pulmonaires, les cellules de Sertoli des tubes séminifères, ou encore les neurones et les cellules gliales au sein du cerveau, et les cellules du derme. Selon la voie d'entrée des xénobiotiques dans l'organisme, les xénobiotiques seront plus ou moins exposés à des organes à fortes capacités de biotransformation.

II.1.2. Effets de premiers passages

Les effets de premier passage correspondent aux biotransformations d'un xénobiotique au premier contact d'un organe. Par conséquent, la fraction inchangée du xénobiotique dans la circulation en aval de cet organe s'en trouve diminuée. La voie d'exposition d'un organisme à un xénobiotique conditionne, de par le type de premier passage, son degré de biotransformation. Par exemple, un xénobiotique entrant dans l'organisme par voie digestive subira nécessairement un premier passage digestif par les entérocytes et la flore bactérienne digestive, et un premier passage hépatique (Figure 8). Un xénobiotique inhalé sera en contact en premier lieu avec les poumons puis se retrouvera dans la circulation générale et sera donc distribué dans l'ensemble des organes. Pour le poisson, un xénobiotique contenu dans la nourriture subira un premier passage digestif et hépatique, alors qu'un xénobiotique présent dans l'eau subira un premier passage branchial (Figure 8).

Après excrétion dans la bile, les xénobiotiques et leurs métabolites peuvent être hydrolysées par la flore bactérienne du tube digestif et à nouveau être absorbés pour subir un nouveau passage hépatique. Ce cycle entéro-hépatique est absent chez le poisson.

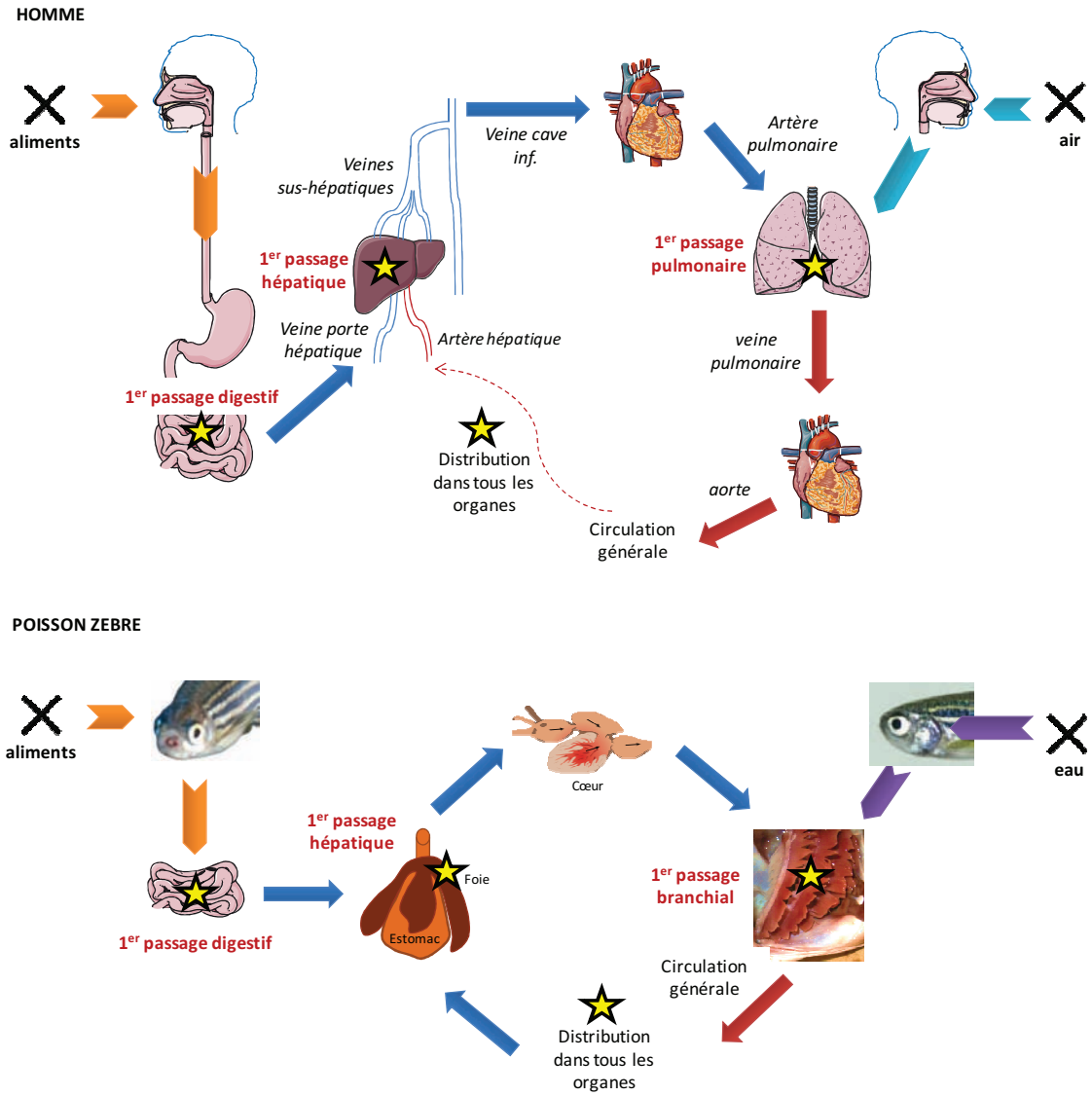


Figure 8. Effets de premiers passages après absorption par voie digestive, pulmonaire ou branchiale d'un xénobiotique chez l'Homme et le poisson zèbre

Les étoiles représentent les organes clefs dotés de capacité de biotransformation; X : xénobiotique.

II.2. Les enzymes de biotransformation

Les EMX sont classiquement répertoriées en deux catégories selon le type de transformation chimique réalisé sur les xénobiotiques : les enzymes de phase I (de « fonctionnalisation ») et les enzymes de phase II (de « conjugaison »). A noter que la phase III du métabolisme est classiquement associée à des protéines de phase III qui sont des protéines de transport prenant en charge certains flux entre le milieu intra- et extracellulaire (Figure 9).

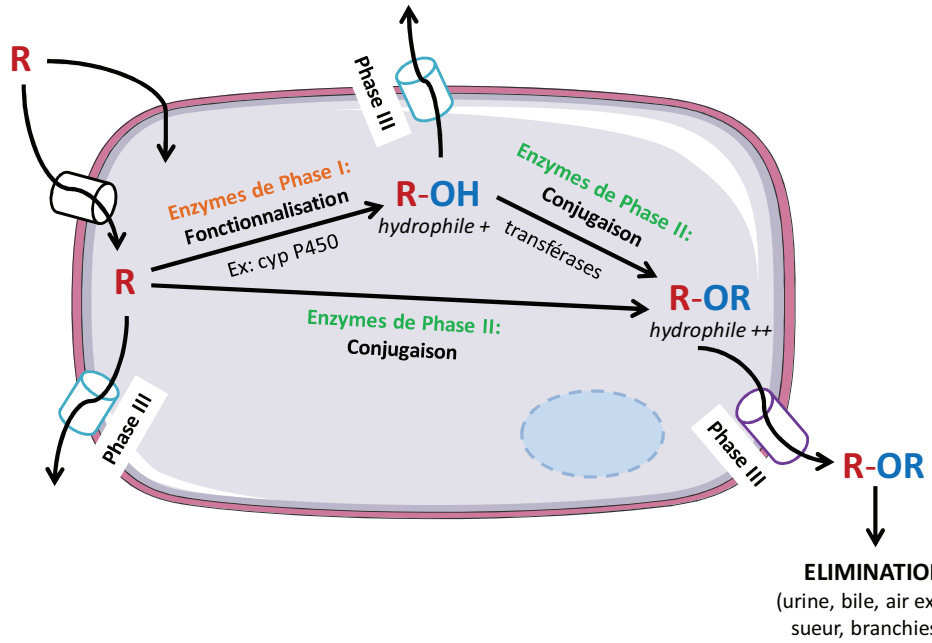


Figure 9. Biotransformations d'un xénobiotique dans un hépatocyte.
Un xénobiotique (R) portant des groupes chimiques O, N, ou S libres peut subir des réactions d'oxydation, de réduction et de conjugaison

II.2.1. Les enzymes de phase I : réactions de fonctionnalisation

Les réactions de fonctionnalisation conduisent à la formation de groupes chimiques fonctionnels et/ou au clivage de la molécule de départ. Les principales familles d'EMX de phase I et leurs fonctions sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8. Familles et fonctions des EMX de phase I

Familles d'EMX de phase I	Fonctions
Cytochromes P450 (CYP)	- Hydroxylation aliphatique ou aromatique - Epoxydation - *N*-, *O*-, *S*-déalkylation - *N*-hydroxylation - Sulfoxidation - Désulfuration - Déshalogénation oxydative
Flavines monooxygénases (FMO)	*N*- et *S*-oxydation
Péroxidases (Px)	Réduction des hydropéroxydes en alcool
Carboxylestérase, amidase	Hydrolyse des esters
Alcool déshydrogénase (ADH)	Oxydation des alcools en aldéhydes
Epoxyde hydrolase (EH)	Hydrolyse des époxydes en dihydrodiols
Monoamine oxydase (MAO)	Désamination oxydative

II.2.1.1. Les cytochromes P450

C'est en 1958 que Garfinkel et Klingenberg ont identifié un pigment hépatique ayant une absorbance maximum à 450 nm et la capacité à fixer du monoxyde de carbone (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Ce pigment a ensuite été caractérisé comme étant un cytochrome par Omura et Sato en 1962 (Omura et Sato 1962). La fonction de ce cytochrome a été mise en évidence en 1963 en étudiant le rôle de microsomes provenant de glandes surrénales dans l'hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone en déoxycorticostérone (Estabrook et al. 1963).

Les cytochromes P450 (CYPs) sont des enzymes héminiques (hémoprotéines). Ils appartiennent à une superfamille d'enzymes que l'on retrouve aussi bien dans le règne végétal qu'animal (Anzenbacher et Anzenbacherova 2001). Les CYPs sont impliquées dans un grand nombre de réactions chimiques de biosynthèse ou de biodégradation de molécules endogènes (hormones stéroïdes, acides biliaires, acides gras ou encore prostaglandines, Figure 10). Ils jouent également un rôle prépondérant dans des réactions de biotransformation de composés exogènes (médicaments, contaminants chimiques). Ces enzymes microsomales (ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique) ou mitochondriales sont classées selon le degré de similarité de leur séquence en acides aminés. Ainsi, une famille de CYPs (par exemple CYP1 et les CYP2) partage plus de 40% d'homologie. Une sous-famille (par exemple CYP1A ou CYP1B) est définie par une homologie de plus de 55%. Pour identifier chacune des iso-enzymes un chiffre arabe est ajouté à la suite comme par exemple, le CYP3A4. Ces enzymes sont majoritairement (qualitativement et quantitativement) exprimées dans le foie, le tractus gastrointestinal, les poumons et les reins. Toutefois, des CYPs sont également présentent dans d'autres organes comme le cerveau, la peau, le cœur, la moelle osseuse, le placenta, la rate ou encore les glandes surrénales.

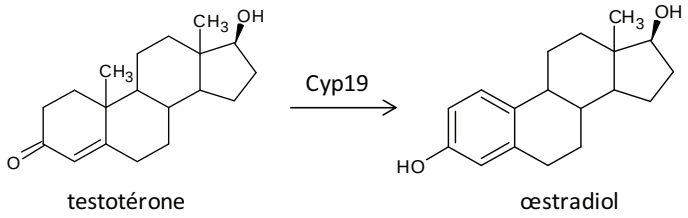


Figure 10. Exemple de la prise en charge d'un substrat endogène par un cytochrome P450

Différents types de réactions chimiques catalysées par les CYP

Les réactions chimiques réalisées par les CYPs sont liées à la capacité du Fe^{2+} contenu dans le noyau porphyrique à fixer de l'oxygène (O_2, Figure 11). Différents types de réactions chimiques peuvent être réalisées par les CYPs (Mansuy 1998). La réaction la plus courante des CYPs correspond à une activité monooxygénase, à savoir le transfert d'un atome d'oxygène provenant d'une molécule de dioxygène sur un substrat organique. Pour cette activité monooxygénase, les CYPs reçoivent des

électrons depuis le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) ou NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) via des protéines de transfert d'électrons (FAD : Flavine adénine dinucléotide, FMN : flavine mononucléotide) très fréquemment couplées à l'enzyme et ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 12). Toutefois, selon les organismes (bactéries, champignons, cellules eucaryotes) et selon la localisation des CYPs, (réticulum endoplasmique ou mitochondrie) les protéines rédox associées à l'enzyme peuvent être de nature différente (FMN, FAD, FeS, Zn) (Guengerich et Munro 2013). Ces réactions de cytochromes P450 monooxygénases peuvent s'écrire suivant la formule RH + O_2 + $2e^-$ +$2H^+$ (NADPH ou NADH) → ROH +H_20 (Mansuy 1998). Une série de réactions moléculaires s'opèrent entre le substrat (RH), l'oxygène (O_2), les électrons, le pouvoir réducteur (NADPH ou NADH) et l'atome de fer au centre du noyau porphyrique du cytochrome P450 (Figure 13).

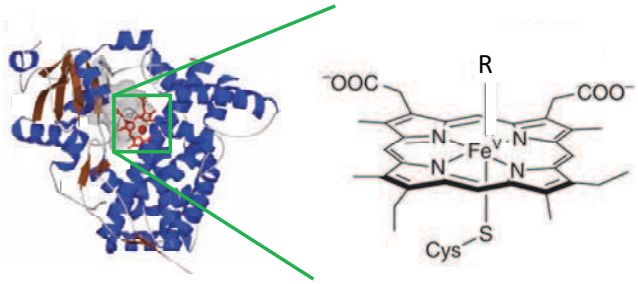


Figure 11. Structure 3D d'un cytochrome P450 et du noyau porphyrique

Liaison du xénobiotique R à l'atome de fer. D'après (Yano et al. 2004; Hohenberger et al. 2012).

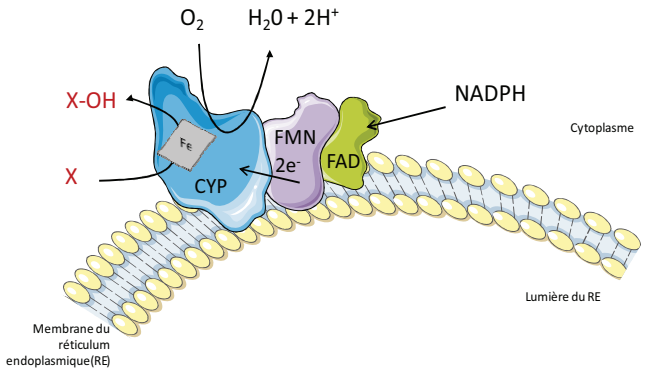


Figure 12. Localisation cellulaire et couplage aux protéines de transfert d'électrons des cytochromes P450 réductases

D'après (Boelsterli 2003)

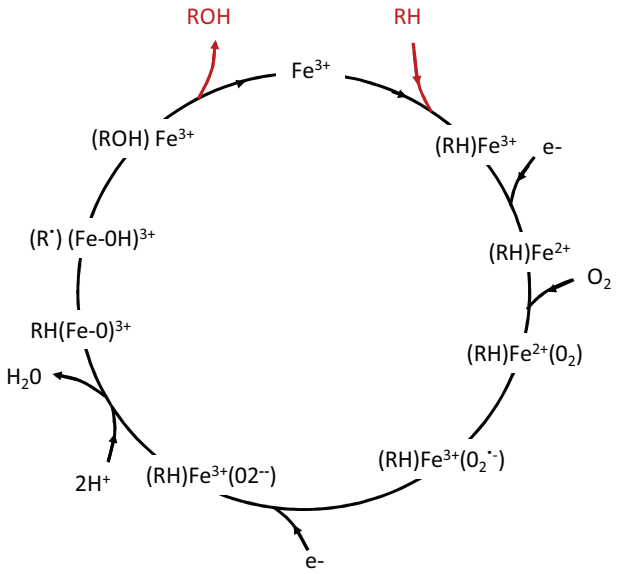


Figure 13. Cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase

RH : substrat de l'enzyme (xénobiotique par exemple), ROH : produit de la réaction. L'atome de fer au centre de l'hème du cytochrome P450 est désigné par Fe. D'après (Anzenbacher et Anzenbacherova 2001).

Ces réactions de type monooxygénase correspondent par exemple à l'hydroxylation d'une liaison C-C en C-OH, à la formation d'époxydes, à la *N*-, *S*- ou *O*-déalkylation oxydative (insertion d'un atome d'oxygène sur une liaison C-H proche d'un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote ou le soufre entrainant le clivage de l'hétéroatome), à une *S*-oxydation (passage de R-S-R' à RR'S^{+}-O^{-}) ou à une *N*-hydroxylation (Figure 14). D'autres types de réactions d'oxydation moins fréquentes et différentes des réactions de type monooxygénase, peuvent être réalisées par les CYPs. Ces réactions peuvent correspondre à des activités de type oxydase (formation de l'ion radicalaire fortement réactif $O_2^{\bullet-}$), à une déshydrogénation (formation d'une double liaison carbone carbone à partir d'une simple liaison), à une péroxydation ou encore à une déformylation oxydative (Figure 14). Les CYPs peuvent également avoir une activité de type réductase. De nombreux exemples démontrent la capacité des CYPs à pouvoir catalyser la réduction de composés polyhalogénés, de composés nitroaromatiques, d'amines tertiaires ou d'arènes oxydes. Enfin, deux CYPs particuliers, des isomérases, à savoir la prostacycline synthase et la thromboxane synthase, catalysent la formation de la prostacycline (PGI_2) et du thromboxane (TXA_2) à partir de la prostaglandine H2 (PGH_2) sans consommation de NADPH ou NADH (Mansuy 1998).

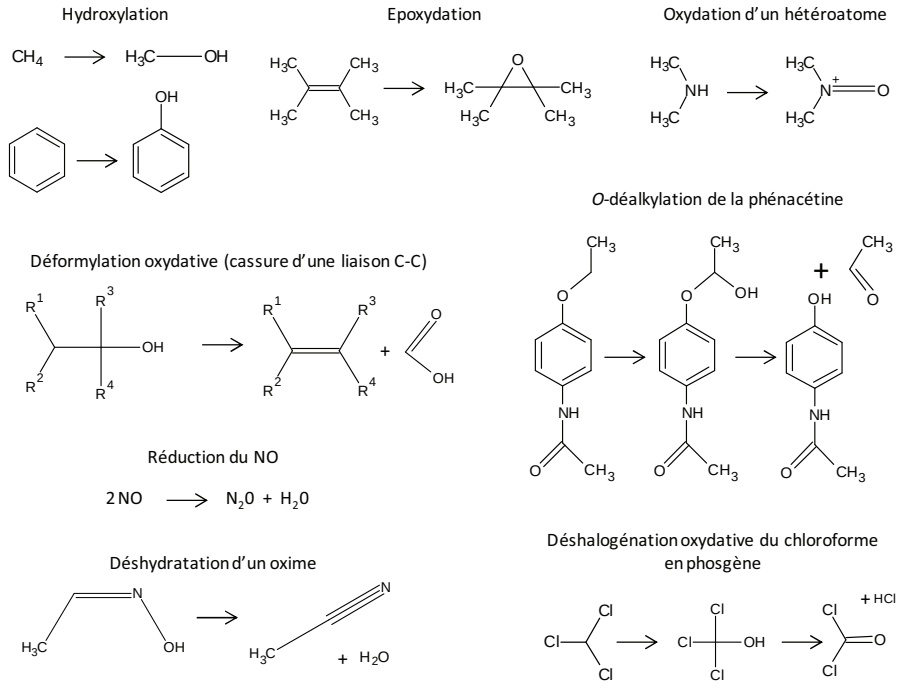


Figure 14. Exemples de réactions chimiques catalysées par les CYPs

D'après (Mansuy 1998).

Les CYPs peuvent être responsables de bioactivation comme celle du paracétamol, de la flutamide et du tégafur (**Figure 15**).

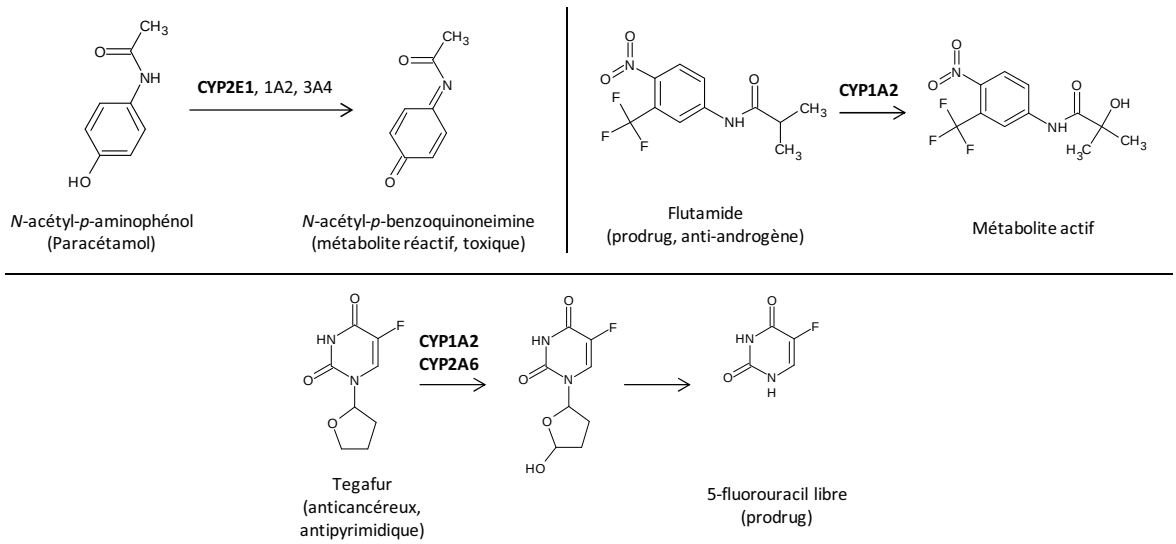


Figure 15. Exemples de bioactivation métabolique par des CYPs

D'après (Ortiz de Montellano 2013).

II.2.1.2. Flavine-monooxygénases

Les monooxygénases dépendantes des flavines (FMO) sont en importance la deuxième famille d'enzymes impliquées dans les réactions de phase I. Elles participent à une grande variété de processus biologiques. Beaucoup de ces enzymes contribuent au catabolisme de composés endogènes et exogènes, mais d'autres participent à l'anabolisme d'hormones et de vitamines. Les FMO incorporent un atome d'oxygène du dioxygène dans un substrat en réduisant l'autre atome d'oxygène en eau (Figure 16) (Huijbers et al. 2014). Comme pour les CYPs, les FMO sont abondamment présentent dans le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal et les poumons. Certaines FMO ont été mises en évidence dans la peau et le cerveau. Ces enzymes ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique sont responsables d'hydroxylations, de sulfoxidations, d'époxidations et d'halogénations. La grande sélectivité des ces enzymes permettent des réactions régio- et énantio-sélectives. Les substrats des FMO peuvent être des amines (primaires, secondaires, tertiaires), des hydroxylamines, des hydrazines, des thiols, des sulfures et disulfures, des thiocarbamates, des mercaptoimidazoles, des dérivés phosphorés, séléniques ou encore boriques (Tableau 9). Actuellement, les FMO sont classées selon leur structure et leurs propriétés fonctionnelles (cofacteur, donneur d'électrons, type de réaction) en 8 groupes dénommés A à H (Huijbers et al. 2014).

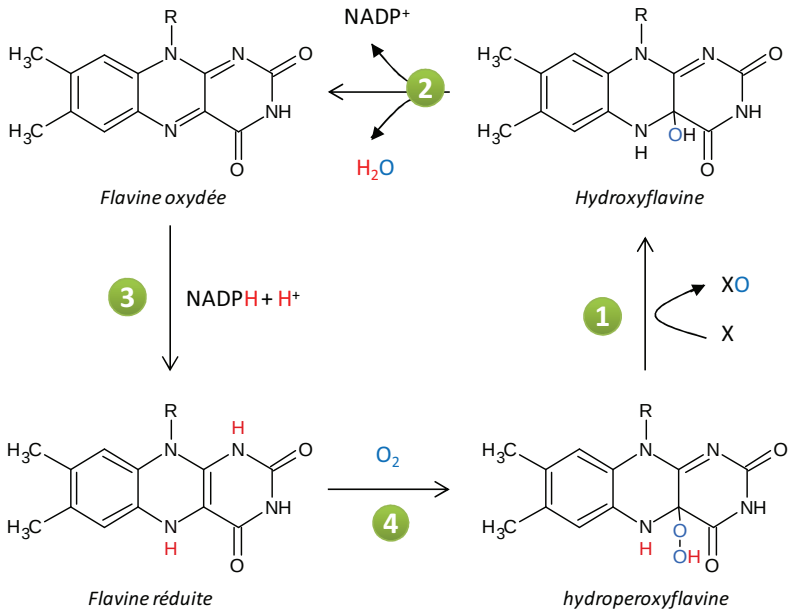


Figure 16. Mécanisme général d'oxydation d'un substrat (X) par les FMO
D'après (Huijbers et al. 2014).

Tableau 9. Exemples de substrats des FMO

Médicaments
Sulindac *(anti-inflammatoire soufré)*
Cimétidine, Ranitidine *(anti-histaminiques)*
Méthimazole *(anti-thyroïdien)*
Albendazole *(antiparasitaire)*
Dérivés des phénothiazines *(neurotropes)*
Pesticides
Aldicarbe, Méthiocarbe
Substrats endogènes
Triméthylamine
Phénéthylamine, Tyramine, Cystéamine... *(amines biogènes)*

II.2.2. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison

Les réactions de conjugaison, réalisées par les EMX de phase II, conduisent au couplage du xénobiotique à un substrat endogène, consécutivement ou pas à une fonctionnalisation préalable par les enzymes de phase I selon le xénobiotique. Une réaction de phase II peut avoir lieu directement pour de nombreux composés. Différents types de conjugaison existent incluant la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation, l'acétylation ou encore l'ajout d'une molécule de glutathion ou d'un acide aminé (Tableau 10). Ces réactions de conjugaison permettent d'augmenter l'excrétion de la molécule initiale et, conduisent dans la grande majorité des cas à la formation de métabolite dépourvue d'activité biologique. Chez l'Homme, les UDP-glucuronyltranférases (UGTs) et les sulfotransférases (SULTs) sont responsables de plus de 50% des biotransformations de type II des médicaments (Jancova et al. 2010).

Tableau 10. Principales familles des EMX de phase II

Familles d'EMX de phase II	Fonction
UDP-glucuronyltransférases (UGT)	Conjugaison d'un acide glucuronique depuis l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) sur le xénobiotique
Sulfotransférases (SULT)	Conjugaison d'un sulfate depuis le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur le xénobiotique
N-acétyltransférases (NAT)	Conjugaison d'un acétate depuis l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) sur le xénobiotique
Méthyl-transférases (MT)	Conjugaison d'un méthyle depuis la S-adénosylméthionine (SAM) sur le xénobiotique
Glutathion-*S*-transférases (GST)	Conjugaison d'un glutathion sur le xénobiotique

II.2.2.1. Les UDP-glucuronyltransférases

Les UDP-glucuronyltransférases (UGTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un sucre provenant de l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) sur un substrat nucléophile (O-, N-, S- ou C- ; Figure 17). La formation de la liaison avec l'UDPGA est possible pour de nombreux types de substrats comme des alcools aliphatiques, des phénols, des acides carboxyliques, des thiols ou des amines (primaires, secondaires, tertiaires). Les enzymes de chaque famille d'UGTs (exemple : UGT1, UGT2) partagent au moins 40% d'homologie dans leur séquence ADN, et les enzymes d'une même sous-famille en partagent 60% (exemple UGT1A, UGT1B). Les UGTs sont exprimées dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, les intestins, les poumons, les glandes surrénales, la rate, la peau, les gonades et le cerveau. Au niveau cellulaire, les UGTs sont ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 18) (Jancova et al. 2010).

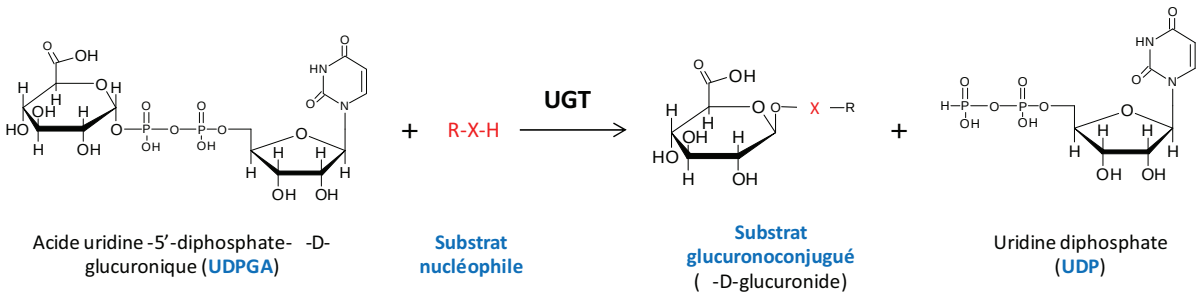


Figure 17. Réaction de conjugaison d'un substrat nucléophile avec l'UDPGA par l'UGT

D'après (Jancova et al. 2010).

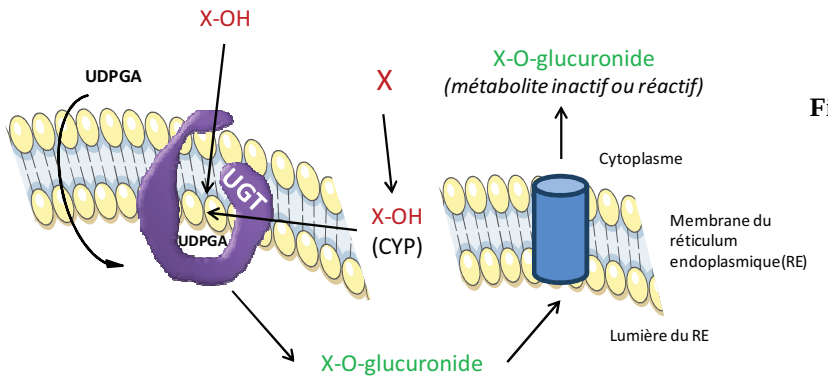


Figure 18. Fonctionnement général et localisation des UDP-glucuronyltransférases

D'après (Boelsterli 2003).

La glucuronidation entraine le plus souvent une modification du pKa des xénobiotiques ayant pour conséquence une meilleure solubilité aqueuse qui facilite alors leur élimination par voie biliaire ou rénale. Par exemple alors que le pKa du phénol, peu soluble dans un milieu aqueux, est de 10, celui de son conjugué glucuronide est de 3,4 environ. Les UGTs participent aussi à l'élimination de composés endogènes tels que la bilirubine, les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes, les acides rétinoïques et les amines biogènes comme la sérotonine (Pearson et Wienkers 2009). Dans la majorité des cas, la glucuronidation d'un xénobiotique entraine la formation d'un métabolite dépourvu d'activité biologique, et donc, non toxique. Toutefois il existe des exemples de xénobiotiques portant certaines fonctions chimiques susceptibles de devenir réactives après glucuronidation. C'est le cas des xénobiotiques portant une fonction acide carboxylique ou une amine. Par exemple, les médicaments contenant une fonction acide carboxylique comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou les lipidémiants de type clofibrate peuvent être métabolisés en acyl glucuronides. Ces conjugaisons sont réalisées par l'UGT2B7 (Homme) et l'UGT2B1 (rat). Contrairement aux ether-glucuronides formés depuis un phénol par exemple, les acyl glucuronides (ou esters glucuronides) sont moins stables et sujets à des hydrolyses, des réarrangements moléculaires, et à l'établissement de liaison covalente avec des cibles moléculaires (protéines, acides nucléiques). En effet, la fonction ester résultant de la conjugaison d'un acide carboxylique avec l'UDPGA représente un site réactif pouvant être la source de l'établissement d'une liaison covalente avec des protéines présentant des atomes d'azote (NH), d'oxygène ou de soufre (Figure 19). Des phénomènes d'isomérisations (réarrangements moléculaires) d'un tel acyl glucuronide peut entrainer l'ouverture du cycle glucuronide et l'apparition d'un site réactif (Figure 19) (Boelsterli 2003). La *N*-glucuronoconjugaison d'amines aromatiques peut également former des métabolites réactifs. C'est le cas de l'intermédiaire de fabrication de l'aniline (utilisée auparavant comme produit de teinture), la 2-naphthylamine. Après avoir été *N*-hydroxylée par un CYP, la *N*-glucuronidation de la 2-naphthylamine dans le foie conduit à la formation d'un métabolite stable à pH physiologique dans le sang. Lors de son arrivée dans les urines après une excrétion rénale, ce métabolite *N*-glucuronoconjugué va être hydrolysé sous l'effet du pH légèrement acide de l'urine. L'ion nitrénium alors formé présente une telle réactivité pour l'ADN qu'il est à l'origine de cancers de la vessie (Case et Pearson 1954). Les xénobiotiques présentant des amines aromatiques *N*-hydroxylées sont alors potentiellement à risque de cancer de la vessie. Toutefois, selon l'espèce, la 2-naphthylamine peut ne pas présenter de toxicité par formation de l'ion nitrénium. Chez les rongeurs, le composé *N*-hydroxylé est rapidement pris en charge dans le foie par une *N*-acétyltransférase, contrairement au chien chez qui cette dernière enzyme n'est pas exprimée au niveau hépatique (Boelsterli 2003). Enfin, il est à noter qu'il existe de rares cas de conjugués glucuronides actifs comme la morphine-6-glucuronide active sur les récepteurs opiacés μ (Sverrisdottir et al. 2015).

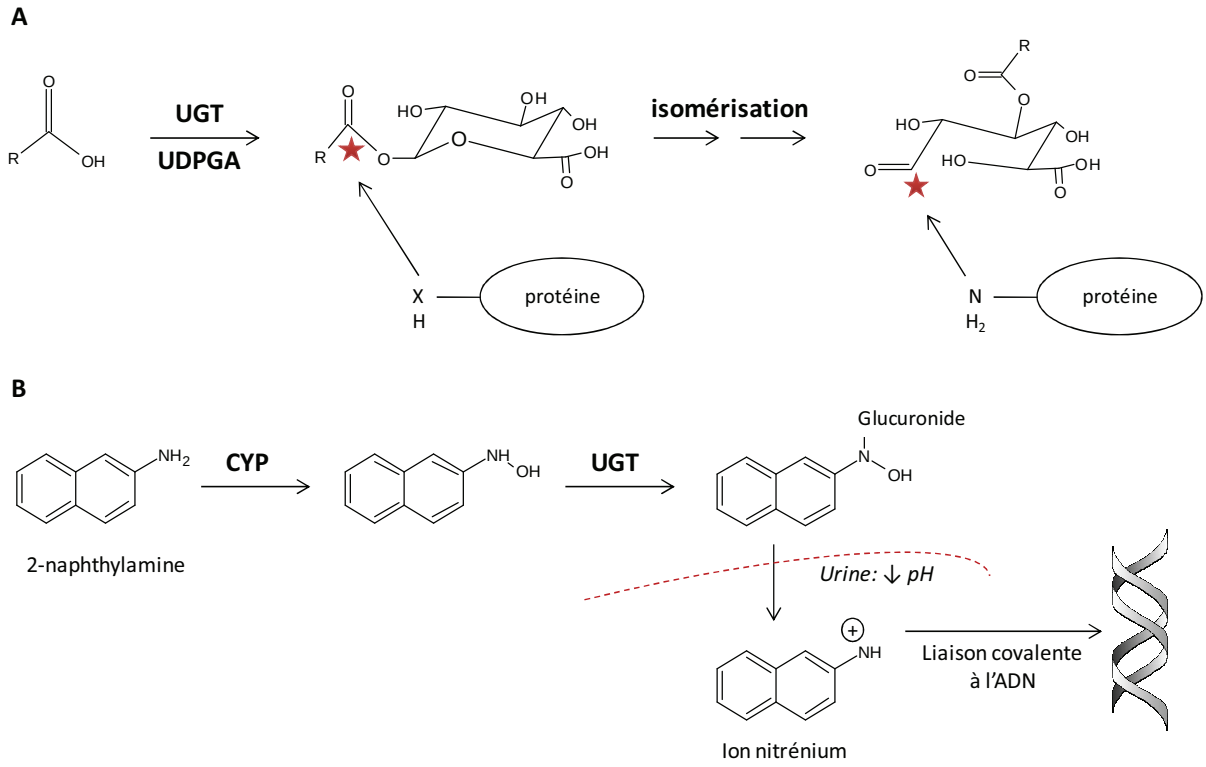


Figure 19. Formation de métabolites glucuronoconjugués réactifs. A. Cas d'acyl glucuronides. B. Cas de l'ion nitrénium issu de la 2-naphthylamine.

D'après (Boelsterli 2003).

II.2.2.2. Les sulfotransférases

Les sulfotransférases (SULTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe sulfate à partir du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur un groupe accepteur (*O*, *N*- ou *S*-) d'un substrat (Figure 20). De manière générale, la sulfatation est impliquée dans le métabolisme de substrats endogènes (stéroïdes, catécholamines, sérotonine, iodothyronines, eicosanoïdes, rétinol, 6-hydroxymélatonine, acide ascorbique, vitamine D) aussi bien qu'exogènes. Bien que les *O*-sulfatations soient majoritaires, les *N*-sulfatations jouent un rôle clef dans la modification des chaines carbohydrates des macromolécules comme l'héparine et l'héparane sulfate, constituant principal des protéoglycanes. La *N*-sulfatation est également impliquée dans la biotransformation de xénobiotiques comme par exemple les quinolones. Les SULTs peuvent être localisées dans le cytoplasme ou attachées à la membrane de l'appareil de Golgi. Ces dernières sont responsables de la sulfoconjugaison de peptides, de protéines, de lipides et de glycosaminoglycanes, alors que les SULTs cytosoliques prennent en charge les xénobiotiques et les petites molécules endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires et les neurotransmetteurs. Les SULTS sont exprimées dans de nombreux organes et tissues : foie, cerveau, glandes mammaires, intestins, poumons, glandes surrénales, endomètre, placenta et rein (Jancova et al. 2010).

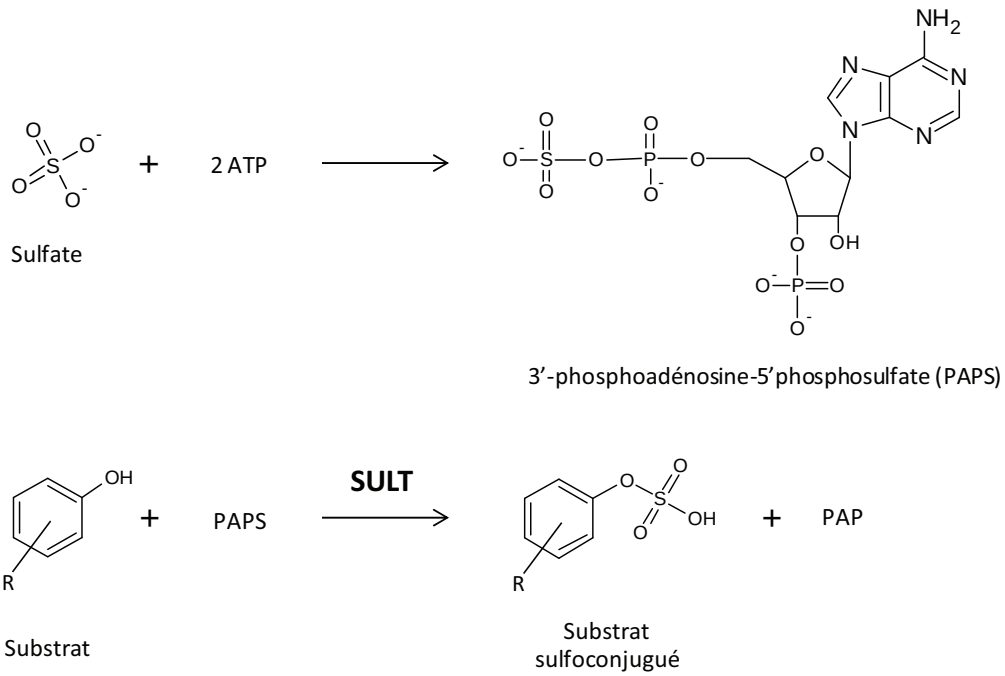


Figure 20. Formation du PAPS et réaction de sulfoconjugaison
D'après (Jancova et al. 2010).

Dans la très grande majorité des cas, la sulfatation des xénobiotiques conduit à la formation de métabolites non toxiques. Pour autant, la sulfatation de certains composés chimiques (procancérigènes) donne lieu à la formation d'intermédiaires hautement réactifs qui peuvent établir des liaisons covalentes délétères avec l'ADN. La réactivité des métabolites sulfoconjugués peut être expliquée par le caractère attracteur d'électrons du groupe sulfate conjugué au substrat. La cassure hétérolytique de la liaison de conjugaison entraine l'apparition d'un carbocation et confère, par conséquent, à la molécule, une forte réactivité électrophile pouvant aboutir à l'établissement de liaisons covalentes avec des macromolécules endogènes. C'est le cas du safrol, un constituant d'épices, qui est responsable, à fortes doses, d'un processus de cancérogénèse par ce mécanisme chez le rat. C'est également le cas du tamoxifène. Le tamoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes, utilisé comme anti-œstrogène dans les cancers du sein hormonodépendants. Outre ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques, le tamoxifène présente des propriétés génotoxiques chez la souris et le rat avec développement de cancers hépatiques chez cette dernière espèce. Bien que le risque de développement de cancers de l'endomètre soit légèrement augmenté chez la femme ayant pris un traitement au tamoxifène, aucune toxicité hépatique n'a été révélée par ce médicament chez l'Homme. L'explication réside dans la différence de capacité de biotransformation entre l'Homme et les rongeurs. Après une première étape d'hydroxylation du tamoxifène, la deuxième étape est majoritairement une glucuronoconjugaison chez l'Homme et une sulfoconjugaison chez le rat. En effet, les activités des UGTs chez l'Homme sont plus importantes que celles observées chez le rat, et

inversement pour les activités des SULTs. Or le métabolite majoritairement formé chez le rat, à savoir le *O*-sulfoconjugué, va donner lieu à un carbocation par le mécanisme décrit auparavant et conférer le caractère génotoxique du tamoxifène. Chez l'Homme, le tamoxifène *O*-glucuronide, majoritairement formé, est stable et éliminé (Figure 21) (Boelsterli 2003; Dezentje et al. 2009; Kiyotani et al. 2012). Cet exemple illustre l'importance de la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques dans l'étude toxicologique des xénobiotiques. Enfin, il existe de rares cas de métabolites sulfatés biologiquement actifs comme le tétrabromobisphénol A (TBBPA) sulfate (Riu et al. 2011).

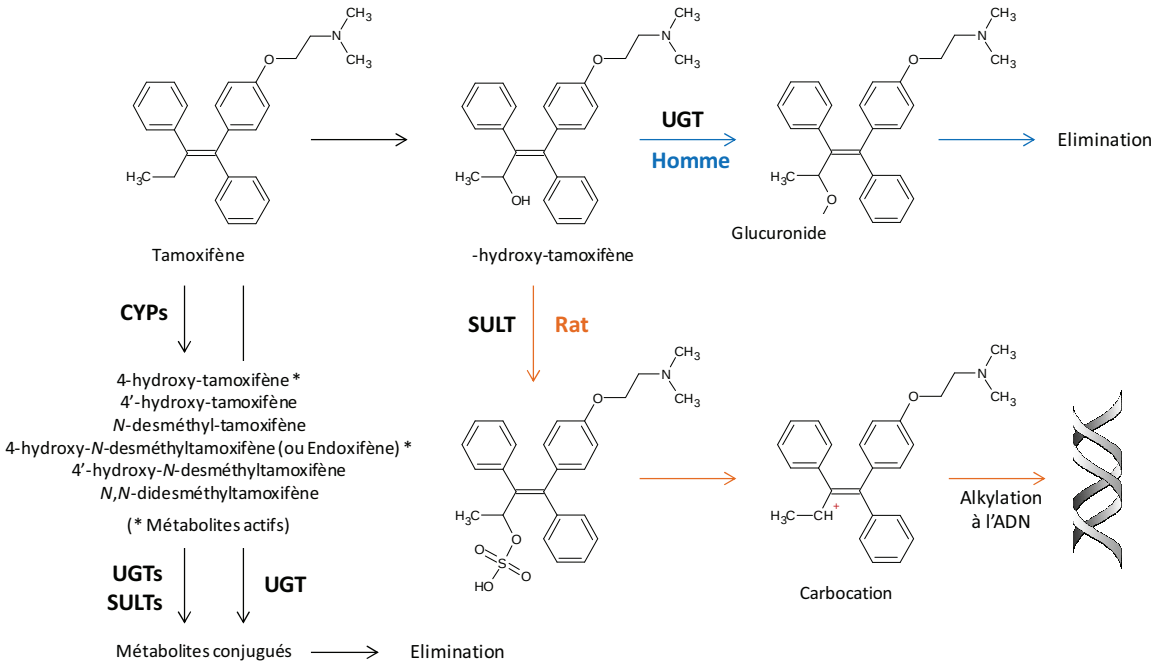
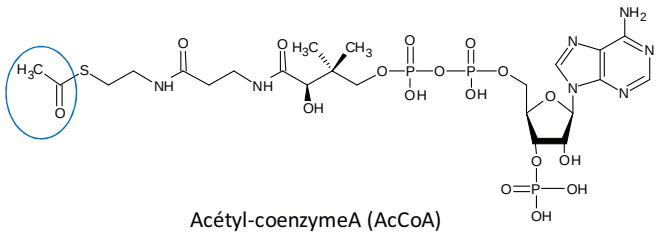


Figure 21. Voies de bioactivation et de détoxication du tamoxifène

La *O*-sulfoconjugaison (majoritaire chez le rat) de l' -hydroxy-tamoxifène entraine la formation d'un carbocation réactif, tandis que la *O*-glucuronoconjugaison (majoritaire chez l'Homme) donne un métabolite stable et éliminé. D'après (Boelsterli 2003; Dezentje et al. 2009; Kiyotani et al. 2012).

II.2.2.3. Les N-acétyltransférases

Les *N*-acétyltransférases (NATs) catalysent le transfert d'un groupe acétyl depuis l'acétyl-coenzyme A (AcCoA) vers des amines aromatiques ou l'azote terminal d'hydrazines (Figure 22). Elles sont responsables de *O*- et de *N*-acétylation. Chez l'Homme, les NATs sont codés par deux gènes (NAT1 et NAT2). Les NATs sont des enzymes cytosoliques également présentes dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ces EMX présentent une distribution tissulaire assez distincte et une relative spécificité de substrat. Chez l'Homme les NAT1 sont exprimées dans l'ensemble des organes alors que l'activité des NAT2 a été retrouvée dans le foie, l'épithélium intestinal et le colon.



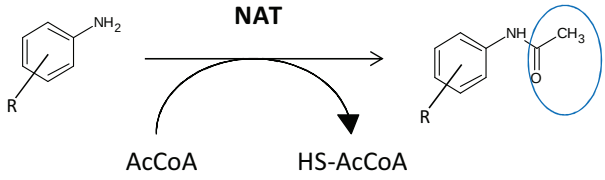


Figure 22. Réaction de *N*-acétylation des arylamines par les *N*-acétyltransférases

D'après (Jancova et al. 2010).

Les NATs sont impliquées dans des processus de bioactivation et de détoxification des xénobiotiques. Contrairement aux autres réactions de conjugaison, le transfert d'un groupe acétyl n'entraine pas une augmentation de la solubilité aqueuse du métabolite. L'exemple le plus courant est celui des sulfonamides *N*-acétylés qui sont susceptibles de précipiter dans les urines (Hein et al. 2000; Jancova et al. 2010). Les *N*-acétylations peuvent représenter une étape de bioactivation de xénobiotiques impliqués dans des processus de cancérogénèse. C'est le cas des amines aromatiques comme la benzidine, cancérigène reconnu chez l'Homme. Cette substance était auparavant utilisée pour la production de colorants azoïques. Bien que la benzidine ne soit plus produite ni utilisée, elle demeure présente dans l'environnement notamment par la transformation bactérienne d'autres produits chimiques. La bioactivation de la benzidine fait suite à des étapes de *N*-hydroxylation et de *N*-acétylation (Figure 23). Le métabolite ainsi formé peut alors subir un réarrangement moléculaire pour donner un acétoxyarylamine. Ce composé peu stable peut se dégrader en ion nitrénium fortement réactif. Parallèlement, le métabolite *N*-hydroxylamine acétylé peut à nouveau donner la *N*-hydroxylamine par dé-acétylation. Dans un milieu légèrement acide, comme les urines, la *N*-hydroxylamine peut se dégrader pour donner le même ion nitrénium (Boelsterli 2003).

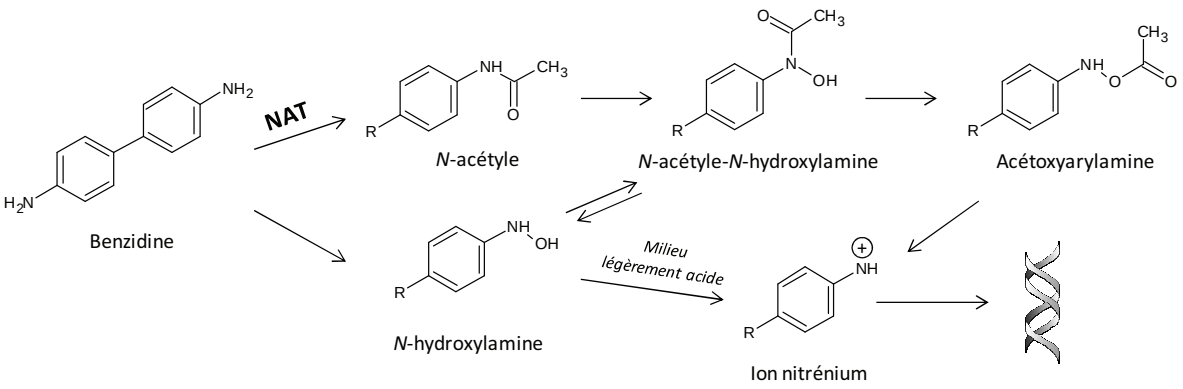


Figure 23. Etape de bioactivation de la benzidine par *N*-acétylation
D'après (Boelsterli 2003).

II.2.2.4. Les Glutathion-S-transférases

Les Glutathion-S-transférases (GSTs) catalysent le transfert d'un glutathion (GSH, tripeptide endogène) via la fonction thiol (formation d'une liaison thioéther) sur un substrat (Figure 24). Les GSTs sont responsables d'une grande variété de réactions comprenant par exemple des substitutions aromatiques nucléophiles, des isomérisations, des réductions d'hydropéroxides ou encore des conjugaisons de composés hydrophobes et électrophiles. Les substrats pris en charge par les GSTs sont les composés capables de réagir avec une fonction thiol. Ce sont, en règle générale, des substrats électrophiles comme les époxides, les cétones , -insaturées, les quinones, les sulfoxides, les esters, les péroxides et les ozonides. La conjugaison au glutathion est notamment essentielle dans la détoxication d'époxydes dérivés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et des cétones , -insaturées. Les GSTs sont également impliquées dans la prise en charge de composés endogènes comme les stéroïdes et les prostaglandines (Jancova et al. 2010).

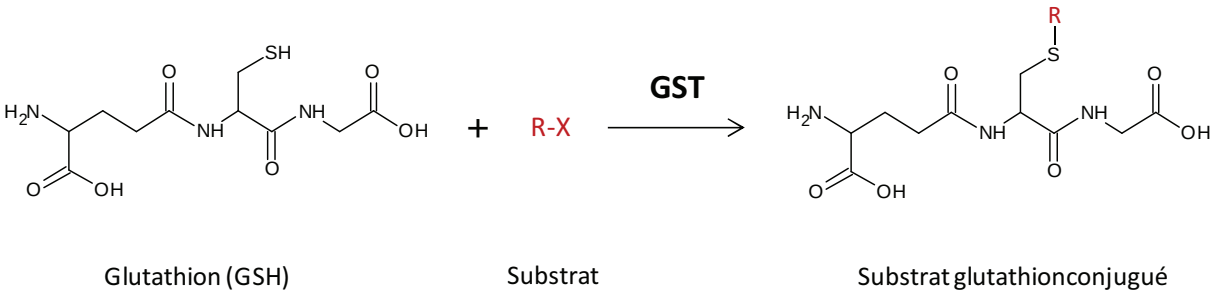


Figure 24. Réaction de conjugaison du glutathion
D'après (Boelsterli 2003).

Deux principales superfamilles de GSTs ont été décrites. La première correspond à des GSTs dimériques solubles, divisées en huit classes (Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta et Omega) et impliquées dans les processus de biotransformations de xénobiotiques et d'endobiotiques. Ces GSTs ont été retrouvées principalement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, les mitochondries et les peroxysomes. L'autre famille de GST, désignée par le sigle MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoids and gluthatione metabolism) est impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Les GSTs solubles et les MAPEG sont largement exprimées dans l'ensemble de l'organisme (foie, rein, cerveau, pancréas, testicules, cœur, poumons, intestins, muscles squelettiques, prostate et rate) (Jancova et al. 2010; Board et Menon 2013).

Les GSTs jouent un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques et dans la protection cellulaire au stress oxydatif. Les GSTs vont notamment permettre de diminuer le stress oxydant notamment représenté par les espèces réactives de l'oxygène (radical superoxide et peroxide d'hydrogène) naturellement formé lors des réactions chimiques catalysées par des CYPs et autres oxydases. Dans beaucoup de cas, la conjugaison d'un GSH permet de neutraliser et d'inactiver un composé réactif et de favoriser son excrétion rénale (Jancova et al. 2010; Board et Menon 2013). C'est le cas des métabolites de certaines aflatoxines. Les aflatoxines sont produites par des micromycètes tels que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* qui se développent dans le sol, sur des matières organiques en décomposition, des graines d'oléagineux et des céréales dans des conditions de température et d'humidité favorables. L'aflatoxine B1 est l'une des aflatoxines les plus cancérigènes. L'oxydation de l'aflatoxine B1 par des CYPs conduit à la formation du métabolite 8,9- époxyde hautement électrophile pouvant alors établir des liaisons covalentes avec l'ADN. Toutefois, cet époxyde peut donner par hydrolyse un dihydrodiol ou bien être neutralisé par les GSTs (Figure 25). Contrairement au rat et à l'Homme, la souris est résistante à l'exposition aux aflatoxines et ne développe pas de cancers hépatiques. Une nouvelle fois, l'explication la plus probable réside en des différences de capacités de biotransformation entre espèces. En effet, l'activité des GST-A est environ 100 fois supérieure chez la souris que chez le rat et l'Homme, permettant une forte détoxication des métabolites réactifs (Eaton et Gallagher 1994; Boelsterli 2003).

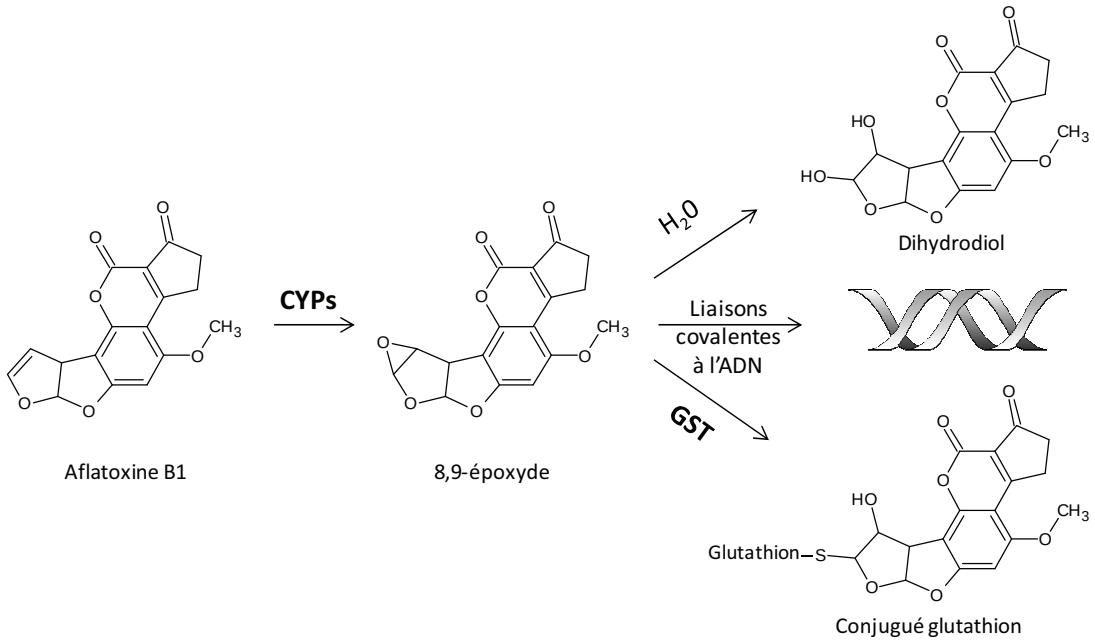


Figure 25. Activation métabolique de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde et détoxication par hydrolyse et conjugaison au glutathion

D'après (Boelsterli 2003).

La conjugaison d'un GSH peut aussi constituer une étape de bioactivation de xénobiotiques conduisant à la formation d'intermédiaires réactionnels réactifs. Les conjugués glutathions des haloalcanes sont, par exemple, réactifs. C'est le cas du 1,2-dibromoéthane (ou éthylène dibromide) utilisé dans l'industrie de la chimie pour la synthèse de colorants. Ce composé est également présent dans l'essence au plomb et à été utilisé comme pesticide par fumigation. Cette substance entraine une toxicité aigue après inhalation mais également chronique avec l'apparition de cancers dans les modèles animaux. L'attaque successive des deux carbones du 1,2-dibromoéthane par le groupe thiol du glutathion entraine la libération des deux atomes de Brome et la formation d'un ion épisulfonium hautement électrophile (Figure 26) (Boelsterli 2003; Guengerich 2003).

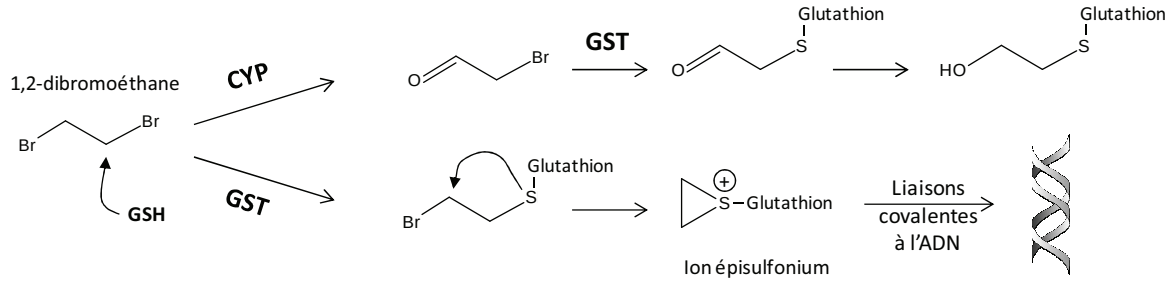


Figure 26. Voies de bioactivation du 1,2-dibromoéthane par les CYP et la GST
D'après (Boelsterli 2003; Guengerich 2003).

En conclusion, les réactions de phase I et de phase II conduisent dans la majorité des cas à la formation de métabolites dépourvus d'activité biologique. Toutefois, les EMX entrainent parfois la formation de métabolites réactifs et toxiques. Etant donné que toutes les espèces n'expriment pas qualitativement et quantitativement les mêmes EMX, il est important de noter que le devenir d'un xénobiotique entre des espèces différentes peut être variable. Il en est de même entre des modèles *in vitro* d'origine (Homme, poisson, rat, souris, cobaye par exemple) et de nature (lignées cellulaires, cultures primaires, cultures d'explants par exemple) différentes. Par conséquent, la prise en compte du devenir des xénobiotiques dans l'interprétation toxicologique d'études menées entre des modèles *in vitro* ou *in vivo*, est nécessaire.

II.3. Capacités de biotransformation des xénobiotiques chez les poissons téléostéens

La connaissance des capacités de biotransformation envers les xénobiotiques est actuellement plus approfondie dans des modèles humains et rongeurs que pour les poissons. C'est pourquoi, dans ce chapitre, les capacités de biotransformation des xénobiotiques des modèles poissons téléostéens (et en particulier du poisson zèbre) seront mises en perspective avec celles des modèles biologiques humains et rongeurs. L'évaluation du potentiel toxique des xénobiotiques peut être réalisée en utilisant des modèles biologiques provenant de différentes espèces et de différents tissus. Trois types de paramètres doivent en particulier être pris en considération dans l'évaluation toxicologique : (1) la complexité biologique des modèles (animal entier vivant, organes perfusés, culture organotypique, culture primaire de cellules, culture de lignées cellulaires, fractions subcellulaires), (2) les stades de développement des modèles animaux (embryon, fœtus, larve pour le poisson et les amphibiens, adulte), et (3) l'espèce du modèle animal ou de laquelle provient un modèle *in vitro* (poisson, rat, souris, cochon d'Inde, lapin, chien, cochon, singe, Homme, par exemple). Selon la complexité

biologique des modèles, leur stade de développement et leur origine, les capacités de biotransformation des xénobiotiques des modèles biologiques seront nécessairement différentes en nature et en intensité.

II.3.1. Les capacités de biotransformation de phase I

II.3.1.1. Les enzymes de phase I chez le poisson zèbre

II.3.1.1.1. *Les monoamines oxydases (MAO)*

Contrairement aux mammifères qui possèdent deux gènes de monoamine oxydase (MAO-A, MAO-B), le poisson zèbre comme d'autres d'espèces de poissons n'en possède qu'un. Les homologies de séquences de la MAO du poisson zèbre avec celles (MAO-A et MAO-B) du rat, de la souris et de l'Homme sont d'environ 68% (Anichtchik et al. 2006; Panula et al. 2010).

II.3.1.1.2. *Les flavines monooxygénases (FMO)*

Chez les mammifères, cinq isoformes de FMO ont été identifiées. Leur distribution tissulaire, leur régulation et leur spécificité de substrats diffèrent assez sensiblement. Seuls 5 des 11 gènes identifiés codent pour des protéines fonctionnelles chez les mammifères. L'expression des FMO peut être modifiée en fonction du régime alimentaire et de l'exposition à des hormones stéroïdiennes ainsi que lors de la gestation. Chez d'autres organismes, et notamment chez les poissons, l'hypoxie, une diminution de température et des conditions hyperosmotiques peuvent être à l'origine d'une modulation de l'expression des FMO (Lavado et al. 2013). Des FMO ont également été identifiées chez plusieurs espèces de mammifères, de vertébrés et d'invertébrés (Schlenk 1998). Chez le poisson, différentes FMO fonctionnelles ont été caractérisées dans les organes de biotransformation des xénobiotiques comme le foie, le rein, les intestins mais aussi dans les tissus olfactifs des poissons euryhalins.

II.3.1.1.3. *Les cytochromes P450 (CYPs)*

Le poisson zèbre compte 94 gènes codant pour des CYPs répartis en 18 familles également retrouvées chez les mammifères (Goldstone et al. 2010).

CYPs 5 à 51

Parmi ces gènes, 32 appartiennent aux familles 5 à 51 qui sont pour la plupart des orthologues de gènes humains. Ces CYPs prennent principalement part à la biotransformation de substrats endogènes. Le fort degré de similarité de séquences ADN de ces CYPs entre l'Homme et le poisson zèbre suggère

une conservation des activités enzymatiques. C'est notamment le cas des CYPs impliqués dans la stéroïdogenèse (CYP19 = aromatase, CYP11A = P450scc, CYP17 = 17 -hydroxylase).

CYPs 1 à 4

Une complexité plus importante a été observée pour les CYPs jouant un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques mais aussi dans le métabolisme des acides gras, à savoir les CYP1, 2, 3, et, dans une moindre mesure, les CYP4.

CYP1

Le poisson zèbre possède 5 gènes codant pour des CYPs de la famille 1, répartis en 4 sous-familles : CYP1A, CYP1B, CYP1C1, CYP1C2 et CYP1D1. Chez l'Homme, on ne retrouve pas de CYP1C, et le CYP1D1 est un pseudogène. Les CYP1 du poisson zèbre ont tous été identifiés chez d'autres poissons ainsi que chez des tétrapodes non-mammaliens. En général, les CYP1A et 1B1 sont fortement impliqués dans la biotransformation de nombreux xénobiotiques, de stéroïdes et d'acides gras. Concernant les CYP1C et 1D1, peu d'informations sont encore disponibles quant à leurs substrats endogènes et exogènes.

CYP2

Chez le poisson zèbre, comme chez les mammifères, c'est la famille 2 de CYPs qui regroupe le plus grand nombre d'isoformes. Le poisson zèbre possède 47 gènes de CYP2 contre 16 chez l'Homme, dont seulement deux sont orthologues (CYP2R1 et CYP2U1). Chez l'Homme, le CYP2R1 correspond à la vitamine D 25-hydroxylase et le CYP2U1 exprimé dans le cerveau et le thymus catalyse l'hydroxylation (et −1) d'acides gras, dont l'acide arachidonique. Les 11 gènes des CYPs de poisson zèbre des sous-familles 2N, 2P, 2V et 2AD font partie du même embranchement phylogénétique que le CYP2J2 humain, suggérant une origine commune. Les fonctions des ces 11 CYPs de poisson zèbre sont actuellement inconnues. Seules les activités des CYP2P3, 2N1 et 2N2 de poissons regroupés sous la dénomination « killifish » ont été mises en évidence et semblent être très proches de celle du CYP2J2 humain impliqué dans l'époxydation de l'acide arachidonique. La sous-famille CYP2K comprend 8 CYPs. Ce groupe de gènes codant pour ces CYPs sont en synténie avec le CYP2W1 humain qui a la particularité d'être exprimé seulement dans des cellules cancéreuses. Le CYP2K6 du poisson zèbre est responsable de la bioactivation délétère de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxide impliqué dans des processus cancéreux. Toutefois, la faible expression du CYP2K6 aux stades embryonnaires et larvaires peut probablement constituer une explication à l'absence de toxicité de l'aflatoxine B1 dans les embryons de poisson zèbre avant l'âge de 5 jours après fécondation (days post fertilization ou dpf). Chez la truite arc-en-ciel l'oxydation de l'aflatoxine B1 en 8,9-époxyde est prise en charge par un CYP de la même sous-famille, le CYP2K1 (Yang et al. 2000). Les fonctions des autres CYP2K du poisson zèbre sont méconnues. Les CYP2Y3 et 2Y4 du poisson zèbre sont en

synténie avec le cluster de gènes humains codant pour des CYP2 impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques comme les CYP2A6, 2A13, 2B6, 2F1.

CYP3

Le génome du poisson zèbre comprend 5 gènes de CYP3 à savoir, le CYP3A65 et quatre CYP3C (3C1 à 3C4). Contrairement à l'Homme qui possède 4 CYP3A, le poisson zèbre n'en possède qu'un, le CYP3A65. Ce dernier partage 54% d'homologie de séquences avec le CYP3A4 humain. Toutefois, les CYP3C du poisson zèbre sont en synténie avec les CYP3A3, 3A4 et 3A7 humains. Il a été montré pour d'autres espèces de poissons que des CYP3A sont présents et jouent un rôle dans la 6 - hydroxylation de la testostérone (James et al. 2005). Concernant les CYPs de la famille 4, le poisson zèbre possèdent 4 gènes codants pour les CYP4F43, 4T8, 4V7 et 4V8 contrairement à l'Homme qui en possède 12.

CYP4

Chez les mammifères, les CYP4 jouent un rôle dans l'hydroxylation d'acides gras et, dans une moindre mesure que les CYP1, 2 et 3, dans la prise en charge de xénobiotiques comme les phtalates ou l'acide perfluorooctanoïque (PFOA).

Expression temporelle des CYPs

Comme illustré par l'exemple de l'époxidation de l'aflatoxine B1 et du CYP2K6 du poisson zèbre, l'interprétation des résultats toxicologiques se doit de prendre en considération les différences d'expression des EMX selon les stades de développement de l'organisme considéré. Chez le poisson zèbre, l'expression de transcrits de certains CYPs peut varier d'un facteur 10 durant son développement (Goldstone et al. 2010). C'est le cas des CYP2P6, 11A2, 26A1, 26B1, 2AA7-AA9, 2AA12, 2Y3, 2Y4 et CYP20. Entre 3 heures après fécondation (hours post fertilization ou hpf) et 48 hpf, certains CYPs ont leur maximum d'expression à 3 hpf, d'autres à 48 hpf, d'autres entre ces deux temps de développement. Certains CYPs comme les CYP2K22, 2N13, 3A65 et 8B1 semblent avoir une expression bimodale, avec un maximum à 3 hpf et à 48 hpf, contre 2 h et 36 hpf pour les CYP5A1, 21A1, 2K17, 8B3 et 4T8. Bien qu'appartenant à la même sous-famille, les CYP2P10, 2P14, 2AD2, 2AD6 sont fortement exprimés à 3 hpf alors que les CYP2P6, 2P7 et 2V1 sont fortement exprimés entre 6 et 12 hpf. Le fort taux de transcrits de certains CYPs dès 3 hpf suggère une origine maternelle. Ces transcrits maternels seraient alors présents dans l'œuf au stade 1 cellule. La recherche de transcrits de CYPs dans les œufs non fécondés à montré une expression significative des CYP1A, 2V1 et 2AA4.

Le tableau 11 présente des exemples de caractérisation de l'activité catalytique d'enzymes de phase I notamment chez le poisson zèbre.

Tableau 11. Caractérisation des activités catalytiques d'enzymes de phase I chez le poisson
ADH : alcool désydrogénases ; MAO : monoamine oxydase ; MPTP : 1 méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine ; dpf : days post fertizilation soit jour après fécondation ; hpf : hours post fertilization soit heures après fécondation

Enzyme		Espèce	Genre	Cibles	*In vivo*	Organes ou tissus	*In vitro*	Substrat	Test fonctionnel	Référence
MAO	-	*Danio rerio*	M et F	ARNm	Adulte	cerveau>intestins> foie>cœur>branchies	-	Tyramine>sérotonine> phényléthylamine>MPTP> dopamine	Mesure du taux de H_2O_2 lors de l'oxydation d'amines	(Anichtchik et al. 2006)
ALD	3	*Danio rerio*	-	ARNm	Embryon et larve : 4 – 144 hpf : ↑	-	-	-	-	(Dasmahapatra et al. 2001)
					Adulte	foie	-	-	-	(Dasmahapatra et al. 2001)
	8A 8B	*Danio rerio*	-	ARNm	24 hpf – 6 dpf 8B stable, 8A ↑	-	-	8A : Ethanol (pas 8B) 8B : pentanol, hexanol, octanol	Mesure du taux de NADH formé	(Reimers et al. 2004)
					Adulte Taux adulte >> larve	foie>cerveau, nageoire, branchies, cœur, rein, muscle	-			
FMO	1 et 2	*Oncorhynchus mykiss*	-	Protéines	Adulte	foie, rein, branchies, intestins	-	Aldicarbe	-	(Schlenk et Buhler 1991) (Schlenk 1995)
	A, B et C	*Oncorhynchus mykiss*	-	Protéines et ARNm	Juvénile (5 mois)	activités catalytiques: foie>intestins>tissus olfactifs>rein	-	Méthyl-*p*-tolyl sulfide (MTS) et Benzydamine (BZN)	Activités enzymatiques : *p*-tolyl sufoxidation (MTSO) et benzydamine *N*-oxygénation (BZNO)	(Lavado et al. 2013)
	A et B	*Oncorhynchus kisutch*			Juvénile	activités catalytiques : foie>intestins>tissus olfactifs	-			(Lavado et al. 2014)
CYP	2K6	*Danio rerio*	M et F	ARNm	Adulte	Foie et ovaire (cerveau, yeux, intestins, cœur, branchies, testicules, muscle : ARNm absent)	-	-	-	(Wang-Buhler et al. 2005)
	3A65	*Danio rerio*	-	hybridation *in situ*	Larve	Expression du CYP dès 72 hpf dans le foie et dès 84 hpf dans le l'intestin	-	-	-	(Tseng et al. 2005)
	1A 1B1 1C1 1C2 1D1	*Danio rerio*	-	-	-	-	Clonage des séquences des CYPs chez *E. coli* et purification des CYPs.	7-Ethoxyrésorufine (ER) 7-Méthoxyrésorufine (MR) 7-Benzyloxyrésorufine (BR) 7-Pentoxyrésorufine (PR) 7-Benzyloxy-4-(trifluorométhyl)coumarine (BFC) 7-Méthoxy-trifluorométhylcoumarine (MFC) Benzo[a]pyrène (BaP)	Activité catalytique des CYPs en présence de substrats : -ER : 1A>1C2>1B1, 1C1>1D1 -MR : 1A>1C1, 1C2>1B1 -BR : 1A, 1B1>1C1, 1C2>1D1 -PR : 1A, 1C1>1C2>1D1 -MCF et BCF (déalkylation) : 1A>>1C1, 1C2, 1B1 (1B1 : MCF seulement) - tous les CYP1s → BaP-1,6-dione + BaP-3,6-dione - CYP1B1 et 1C2 → 3-hydroxy-BaP -CYP1A et 1C1 → BaP-7,8-dihydroxydiol + 3-hydroxy-BaP	(Scornaienchi et al. 2010b)
	1A 1B1 1C1 1C2 1D1 3A65	*Danio rerio*		-	-	-	Clonage des séquences des CYPs chez *E. coli* et purification des CYPs.	17 -œstradiol (E2)	Implication des CYPs dans le métabolisme de l'E2. 2-OHE2 produit par tous ces CYPs 4-OHE2 non produit par 1D1 et 3A65 16 -OHE1 produit par A1 Taux de métabolisme de E2 : 1A, 1C1>>1C2>>1B1, 1D1, 3A65	(Scornaienchi et al. 2010a)
		Danio rerio	-	-	Larve	-	-	BaP -naphtoflavone	↑ activité EROD mesurée entre 4 et 8 dpf	(Noury et al. 2006)

II.3.1.2. Capacités de biotransformation liées aux CYP dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme.

De nombreuses études toxicologiques utilisent des modèles *in vitro* humains afin d'évaluer l'effet d'un xénobiotique. La nature du modèle *in vitro* (lignées cellulaires et cultures primaires par exemple) et son origine tissulaire (foie et glande mammaire par exemple) sont autant de facteurs pouvant faire varier la nature et la quantité d'EMX et notamment les CYPs. *A fortiori*, le devenir d'un xénobiotique entre des modèles *in vitro* d'espèces différentes (Homme et poisson zèbre par exemple) est probablement différent. C'est pourquoi, il est important de considérer les capacités de biotransformation, notamment de phase I, entre les modèles biologiques afin de mieux pouvoir interpréter les résultats toxicologiques. C'est pourquoi le tableau suivant (Tableau 12) présente les capacités de phase I connues entre des modèles issus d'espèces différentes (Homme et poissons), de natures différentes et d'origines tissulaires différentes. Les capacités de biotransformation de ces modèles cellulaires sont très variables. Le modèle cellulaire pour lequel cette caractérisation est la plus importante est HepaRG (Gripon et al. 2002). L'expression d'EMX de phase I dans la lignée cellulaire HepaRG se rapproche le plus de celle d'hépatocytes humains en culture primaire. Pour les autres modèles cellulaires, bien que certaines études rapportent des taux d'expression de gènes d'EMX ou bien des activités fonctionnelles, encore peu de données sont actuellement disponibles. La connaissance parcellaire des capacités de biotransformation de ces modèles montrent la nécessité d'approfondir la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques eu égard au rôle que jouent les EMX dans les profils toxicologiques des xénobiotiques.

Tableau 12. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux CYPs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson

EROD : éthoxyrésorufine O-déethylase, DMBA :7-12-diméthyl-benz[a]anthracène hydroxylase

		Modèle cellulaire	Origine	Utilisation	ARNm de CYPs	Test fonctionnel de CYPs	Référence
Humain	**Culture primaire**	**Hépatocytes (H)**	Foie	Toxicologie hépatique	Expression des ARNm des CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43, 7A1 -Globalement : H>RG>G2 -CYP1A1, 3A4, 7A1 : RG≥H>G2 -**H**: 3A4, 2C8>2E1, 2A6>3A5, 3A7, 2D6, 2C19 -**RG**: 1A1, 7A1>3A4>3A7, 2C9, 2C19>1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2E1>2D6 -**G2**: 7A1>3A7, 2C19>2A6, 2D6	-	(Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
	Lignée cellulaire	**HepaRG (RG)** (Gripon et al. 2002)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique		-Activité basale CYP1A faible mais fortement induite -Activités basales CYP2C9, 2E1, 3A4	(Aninat et al. 2006) (Guillouzo et al. 2007) (Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
		HepG2 (G2) (Knowles BB et al. 1980)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique		-	(Kanebratt et Andersson 2008) (Hart et al. 2010)
		MELN (Balaguer et al. 1999)	Cancer du sein. Cellules MCF-7 modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	**MCF-7** : Expression basale des ARNm et des protéines des CYP1A1, 1A2, 1B1	-	(Coumoul et al. 2001) (Szaefer et al. 2012) (Piotrowska et al. 2013)
		T47D-KBLuc (Wilson et al. 2004)	Cancer du sein. Cellules T47D modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	**T47D** : expression (ARNm) basale et induite du CYP1B1. Expression du 1A1 après induction	-	(Angus et al. 1999) (Coumoul et al. 2001)
Poisson	**Culture primaire**	**Hépatocytes de truite arc-en-ciel**	Foie d'*Oncorhynchus mykiss* adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-	Activité basale EROD (CYP1A) augmentée par inducteurs	(Pesonen et Andersson 1991) (Cravedi et al. 1996) (Laville et al. 2004) (Grans et al. 2010)
		Hépatocytes de poisson zèbre	Foie de *Danio rerio* adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	Expression (ARNm) CYP1A1 et 3A65 (Mâle>Femelle)	-	(Eide et al. 2014)
	Lignée cellulaire	**ZFL** (Gosh et al. 1994)	Foie normal de *Danio rerio* adulte	Toxicologie hépatique	Faible expression basale des ARNm des CYP1A1 et 3A65	Activité EROD et DMBA augmentées par inducteurs	(Miranda et al. 1993) (Collodi et al. 1994) (Eide et al. 2014)
		PLHC-1 (Hightower et Renfro, 1988)	Hépatocarcinome de *Poeciliopsis lucida*	Toxicologie hépatique	-	Faible activité basale EROD Inhibition de l'activité basale EROD Activités CYP3A-like et 2K-like	(Laville et al. 2004) (Thibaut et al. 2009) (Della Torre et al. 2011)

II.3.2. Les capacités de biotransformation de phase II

II.3.2.1. Glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison chez le poisson zèbre

II.3.2.1.1. *Les UGTs*

Chez les mammifères, les gènes *UGTs* sont classés en deux familles : *UGT1* et *UGT2*. Chez le poisson zèbre, la description récente du répertoire des gènes *UGTs* (Huang et Wu 2010) a mis en évidence 45 gènes *UGTs* divisés en 3 familles : *UGT1*, *UGT2* et *UGT5*. Les familles 1 et 2 sont elles-mêmes divisées en deux clusters a et b : *UGT1a*, *UGT1b*, *UGT2a* et *UGT2b*. Les familles 1 et 2 du poisson zèbre sont génétiquement proches des familles 1 et 2 codant pour les UGTs des mammifères. La famille 5 a seulement été identifiée à ce jour chez les amphibiens et les poissons téléostéens.

Chez le poisson zèbre adulte, l'expression des transcrits des isoformes des gènes *UGTs* est très variable selon les tissus (Wang et al. 2014) (Tableau 13). D'autres résultats, qui diffèrent parfois de ceux de Wang et al. (2014) suggèrent que les transcrits des *UGT1a, UGT1b,* et *UGT5a4* sont plus fortement exprimés dans le foie chez les mâles que chez les femelles. Il en est de même pour les transcrits des *UGT1b* dans les testicules, des *UGT5a1* et *5a3* dans les intestins chez le mâle, et de l'*UGT5c2* dans le cerveau mâle (Christen et Fent 2014). Chez la larve de poisson zèbre, l'expression des transcrits des *UGTs* varie également selon l'âge de développement. L'expression des 7 *UGTs 1a*, *1b*, *5a1*, *5a3*, *5a4*, *5c2* et *5c3* est plus élevée à 24 hpf qu'à 48 hpf. Leur taux d'expression augmente dans les heures qui suivent (72, 96, 120 hpf). Contrairement aux autres *UGTs*, l'expression du *5a5* est plus faible à 24 hpf qu'à 48 hpf (Christen et Fent 2014).

Chez les mammifères aussi bien que chez les poissons, l'expression des *UGTs* diffère selon les tissus. Chez l'Homme, les *UGTs* majoritaires dans le foie sont les *UGTs 2b4, 1a9, 2b7, 1a4, 2b10, 1a1* (par ordre décroissant), alors que chez le poisson ce sont les *UGTs 1a1*, *1a3*, *1b7*, *2a3*, *2a5* et *5a1*. Chez l'Homme, les isoformes *2a3*, *1a10*, *1a1*, *1a6* et *2b7* sont les plus exprimées dans l'intestin grêle, et les isoformes *1a10* et *2a3*, dans le colon. Chez le poisson zèbre les *UGTs* majoritaires dans l'intestin sont les isoformes *1a1*, *1a3*, *2a1*, *2a3*, *2b1* et *5a1* (Christen et Fent 2014).

Avec l'objectif d'évaluer l'activité biologique de plusieurs UGTs du poisson zèbre, Wang et al. ont exprimé dans les cellules HEK293T les protéines correspondantes puis ont vérifié leur fonctionnalité à l'aide de substrats de référence. Les composés phénoliques et les acides carboxyliques sont majoritairement pris en charge par les UGTs de la famille 1. Les UGT 1A1, 1A7, 1B1 possèdent la plus forte activité envers ces substrats. L'UGT1A1 est, par exemple, la plus fortement impliquée dans la conjugaison du bisphénol A. Contrairement à la famille 1, les UGTs de la famille 2 et 5 possèdent une faible activité envers les composés phénoliques. Par ailleurs, il a été montré que la prise en charge de l'œstradiol (E2) était principalement réalisée par les UGT1A1, 1B1, 5A5, 5B2 et 5E1, celle de la testostérone par les UGT5A5 et 5E1, et celle de la bilirubine par le 1B7 (Wang et al. 2014).

Tableau 13. Taux d'expression des gènes UGTs (ARNm) dans différents tissus issus du poisson zèbre adulte âgé de 6 mois
u1 et u2 sont des variants des isoformes. D'après (Wang et al. 2014).

Familles d'UGTs	Isoformes	Cerveau	Yeux	Branchies	Cœur	Reins	Rate	Foie	Intestins	Ovaires	Testicules	Muscle	Corps entier
1	a1	+	0	+	0	0	++	+++	+++	+/0	+++	+/0	+++
	a2	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0/+
	a3	0	0	0	0	0	0	+++	+++	0	+	0	+++
	a4	0	0	+	0	0	+/0	++	++	0	+	0	+++
	a5	0	0	+++	0	+	0	+/0	0	0	0	0	+
	a6	0	0	0	0	0	0	+	+/0	0	0	0	0
	a7	0	0	+	0	0	0	0	++	0	0	0	0
	b1	+	+	++	++	+	+	+	+	0	0	+	+
	b2	0	0	0	0	+/0	0	0	+	0	0	+/0	+
	b3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0
	b4	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+
	b5	0	0	0	0	+/0	0	+	0	0	0	0	+
	b7	0	0	0	0	0	0	+++	+	0	+/0	+/0	+
2	a1	0	0	++	+	++	++	++	+++	+	++	+	++
	a2	0	0	0	0	+/0	+/0	+	+	+/0	+	+/0	+/0
	a3	+/0	+	+	+	+	+	+++	+++	++	++	+	++
	a4	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
	a5	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+++
	a6	0	0	+	+	+/0	+/0	+	+	+	+	0	++
	b1	0	0	0	0	0	+	++	+++	0	+	0	+/0
	b3	0	0	0	0	0	0	++	++	0	+/0	0	++
	b5	0	0	+/0	0	++	+/0	++	++	0	++	0	+++
	b6	0	0	0	+/0	0	0	+	0	+/0	0	0	0
5	a1	0	+	0	0	0	+	++	+++	0	+/0	0	++
	a2	0	+/0	0	0	+/0	+	++	+	0	+/0	0	++
	a3	0	0	0	0	0	0	+/0	+/0	0	0	0	+
	a4	0	0	0	0	0	0	++	++	0	0	0	++
	a5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+/0	+	++
	b1 (u1)	0	0	+	+/0	+/0	++	+/0	+/0	0	0	0	+/0
	b1 (u2)	0	0	+	0	+	+	+	+	+/0	0	0	+
	b2 (u1)	+	+	+	0	+	++	++	+	+	+	+	+
	b2 (u2)	0	+	++	0	+	0	0	0	0	0	0	++
	b3	0	0	0	0	0	0	+/0	+	0	0	0	++
	b4	+	+	+	0	++	+	+	+	0	+/0	0	+
	c1	0	0	0	0	0	0	0	+/0	0	+/0	0	0
	c2	0	+/0	0	0	+	++	+++	++	++	+/0	0	+++
	c3	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	d1	0	0	0	0	0	0	++	++	0	+/0	0	++
	e1	0	0	+/0	+/0	+/0	0	0	0	0	+/0	0	+
	f1	++	0	++	++	++	0	+	++	+++	+	+	+++
	g1	+	0	++	++	++	0	++	++	++	++	+/0	++
	g2	0	+++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0

II.3.2.1.2. *Les SULTs*

Chez l'Homme, quatre familles de SULTs ont été identifiées (SULT 1, 2, 4 et 6) regroupant 13 isoformes (Gamage et al. 2006). Chez le poisson zèbre, 20 SULTs réparties en 6 familles (SULT 1, 2, 3, 4, 5 et 6) ont été mises en évidences (Sugahara et al. 2003; Kurogi et al. 2013). Chez l'Homme, les SULTs de la famille 1 sont : SULT1A1 et 1A2 (considérés comme les principales SULTs impliquées dans les processus de détoxication), SULT1A3 (spécifiquement impliquée dans la conjugaison de la dopamine et des cathécholamines), SULT1B1 (sulfatation des hormones thyroïdiennes), SULT1C2 et 1C4 (impliquées notamment dans la bioactivation des hydroxyarylamines) et SULT1E1 (métabolisme

des œstrogènes). Parmi la famille 2 on trouve : SULT2A1 (sulfatation de la déhydroépiandrostérone), SULT2B1a (métabolisme du cholestérol), SULT2B1b (métabolisme de la prégnénolone). Enfin, il a été montré qu'une SULT de la famille 4 est présente au niveau cérébral. Quant à la SULT 6, elle n'est pas encore totalement caractérisée (Kurogi et al. 2013). Chez le poisson zèbre, un recouvrement très important des substrats endogènes et exogènes des SULTs a été mis en évidence (Tableau 14). Toutefois, les SULT1 (ST1, ST2 et ST3) ont montré les plus fortes activités envers de nombreux médicaments, même si des SULTs appartenant à d'autres familles sont également impliquées dans leur prise en charge (Kurogi et al. 2010; Kurogi et al. 2013).

Tableau 14. Exemples de substrats endogènes et exogènes des SULTs du poisson zèbre
D'après (Liu et al. 2010; Kurogi et al. 2013).

Famille de SULT	Isoforme de SULT	Substrats endogènes	Substrats exogènes
1	ST1	Déhydroépiandrostérone, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, génistéine, 2-naphtol, *p*-nitrophénol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST2	Déhydroépiandrostérone, L-dopa, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, génistéine, 2-napthol, *p*-nitrophénol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST3	Déhydroépiandrostérone, L-dopa, dopamine, estrone, thyroxine	Daidzéine, acide gallique génistéine, 2-naphtol, *p*-nitrophénol, anisole hydroxybutylé
	ST4	Déhydroépiandrostérone, estrone, thyroxine	Génistéine, 2-naphtol, p-nitrophénol, anisole hydroxybutylé
	ST5	Hormones thyroïdiennes	**Bisphénol A**, anisole hydroxybutylé, génistéine, 2-naphtol, *p*-nitrophénol
	ST6	Estrone, 17 -œstradiol	anisole hydroxybutylé, génistéine, 2-naphtol, *p*-nitrophénol
	ST7	Non connu	Paracétamol, daidzéine, génistéine, 2-naphtol, PCBs hydroxylés
	ST8	Non connu	3-chloro-4-biphenylol, daidzéine, PCBs hydoxylés
2	ST1	17 -œstradiol, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	Non connu
	ST2	17 -œstradiol, estrone, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	Non connu
	ST3	Corticostérone, 17 -œstradiol, déhydroépiandrostérone, pregnénolone	Non connu
3	ST1	17 -œstradiol, estrone, prégnénolone, déhydroépiandrostérone	**Bisphénol A**, diéthylstilbestrol, 17 -éthynylestradiol, tetrachlorobiphényldiol, 3-chloro-4-biphenylol
	ST2	Corticostérone, 17 -œstradiol, pregnénolone, hydrocortisone	3-chloro-4-biphenylol, désipramine, diéthylstilbestrol, 17 -éthynylestradiol, tetrachlorobiphényldiol
	ST3	Corticostérone, 17 -œstradiol, pregnénolone, hydrocortisone	**Bisphénol A**, désipramine, diéthylstilbestrol, dextorphan, hydrozine, minoxidil, troglitazone
6	-	Dopamine, thyroxine	Daidzéine, acide gallique, *p*-nitrophénol

Chez la larve de poisson zèbre, la nature des SULTs exprimée est moins bien caractérisée. Il est cependant notable qu'elle est très variable selon les heures de développement (Tableau 15).

Tableau 15. Taux d'ARNm des SULTs selon le stade de développement du poisson zèbre

La quantité d'ARNm est représentée par les nuances de gris allant du blanc (absence d'ARNm) au noir. NF : œuf non fécondé, hpf : heure après fécondation (hours post fertilization), M : mâle, F : femelle, IND : indifférencié, n.r.: non recherché. D'après (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008).

SULTs			Hpf								Semaine après fécondation				Mois		
															M	F	IND
		NF	0	1	3	6	12	24	48	72	1	2	3	4	3	3	3
1	ST1														n.r.	n.r.	
	ST2														n.r.	n.r.	
	ST3														n.r.	n.r.	
	ST4														n.r.	n.r.	
	ST5														n.r.	n.r.	
	ST6														n.r.	n.r.	
2	ST1																n.r.
	ST2																n.r.
	ST3																n.r.
3	ST1																n.r.
	ST2																n.r.

II.3.2.2. Capacités de biotransformation liées aux UGTs et aux SULTs dans des modèles *in vitro* issus de poissons et de l'Homme.

La caractérisation de l'expression des transcrits des UGTs et SULTs dans les modèles cellulaires humains et hépatiques montre que les UGTs sont davantage exprimées dans les hépatocytes humains en culture primaire, et le modèle cellulaire HepaRG que dans les cellules HepG2 (Tableau 16). Pour les SULTs, l'expression des transcrits semble être la même entre ces modèles cellulaires. Aucune ou très peu d'informations sont disponibles pour les lignées cellulaires humaines issues des glandes mammaires (MELN, T47DKBLuc) et les modèles cellulaires de poissons (Hépatocytes en culture primaire, ZFL et PLHC-1). Ce défaut d'information montre la nécessité d'approfondir la caractérisation des capacités de biotransformation de ces modèles *in vitro* utilisé en toxicologie.

Tableau 16. Caractérisation des capacités de biotransformation liées aux UGTs et SULTs dans un panel de modèles cellulaires humains et de poisson

		Modèle cellulaire	Origine	Utilisation	ARNm des UGTs et SULTs		Activité fonctionnelle	Référence
Humain	**Culture primaire**	**Hépatocytes (H)**	Foie	Toxicologie hépatique	**UGTs** Expression des ARNm des UGTs 1A, 1A6, 2A3, 2B4, 2B15, 2B17, 2B28, 3A1 et 8 Globalement : H>RG>G2 -**H**: 1A, 2B4, 2B28 > 2A3, 2B15, 3A1 > 1A6, 2B17, 8 -**RG**: 1A, 2B4, 2B15, 2B28 >1A6, 2A3 > 2B17, 3A1, 8 -**G2**: 2B28, 2A3 > 1A, 2B4, 2B15, 3A1, 1A6, 2B17, 8	**SULTs** Expression des ARNm des SULTs 1A1, 1A2, 1B1, 1C2, 1C4, 1E1, 2A1 Globalement : H=RG=G2 **H, RG et G2**: 1A1, 1A2, 2A1 > 1B1 1C2, 1C4, 1E1	-	(Hart et al. 2010) (Westerink et Schoonen 2007)
	Lignée cellulaire	**HepaRG (RG)**	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique			-	(Hart et al. 2010)
		HepG2 (G2)	Hépatocarcinome	Toxicologie hépatique			-	(Hart et al. 2010) (Westerink et Schoonen 2007)
		MELN	Cancer du sein. Cellules MCF-7 modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	**MCF-7** : UGT2B15		-	(Harrington et al. 2006)
		T47D-KBLuc	Cancer du sein. Cellules T47D modifiées	Criblage de xéno-œstrogènes	**T47D** : UGT2B15		-	(Harrington et al. 2006)
Poisson	**Culture primaire**	**Hépatocytes de truite arc-en-ciel**	Foie d'*Oncorhynchus mykiss* adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-		-	-
		Hépatocytes de poisson zèbre	Foie de *Danio rerio* adulte	Toxicologie hépatique et criblage de xéno-œstrogènes	-		-	-
	Lignée cellulaire	**ZFL**	Foie normal de *Danio rerio* adulte	Toxicologie hépatique	-		-	-
		PLHC-1	Hépatocarcinome de *Poeciliopsis lucida*	Toxicologie hépatique	-		Testostérone → conjugué sulfate 1-naphthol → conjugués glucuronide et sulfate	(Thibaut et al. 2009)

II.3.3. Exemples de biotransformation chez le poisson zèbre par les EMX de phase I et II

Il n'existe pas beaucoup d'exemples pour lesquels une comparaison directe et détaillée puisse être faite entre poisson zèbre et mammifères. L'une des comparaisons de biotransformation actuellement les mieux étayées par la littérature est celle du 17 -œstradiol (E2). Chez les mammifères, les CYP1 et 3A sont majoritairement responsables de la biotransformation de l'E2 en métabolites oxydés tels que la 2-OH-E2, la 4-OH-E2, la 16 -OHE1. Contrairement aux mammifères, il semble que chez le poisson zèbre, les CYP1A et 1C soient les principales isoformes impliquées dans la biotransformation

de l'E2 (Scornaienchi et al. 2010a) avec des taux plus élevés de biotransformation lors d'incubations réalisées avec les CYP1A et 1C1, et dans une moindre mesure pour celles réalisées avec le CYP 1C2. Quant aux CYP1B1, 1C2 et 3A65, ils ne sont responsables que de la formation en faible proportion des métabolites.

Différentes études ont montré la capacité du poisson zèbre à prendre en charge la biotransformation de la testostérone. La formation de la 6 -hydroxytestostérone démontre la présence d'une activité équivalente à l'activité CYP3A4/5 humaine dans la prise en charge de la testostérone chez la larve (Alderton et al. 2010; Chng et al. 2012), les hépatocytes de poisson zèbre (Reschly et al. 2007) ainsi que les microsomes hépatiques de poisson zèbre (ZLM) (Chng et al. 2012). Chez la larve, un seul métabolite hydroxylé a été identifié alors que quatre l'ont été dans les hépatocytes, à savoir les métabolites de la testostérone hydroxylés en position 6 , 15 , 16 et 16 . Chng et al. a mis en évidence encore davantage de métabolites formés suite à l'incubation de la testostérone dans les ZLM : 2 -, 6 -, 16 -hydroxytestostérone, et 3 autres métabolites potentiels non identifiés. Cette même étude a également mis en évidence la formation de la 6 -hydroxytestostérone ainsi qu'un conjugué glucuronide et un métabolite non identifié dans les homogénats de larves âgés de 5 dpf et dans le milieu de culture. Les études de docking *in silico* de Chng et al. semblent indiquer l'implication des CYP3A65 et 3C1 dans le métabolisme de la testostérone. Les profils de biotransformation de la testostérone semblent différer selon les espèces. Bien que le métabolite majoritaire (la 6 -hydroxytestostérone) soit commun, davantage de métabolites hydroxylés semblent être formés par les ZLM que par les HLM (human liver microsome) (Chng et al. 2012).

Chez l'Homme, différents CYPs (2E1, 1A2, 3A4) peuvent être impliqués dans la bioactivation du paracétamol en un métabolite réactif, la *N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), inactivée par la conjugaison au glutathion. L'hépatotoxicité du paracétamol, médicament de référence, a également été démontrée chez le poisson zèbre (North et al. 2010) pour qui la formation du NAPQI a été mise en évidence avec les ZLM. Toutefois, la formation de NAPQI semble être quantitativement inférieure à celle obtenue avec des HLM (Chng et al. 2012). Des différences de cytotoxicité et de biotransformation du paracétamol ont déjà été observées entre le rat, la souris et l'Homme (Jemnitz et al. 2008). Les études de docking de Chng et al. mettent en avant l'implication possible des CYP3A65 et 3C1 dans la bioactivation du paracétamol (Chng et al. 2012). Cet exemple illustre la nécessité de caractériser les capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés à des fins toxicologiques, et ce notamment lorsque des comparaisons inter-espèces doivent être faites avant de pouvoir extrapoler les données. L'étude de la biotransformation d'un autre médicament, l'ibuprofène, a été réalisée chez le poisson zèbre à l'état larvaire (Jones et al. 2009). Le principal métabolite formé chez les mammifères, l'hydroxy-ibuprofène, a été retrouvé dans l'eau et dans les homogénats de

larves. Ces résultats démontrent qu'à un stade précoce de développement (72-96 hpf), la larve est déjà dotée de capacités oxydatives rappelant les activités CYP2C9 et 2C19 humaines. D'autres études ont montré la capacité de la larve de poisson zèbre âgée de 7 dpf à réaliser des oxydations, mais aussi des *N*- et des *O*-déméthylations, des *N*-déalkylations, des sulfatations et des glucuronidations (Alderton et al. 2010) de composés pharmaceutiques comme le cisapride, le vérapamil et la chlorpromazine. Le cisapride est majoritairement transformé en *N*-sulfate par la larve âgée de 7 dpf. Chez les mammifères, ce métabolite est minoritaire et n'a été observé que chez le chien. Les principales biotransformation de phase I et II du cisapride (pipéridine *N*-déalkylation, oxydation du noyau flurophényl, oxydation en 3-hydroxy cisapride, glucuronoconjugués) observées chez l'Homme ne sont pas retrouvées chez la larve de poisson zèbre. La biotransformation du vérapamil par la larve donne lieu à la formation de métabolites également retrouvés chez l'Homme. Toutefois, d'autres métabolites oxydés ont été retrouvés chez la larve. Il a aussi été montré que la larve de poisson zèbre était capable de former le paracétamol à partir de la phénacétine, réaction catalysée chez l'Homme par le CYP1A2. De même, la larve est capable de déméthyler le dextromethorphan en dextrorphan, réaction catalysée chez l'Homme par le CYP2D6 (Alderton et al. 2010).

L'ensemble de ces données montrent que le poisson zèbre est doté de capacités de biotransformation des xénobiotiques non seulement chez les adultes mais également au stade larvaire. La majorité des informations disponibles sont relatives à des taux d'expression de transcrits d'EMX et non à une caractérisation fonctionnelle des enzymes. De plus, ces informations (stades de développement, activité enzymatique, répartition tissulaire) sont variables selon la nature des enzymes considérées (CYPs, UGTs, SULTs). Il est évident que la caractérisation de capacités de biotransformation des modèles cellulaires du poisson, et notamment du poisson zèbre est encore parcellaire. Une caractérisation plus approfondie à des fins toxicologiques est nécessaire non seulement pour mieux caractériser le modèle poisson zèbre, mais aussi pour permettre des approches comparatives entre espèces et entre stades de développement.

Enfin, l'expression de ces EMX dans les modèles *in vivo* et *in vitro* étant sous le contrôle de mécanismes de régulation, la compréhension de ces mécanismes et de leur modulation par les xénobiotiques constituent également des considérations clefs pour l'interprétation des résultats toxicologiques.

II.4. Mécanismes de régulation de l'expression des enzymes de biotransformation

L'exposition des organismes (ou des systèmes cellulaires) à des xénobiotiques peut conduire à l'induction ou à la répression de l'expression d'EMX (phase I et II) et des protéines de transport (phase III). Ces mécanismes de régulation vont en général dans le sens d'une détoxication et d'une meilleure élimination des xénobiotiques et de leurs métabolites (Figure 27). Au travers de l'interaction avec des récepteurs nucléaires, les xénobiotiques peuvent non seulement entrainer la survenue d'un effet biologique, mais aussi moduler l'induction ou la répression de leurs propres enzymes de biotransformation.

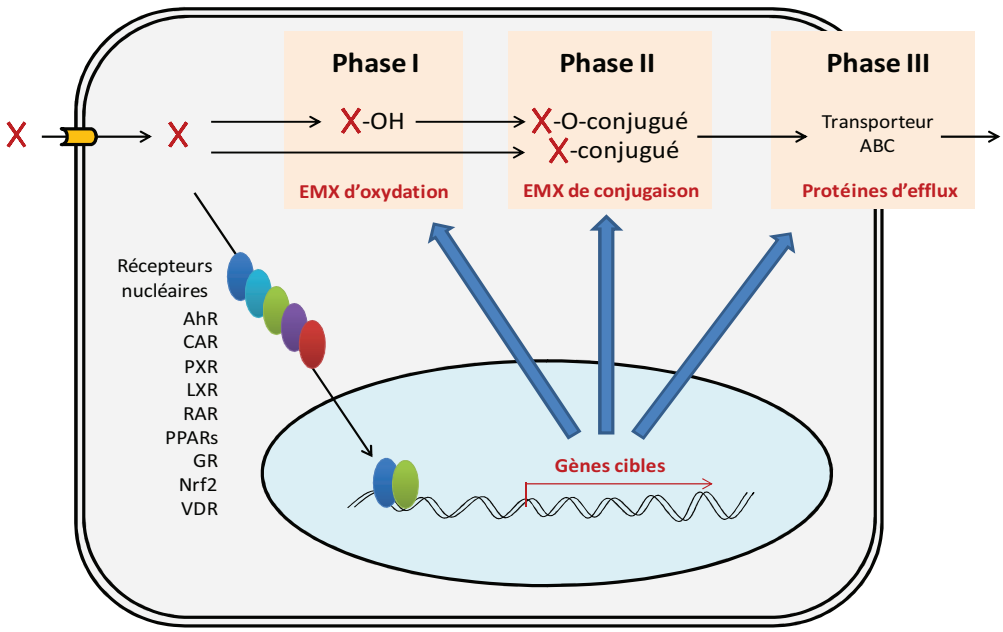


Figure 27. Principe de la régulation de l'expression des EMX de phase I et II et des protéines d'efflux (phase III) par l'interaction des xénobiotiques avec les récepteurs nucléaires

D'après (Nakata et al. 2006).

De nombreux récepteurs nucléaires dont le AhR (aryl hydrocarbon receptor), Nrf2 (nuclear factor-erythoroid 2 p45-related factor), CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor), LXR (liver X receptor), PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor), RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoid X receptor) sont des molécules clefs impliquées dans les mécanismes de

modulation de l'expression des protéines de phase I, II et III (Tableau 17 et 18). 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 le CAR soit absent. 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 de part la structure plus restrictive de la poche de liaison aux ligands de ce récepteur (Ekins et al. 2008).

Tableau 17. Exemples d'interactions ligand/ récepteur et de leurs effets sur l'expression des enzymes de phase I et II, et des transporteurs, chez l'Homme

D'après (Nakata et al. 2006).

Ligand	**Récepteur nucléaire**	**Elément de réponse**	**Gène cible (+ induction, - répression de l'expression)**		
			Phase I	**Phase II**	**Phase III**
Xénobiotiques	AhR	XRE	CYP1A1 (+) CYP1A2 (+) CYP1B1 (+)	UGT1A1 (+) UGT1A6 (+)	ABCG2 (+)
Xénobiotiques (dont phénobarbital)	CAR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP2A6 (+) CYP2B1 (+) CYP2B6 (+) CYP2C9 (+) CYP2C19 (+)	UGT1A1 (+)	ABCC2 (+) ABCC3 (+) ABCC4 (+)
Xénobiotiques Stéroïdes	SXR/PXR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP1A1 (+) CYP2B6 (+) CYP2C9 (+) CYP2C19 (+) CYP3A4 CYP3A7 CYP7A1 (-) CYP3A (+)	SULT2A1 (+) UGT1A1 (+) UGT1A3 (+) UGT1A4 (+)	ABCA1 (+) ABCB1 (+) ABCB11 (+) ABCC1 (+) ABCC2 (+) ABCC3 (+) ABCG2 (+)
Oxystérols	LXR ,	DR-4	CYP2B6 (+) CYP3A4 (+)		ABCA1 (+) ABCG1 (+) ABCG4 (+) ABCG5 (+) ABCG8 (+)
Acides gras Fibrates	PPAR	DR-1	CYP4A1 (+) CYP4A3 (+) CYP7A	UGT1A9 (+) UGT2B4 (+)	ABCA1 (+) ABCC2 (+) ABCD2 (+) ABCD3 (+)

Tableau 18. Exemples de substrats (inducteurs ou répresseurs) des EMX de phase I et II chez les mammifères et le poisson

* : cas du poisson zèbre. D'après (Miranda et al. 1998; Song 2001; Harris et al. 2004; Thibaut et Porte 2004; Waring et al. 2008; Creusot 2011; Chang et al. 2013; Kubota et al. 2013).

	Enzyme		Inducteur	Récepteur nucléaire	Répresseur
MAMMIFERES	CYPs	CYP1A1	HAP, oméprazole	AhR	-naphtoflavone, Kétoconazole, Clotrimazole
		1A2	HAP, TCDD, oméprazole,	AhR	
			Rifampicine	PXR	
			Carbamazépine	CAR	
			Barbituriques, Phénytoine	CAR/PXR	
	UGTs	UGT1	Benzo[a]pyrène, TCDD	AhR	**Bisphénol A**
		UGT1 et 2	b-naphtoflavone, Quercetin, Sulforaphane, Eicosanoïdes, Bilirubine	Nrf2	
		UGT1A1	Phénobarbital, Péhytoine, Carbamazépine, Rifampicine	PXR/CAR	
			Fibrates	PPAR	
	SULTs	-	Methotrexate, Genistéine, Acide rétinoïque	-	Flavonoïdes, Phénols, Plastifiants (**Bisphénol A**), Alkylphénols
POISSONS	CYPs	CYP1A	HAP, dioxines, furanes, PCB	-	-naphtoflavone, Parathion, Clotrimazole, Kétoconazole, Miconazole, Elliptiscine, Isosafrole, Pipéronyl butoxide
		CYP2AA1* CYP2AA2*	TCPOBOP, Phénobarbital	PXR	
		CYP3A	Kétoconazole, Nonylphénol, Rifampicine, TCDD, Dexaméthasone, Fluoxétine	-	-naphtoflavone, Parathion, Clotrimazole, Kétoconazole, Miconazole, EE2, Nonylphénol, Isosafrole, Pipéronyl butoxide
		CYP3A65*	Dexamethasone, Rifampicine, TCDD	AhR2	
	UGTs	-	-	-	Alkylphénols, Phtalates, Orgénoétains
	SULTs	-	-	-	Alkylphénols, Phtalates, orgénoétains

Par ailleurs, il existe des communications croisées (crosstalk) entre les différents récepteurs nucléaires qui rendent moins prévisible la régulation des gènes cibles. Le crosstalk PXR-CAR/ER, par exemple, entraine une diminution du taux d'hormones circulantes par l'augmentation de l'expression des enzymes prenant en charge la biotransformation des stéroïdes endogènes (Kliewer et al. 1999). Le crosstalk AhR/ER, via la formation de l'hétérodimère AhR-ARNT-ERE, participe au contrôle de l'expression des gènes cibles du ER (Ohtake et al. 2003).

En conclusion, ce chapitre consacré au métabolisme des xénobiotiques montre la complexité de la biotransformation des substrats endogènes et exogènes et l'impact potentiel des biotransformations sur les réponses toxicologiques. Différents paramètres tels que les activités enzymatiques, la répartition tissulaire des enzymes, les différences et similitudes entre espèces et entre modèles (*in vitro* et *in vivo*) ainsi que les mécanismes de régulation de l'expression des EMX sont, par conséquent, à prendre en considération notamment dans le contexte de l'évaluation du danger liés aux xénobiotiques. Actuellement, trop peu d'informations relatives aux capacités de biotransformation des modèles et outils biologiques sont disponibles, et ce en particulier pour des modèles alternatifs de plus en plus utilisés en toxicologie comme le poisson zèbre.

III. CONTEXTE REGLEMENTAIRE ET OUTILS BIOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Le poisson zèbre est un modèle qui présente de nombreux avantages pratiques et un intérêt scientifique évident. Plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés ou sont en cours de développement à partir de cette espèce, avec comme objectif d'identifier le potentiel perturbateur endocrinien et notamment œstrogéno-mimétique de substances chimiques. La mise en place de ces modèles (cellules transfectées, animaux transgéniques, criblage haut-débit…) constitue des défis techniques et scientifiques mais doit aussi répondre à des exigences réglementaires. L'impact délétère des perturbateurs endocriniens sur l'environnement et le danger qu'ils représentent pour l'Homme a conduit les instances européennes et internationales à réfléchir à la mise en place d'un cadre réglementaire visant à répertorier, évaluer et autoriser l'usage des substances chimiques. Ce cadre réglementaire qui exige une évaluation rapide du potentiel toxique de substances chimiques, a renforcé la nécessité de développer de nouveaux outils biologiques. De nombreuses équipes œuvrent en ce sens afin d'améliorer nos connaissances des modèles biologiques et de mettre au point de nouveaux outils de criblage.

III.1. Etude des PE : des modèles intégratifs aux modèles de criblage

L'effet d'un PE peut être évalué à différentes échelles biologiques, de la cellule à l'organisme. Un grand panel de modèles biologiques peut être utilisé. Ces modèles sont d'une complexité biologique variable. Les modèles *in vivo* (non humains) permettent une évaluation toxicologique dans un système intégratif. Les variations de paramètres biochimiques mesurés *in vivo* sont dans ce cas le reflet de perturbations physiologiques globales. Cette complexité biologique ne facilite cependant pas la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces troubles physiologiques. Les modèles *in vitro* permettent d'accéder à l'échelle moléculaire en écartant toute possibilité immédiate de vision intégrative à l'échelle de l'organe ou de l'organisme. On comprend alors aisément la complémentarité que représentent ces deux approches (Figure 28). Toutefois, les modèles *in vivo* sont peu compatibles avec une approche de criblage toxicologique haut débit de contaminants chimiques dont la variété augmente au fur et à mesure de l'industrialisation. La durée d'exposition, la

surveillance des animaux, les temps nécessaires aux prélèvements des échantillons biologiques, les coûts associés, et les considérations éthiques sont autant de facteurs limitant l'utilisation d'expérimentations *in vivo* (Tableau 19). Ce n'est pas le cas des modèles *in vitro*, qui sont les mieux adaptés aux besoins de criblage. Cependant, les modèles *in vitro*, qui peuvent toutefois être combinés, peuvent ils apporter des réponses suffisantes quant à l'évaluation toxicologique comprise à l'échelle de l'organisme ? Car *in fine* c'est bien l'effet du contaminant dans le système global et complexe qu'est l'organisme qui intéresse les évaluateurs du danger et du risque toxicologique. Le choix du ou des modèles biologiques utilisés dépend alors de la question scientifique posée : mettre en évidence l'activité biologique d'une substance chimique, ou bien mettre en évidence les effets délétères de cette substance chez l'organisme cible.

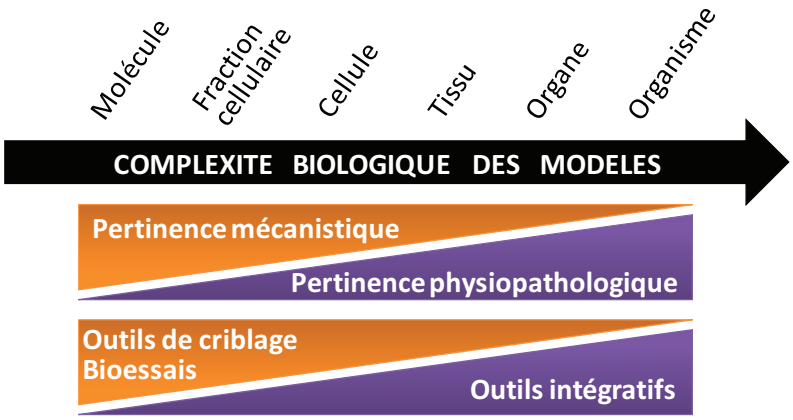


Figure 28. Paradigme des analyses en toxicologie

Tableau 19. Avantages et inconvénients des modèles *in vivo* et *in vitro* dans les analyses toxicologiques

OUTILS BIOLOGIQUES	*In vivo*	*In vitro*
Avantages	Intégratif	Sensibles
	Réponse globale	Spécifiques
	Prise en compte d'autres facteurs biologiques notamment ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination, pharmacodynamie)	Rapides
		Peu couteux
		Sans problème éthique
		Adapté au criblage
		Identification possible des mécanismes en jeux
Inconvénients	Durée d'exposition	Risque de faux positifs
	Coûts	Risque de faux négatifs
	Ethique	Simplicité relative des systèmes
	Sous l'influence de facteurs externes non ou partiellement maitrisés pouvant influencer la réponse biologique	Ne reflète pas une réponse à l'échelle de l'organisme
	Difficulté à identifier un mécanisme sous-jacent à l'effet biologique observé	Pas de prise en compte ou prise en compte partielle des paramètres ADME

Il est important de noter que les modèles *in vivo* embryonnaires du poisson zèbre sont, au sens réglementaire, des modèles *in vitro* jusqu'à 5 jours après fécondation, c'est-à-dire tant que les larves se nourrissent en puisant leurs nutriments dans le sac vitellin (UE 2010). Bien que le stade de développement soit précoce, la majorité des organes sont fonctionnels. Ce modèle embryo-larvaire peut également être plus aisément utilisé pour du criblage haut débit. Par conséquent, il constitue une alternative intéressante au modèle *in vivo* classiquement utilisé dans les études toxicologiques.

III.2. Cadre et problématique réglementaires relatifs aux perturbateurs endocriniens

La question de la réglementation des produits chimiques dotés de propriétés de perturbateur endocrinien a été prise en considération par les institutions publiques à partir de la fin des années 1990. Pour autant, les premières publications scientifiques faisant état d'altérations de la reproduction chez des animaux sauvages (poissons, batraciens) remontent aux années 1970. C'est en 1991 que le terme de « perturbateur endocrinien » fut employé pour la première fois lors d'une conférence scientifique réunie à l'initiative de Theo Colborn et connu sous le nom de « conférence de Wingspread ». Devant l'accumulation d'observations de troubles hormonaux chez de nombreuses espèces animales, puis avec les études épidémiologiques montrant une augmentation des troubles de la reproduction chez l'Homme et une diminution de la fertilité masculine, la Commission Européenne publia en 1999 une stratégie communautaire sur les PE.

Différentes agences nationales, européennes, américaines et internationales participent aujourd'hui à l'évaluation du danger et du risque que représentent les PE pour l'Homme et l'environnement : l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), l'ECHA (agence européenne des produits chimiques), l'EFSA (autorité européenne de sécurité des aliments), l'EPA (agence américaine de protection de l'environnement), la FDA (agence américaine des produits alimentaires et des médicaments). D'autres structures s'attachent au développement et à la validation de nouveaux tests scientifiques destinés à l'évaluation des PE : l'EURL ECVAM (centre européen pour la validation des méthodes alternatives) et l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques).

III.2.1. La question de la définition des perturbateurs endocriniens : un enjeu scientifique et réglementaire

La notion de PE a été officiellement définie pour la première fois en 1996 à Weybridge au Royaume-Uni, lors d'un colloque réunissant la Commission Européenne, l'OCDE, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et l'industrie chimique européenne : *« une substance chimique étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale »* (UE 1996). Contrastant avec cette définition, celle de l'EPA proposée lors d'un groupe de travail avec Kavlock et al. (1996), insiste davantage sur les modes d'actions de ces PE que sur leur nocivité : *« un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la reproduction, du développement et/ou du comportement »*. Aujourd'hui, la définition de l'OMS émise, en 2002 à la suite du programme international sur la sécurité chimique est la plus consensuelle : *« une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant de ce fait des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance »* (OMS 2002). L'EFSA s'est inspirée de la définition de l'OMS pour établir la suivante : *« tout produit chimique susceptible d'interagir directement ou indirectement avec le système endocrinien, et par voie de conséquence de produire un effet sur ce dernier et d'impacter les organes et les tissus »* (EFSA 2010). La notion de PE potentiel a ensuite été introduite : *« une substance ou un mélange exogène possédant des propriétés dont l'on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance »*. Au-delà de ces définitions, la notion d' « effets néfastes » a été précisée en 2009: *« changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, la reproduction, le développement ou la longévité d'un organisme, se traduisant par une perte de capacités fonctionnelles ou une perte de capacité à compenser un stress additionnel ou une sensibilité accrue aux effets nocifs découlant d'autres influences environnementales »* (OMS 2009).

Bien que la définition d'un PE ait évolué au cours des années et présente quelques différences parfois notables entre les instances, il n'en reste pas moins à définir les critères scientifiques à transposer de manière réglementaire afin de statuer sur le caractère de « perturbateur endocrinien » d'une substance chimique. En 2007, l'Union Européenne a mis en place le règlement « REACh » relatif à l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Ce règlement a pour objectif de rationaliser et d'améliorer l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne sur les produits chimiques. Toutefois, il n'est pas spécifiquement dédié aux PE. Et d'ailleurs la pertinence des méthodologies suivies dans le cadre de REACh pour les PE est discutée. Mais en l'absence de critères scientifiques et réglementaires au sujet des PE, l'Europe ne peut réellement revoir leur réglementation. A la fin de l'année 2011, un rapport commandé par la direction générale de l'environnement de la

Commission Européenne et ayant pour objectif de faire un état des lieux sur les PE a fait évoluer la considération des instances politiques sur les PE. Ce rapport, écrit sous la direction d'Andreas Kortenkamp (Kortenkamp et al. 2011) reprend l'ensemble des avancées scientifiques sur les PE depuis 2002 et pose des recommandations relatives à la question des PE dans la législation européenne relative aux produits chimiques : révision et actualisation des méthodes d'essais validés internationalement, récusation de la notion de seuil d'exposition relativement rigide comme critère de définition au profit de critères de nocivité prenant en compte les modes d'action endocriniens. En 2013, à l'initiative d'Andreas Kortenkamp, la sonnette d'alarme est tirée par 89 scientifiques mondialement reconnus par la publication d'un manifeste intitulé « déclaration de Berlaymont » invitant la Commission Européenne à réagir face aux dangers et aux risques sanitaires liés aux PE. Toutefois, certains scientifiques en désaccord avec les notions toxicologiques que posent les PE et le principe de précaution, font savoir leur mécontentement et publient un éditorial accompagné d'une lettre ouverte à la conseillère scientifique du président de l'Union européenne. Un consensus est finalement trouvé mais cette mésaventure n'a fait que retarder les prises de décisions européennes. Face à cette problématique, la France a été le premier payé européen à réagir en prenant en considération les alertes au sujet du bisphénol A. Le Parlement français a voté en 2012, la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de tout conditionnement comportant du bisphénol A et destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires destinées aux enfants âgés de moins de trois ans. Cette loi, en vigueur depuis le 1er janvier 2013 est également destinée aux consommateurs de tous âges à compter du 1er janvier 2015. En mars 2012, l'ANSES a publié un avis relatif à une demande d'appui scientifique et technique concernant la révision de la stratégie européenne relative aux PE (ANSES 2012). L'Etat français a demandé à l'agence (1) d'élargir ses analyses à des substances chimiques suspectées d'être des PE et relevant de la réglementation des biocides et substances chimiques couvertes par REACh, (2) de donner un avis argumenté sur les critères « PE » déjà proposés dans d'autres pays (Allemagne, Royaume-Unis, Danemark) ainsi que par des organisations non gouvernementales et des industriels de la chimie, (3) de proposer, si besoin est, d'autres critères pertinents de perturbation endocrinienne qui s'appliquent aux réglementations concernées (phytopharmaceutiques, biocides, substances chimiques couvertes par REACh). En 2013, le parlement européen a remit un rapport sur la protection de la santé publique contre les perturbateurs endocriniens (EU 2013). Ce document comporte d'importances avancées dans la prise en considération du danger que représentent les PE et met en avant la nécessité de mettre en adéquation les données toxicologiques propres aux PE avec la réglementation européenne. C'est ainsi que l'on peut lire *« […] l'absence de connaissances précises, notamment d'éléments établissant un lien inconstatable de cause à effet, ne doit pas faire obstacle à des mesures de protection sanitaire prises en vertu du principe de précaution, sous réserve qu'elles respectent le principe de proportionnalité ».* Ce rapport aborde aussi les critères généraux de définition des PE en prenant en compte les effets combinés de substances : *« […] estime que les critères de définition des*

perturbateurs endocriniens doivent reposer sur des éléments visant à définir l' « effet préjudiciable », et le « mécanisme d'action endocrinien », […] souligne que les éventuels effets combinés tels que les mélanges ou les effets cocktails doivent être pris en compte ». De plus, ce rapport indique que le parlement européen *« est en total désaccord avec les tentatives visant à introduire le critère d' « activité » en tant que seuil de définition des perturbateurs endocriniens »*. Il ajoute que *« […] les perturbateurs endocriniens doivent, dans ces conditions, être assimilés à des substances « dépourvues de seuil » […] »*. En décembre 2013, l'ANSES publie un rapport d'expertise collective relatif à la méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation (ANSES 2009). L'ANSES a en effet été chargée (1) d'identifier les produits contenant des substances reprotoxiques ou susceptibles de l'être (perturbateurs endocriniens notamment), (2) de sélectionner les produits à étudier en priorité, (3) d'analyser et, si possible, de quantifier les voies d'exposition de la population générale à ces substances en précisant les sources directes et indirectes, et incluant des populations vulnérables et les personnes en milieux de travail, (4) de procéder à une évaluation bénéfice/risque, (5) d'envisager des substitutions. En février 2014, est enregistré à la Présidence de l'Assemblée Nationale un rapport d'information déposé par la Commission des affaires européennes sur la stratégie européenne en matière de perturbateur endocrinien ou « perturbateurs endocriniens, l'urgence d'agir » (AN 2014). Ce document, qui reprend notamment l'ensemble des informations scientifiques émanant de différents rapports d'expertise et qui expose les moyens permettant la mise en place d'une meilleure réglementation européenne, souligne le devoir pour l'Union européenne de *« faire primer la vérité scientifique, dans l'intérêt des personnes, en tant que citoyens, consommateurs et contribuables »*. Aujourd'hui, en France, les critères scientifiques d'identification d'un PE applicables aux réglementations REACh, biocides et pesticides sont basés sur ceux des autorités danoises. C'est ce qui a été proposé par l'ANSES en 2012 (ANSES 2012). Les PE sont ainsi divisés en deux catégories (catégorie 1 : avérés ; catégorie 2 : potentiels). La catégorie 2 est elle-même divisée en catégorie 2a (PE suspectés) et 2b (substances avec des interactions de perturbation endocrinienne). Enfin, en juin 2014, la Commission européenne a publié sa feuille de route relative à la définition des critères d'identification des PE dans le contexte de la mise en œuvre du règlement relatif à la protection des végétaux et du règlement relatif aux produits biocides. Plusieurs options de définitions des critères d'identification des PE y sont abordées. Les options proposées se caractérisent soit par un ***status quo***, soit par les critères émis par l'OMS en 2002, soit par ces mêmes critères en introduisant différentes catégories (PE avérés, PE suspectés, substances avec des indications de perturbation endocrinienne), soit par ces mêmes critères de l'OMS en ajoutant la notion de « potentiel » comme élément participant à la caractérisation du danger. Concernant les différentes approches de prise de décision au niveau réglementaire, est notamment proposée l'introduction de considérations socio-économiques comprenant la notion de bénéfice/risque.

III.2.2. Le cadre de l'évaluation réglementaire des PE par l'OCDE

Le groupe d'étude spécial de l'OCDE pour l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, mis en place en 1998, est chargé de la mise au point des méthodes d'essai permettant de répondre aux besoins de criblage des PE avec des tests validés. Aujourd'hui, plusieurs tests sont validés au niveau international par l'OCDE afin d'évaluer certaines propriétés biologiques relatives aux perturbations endocriniennes de substances chimiques, aussi bien pour l'Homme que pour les espèces sauvages, sur la base de la mesure de paramètres biologiques définis. Ces outils biologiques mammaliens et non mammaliens sont regroupés dans un schéma conceptuel de tests à 5 niveaux. Le niveau 1 concerne des données existantes sur des substances chimiques ou obtenues par des moyens autres que des tests biologiques. Les niveaux 2 et 3 correspondent à des tests *in vitro* donnant des informations sur des mécanismes d'action définis. Le niveau 4 correspond aux tests *in vivo* donnant des informations sur des effets délétères, d'après des paramètres définis de perturbations endocriniennes. Le niveau 5 correspond à des tests *in vivo* donnant des informations permettant une meilleure compréhension des effets délétères sur la base de paramètres définis de perturbations endocriniennes allant au-delà du cycle de vie de l'organisme considéré (effets transgénérationnels). L'ensemble de ces tests biologiques permet de mettre en évidence des propriétés endocriniennes de substances chimiques via des effets médiés par les récepteurs aux œstrogènes, les récepteurs aux androgènes, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, et les perturbations de la stéroïdogenèse. Les tableaux 20 et 21 présentent les tests, validés ou en cours d'étude, spécifiques à l'identification des PE.

Tableau 20. Lignes directrices des tests spécialement développés ou actualisés pour l'identification ou l'évaluation de propriétés endocriniennes de substances chimiques

D'après ; OCDE, 20 septembre 2014 ;
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm

En gris: test réalisable (ou en partie réalisable) chez le poisson zèbre

Ligne directrice	Titre	Année d'adoption
440	Test utérotrophique chez le rongeur : essai de dépistage à court terme de propriétés œstrogéniques	2007
407 (actualisée)	Etude de toxicité à doses répétées pas voie orale sur 28 jours chez les rongeurs	2008
211 (actualisée)	Test de reproduction chez la Daphnie (*Daphnia magna*)	2011
441	Bio-essai de Hershberger chez le rat : essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques	2009
229	**Test de reproduction à court terme chez le poisson**	**2009**
230	**Essai de 21 jours chez les poissons : essai de dépistage à court terme de l'activité œstrogénique et androgénique, et d'inhibition de l'aromatase**	**2009**
231	Bio-essai de métamorphose des amphibiens	2009
455	Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur d'œstrogène alpha humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste des substances testées	2009
233	Essai de toxicité sur le cycle de vie des chironomes dans un système eau-	2010

	sédiment chargé ou eau chargée-sédiment	
234	**Essai de développement sexuel des poissons**	**2011**
456	Essai de stéroïdogenèse H295R	2011
457	Essai de transactivation faisant appel au récepteur des œstrogènes BG1Luc pour identifier les agonistes ou antagonistes des récepteurs des œstrogènes	2012

Tableau 21. Tests non validés actuellement en cours d'étude pour l'identification des perturbateurs endocriniens

D'après ; OCDE, 20 septembre 2014 ;
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm

En gris: test développé chez le poisson zèbre en cours d'évaluation

Test en cours d'étude	**Pays**
Essai de cycle de vie chez le poisson/ Essai multigénérationnel chez le poisson Medaka	USA/JPN/DEU
Essai de reproduction/cycle de vie partiel chez le poisson	USA
Essai de développement et de croissance de larves d'amphibiens	USA/JPN
Essai de dépistage d'une activité thyroïdienne chez le xénope à l'état embryonnaire	FRA
Essai de dépistage de substances endocriniennes agissant via le récepteur aux œstrogènes chez le poisson zèbre à l'état d'embryon	**FRA**
Essai de toxicité sur le cycle de vie de la crevette Mysid	USA
Essai de reproduction et de développement chez les Copépodes	SWE
Essai de reprotoxicité chez les mollusques – développement et validation des lignes directrices	DEU/GBR/FRA/DNK
Essai aviaire de reprotoxicité sur 2 générations	USA
Essai de binding sur le récepteur des œstrogènes alphas humains recombinant	USA/EC/DEU/JPN
Essai de détection des activités androgéniques et anti-androgéniques (STTA)	JPN
Essai de détection de l'activité anti-œstrogénique des produits chimiques	E
Essai de transactivtation du récepteur aux androgènes	EC
Essai de transactivation pour la détection de composés œstrogéniques et anti-œstrogéniques par les cellules MELN	EC
Thyroid Scoping Document	OECD Secr.
Mise à jour des test TG 421 et 422	DK

III.2.3. Les capacités de biotransformation des tests biologiques appliqués aux PE : une priorité scientifique et réglementaire ?

Comme expliqué précédemment, les biotransformations d'un xénobiotique dans un modèle biologique considéré peuvent considérablement moduler la réponse toxicologique mesurée. Or ces capacités de biotransformation varient selon les modèles biologiques. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de différences dans ces capacités de biotransformation. Pour les modèles *in vivo* de tels facteurs sont par exemple l'espèce, le stade de développement, la durée et la voie d'exposition à un xénobiotique. Pour les modèles *in vitro* ces facteurs sont, entre autres, l'espèce de provenance, la durée d'exposition et les conditions de culture. L'un des reproches que l'on peut faire au sujet des tests *in vitro* est, en règle générale, leur faible capacité de biotransformation en comparaison avec les tests *in vivo*. Or les considérations éthiques actuelles et les recommandations scientifiques vont dans le sens d'une

moindre utilisation des modèles *in vivo* au profit des modèles *in vitro*. Dans ce contexte, la question est de savoir dans quelle mesure les tests *in vitro* peuvent rendre compte de l'effet biologique qui serait observé chez l'animal (et chez l'Homme), sans oublier de prendre en compte la biotransformation des xénobiotiques. Ainsi la comparaison des résultats visant à évaluer l'activité endocrinienne de substances chimiques, d'une part entre des tests *in vitro* aux capacités de biotransformation différentes, d'autre part entre des tests *in vivo*, et enfin, *a fortiori* entre des tests *in vitro* et *in vivo*, peut conduire à des différences importantes d'interprétation comprenant notamment des faux positifs et négatifs à l'échelle de l'organisme considéré. Dans le cas où le métabolite d'un composé présente une activité biologique pour la cible considérée similaire à celle du composé parent, il est logique de ne pas observer de différence d'effet biologique entre un système qui ne métabolise pas et un système qui métabolise (au final, la concentration en substances actives sera similaire). En revanche, dans le cas où le métabolite d'un composé peu actif présente une activité biologique pour la cible considérée plus importante que le composé parent, alors un système biologique métaboliquement compétent indiquera une toxicité beaucoup plus importante qu'un système biologique dépourvu de capacité de biotransformation. Ceci peut être observé dans le cas de SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator) tels que le tamoxifène qui est métabolisé en hydroxy-tamifène. A l'inverse, si la métabolisation résulte en une détoxication (molécule parente active et métabolite inactif), la mesure d'activité refletera peu ou pas l'activité de la molécule testée.

En 2007, l'OCDE a publié un rapport sur l'utilisation de systèmes de biotransformation pour l'évaluation *in vitro* de l'activité endocrinienne de substances chimiques (OCDE 2008). En 2012, l'OCDE a émis un nouveau rapport afin d'évaluer les besoins à venir en termes de réglementation concernant des tests *in vitro* de biotransformation et de biodisponibilité pour les PE (OCDE 2012). La nécessité absolue et prioritaire d'évaluer le métabolisme des PE dans le cadre de leur évaluation toxicologique a été rappelé par Myriam Jacobs en 2013 (Jacobs et al. 2013).

Dans son rapport publié en 2008, l'OCDE, conclue que la solution idéale serait une évaluation simultanée de l'activité endocrinienne et du métabolisme des substances chimiques, mais que cet objectif est difficilement atteignable dans un futur proche. Toutefois, ce rapport met en avant l'utilisation possible de combinaisons de tests déjà disponibles. Par exemple, ce rapport préconise la caractérisation des capacités de biotransformation de tests déjà utilisés dans l'évaluation de l'activité endocrinienne des produits chimiques, ou bien encore parmi d'autres propositions, le développement de systèmes exprimant spécifiquement des enzymes de phase I et/ou II, ou encore la mise en place d'approches permettant une extrapolation *in vivo* à partir de tests *in vitro*. Or, depuis 2008, relativement peu d'avancées ont été réalisées et traduites en termes réglementaires. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser des modèles biologiques dépourvus de capacités de biotransformation (la levure par exemple) pour attribuer sans équivoque une activité biologique au composé testé. Toutefois, dès que l'objectif est de comprendre le comportement d'un xénobiotique dans un modèle *in vitro* suffisamment « riche », alors le recours à d'autres modèles notamment cellulaires ou à des

modèles animaux à un stade de développement très précoce et considérés réglementairement comme des modèles *in vitro,* est nécessaire. Certains efforts ont permis d'établir des critères de standardisation pour l'obtention et l'utilisation des fractions subcellulaires hépatiques S9 de poissons pour évaluer les biotransformations de composés chimiques (Johanning et al. 2012). De plus, les modèles *in vitro* déjà en place, validés par l'OCDE ou très largement utilisés dans les laboratoires de recherche sont invités à faire l'objet d'un travail de caractérisation de leurs capacités de biotransformation, illustrées par l'étude du devenir de substances chimiques clefs (Jacobs et al. 2013). Des recommandations à court, moyen et long terme ont été émises par l'OCDE (2008, 2012) et relayés et renforcés par M. Jacobs et al. en 2013. Brièvement, à court terme, les objectifs sont (1) de fixer une liste de substances de référence pour l'étude de leur biotransformation dans des systèmes biologiques dédiés à l'évaluation des activités endocriniennes, (2) de valider des tests *in vitro* S9 au sein des systèmes biologiques *in vitro* validés pour l'évaluation des activités endocriniennes, (3) de caractériser les capacités de biotransformations des modèles cellulaires (validés ou non) utilisés pour évaluer les activités endocriniennes des substances chimiques. On peut citer par exemple des modèles comme les cellules MCF-7 (MELN) (Balaguer et al. 1999), les cellules T47D et d'autres modèles notamment des modèles en développement dont ZFL et ZELH-zfERs (Cosnefroy et al. 2012) et le EASZY assay (Brion et al. 2012). A moyen terme, les propositions sont notamment d'intégrer des tests de biotransformation dans les différents niveaux du cadre conceptuel des tests de l'OCDE. A long terme, l'objectif serait de développer les modèles prédictifs *in silico* sur la base des données *in vitro* et *in vivo* en termes de biotransformation (harmonisation des bases de données, définition des voies métaboliques, développement d'outils prédictifs).

Au final, il existe déjà un certain nombre d'outils pour évaluer les capacités de biotransformation des modèles biologiques et pour évaluer le devenir des substances chimiques. Mais le développement de modèles et de tests complémentaires, et la bonne intégration de ces tests par rapport aux modèles biologiques déjà validés, restent à être menés dans le cadre réglementaire de l'évaluation de l'activité endocrinienne des substances chimiques. Le poisson zèbre continue de faire l'objet de recherches afin de développer des modèles à la fois sensibles, spécifiques, et faciles d'utilisation, pour améliorer nos capacités à évaluer le caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques, que celles-ci représentent un danger pour la santé humaine ou environnementale.

III.3. Place des modèles issus du poisson zèbre dans l'étude des perturbateurs endocriniens œstrogéniques

Le poisson zèbre est l'une des espèces à partir de laquelle ont été développés différents modèles biologiques visant à évaluer le caractère perturbateur endocrinien de substances chimiques. Les modèles poisson zèbre peuvent être utilisés à différentes fins : mise en évidence de propriétés (anti)œstrogéniques et (anti)androgéniques, étude des rétrocontrôles hormonaux, de la fonction gonadique, et du système thyroïdien (Tableau 22). Le poisson adulte représente le principal modèle utilisé pour ces études. Certains modèles *in vitro/in vivo* (cellules transfectées et larves transgéniques) ont par ailleurs récemment été développés afin de mettre en évidence l'activité œstrogénique des xénobiotiques. Les larves âgées de moins de 5 jours après fécondation, qui sont dépendantes des nutriments présents dans le sac vitellin, ont l'avantage d'être considérées comme des modèles *in vitro* d'un point de vue réglementaire (UE 2010). Ces larves bien qu'en développement, représentent un modèle assez intégratif puisque la majorité des organes est déjà fonctionnel à ce stade.

Tableau 22. Liste non exhaustive de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle biologique destiné à l'étude des perturbations du système endocrinien

Perturbations endocriniennes	Modèles et paramètres mesurés	Références
Potentiel œstrogénique et anti-œstrogénique	- Taux de vitellogénine (ELISA) ou de ses transcrits (RT-qPCR). - Modèles transgéniques : Tg(ERE-Luc), Tg(ERE-zvtg1:GFP), EASZY assay (cypa19a1b-GFP) - Modèles cellulaires transféctés (ZELH-zfERs)	(Arukwe et Goksoyr 2003) (Segner 2009) (Legler et al. 2000) (Chen et al. 2010) (Brion et al. 2012) (Cosnefroy et al. 2012)
Potentiel androgénique et anti-androgénique	- Taux de 11-kétotestostérone - Réversion du sexe - Sexe ratio - Indice gonadosomatique	(Scholz et Mayer 2008) (Kwok et al. 2005)
Rétrocontrôles centraux des PE sur les régulations endocriniennes	- Axe HHG : gonadotrophines (FSH, LH, TSH), GnRH - Métabolisme des stéroïdes cérébraux	(Scholz et Mayer 2008) (Kwok et al. 2005) (Lohr et Hammerschmidt 2011) (Baudiffier et al. 2012) (Segner 2009)
Effets des PE sur la reproduction, le développement et la maturation gonadique	- Proportion d'œufs fécondés - Histopathologie gonadique - Taux des stéroïdes sexuels (œstradiol, 11-kétotestostérone) - Indice gonadosomatique - Sexe ratio	(Segner 2009) (Scholz et Mayer 2008)
Effets des PE sur le système thyroïdien	- Taux de T3 et T4 circulants - T4 immunofluorescence quantitative disruption test (TIQDT) - Niveau d'expression de *thraa*, *thrab* (TRα) et *thrb* (TRβ), *slc5a5*, *tg*, *tshb* - Hypertrophie/ hypotrophie de la glande thyroïde, altération de la morphogénèse, nombre et position des follicules fonctionnels	(Raldua et al. 2012) (Scholz et Mayer 2008)

La majorité des modèles cellulaires actuellement destinés à évaluer le potentiel œstrogénique des xénobiotiques est issue de lignées cellulaires d'origine humaine provenant de cancers du sein ou du col de l'utérus (Tableau 23). Trois modèles cellulaires ichthyens, dont un développé à partir du poisson zèbre, ont été construits à partir d'hépatocytes ou de cellules gonadiques. Ces modèles cellulaires ont la particularité d'exprimer un gène rapporteur (GFP, luciférase, -galactosidase par exemple) permettant de mettre en évidence un effet rapide du xénobiotique étudié, suite à sa fixation sur un récepteur nucléaire. Les cellules sont généralement transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse d'un récepteur donné (ER par exemple). Ce récepteur peut être présent de façon endogène ou introduit par transfection stable ou transitoire. Une fois activé, le récepteur se fixe sur le promoteur du gène. Toutefois, ces modèles cellulaires ne permettent pas d'appréhender les conséquences (expression de gènes) de cette activation du récepteur nucléaire considéré. De manière similaire aux cellules, un modèle transgénique du poisson zèbre permet aujourd'hui d'évaluer le potentiel œstrogénique des xénobiotiques par la mesure de la fluorescence émise par la GFP. Le gène codant pour la GFP a été introduit chez le poisson zèbre et placé sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'aromatase B cérébrale (*cyp19a1b*) dont l'expression est œstrogéno-régulée (Menuet et al. 2005). Ce modèle de poisson zèbre au stade larvaire, développé à l'INERS, exprimera alors la GFP après avoir été exposé à une substance chimique activant le ER (Tong et al. 2009; Brion et al. 2012).

Tableau 23. Bioessais in vitro basés sur l'expression de gènes naturels ou transfectés pour l'étude des propriétés œstrogéniques des produits chimiques

Fond orange : modèle levure ; fond bleu : modèles humains ; fond vert : modèles poissons ; lettres rouges : modèles poisson zèbre ; ed : endogène, ex : exogène , R : gène rapporteur , N : gène naturel , St : tranfection stable , Tr : tranfection transitoire. D'après (Creusot 2011).

Récepteur	Lignée cellulaire (Isotype, Système)	Lignée Mère (Espèces-Tissus)	Référence
ER	**YES** (hERα-ex, R- βGal-St)	*Saccharomyces cerevisiae* (Levure)	(Routledge et Sumpter 1996)
	MELN (hERα-ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	(Balaguer et al. 1999)
	MVLN (hERα-ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	(Pons et al. 1990)
	HELN (hERα/β-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	(Balaguer et al. 1999)
	ER-CALUX® (hERα/β-ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	(Legler et al. 1999)
	T47D-KBluc (hERα/β-ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	(Wilson et al. 2004)
	BG1Luc4E2 (hER-ed,R-Luc-St)	BG1 (Homme, cancer ovaire)	(Rogers et Denison 2000)
	HELN-rtER (rtERα-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	(Molina-Molina et al. 2008)
	ZELH (zfERα/β1/β2-ex, R-Luc-St)	ZFL (Poisson, hépatocytes)	(Cosnefroy et al. 2012)
	PELN-rtER (rtERα-ex, R-Luc-St)	PLHC-1 (Poisson, hépatocytes)	(Cosnefroy et al. 2009)
	RTG-2-rtERα (rtERα-ex, R-Luc-St)	RTG-2 (Poisson, gonades)	(Ackermann et al. 2002)
	Modèle animal in vitro	**Espèce animale**	**Référence**
	EASZY assay (Tg, *cyp19a1b*-GFP, stade larvaire)	Poisson zèbre (*Danio rerio*, souche AB)	(Tong et al. 2009) (Brion et al. 2012)

Il existe également un certain nombre de bio-essais *in vivo* actuellement développés chez le poisson (et notamment chez le poisson zèbre), pouvant être utilisés de manière réglementaire selon le schéma conceptuel de l'OCDE. Mais aucun bio-essai *in vitro* développé chez le poisson zèbre et dont l'objectif est la mise en évidence de PE, n'a encore été validé par l'OCDE. La validation de tels bio-essais *in vitro* permettrait d'élargir le panel de tests actuellement disponible pour l'évaluation du potentiel œstrogénique des xénobiotiques.

Démarche expérimentale et choix méthodologiques

I. Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité d'une démarche ayant pour objectif le développement et la caractérisation de modèles du poisson zèbre *in vivo* et *in vitro* permettant une meilleur évaluation de l'activité œstrogénique des substances chimiques. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL (ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012) et *in vivo* basés sur l'expression de la Green Fluorescent Protein (GFP) placée sous le contrôle du promoteur du gène cyp19a1b régulé par les œstrogènes et exprimé au niveau cérébral (EASZY assay) (Brion et al. 2012). Pour utiliser ces modèles dans une démarche intégrée combinant les tests *in vivo* et *in vitro*, la prise en compte du métabolisme des xénobiotiques dans les différents systèmes d'essai est nécessaire. En effet, la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques, qui permet de s'intéresser aux processus de bioactivation et de détoxication dans l'évaluation des effets biologiques des xénobiotiques, est un déterminant essentiel qui n'est que peu pris en compte dans les modèles utilisés en toxicologie.

Plus précisément ce travail a consisté, d'une part, en l'étude du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux émergeants à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre et, d'autre part, en l'étude du métabolisme de ces contaminants dans les différents systèmes d'essai *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre, complétée par une étude de métabolisme comparée avec des modèles cellulaires d'origine humaine.

Afin de mener à bien ce projet, l'INERIS et l'INRA ont décidé de collaborer sur un tel projet dont les objectifs principaux sont :

(1) l'amélioration de la caractérisation du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux et alimentaires dans les modèles de poisson zèbre

(2) la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles de poisson zèbre utilisés en toxicologie

(3) la compréhension et l'interprétation des réponses biologiques observées dans ces modèles

(4) l'évaluation de leur intérêt en termes de changement d'échelle

II. Démarche expérimentale

Ce chapitre a pour objectif d'exposer la stratégie expérimentale ainsi que les choix méthodologiques et les approches expérimentales utilisés pour répondre à la problématique de la thèse. Le lecteur pourra se rapporter aux paragraphes « Matériel et Méthodes » des publications où l'intégralité des données expérimentales est donnée.

II.1. Stratégie expérimentale

Pour mener à bien ce projet, différentes études complémentaires ont été réalisées.

Après avoir mis en place le modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH), le potentiel œstrogénique d'un panel de xénobiotiques a été évalué dans les modèles du poisson zèbre. Certains des xénobiotiques retenus sont des contaminants environnementaux émergeants ou de référence [benzophénone-2 (BP2), bisphénol A (BPA), bisphénol F (BPF), bisphénol S (BPS)].

Par la suite, le devenir de la BP2 et du BPS radiomarqués (^{3}H-BP2 et ^{3}H-BPS) a été exploré dans les différents modèles du poisson zèbre (PZFH, ZFL, ZELH-zfERs), ainsi que dans des lignées cellulaires humaines hépatiques (HepG2, HepaRG) ou issues des glandes mammaires et utilisées régulièrement dans l'évaluation du potentiel œstrogénique des xénobiotiques (MELN, T47D-KBLuc). Après exposition des différents modèles biologiques à la ^{3}H-BP2 et au ^{3}H-BPS, et suite à une étape de développement analytique, les profils métaboliques ont été étudiés par radio-CLHP. L'identification des métabolites a été réalisée par des techniques de biochimie et confirmée par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR).

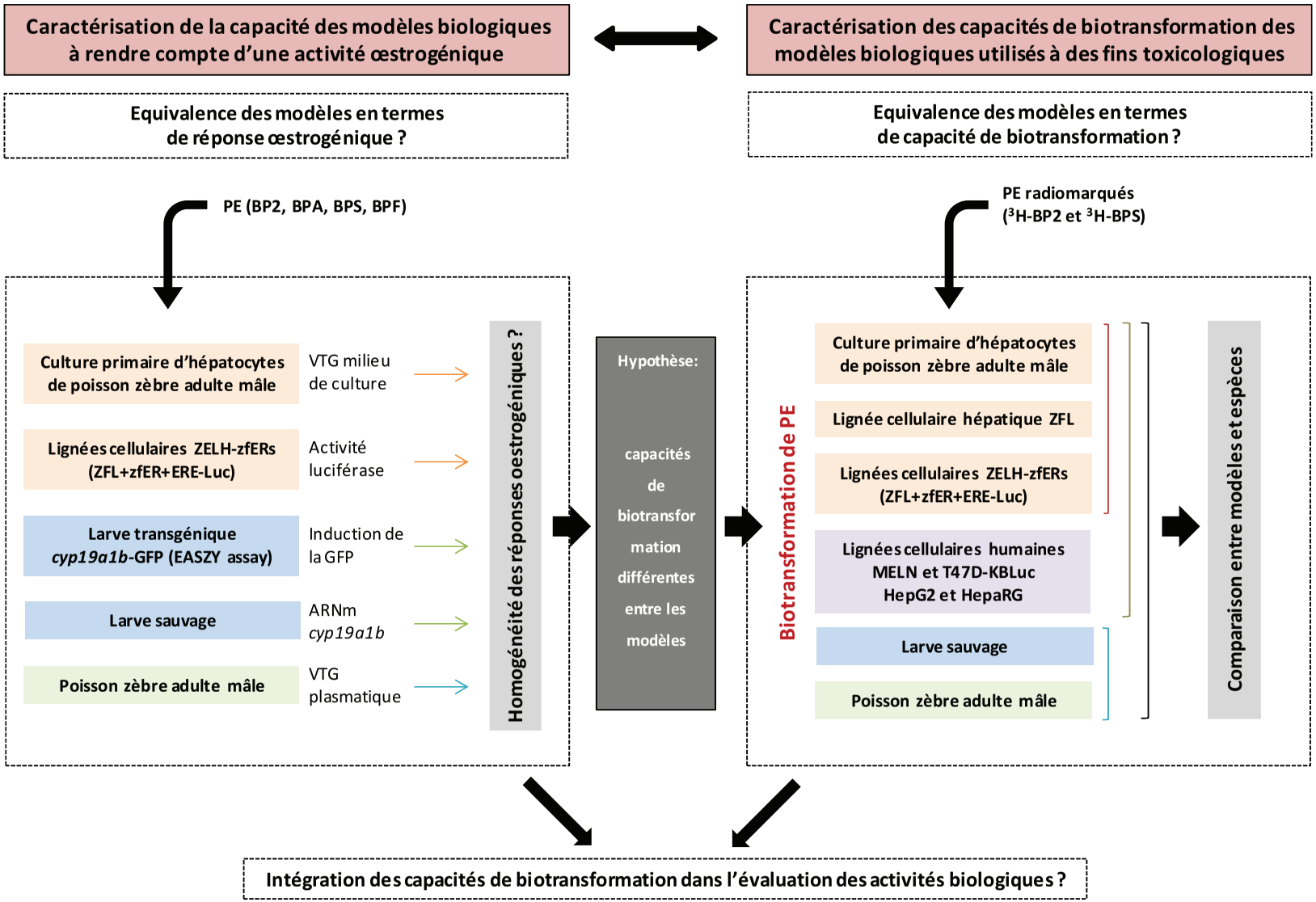


Figure 29. Démarche expérimentale générale

II.2. Modèles biologiques

II.2.1. Modèles cellulaires

Les différents modèles cellulaires utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt sont présentés dans le tableau 24.

II.2.1.1. Evaluation du potentiel œstrogénique des PE

L'étude de l'activité œstrogénique des xénobiotiques d'intérêt a été réalisée dans deux modèles cellulaires issus du poisson zèbre.

Les cultures primaires possèdent en général de plus grandes capacités de biotransformation que les lignées cellulaires qui sont issues de cellules cancéreuses, et qui ont perdu tout ou partie de leurs capacités métaboliques. Pour cette raison, il était pertinent de mettre en place une culture primaire d'hépatocytes à partir de poisson zèbre adulte mâle (PZFH) pour servir de référence à l'étude du devenir de xénobiotiques d'intérêt abordés dans cette thèse. La capacité du modèle PZFH à répondre à une stimulation œstrogénique a été évaluée par l'utilisation de xénobiotiques de référence, qui sont retrouvés dans l'environnement ou suspectés l'être compte tenu de leur utilisation.

Outre ce modèle de culture primaire, l'évaluation du potentiel œstrogénique de substances chimiques a été réalisée dans les lignées cellulaires nouvellement développées ZELH-zfERs (Cosnefroy et al. 2012). Ces lignées cellulaires sont issues d'une double transfection stable, de l'un des récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (zfER , zfER 1 ou zfER 2) et du gène de la luciférase (Luc) placé sous le contrôle de l'élément de réponse des œstrogènes (ERE). L'activation des ER par la présence d'un composé chimique va entrainer la fixation d'un complexe ER sur l'ERE. Il s'en suit l'expression du gène de la luciférase placé sous le contrôle de l'ERE. La prise en charge du substrat D-luciférine par la luciférase va entrainer la formation d'oxyluciférine et l'émission d'une lumière. L'intensité de la luminescence émise est proportionnelle à l'activité œstrogénique du composé chimique à l'étude (Figure 30).

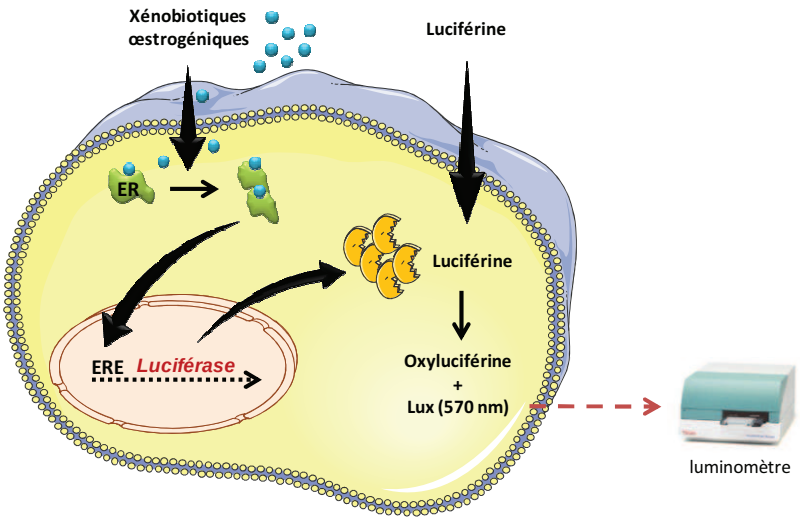


Figure 30. Principe de la mesure du potentiel œstrogénique d'un xénobiotique dans les modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre doublement transfecté, par l'émission de lumière suite à l'activation des ER.
Certains éléments iconographiques proviennent de Servier Médical Art.

II.2.1.2. Etude du devenir des PE d'intérêt

L'étude du devenir de PE d'intérêt a été réalisée dans différents modèles cellulaires issus du poisson zèbre et de l'Homme.

Les modèles cellulaires du poisson zèbre sont ceux utilisés dans de la cadre de l'évaluation de l'activité œstrogénique de PE dans ce travail de thèse, à savoir la culture primaire PZFH et les lignées ZELH-zfERs, auxquelles s'ajoute la lignée cellulaire hépatique ZFL du poisson zèbre de laquelle sont issues les lignées ZELH-zfER et ZELH-zfER 2. En effet, il est important d'évaluer l'impact potentiel de la double transfection de la lignée ZFL sur la capacité de biotransformation de ces cellules.

D'autres lignées cellulaires telles que MELN (Balaguer et al. 1999) et T47D-KBLuc (Wilson et al. 2004), toutes deux d'origine humaine, sont fréquemment utilisées pour évaluer le potentiel œstrogénique de PE. Par conséquent, la comparaison du devenir de PE entre ces modèles issus d'espèces différentes mais qui sont utilisées avec des objectifs similaires était indispensable. Toutefois, ces lignées cellulaires humaines MELN et T47D-KBLuc ont une origine tissulaire différente des lignées ZELH-zfERs. MELN et T47D-KBLuc sont respectivement issues des lignées cellulaires MCF-7 et T47D, provenant de glandes mammaires humaines. Afin de comparer le devenir de PE dans des cellules d'origine tissulaire identique à celle des modèles cellulaires du poisson zèbre, nous avons complété nos études de biotransformation par l'utilisation des lignées hépatiques humaines HepG2 (Knowles et al. 1980) et HepaRG (Gripon et al. 2002), qui ne sont pas utilisées dans

l'évaluation du potentiel œstrogénique de PE, mais qui sont connues pour la conservation de leur capacités métaboliques, en particulier pour ce qui est d'HepaRG, un modèle de plus en plus utilisé en toxicologie (Hewitt et Hewitt 2004; Antherieu et al. 2012). Les cellules HepG2 sont encore plus fréquemment utilisées dans le cadre d'étude toxicologique, mais leur relevance sur le plan métabolique mériterait d'être davantage précisée.

II.2.2. Modèles animaux

Les différents modèles animaux utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt sont présentés dans le tableau 24.

II.2.2.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE

L'étude de l'activité œstrogénique des PE d'intérêt a également été réalisée dans trois modèles animaux du poisson zèbre.

Le poisson zèbre adulte (souche AB) a été choisi comme modèle le plus intégratif. La réponse biologique obtenue tient ainsi compte des paramètres pharmacocinétiques (ADME) et des processus de régulation à différentes échelles (cellules, tissus, organes, organisme).

La larve du poisson zèbre (également de souche AB) a été utilisée en complément du modèle larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) qui constitue l'autre modèle de criblage de l'activité œstrogénique de PE récemment développé à l'INERIS (Brion et al. 2012). Dans ce modèle transgénique, le gène codant pour la GFP a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'aromatase B cérébrale (cyp19a1b) dont l'expression est œstrogéno-régulée. En présence d'un ligand du ER, les récepteurs activés vont se fixer à l'élément de réponse et induire l'expression de la GFP (Figure 31). La quantité de fluorescence émise est proportionnelle à l'activité œstrogénique du composé chimique étudié. A la différence des autres modèles, le contexte cellulaire de l'activation des ER n'est, dans ce cas, pas hépatique, mais cérébral, puisque l'aromatase B est exprimée dans les cellules gliales radiaires du poisson zèbre. Le modèle larve, bien que correspondant à un modèle animal précoce, présente l'avantage d'être un modèle plus intégratif qu'un modèle cellulaire. Bien que la larve soit un modèle *in vivo*, elle est considérée, au niveau réglementaire, comme étant un modèle *in vitro* jusqu'au stade de développement 5 dpf, c'est-à-dire tant qu'elle se nourrit que des réserves vitellines (Strahle et al. 2012).

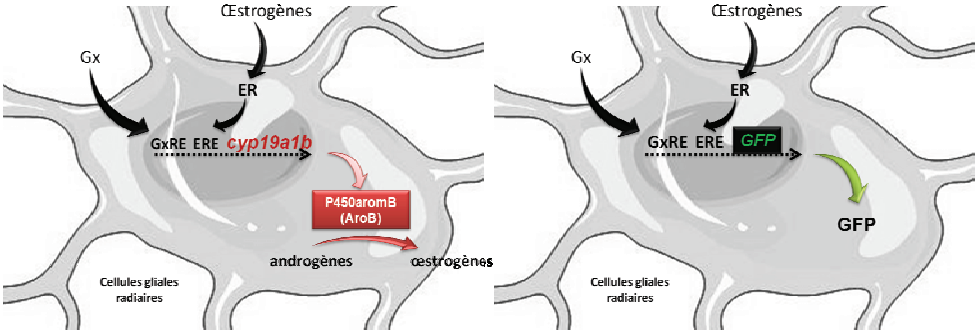


Figure 31. Expression de la GFP dans les cellules gliales radiaires du modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay)

Certains éléments iconographiques proviennent de Servier Medical Art.

II.2.2.2. Etude du devenir des PE d'intérêt

L'étude du devenir de PE d'intérêt a été réalisée, pour ce travail de thèse, dans les deux modèles animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique, à savoir le poisson zèbre adulte (souche AB) et la larve (souche AB). Afin d'appréhender un changement d'échelle potentiel entre les modèles *in vitro* et *in vivo*, cette étude de biotransformation de PE d'intérêt dans ces modèles animaux était indispensable.

Le tableau suivant reprend l'ensemble des modèles cellulaires et animaux utilisés dans l'évaluation du potentiel œstrogénique et dans le devenir des PE d'intérêt.

Tableau 24. Modèles cellulaires et animaux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique de PE et leur devenir

		Modèle cellulaire	Nature	Origine tissulaire	Description	Utilisation		Référence
						Activité œstrogénique	Biotransformation	
IN VIVO	Poisson zèbre	**ADULTE**	Sauvage	-	Souche AB	X	X	-
		LARVE	Sauvage	-	Souche AB	X	X	-
		EASZY assay	Transgénique	-	*cyp19a1b*-GFP Souche AB	X		(Tong et al. 2009) (Brion et al. 2012)
IN VITRO	Poisson zèbre	**PZFH**	Culture primaire	Foie sain	Sauvage Souche AB	X	X	D'après (Ibabe et al. 2005; Bjorkblom et al. 2007)
		ZFL	Lignée cellulaire	Foie sain	-		X	(Ghosh et al. 1994)
		ZELH-zfER	Lignée cellulaire	Foie sain	zfER + ERE-Luc	X	X	(Cosnefroy et al. 2012)
		ZELH-zfER_1	Lignée cellulaire	Foie sain	ZfER_1 + ERE-Luc	X		
		ZELH-zfER_2	Lignée cellulaire	Foie sain	ZfER_2 + ERE-Luc	X	X	
	Humain	**MELN**	Lignée cellulaire	Adénocarcinome glandes mammaires	MCF-7 + ERE-Luc		X	(Balaguer et al. 1999)
		T47D-KBLuc	Lignée cellulaire	Adénocarcinome glandes mammaires	T47D + ERE-Luc		X	(Wilson et al. 2004)
		HepG2	Lignée cellulaire	Carcinome hépatocellulaire	-		X	(Knowles et al. 1980)
		HepaRG	Lignée cellulaire	Carcinome hépatocellulaire	Cellules bipotentes (hépatocytes et cellules biliaires)		X	(Gripon et al. 2002)

II.3. Choix des xénobiotiques

Pour ce travail, les xénobiotiques retenus ont été des molécules œstrogéniques de référence, mais aussi des contaminants environnementaux émergeants (Tableau 25 et Figure 32).

Tableau 25. Caractéristiques des molécules utilisées au cours des expositions des modèles biologiques
E2 : 17 -œstradiol, EE2 : éthinylestradiol, BP2 : benzophénone-2, BPA : bisphénol A, BPF, bisphénol F, BPS : bisphénol S

Molécule	Classe	Fonction	Masse molaire (g/mol)	Log P	Concentration					
					Modèles cellulaires		Modèles larves		Modèle adulte	
					Activité œstrogénique	Métabolisme	Activité œstrogénique	Métabolisme	Activité œstrogénique	Métabolisme
E2	Hormone œstrogénique naturelle	-	272,4		0,1 pM – 0,01 µM	-	0,1 µM	-	0,01 µM	-
EE2	Hormone de synthèse	Agoniste du ER	296,4	3,67	-	-	0,05 nM	-	-	-
BP2	Benzophénone	Filtre UV	246,2	2,57	0,01 – 10 µM	0,1 – 200 µM	0,01 – 20 µM	1 µM	4 – 20 µM	1 µM
BPA	Bisphénol	Xéno-œstrogène	228,3	3,43	0,01 – 10 µM	-	0,25 – 10 µM	-	-	-
BPF	Bisphénol	Xéno-œstrogène	200,2	2,73	0,01 – 10 µM	-	0,01 – 20 µM	-	0,1 – 20 µM	-
BPS	Bisphénol	Xéno-œstrogène	250,3	1,83	0,01 – 10 µM	0,1 – 200 µM	0,25 – 30 µM	1 µM	-	1 µM

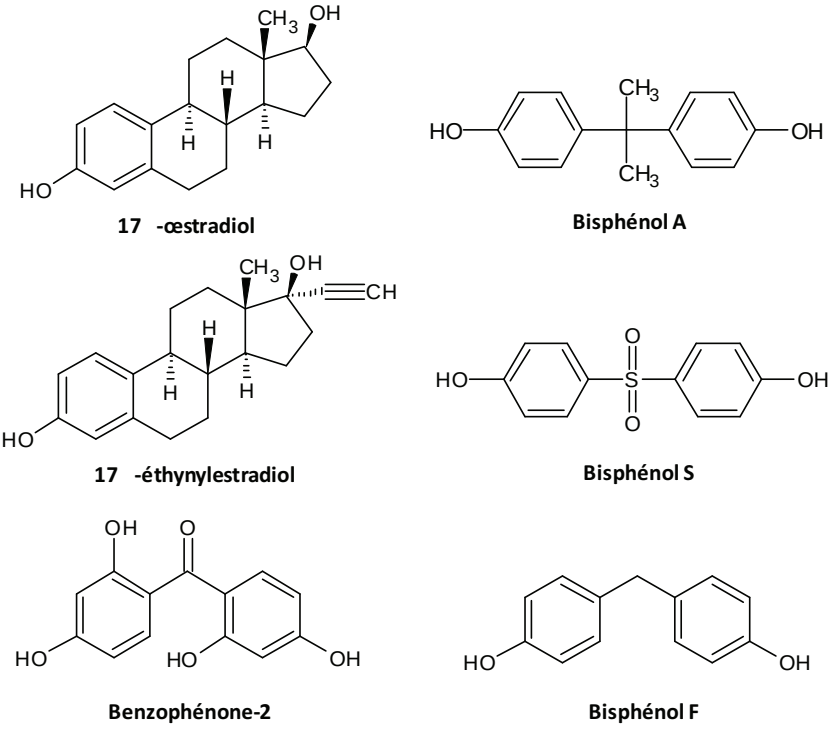


Figure 32. Formule chimique développée des molécules utilisées

II.3.1. 17 -œstradiol et éthinylestradiol

Ces deux molécules ont été utilisées comme témoins positifs d'une activité œstrogénique. La 17 -œstradiol (E2) est la principale hormone œstrogénique des vertébrés. L'éthinylestradiol (EE2) est le dérivé de synthèse de l'E2 le plus couramment utilisée dans les pilules contraceptives. Son activité œstrogénique et sa présence avérée dans l'environnement en font l'un des xéno-œstrogènes de référence.

II.3.2. Benzophénone 2

Les benzophénones sont des substances chimiques de synthèse qui ont la capacité d'absorber les rayonnements ultra-violets. Ces filtres UV sont, pour cette raison, utilisés dans de nombreux produits de consommation courante comme des revêtements (peinture, vernis), des plastiques alimentaires, des textiles et des produits cosmétiques (crèmes solaires, shampooings, baumes à lèvres). Ils sont utilisés comme adjuvent dans la majorité de ces produits ou bien en tant que substance active dans les crèmes solaires. L'utilisation de plus en plus fréquente de cette famille de composés chimiques entraine une contamination environnementale. Les benzophénones sont retrouvées dans les eaux usées, les rivières, les lacs, l'eau de mer à des concentrations de l'ordre du ng/L, dans le sol et les sédiments à des concentrations de l'ordre du ng/kg, et dans les poissons à des concentrations de l'ordre de ng/g de lipides (Balmer et al. 2005; Jeon et al. 2006; Zenker et al. 2008; Fent et al. 2010).

Les benzophénones, dont la benzophénone-2 (BP2), sont des PE capables de perturber différents types de fonctions hormonales. La BP2 a été caractérisée comme ayant des propriétés anti-androgéniques (Molina-Molina et al. 2008) et antithyroïdiennes (Schmutzler et al. 2007). Une altération de la stéroïdogenèse par la BP2 a également été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (Kim et al. 2011). Les propriétés œstrogéniques de différentes benzophénones, dont la BP2, ont été démontrées avec l'utilisation de différents modèles cellulaires d'origine humaine (Nakagawa et al. 2000; Schlumpf et al. 2001; Nakagawa et Suzuki 2002; Suzuki et al. 2005; Kunz et al. 2006; Molina-Molina et al. 2008). *In vivo*, l'effet œstrogénique de la BP2 a été montré chez le poisson à tête de boule (*Pimephales promelas*) par la mise en évidence d'une altération de la fonction de reproduction associée à une augmentation du taux de Vtg circulante (Weisbrod et al. 2007). Chez la souris, un hypospadias ER-dépendant a été retrouvé chez les nouveau-nés issus de mères exposées à la BP2 (Hsieh et al. 2007). Chez le rat, l'essai utérotrophique s'est révélé positif à la suite d'une exposition à la BP2 (Yamasaki et al. 2003).

Enfin, à ce jour, une seule étude décrivant les produits de transformation de la BP2 *in vivo* pour une espèce de mammifère (le rat) a été publiée. Deux métabolites de la BP2, un conjugué à l'acide glucuronique et un conjugué sulfate, ont été retrouvés dans le plasma et les urines chez le rat, après exposition par voie orale (Schlecht et al. 2008).

II.3.3. Bisphénols A, F et S

Les bisphénols, molécules issues de la synthèse chimique, sont des monomères utilisés dans la fabrication de résines époxydes et de polycarbonates. Ils sont principalement retrouvés dans certains plastiques. Le bisphénol le plus utilisé à ce jour est le bisphénol A (BPA) qui rentre dans la composition de très nombreux produits de consommation courante : matériaux plastiques, revêtements intérieurs des boîtes de conserve, laques, vernis, peintures, tickets de caisse, ciments dentaires, fluides caloporteurs, lubrifiants... (ANSES 2011). Comme expliqué dans le paragraphe III.2.1. de la synthèse bibliographique, depuis le 1er janvier 2013, les matières contenant du bisphénol A et en contact direct avec les aliments destinés aux enfants de moins de 3 ans sont interdites en France. Cette mesure s'est étendue à l'ensemble des contenants alimentaires à compter du 1er janvier 2015. D'autres bisphénols comme le bisphénol F et le bishpénol S sont potentiellement des composés de substitution pour le bisphénol A. Des études *in vivo* et *in vitro* réalisées chez l'Homme ou l'animal dont le poisson zèbre ont montré que ces trois bisphénols possèdent des activités de type œstrogénique. Toutefois, les cibles moléculaires de ces bisphénols ne sont pas restreintes aux récepteurs des œstrogènes (Olea et al. 1996; Perez et al. 1998; vom Saal et al. 1998; Chen et al. 2002; Yamasaki et al. 2002; Lindholst et al. 2003; Van den Belt et al. 2003; Kuruto-Niwa et al. 2005; Cabaton et al. 2009; Vandenberg et al. 2009; Grignard et al. 2012; Ji et al. 2013; Molina-Molina et al. 2013; Naderi et al. 2014).

Bisphénol A

Le bisphénol A présent dans l'environnement à une origine anthropique. Le BPA a été retrouvé dans tous les milieux environnementaux. Il a été identifié dans les rivières, les lacs, les estuaires et les océans. Les concentrations environnementales en BPA dans les eaux de différents pays sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de ng/L. Dans les sédiments, les concentrations en BPA mesurées sont de l'ordre du µg à la centaine de µg/kg (ANSES 2013). Le BPA a également été retrouvé chez l'Homme dans les urines et dans le sang (ANSES 2013). Le BPA total (BPA et métabolites) a été identifié dans plus de 90% des échantillons urinaires provenant de la population américaine (USA) (Calafat et al. 2008). D'autres études ont montré la présence de BPA (libre ou conjugué) dans le liquide amniotique (Yamada et al. 2002; Edlow et al. 2012), le sang de cordon ombilical (Lee et al. 2008; Chou et al. 2011) et le placenta humain (Jimenez-Diaz et al. 2010; Cao et al. 2012) suggérant une exposition fœtale, ce qui conforte les conclusions relatives à la distribution de ce composé chez l'animal, suite à

une exposition gestationnelle (Zalko et al. 2003). Différentes études épidémiologiques et expérimentales ont évalué les effets potentiels du BPA sur l'environnement et l'Homme. Selon les rapports de l'ANSES (ANSES 2011, 2013), certains effets du BPA, qualifiés d'avérés chez l'animal, touchent le cerveau et le comportement (modification histologique de la neurogénèse lors d'expositions pré ou périnatales), l'appareil reproducteur femelle (kystes ovariens, hyperplasie de l'endomètre, avancement de l'âge de la puberté, lors d'expositions pré ou postnatales), le métabolisme énergétique (altération de la lipogenèse lors d'une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte), l'appareil reproducteur mâle (altération de la production spermatique lors d'exposition à l'âge adulte) et la glande mammaire (accélération de la maturation et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires à l'âge adulte en lien avec une exposition pré ou périnatale). Chez l'Homme, les effets suspectés concernent l'appareil reproducteur femelle (maturation oocytaire chez la femme dans un contexte de procréation médicalement assistée), le système cardio-vasculaire (maladies coronariennes) et le métabolisme énergétique (diabète). Compte tenu des études animales, il est possible que le BPA joue un rôle dans les problèmes de fertilité masculine par ailleurs avérés. Le Bisphénol A est aujourd'hui considéré comme un xénobiotique de référence dans les études expérimentales portant sur les PE.

Différentes études portant sur la biotransformation du BPA ont été menées dans des modèles *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*. Chez la souris gestante, un conjugué glucuronide, plusieurs double-conjugués, et des conjugués méthoxylés excrétés dans les urines ont été mise en évidence (Zalko et al. 2003) suggérant la formation de petites quantités de métabolites réactifs *in vivo*. L'emploi de fractions microsomales hépatiques S9 de souris a permis de mettre en évidence l'oxydation du BPA et la production d'intermédiaires réactionnels dont la formation est dépendante des CYPs (Jaeg et al. 2004). Ces intermédiaires réactionnels sont responsables de la formation d'adduits à l'ADN (Atkinson et Roy 1995). Par ailleurs, le BPA entraine une inhibition de certaines formes de CYPs et interfère avec la conjugaison d'autres composés comme la testostérone et l'umbelliférone (Pfeiffer et Metzler 2004). Le BPA et ses métabolites conjugués (glucuronide et sulfate, simples ou doubles conjugués) sont majoritairement éliminés par voie urinaire chez l'Homme et par voie fécale chez le rat (Lindholst et al. 2003).

Bisphénols F et S

L'utilisation du bisphénol F (BPF) et du bisphénol S (BPS) en tant que substituts au BPA est déjà effective. En effet, le BPS a été retrouvé dans des cannettes et des boites de conserve (Vinas et al. 2010; Gallart-Ayala et al. 2011) et dans des tickets de caisses thermiques (Becerra et Odermatt 2012; Liao et al. 2012b). De plus, le BPS a été retrouvé dans plus de 81% des échantillons urinaires provenant de la population américaine (USA) (Liao et al. 2012a) suggérant une large exposition des populations. Bien que les concentrations environnementales du BPS et du BPF semblent être

inférieures à celle du BPA (Fromme et al. 2002; Stachel et al. 2003), la contamination environnementale par ces bisphénols de substitution devrait aller en augmentant avec leur utilisation.

Selon les modèles cellulaires utilisés, il a été montré que le BPS exerce une activité œstrogénique plus faible (Molina-Molina et al. 2013) ou similaire à celle du BPA (Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Kitamura et al. 2005; Kuruto-Niwa et al. 2005; Grignard et al. 2012). Récemment, deux études menées chez le poisson zèbre adulte exposé au BPS ont mis en évidence une altération de la fécondité (diminution de la qualité spermatique) et des troubles hormonaux (hormones stéroïdes, hormones thyroïdiennes) (Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014). Concernant le BPF, des études ont également confirmé son activité œstrogénique *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* (Perez et al. 1998; Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Yamasaki et al. 2002; Stroheker et al. 2004; Cabaton et al. 2009; Molina-Molina et al. 2013).

Les études de biotransformation du BPF avec des systèmes subcellulaires comme des fractions microsomales ou des fractions S9 de foie ont révélé la formation de métabolites de phase II (glucurono- et sulfoconjugués) et de phase I. Plusieurs métabolites hydroxylés ont été identifiés. Les métabolites de phase I majoritaires sont les BPF *méta*- et *ortho*-hydroxylés (catéchol) dont la formation est dépendante des CYPs (Cabaton et al. 2008). Chez le rat, l'excrétion du BPF et de ses métabolites est majoritairement urinaire. Plusieurs métabolites du BPF y ont été retrouvés, le métabolite majoritaire étant dans ce cas un conjugué sulfate. Chez la ratte gestante, le BPF et ses métabolites ont été détectés dans l'utérus, le placenta, le liquide amniotique et le fœtus (Cabaton et al. 2006). Concernant le BPS, les premières informations relatives à sa biotransformation proviennent du travail réalisé dans le cadre de cette thèse (articles 3 et 4, paragraphe IV et V de la partie résultats).

II.3.4. Molécules retenues pour les études de biotransformation

Deux molécules ont été sélectionnées pour l'étude de leur devenir dans les modèles biologiques. Il s'agit de la benzophénone-2 et du bisphénol S. Ce choix se justifie d'une part par les résultats précédemment obtenus, qui montraient une différence de réponse œstrogénique entre des modèles biologiques du poisson zèbre, et d'autre part, par l'intérêt que présentent ces molécules émergeantes d'un point de vue environnemental, et plus généralement, d'un point de vue de sécurité sanitaire.
L'étude du devenir de ces molécules nécessitait leur marquage radioactif. Pour ceci, ces molécules ont été synthétisées avec un marquage au tritium sur les noyaux aromatiques, par des prestataires spécialisés.

II.4. Modalités d'exposition des modèles biologiques aux xénobiotiques

II.4.1. Evaluation du potentiel œstrogénique de PE

II.4.1.1. Cultures cellulaires

II.4.1.1.1. Culture primaire d'hépatocytes de poisson 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 co-encadrant mon travail de thèse. Cette mise au point a été réalisée sur la base de protocoles précédemment décrits chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Bjorkblom et al. 2007) et le poisson zèbre (Ibabe et al. 2005). La modification de différents paramètres clefs des différentes étapes de la mise en culture a conduit à l'établissement d'un procédé finalisé détaillé dans l'article 3 (paragraphe IV de la partie résultats) (Le Fol et al. 2015). Le foie étant richement **VASCULARISE**, l'une des difficultés a été l'élimination du plus grand nombre d'hématies possible au cours des étapes de mise en culture. La composition de la solution de lavage, la composition de la solution de dissociation, les différents paramètres de dissociation (durée, température, agitation, aspiration/refoulement), le procédé de filtration, les centrifugations et la densité d'ensemencement ont fait l'objet d'essais successifs.

L'exposition des hépatocytes en culture primaire a été réalisée en plaques 96 puits pendant 96 heures à 28°C ± 2°C (Figure 33). Les cellules ont été exposées dans un milieu de culture LDF sans rouge de phénol contenant du SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté et déstéroïdé (5% v/v). Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO (0,15% v/v). Le 17 -œstradiol a été utilisée comme contrôle positif de l'induction de l'expression de la vitellogénine. Le contrôle négatif correspondait à des cellules exposées à du DMSO sans xénobiotique. La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) a été utilisée pour la mesure de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufin *O*-deéthylase), test enzymatique reflétant l'activité des CYP1A. La moitié du milieu de culture a été renouvelée à 48h. A la fin de l'exposition, le milieu de culture de chaque puits a été récupéré puis stocké à -80°C. La mesure de l'activité EROD sur les cellules des puits et l'analyse de la quantité de vitellogénine par ELISA ont ensuite été entreprises.

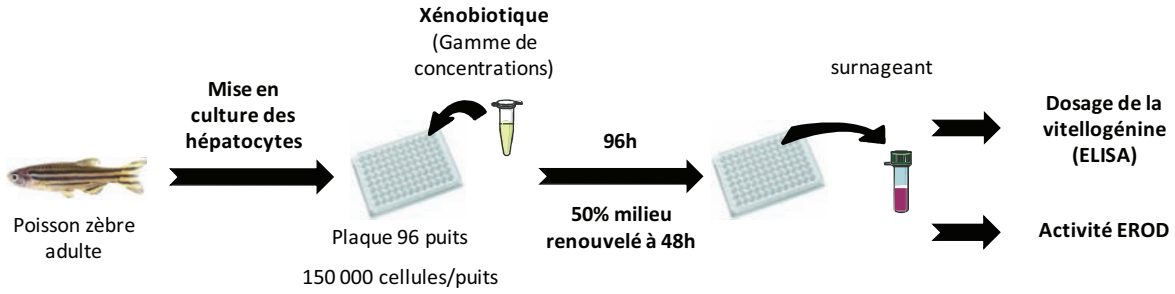


Figure 33. Exposition d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire en vue du dosage de la vitellogénine et de la mesure de l'activité EROD

II.4.1.1.2. *Lignées cellulaires ZELH-zfERs*

Les lignées cellulaires transfectées ZELH-zfERs ont été développées au laboratoire INERIS (Cosnefroy et al. 2012). Les conditions de culture utilisées dans ce travail ont été identiques à celles mises au point précédemment (Figure 34). Brièvement, les cellules ont été mises en culture à 28°C ± 2°C dans du milieu LDF - SVF décomplémenté (5% v/v) et dans du LDF sans rouge de phénol - SVF décomplémenté et déstéroïdé (5% v/v) lors de l'exposition aux xénobiotiques. Suivant la lignée, les densités cellulaires auxquels ont été ensemencées les cellules en plaque 96 puits, étaient les suivantes : ZELH-zfER et 1 à 25000 cellules par puits ; ZELH-zfER 2 à 75000 cellules par puits. Après une nuit, les cellules ont été exposées aux xénobiotiques dissous dans du DMSO (0,15%, v/v) et mises à incuber pendant 72h. Le potentiel œstrogénique des xénobiotiques a ensuite été évalué par la mesure de l'activité de la luciférase.

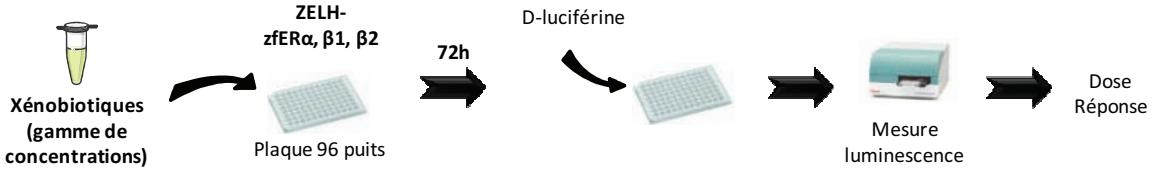


Figure 34. Exposition des cellules ZELH-zfERs en vue de la mesure de l'activité luciférase

II.4.1.2. Larve transgénique *cyp19a1b*-GFP et larves sauvages de poissons zèbres

Le procédé d'exposition a été le même pour les larves transgéniques et pour les larves sauvages (Figure 35). Après la ponte, les œufs fécondés ont été triés sous loupe binoculaire. Dans le cas des larves transgéniques, une mesure de fluorescence a été faite sur chacune des larves. Une quinzaine d'œufs fécondés a été regroupée par condition expérimentale, et l'expérimentation a été réalisée en triplicat. Dans le cas des larves sauvages, le taux de transcrits a été évalué sur un pool de 25 larves par condition, et chacune des conditions a été répétée 3 fois. Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO puis dans l'eau. La concentration finale en DMSO était de 0,01% (v/v). Le témoin négatif correspond à une exposition à cette dilution de DMSO. Les larves ainsi exposées ont été placées dans une étuve à 28°C ± 2 avec un cycle jour/nuit de 14/10 h. La moitié de l'eau a été renouvelée toutes les 24 h. A la fin des 96 heures d'exposition, les larves ont été récupérées pour une mesure de fluorescence dans le cas des larves transgéniques, ou bien pour un stockage à -80°C en vue de l'analyse de l'expression des transcrits dans le cas des larves sauvages.

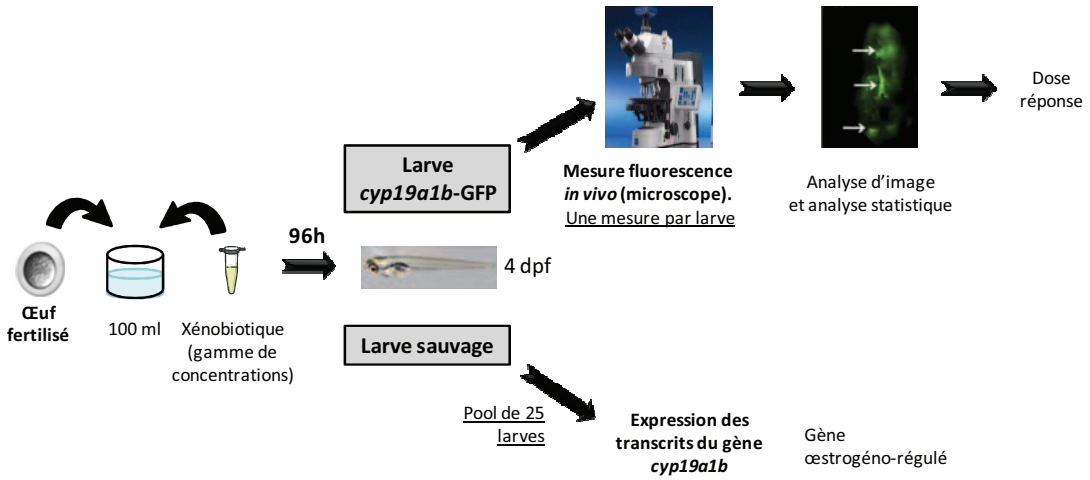


Figure 35. Exposition des larves cyp19a1b-GFP et larves sauvages en vue de mesures de fluorescence et d'analyses d'expression de transcrits

II.4.1.3. Poisson zèbre adulte

Les poissons zèbres adultes mâles ont été exposés pendant 7 jours à différents xénobiotiques (Figure 36). La voie d'exposition retenue a été l'eau. Cette voie d'exposition est couramment utilisée au laboratoire et permet des prélèvements d'échantillons d'eau pour une quantification du xénobiotique. Les poissons ont été exposés dans des aquariums de 4 L d'eau en conditions semi-statiques. Pour chacune des conditions expérimentales, huit poissons ont été exposés. Ce nombre de poissons permet de limiter un stress potentiel dû à une surpopulation. L'eau a été renouvelée toutes les 24h. Lors du

changement d'eau, une nouvelle dose de xénobiotique a été ajoutée. Les molécules à l'étude ont été dissoutes dans du DMSO 0,006% (v/v), solvant qui n'entraine pas de toxicité à cette concentration. De plus, des études réalisées au laboratoire ont montré une absence de modifications des paramètres biochimiques chez les poissons pour ce solvant ou pour de l'eau sans DMSO. Les poissons des aquariums témoins ont été exposés au DMSO à la dilution de 0,006% (v/v). Les conditions d'exposition ont été contrôlées quotidiennement par le suivi de paramètres physicochimiques de l'eau (température, pH, conductivité et concentration en oxygène dissous).

Les concentrations en xénobiotique ont été déterminées avant le dernier renouvellement d'eau (24h après la dernière exposition). Les échantillons d'eau ont été purifiés et concentrés sur colonne SPE (Solid Phase Extraction). La concentration en xénobiotiques a été évaluée par CLHP à l'aide d'une gamme de standards.

A la fin de l'exposition, les poissons ont été sacrifiés à l'aide d'eau glacée (mélange de glace et d'eau). Cette méthode d'euthanasie est spécifique des poissons d'eau chaude. Pour chaque poisson, le poids et la taille ont été mesurés. Différents organes et tissus ont été prélevés : (1) 10 µL de sang dans du PBS hépariné conservés à -20°C, (2) le foie, le cerveau et une des deux gonades dans du RNAlater® (Sigma-Aldrich, France) et conservés à -20°C en vue d'analyses potentielles d'expression de gènes, (3) une gonade par animal a été recueillie dans du liquide de Bouin pour des analyses histologiques et immunohistochimiques potentielles.

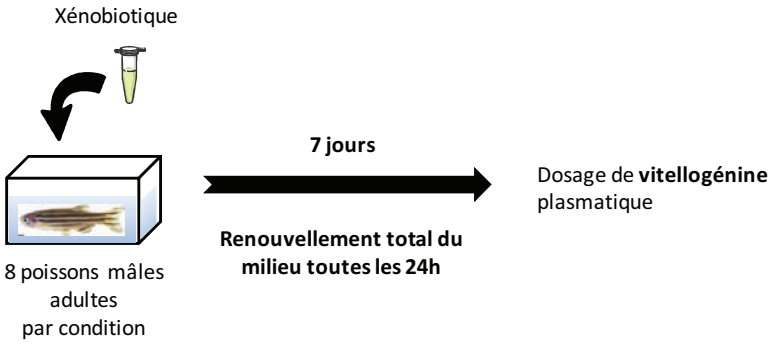


Figure 36. Exposition de poissons zèbres adultes mâles en vue du dosage de la vitellogénine

II.4.2. Etudes de biotransformation

II.4.2.1. Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires humaines (MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG) et de poisson zèbre (ZFL, ZELH-zfER et ZELH-zfER 2) ainsi que les cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH) ont été exposées à la ^{3}H-BP2 et au ^{3}H-BPS pour l'étude de leur biotransformation dans les modèles biologiques (Figures 37 et 38).

Les modèles cellulaires du poisson zèbre ont été cultivés à 28°C dans des milieux de culture identiques à ceux utilisés pour l'étude de l'activité œstrogénique des xénobiotiques (Cosnefroy et al. 2012). Les modèles cellulaires humains ont été cultivés à 37°C ± 2 dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé pour les cellules MELN et T47D-KBLuc a été celui décrit précédemment (Molina-Molina et al. 2008). Les cellules HepaRG ont également été utilisées dans des conditions déjà décrites (Aninat et al. 2006). Brièvement, les milieux de culture des cellules MELN et T47D-KBLuc se composaient principalement de DMEM enrichi en SVF décomplémenté (15% v/v), du MEM enrichi en SVF décomplémenté (10% v/v) pour les cellules HepG2, et du Williams' E enrichi en SVF (10% v/v) pour les cellules HepaRG. Après 24h de culture, le milieu a été remplacé par du milieu sans SVF pour HepG2 et HepaRG, ou par du milieu contenant du SVF décomplémenté et déstéroïdé pour MELN et T47D-KBLuc (cas identique aux modèles cellulaires du poisson zèbre). Toutes les expérimentations ont été réalisées dans des milieux sans rouge de phénol.

Les modèles cellulaires ZFL, ZELH-zfERs, MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG ont été ensemencés à 350 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits contenant 2 ml de milieu par puits. Les hépatocytes en culture primaire ont été ensemencés à 195 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits contenant 500 µL de milieu par puits. Ces densités cellulaires ont été choisies afin de garantir un même ratio nombre de cellules/ surface du puits pour tous les modèles. Après les 24 premières heures, le milieu d'ensemencement a été remplacé par 1 ml du milieu d'exposition pour les cellules ZFL, ZELH-zfERs, MELN, T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG, et par 310 µl du milieu d'exposition pour les hépatocytes en culture primaire. Ces volumes ont permis de conserver un même ratio surface du puits/ hauteur du milieu de culture.

Les solutions de ^{3}H-BP2 (5045 Bq par puits) et le ^{3}H-BPS (5045 Bq par puits) ont été complétées par l'ajout de BP2 et BPS non radiomarqués pour atteindre les concentrations finales de 0,1, 1, 10, 20, 50, 100, 150 et 200 µM dans les milieux de culture. La BP2 et le BPS radiomarqués et non radiomarqués ont été dissous dans du DMSO dont la concentration finale dans les milieux de culture était de 0,1 % (v/v). Dans ces études de biotransformation, le témoin négatif (200 µM) a été réalisé dans les mêmes

conditions de culture mais sans les cellules. Il s'agissait, dans ce cas, d'évaluer la stabilité (ou la dégradation) de la molécule radiomarquée en l'absence de cellules.

Après 24 heures d'exposition, les milieux de culture ont été récupérés et conservés à -20°C. Les cellules ont été décollées des puits et lysées par un grattage du puits dans une solution H_20/CH_3CN (50:50, v/v). Ce milieu a été conservé, lui aussi, à -20°C.

La radioactivité dans les milieux de culture et dans les milieux contenant les cellules lysées a été quantifiée par scintillation liquide avant de procéder à l'analyse de leur contenu par radio-CLHP.

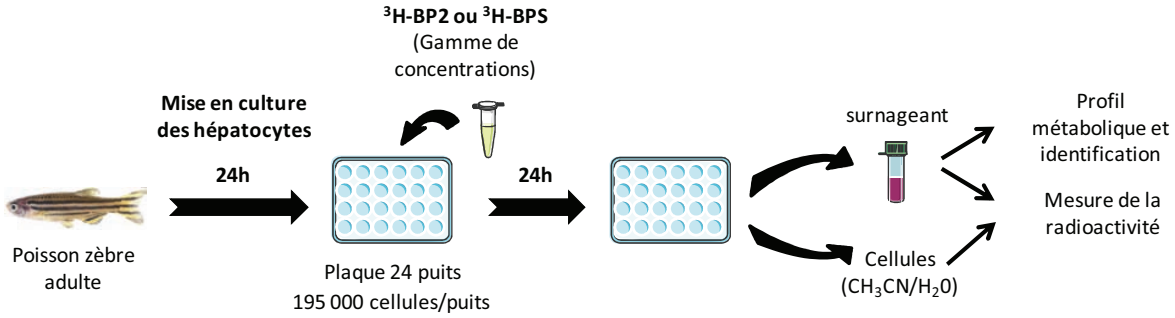


Figure 37. Exposition des hépatocytes de poisson zèbre mâle en culture primaire pour l'étude du devenir des xénobiotiques

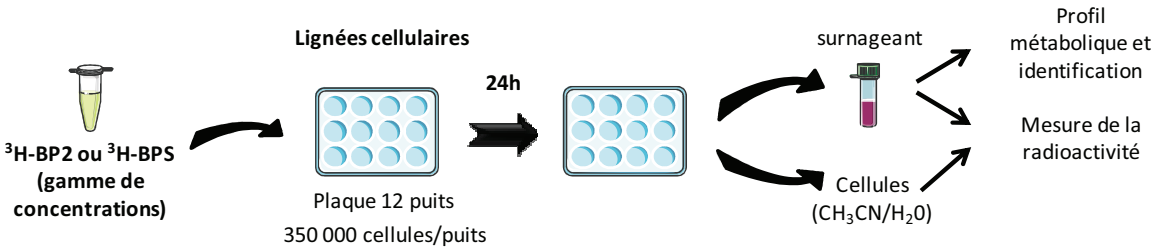


Figure 38. Exposition des lignées cellulaires humaines et des lignées de poisson zèbre pour l'étude du devenir des xénobiotiques

Pour chaque condition d'exposition, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée au PrestoBlue®. Dans ce test, le pouvoir réducteur des cellules viables entraine la transformation de la résazurine bleue en un composé rouge, associée à l'émission d'une fluorescence. Pour chaque modèle cellulaire, les cellules ont été ensemencées en plaques 96 puits dans les mêmes conditions que décrites précédemment, à une densité cellulaire de 25 000 cellules par puits pour ZFL et ZELH-zfER , de 75 000 cellules par puits pour ZELH-zfER 2, et de 50 000 cellules par puits pour PZFH, MELN,

T47D-KBLuc, HepG2 et HepaRG. Après 24 h de culture, le milieu a été remplacé par le milieu d'exposition non radiomarqué correspondant. Les cellules ont été exposées à 0,1, 1, 10, 20, 50, 100, 150 et 200 µM pendant 24 h. Le milieu de culture a alors été remplacé par du PrestoBlue® dilué dans le milieu correspondant à la lignée cellulaire. Après 2 heures d'incubation, la fluorescence émise a été mesurée par spectrométrie. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage du témoin négatif (DMSO).

II.4.2.2. Larves sauvages

Le devenir de la BP2 et du BPS a été exploré sur des larves sauvages, et non sur des larves transgéniques, pour des raisons de conditions d'élevage et de stabulation des poissons. Chaque condition expérimentale a été obtenue sur la base d'un ensemble de 60 œufs fécondés, triés sous loupe binoculaire, placés dans un volume d'eau claire de 50 mL (Figure 39). L'eau (vecteur de l'exposition) contenait un mélange de la molécule radiomarquée et de la molécule non radiomarquée, pour obtenir la concentration finale de 1 µM et une quantité de radioactivité de 841 000 Bq par condition. La concentration de 1 µM a été choisie d'une part car elle permettait d'obtenir une quantité de matière radiomarquée suffisante pour le volume d'eau des expérimentations et d'autre part, car c'est une concentration couramment utilisée dans les études toxicologiques et également présente comme point de gamme dans nos modèles cellulaires. Nos expérimentations préliminaires avaient par ailleurs démontré que l'utilisation d'une concentration de 0,1 µM ne permettait pas de travailler avec une quantité de radioactivité suffisante pour nos objectifs de profilage radio-CLHP. Les xénobiotiques ont été dilués dans du DMSO (0,01 % v/v final). Pour les témoins, nous avons procédé à l'identique mais sans poisson et en utilisant une eau d'élevage (et non une eau claire) ce qui nous permettait de nous assurer de la stabilité du xénobiotique dans les conditions expérimentales. Un bain-marie a été utilisé afin de garantir une température d'exposition de 28°C ± 2, et un cycle jour/nuit de 14/10 h a été mise en place.

Après 24 h d'exposition à la BP2 ou au BPS non radiomarqué, la totalité de l'eau a été éliminée. Les œufs ont alors été exposés aux mélanges radiomarqué/non radiomarqué dans 50 mL d'eau claire. Pendant les 72 h suivantes, c'est-à-dire jusqu'au stade 4 dpf, l'eau n'a pas été renouvelée. Ce procédé d'exposition à été adapté d'après celui utilisé pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques par les larves transgéniques. Une durée totale d'exposition de 96 h d'exposition a ainsi été conservée et un renouvellement du milieu a été maintenu à la fin des 24 premières heures. L'absence de renouvellement de l'eau pendant les 72 h suivantes a été choisi afin d'obtenir une plus grande concentration en métabolites et de faciliter l'interprétation des résultats. Cette absence de renouvellement d'eau n'a pas de conséquence sur la qualité de l'exposition comme l'ont démontré des

expérimentations antérieures visant à évaluer l'activité œstrogénique de composés chimiques (résultats préliminaires non montrés).

A la fin de l'exposition, l'eau a été récupérée pour quantifier la radioactivité et a été conservée à -20°C en vue des profilages métaboliques par radio-CLHP. Les larves ont été euthanasiées par l'ajout d'un faible volume d'eau refroidie à 4°C (0,7 à 1 mL). Les étapes d'extraction des xénobiotiques et de leurs métabolites à partir des larves fraiches ont alors été entreprises. La verrerie a été rincée à plusieurs reprises par des solvants afin de récupérer la totalité de la radioactivité. La radioactivité de ces rinçages a également été mesurée pour être inclue dans le bilan de radioactivité.

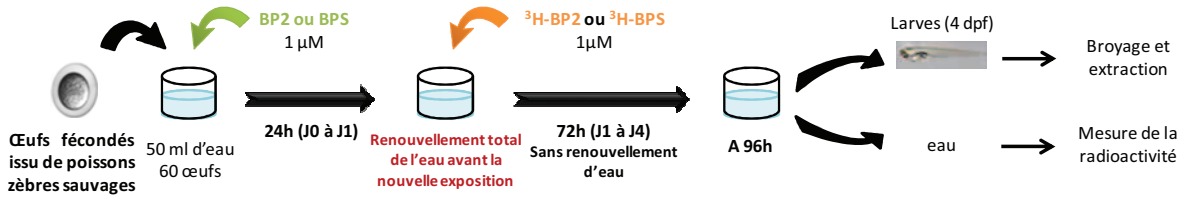


Figure 39. Exposition des larves pour l'étude du devenir des xénobiotiques

II.4.2.3. Poisson zèbre adulte

Dans cette étude de biotransformation, la principale difficulté a été d'avoir un nombre suffisant d'animaux par volume d'eau (biomasse) pour s'assurer d'obtenir une quantité suffisante de radioactivité et pouvoir quantifier chacun des métabolites formés. La condition expérimentale de 8 poissons zèbres adultes pour 4 litres d'eau (soit environ 1 g de poisson par litre d'eau) utilisée pour l'évaluation de l'activité œstrogénique de xénobiotiques, ne nous permettait pas d'atteindre la biomasse suffisante à la quantification des métabolites. Par conséquent, une étude préalable a été menée afin de s'assurer de la faisabilité d'une exposition de poisson zèbre adulte à une biomasse de 10 g de poisson par litre d'eau. Cette étude a montré une absence de variabilité significative des paramètres physico-chimiques de l'eau (oxygène dissout, conductivité, pH, température) et une absence de mortalité et de signes de souffrance de l'animal sur une période de 48 heures. Une exposition préliminaire de poissons zèbres adultes à la ^{3}H-BP2 à une biomasse de 5 g/L a notamment permis de montrer la faisabilité de cette étude à ce niveau de biomasse, deux fois inférieur à celui évalué précédemment sans exposition.

La voie d'exposition retenue pour les expérimentations visant à évaluer l'activité œstrogénique de composés chimiques a été conservée pour les études de biotransformation. Les poissons ont été

exposés aux xénobiotiques à une biomasse de 5 g par litre d'eau, soit 14 à 16 poissons dans 1,5 litre d'eau claire. L'eau radioactive servant à l'exposition a été obtenue par un mélange ^{3}H-BP2/BP2 ou ^{3}H-BPS/BPS pour atteindre une concentration finale de 1 µM et une quantité de radioactivité de 1 009 000 Bq par condition. La concentration de 1 µM a été retenue pour les mêmes raisons que dans le cas des larves. Les xénobiotiques ont été dissous dans du DMSO (0,005% v/v final). La condition témoin a été obtenue dans les mêmes conditions expérimentales mais en utilisant une eau d'élevage (différente de l'eau claire) et sans poisson. Les potentielles dégradations des molécules radiomarquées notamment par les micro-organismes de l'eau ont alors pu être examinées. Les aquariums ont été placés dans une étuve permettant d'assurer une température d'exposition de 28°C ± 2 et un cycle jour/nuit de 14/10 h.

Le schéma d'exposition (Figure 40) a été adapté de celui utilisé dans la cadre de l'évaluation de l'activité œstrogénique des composés chimiques. Une durée totale d'exposition de 7 jours a été maintenue. Lors des 4 premiers jours, les poissons ont été exposés à une molécule non radiomarquée, et un renouvellement total de l'eau a été réalisé. A partir du 4ième jour, les poissons ont été exposés au mélange radiomarqué/non radiomarqué. L'eau n'a pas été renouvelée jusqu'au 7ième et dernier jour d'exposition. La durée de 72 h sans renouvellement d'eau a permis d'obtenir une plus grande concentration en métabolites et de faciliter l'interprétation des résultats.

De petits échantillons d'eau ont été prélevés au cours de l'exposition, de J4 à J7, afin de quantifier la radioactivité aux heures 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 et 72 (comptées à partir de J4). A la fin de l'exposition, l'eau a été récupérée pour réaliser des comptages de radioactivité, puis stockée à -20°C en vue des profilages métaboliques par radio-CLHP. La radioactivité présente dans les rinçages successifs de l'ensemble de la verrerie et des ustensiles utilisés a également été mesurée. Après avoir sacrifié les poissons dans un volume minimal d'eau refroidie (100 ml), les poissons ont été pesés individuellement puis stockés à -80°C avant les étapes de broyage, d'extraction et de profilage métabolique. L'eau d'euthanasie des poissons a également fait l'objet d'une quantification de la radioactivité.

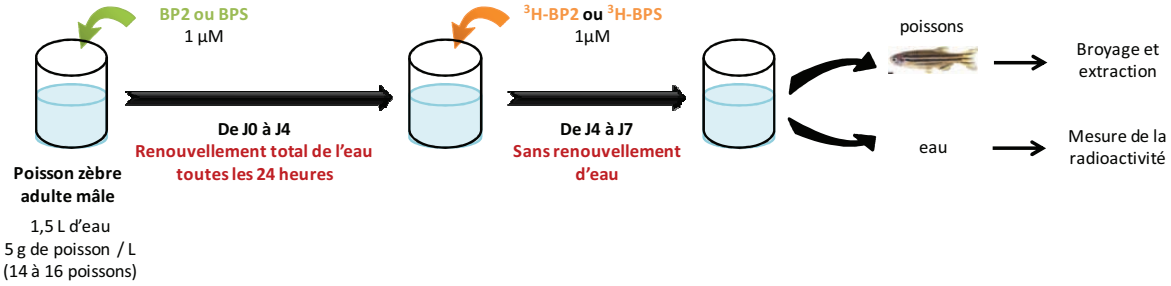


Figure 40. Exposition des poissons zèbres adultes pour l'étude du devenir des xénobiotiques

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité œstrogénique

L'activité œstrogénique des xénobiotiques a été évaluée par l'utilisation de différentes techniques et méthodes selon les modèles cellulaires et animaux : dosage par ELISA de la vitellogénine dans le milieu de culture et dans le sang, activité luciférase, induction de l'expression de la GFP, évaluation du taux de transcrits de gènes œstrogéno-régulés.

II.5.1. Concentration en vitellogénine dans les milieux de culture et dans le sang

Une technique d'immunomarquage ELISA indirect et par compétition (Brion et al. 2002) a été utilisée pour le dosage de la vitellogénine (Vtg) présente dans le surnageant de culture ou dans le sang des poissons (Figure 41). Le principe est basé sur une compétition pour les anticorps (primaires) anti-Vtg (anticorps polyclonaux de Vtg de poisson zèbre DR-264) entre la Vtg contenue dans l'échantillon (surnageant de culture ou sang) et la Vtg purifiée de poisson zèbre (zf-Vtg) fixée sur une microplaque. D'une part, la Vtg purifiée (zf-Vtg) a été fixée sur une microplaque 384 puits sur la nuit. D'autre part, l'échantillon contenant la Vtg à doser et une solution standard de zf-Vtg ont été dilués plusieurs fois. Une quantité connue et excédentaire d'anticorps primaire anti-Vtg a alors été ajoutée à chacune des dilutions pour obtenir la formation de complexes anticorps/antigène. Le lendemain, lors du transfert de ces solutions dans la plaque contenant l'antigène zf-Vtg fixé, les anticorps primaires libres ont pu former un complexe avec la zf-Vtg de la plaque. Les complexes précédemment établis ont été éliminés par des lavages. L'incubation d'un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire, couplé à la peroxydase du raifort, a permis, par l'ajout de son substrat (le tétraméthyl benzydine (TMB)), une quantification colorimétrique (absorbance) par spectrophotométrie. Par conséquent, dans ce dosage

Vtg par ELISA, plus l'échantillon est riche en Vtg, plus le signal à 450 nm est faible, et inversement. Pour déterminer l'absorbance maximale (*B*0), des échantillons contenant seulement de l'anticorps primaire (pas de Vtg) ont été incubés pour chaque série de dosage.

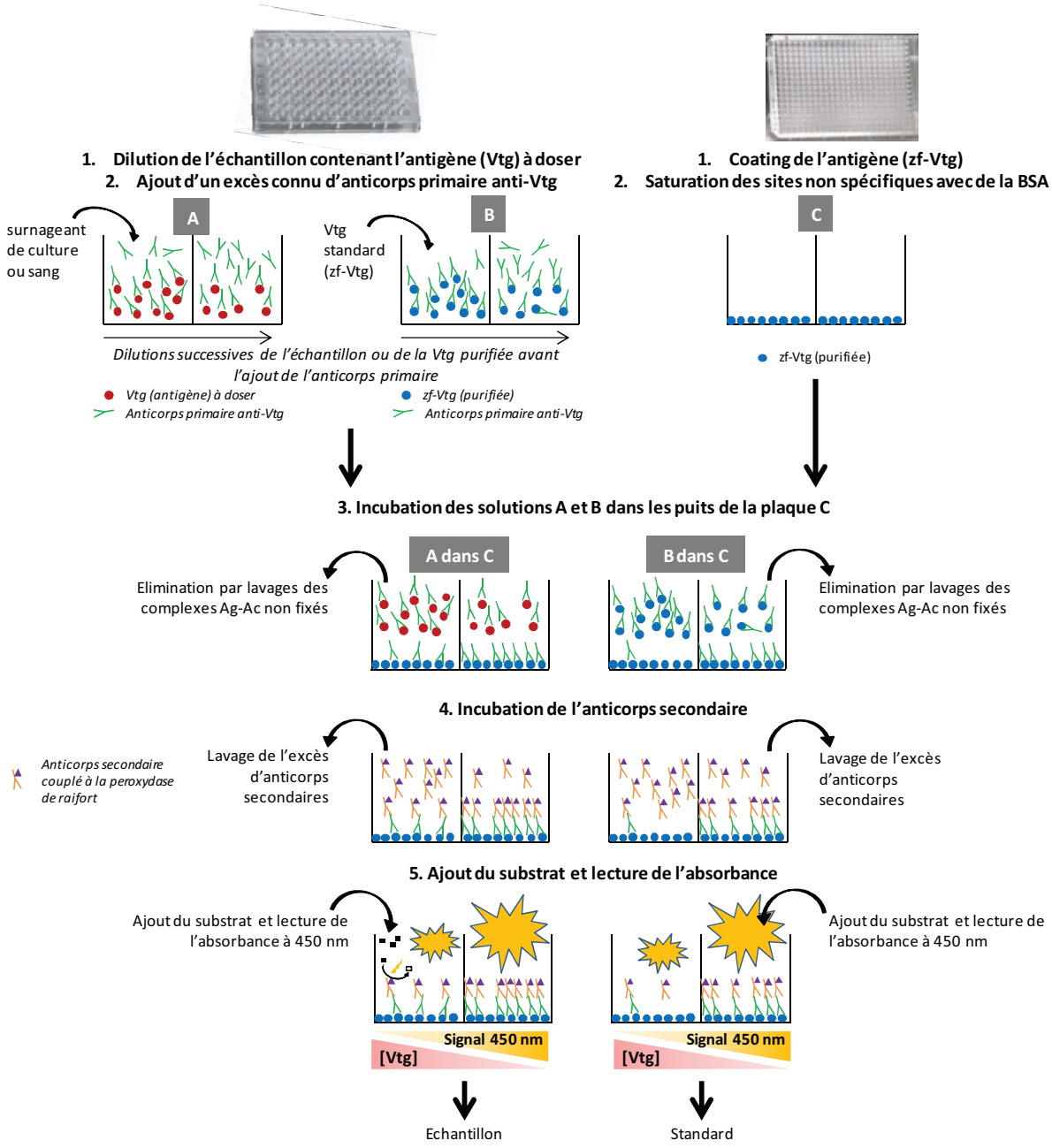


Figure 41. Principe du dosage ELISA compétitif et indirect de la vitellogénine du poisson zèbre
D'après (Brion et al. 2002). BSA : bovine serum albumine, Vtg : vitellogénine

Le pourcentage de fixation de l'anticorps primaire dans le puits (B_i/B_0) a été calculé d'après l'équation suivante :

$$\frac{B_i}{B_0} = \left[\frac{\text{Absorbance du standard ou de l'échantillon} - \text{bruit de fond}}{\text{Absorbance de la fixation maximale} - \text{bruit de fond}} \right] \times 100$$

Bi/B_0 = 100% correspond à la situation où l'échantillon ne contient pas de Vtg. Tout l'anticorps primaire a pu se fixer à l'antigène purifié (zf-Vtg) fixé à la plaque.

B_i/B_0 = 0% correspond à la situation où l'échantillon est très chargé an antigène à doser (Vtg). Tout l'anticorps primaire a été saturé en Vtg pendant l'étape de pré-incubation (Figure 41, étape 2) avec l'échantillon. Aucun anticorps primaire n'a alors pu se fixer à l'antigène purifié (zf-Vtg) fixé à la plaque.

La figure suivante représente le dosage de la Vtg purifiée.

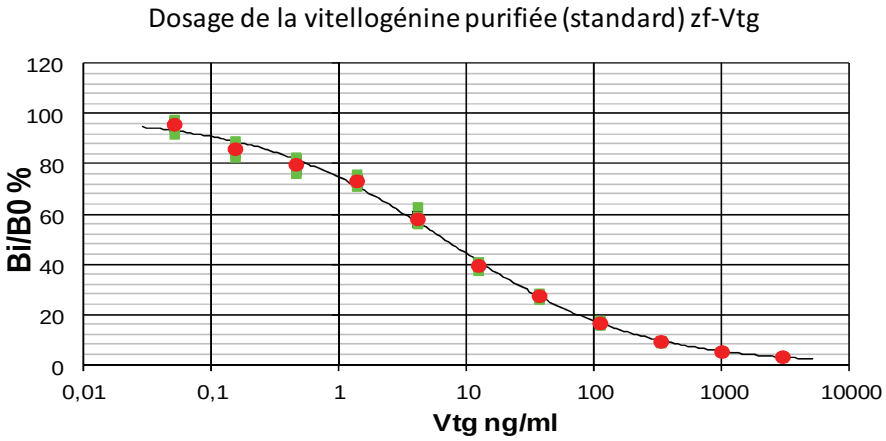


Figure 42. Dosage ELISA du standard de vitellogénine (zf-Vtg)
Ce dosage correspond à la situation « B dans C » de la Figure 41

II.5.2. Activité EROD

Dans le cadre de la caractérisation du modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH) qui a été mis en place, l'activité EROD (7-éthoxyrésorufin *O*-deéthylase) qui reflète celle des CYP1A, a été évaluée comme décrit précédemment (Laville et al. 2004). A la fin de l'exposition des hépatocytes (96h), le milieu a été remplacé par 100 µL de milieu sans sérum contenant de la 7-éthoxyrésorufine. La cinétique de production de la résorufine a été suivie pendant 45 minutes par fluorométrie. A la suite, un dosage des protéines totales a été réalisé par l'emploi de la fluorescamine (Lorenzen et Kennedy 1993). Brièvement, après une étape de congélation décongélation des cellules, une gamme d'albumine sérique de bœuf (BSA) a été réalisée pour permettre la quantification des protéines totales contenues dans les cellules. Suite à l'ajout de la fluorescamine dans chaque puits et après une incubation de 10 minutes à l'abri de la lumière, la fluorescence émise a été mesurée. L'activité EROD a alors été rapportée à la quantité de protéines totales, et exprimée en pmol de résorufine / min/ mg de protéine.

II.5.3. Taux relatifs de transcrits

Les variations d'expression des gènes *cyp19a1b*, *vtg1* et *vtg2* (Tableau 26) ont été mesurées chez la larve sauvage. Ces mesures ont permis d'appréhender l'effet œstrogénique des substances étudiées en complément des résultats obtenus dans le modèle larve transgénique *cyp19a1b*-GFP.

Tableau 26. Caractéristiques des gènes cibles et du gène de référence

Nom	Nom développé	Fonction de la protéine	Séquence de l'amorce sens (5' vers 3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5' vers 3')	Numéro d'accès
cyp19a1b	Cytochrome P450, famille 19, sous-famille A, polypeptide 1b	Stéroïdogenèse	ACTAAGCAAGTCC TCCGCTGTGTACC	TTTAAACATACCTA TGCATTGCAGACC	NM_131642.1
vtg1	Vitellogenin 1	Précurseur de protéines du sac vitellin	AACGAACAGCGAG AAAGAGATTG	GATGGGAACAGCGA CAGGA	NM_0010448 97.2
vtg2	Vitellogenin 2	Précurseur de protéines du sac vitellin	GGCTCAGTTCAAG GACAAGC	TTGCAAAGCAACCAC AAGAG	Gene ID: 559931
gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Enzyme impliquée dans l'oxydation du glucose	GAGCACCAGGTTG TGTCCA	TGTCATACCATGTGA CCAGCTT	Gene ID: 317743

Les gènes *cyp19a1b, vtg1* et *vtg2* ont été quantifiés par PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction). L'ARN total a été extrait des larves par l'emploi de Trizol®. La qualité des ARN totaux a été vérifiée par migration sur gel d'agarose. Après une quantification et une normalisation de la concentration en ARN total, une étape de transcription inverse a permis l'obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN.

La validité des amorces a été vérifiée auparavant sur des échantillons témoins afin d'évaluer leur spécificité et leur qualité. Une PCR classique suivie d'une migration sur gel d'agarose a permis d'évaluer leur spécificité et la taille de l'amplicon. Des essais de PCR quantitative ont été réalisées sur des échantillons témoins afin d'évaluer l'efficacité de la réaction PCR selon les amorces et leur concentration.

La PCR quantitative a été réalisée sur les ADNc. Le principe de la PCR est l'amplification d'un brin d'ADNc, spécifique d'un gène, à l'aide d'un couple d'amorces. Cette amplification, réalisée par un thermocycleur, se déroule selon des cycles de PCR caractérisés par trois étapes, chacune correspondant à une température spécifique : (1) la dissociation des ADNc « double brin », (2) l'hybridation des amorces, et (3) l'élongation de l'amplicon grâce à l'enzyme polymérase. Dans notre cas, l'amplification des brins d'ADNc a été évaluée par l'utilisation du SYBR Green®. Ce composé se lie aux doubles brins au fur et à mesure de leur formation au cours de l'élongation. A chaque cycle, la fluorescence mesurée, augmente avec la quantité d'acides nucléiques. Cette augmentation de

fluorescence est liée à l'efficacité de l'amplification qui est théoriquement de 2. La fluorescence mesurée est donc en relation avec la quantité de produits d'amplification obtenue, qui est elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc. Après n cycles, la fluorescence dépasse un seuil de détection. Plus l'ADNc est concentré, plus son cycle de sortie appelé Ct (« Cycle treshold ») est bas, c'est-à-dire qu'un plus faible nombre de cycles de PCR est nécessaire pour atteindre ce Ct.

Les résultats des PCR quantitatives ont été exprimés en taux de transcrits du gène cible de manière relative à un gène de référence (*gapdh*) pour lequel l'absence de variation des taux de transcrits selon les traitements subies par les larves a été vérifiée. La méthode de quantification relative, souvent utilisée, pour laquelle le taux d'expression des ARNm est obtenu selon le calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$, fixe arbitrairement l'efficacité de la PCR à 2. Or, la valeur réelle d'efficacité peut varier. Dans notre cas, l'expression des résultats tient compte de cette variabilité d'efficacité de la PCR (efficacité minimale retenue : 1,8). Le programme associé au thermocycleur Eppendorff realplex4 Mastercycler epgradient S, permet de calculer, à partir d'une gamme de concentration d'ADNc, une concentration en µg/µL pour chaque Ct. Ainsi, grâce à cette gamme d'ADNc obtenue par dilutions successives, le résultat de chaque qPCR a été exprimé en µg/µL. Par la suite, le rapport entre la concentration du gène cible et la concentration du gène de référence, pour chaque traitement et réplicat, a permis d'obtenir un rapport d'induction. La moyenne de ce rapport a été ramenée à 1 pour le traitement témoin à savoir le DMSO. Selon les traitements, le taux d'induction du gène cible a alors été exprimé relativement au témoin.

II.5.4. Activité luciférase

Dans les modèles cellulaires du poisson zèbre ZELH-zfERs, l'activité œstrogénique de substances chimiques a été évaluée en mesurant l'activité luciférase. Cette méthode consiste à mesurer la bioluminescence produite par l'activité luciférase dans les cellules vivantes. La D-luciférine (substrat de la réaction) est transformé en oxyluciférase en présence d'O_2 et d'ATP. A l'état excité, cette molécule instable retourne à son état initial en émettant de la lumière. La luminescence a été lue puits par puits pendant deux secondes par un luminomètre. Les résultats bruts ont été obtenus en unité de luminescence relative (RLU). Par la suite, ils ont été exprimés en pourcentage par rapport à l'activité maximale induite par le témoin positif, à savoir le 17 -œstradiol à 10^{-8} M (Figure 43).

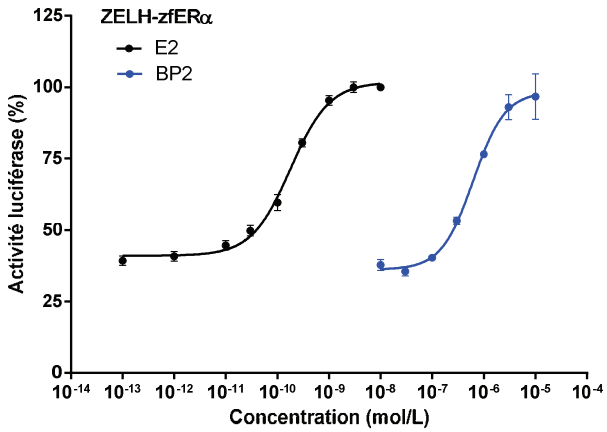


Figure 43. Courbe dose-réponse de l'activité luciférase du 17 -œstradiol (E2) et de la benzophénone-2 (BP2) dans les cellules ZELH-zfER

II.5.5. Induction de l'expression de la GFP

Dans le modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP, l'activité œstrogénique des substances chimiques a été évaluée par la mesure de la fluorescence liée à l'expression de la GFP. La mesure de la fluorescence a été réalisée sur chacune des larves exposées. Ces dernières ont été placées dans une goutte d'eau sur des plaques en verre compartimentées sous un microscope à fluorescence couplé à une caméra. La tête de chaque larve a été photographiée en vue dorsale (Figure 44). Toutes les photographies ont été réalisées avec les mêmes paramètres (objectif X10, temps d'exposition de 134 ms, et intensité maximale). La quantification de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Pour chaque image, la somme des niveaux de gris de chaque pixel dans la région d'intérêt a été déterminée. Le bruit de fond du niveau de gris a été défini à 290. Les résultats ont été exprimées en moyenne d'induction par rapport au solvant contrôle (DMSO).



Figure 44. Tête d'une larve en vue dorsale exprimant la GFP

nrp : récessus postérieur de l'hypothalamus caudal ; **ob** : bulbe olfactif ; **poa** : aire préoptique ; **tel** : telencéphale

II.6. Méthodes d'évaluation de la biotransformation des xénobiotiques

Les méthodes détaillées ici ont pour objectif la séparation et l'identification des métabolites (radiomarqués) issus de la biotransformation de la molécule parente (radiomarquée) par les systèmes enzymatiques de phase I et II fonctionnels dans les modèles biologiques étudiés. Contrairement à l'eau, les échantillons animaux (poisson adulte, larve) ont dû faire l'objet de développements analytiques préalables (broyages, extractions, préparations). Les échantillons ont été analysés par différentes techniques dont l'objectif était soit de mesurer la quantité totale de radioactivité contenue dans un échantillon (par scintillation liquide directe ou après brûlage à l'oxidizer), soit de séparer les différentes molécules radiomarquées d'un échantillon [radio-chromatographie liquide haute performance (radio-CLHP)], soit d'identifier les molécules [hydrolyses enzymatiques et spectrométrie de masse haute résolution (SMHR)].

II.6.1. Synthèse des approches utilisées pour les études de métabolisme

La figure suivante présente de manière schématique l'ensemble des expérimentations et des étapes qui ont conduit à l'analyse du devenir de la BP2 et du BPS marqués au tritium.

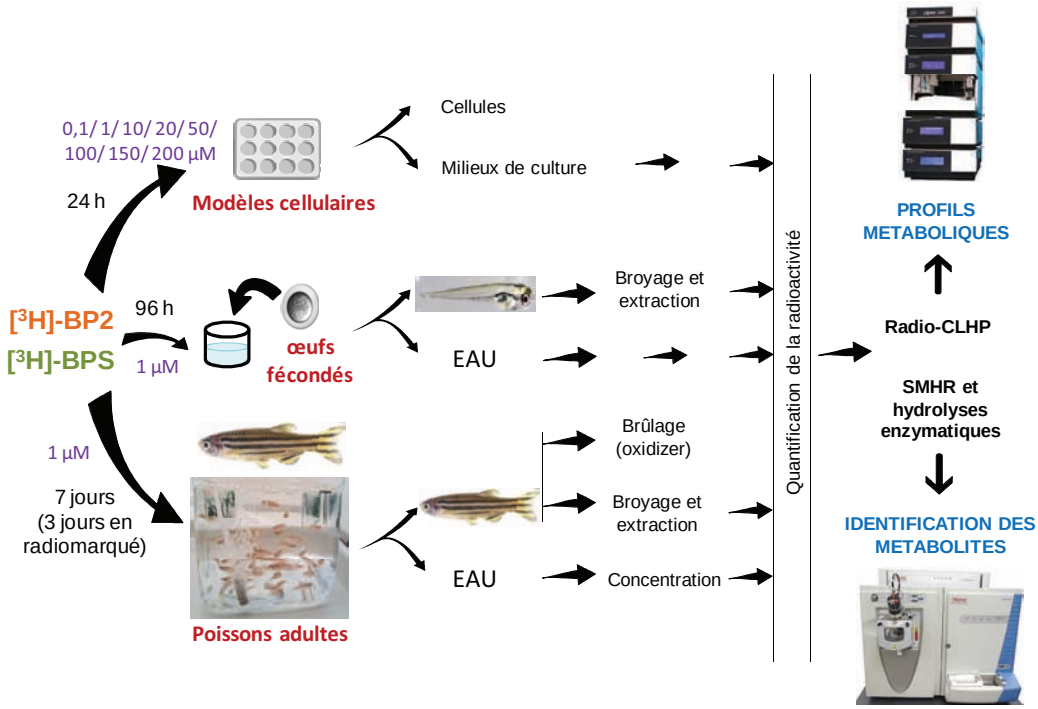


Figure 45. Vue d'ensemble des étapes mises en œuvre pour l'analyse de la biotransformation de la ^{3}H-BP2 et du ^{3}H-BPS dans les différents modèles *in vitro* et utilisés au cours de ce travail

II.6.2. Traitement des échantillons liquides et solides en vue de leur profilage métabolique

II.6.2.1. Les modèles cellulaires

Comme expliqué dans le paragraphe II.4.2.1., après 24 heures d'exposition, les milieux de culture ont été récupérés et conservés à -20°C. Les cellules ont été décollées des puits et lysées avec une solution H_20/CH_3CN (50:50, v/v) en vue d'extraire les molécules radiomarquées (molécules parentes ± métabolites) potentiellement encore contenues dans les cellules. Cet extrait cellulaire a également été conservé à -20°C dans l'attente de son analyse.

Les deux matrices (milieu de culture et solution d'extraction eau/acétonitrile) ont fait l'objet d'un comptage de radioactivité au compteur à scintillation liquide. Les matrices contenant de la radioactivité ont ensuite été analysées, avant et après hydrolyse enzymatique, en radio-CLHP (profilages métaboliques) et en SMHR (identification/confirmation des métabolites présents).

II.6.2.2. Le modèle larve

La radioactivité contenue dans l'eau d'exposition des larves, dans les échantillons d'eau des rinçages et dans l'eau qui a servi à l'euthanasie des larves a été mesurée par scintillation liquide. L'eau d'exposition a ensuite été analysée par radio-CLHP.

Pour mesurer la radioactivité contenue dans les larves, des étapes de broyage et d'extraction ont été nécessaires. Les 60 larves correspondant à chaque condition et à chaque réplicat ont été broyées dans des microtubes à billes dans une solution d'extraction acétonitrile/méthanol/tampon acétate d'ammonium $CH_3CN/CH_3OH/CH_3CO_2NH_4$ 40 mM pH 3,5 (6:3:1, v/v). Au préalable, l'absence de fixation de la BP2 et du BPS (molécules tritiées) dans les tubes à billes a été vérifiée. Cette étape de broyage a fait l'objet de mises au point (quantité de solvant, durée et force du broyage). Après une étape de centrifugation, le surnageant a été récupéré. Cette étape de broyage/extraction a été répétée trois fois pour chacune des conditions expérimentales. Un comptage de la radioactivité de ces extraits a ensuite été réalisé par scintillation liquide, et chacun a fait l'objet d'une analyse par radio-CLHP précédée (ou pas) par des hydrolyses enzymatiques spécifiques permettant de mettre en évidence les métabolites conjugués à l'acide glucuronique et les conjugués sulfates.

II.6.2.3. Le modèle poisson adulte

A la fin de l'exposition des poissons adultes à la ^{3}H-BP2/BP2 ou au ^{3}H-BPS/BPS, l'eau d'exposition, l'eau d'euthanasie des poissons et les solutions de rinçage des aquariums ont fait l'objet de comptages de radioactivité au compteur à scintillation liquide.

Eau d'exposition

Compte tenu du volume d'eau et de la quantité de radioactivité, il a été nécessaire de concentrer par évaporation l'eau d'exposition afin de procéder à l'analyse par radio-CLHP, là aussi, avec ou sans une étape préalable d'hydrolyse enzymatique. Plusieurs méthodes de concentration de l'eau ont été évaluées : (1) évaporateur rotatif (évaporation sous pression réduite abaissant la température d'ébullition des solvants des échantillons placés dans un ballon en rotation pouvant plonger dans un bain-marie chauffé), (2) flux d'azote (évaporation de l'échantillon placé dans un contenant adapté sous un léger flux d'azote (gaz inerte)) et (3) SpeedVac (évaporation de solvants d'échantillons en centrifugation, sous pression réduite. Les résultats de ces mises au point ont montré que le rendement des ces trois méthodes était équivalent dans le cas des molécules étudiées. Le choix du SpeedVac a été retenu sur trois critères : le faible volume à évaporer par condition (2 ml), la plus grande facilité de mise en œuvre et le gain de temps par rapport aux autres méthodes qui, par ailleurs, n'ont pas présenté d'avantages spécifiques (absence de chauffage dans tous les cas, par exemple). A la suite de l'évaporation de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 à 200 µL, une analyse par radio-CLHP avant et après hydrolyses enzymatiques a été réalisée.

Poissons zèbres

Afin de pouvoir évaluer le devenir de la BP2 et du BPS dans le poisson adulte, des étapes de broyages et d'extractions ont été nécessaires. Ces étapes ont, elles aussi, ont fait l'objet de mises au point.

Broyages des poissons zèbre adultes congelés à -80°C :

Le choix de la technique de broyage des poissons s'est porté sur un broyage de type vibrant (MM400, Retsch, Figure 46) utilisant des bols à billes.

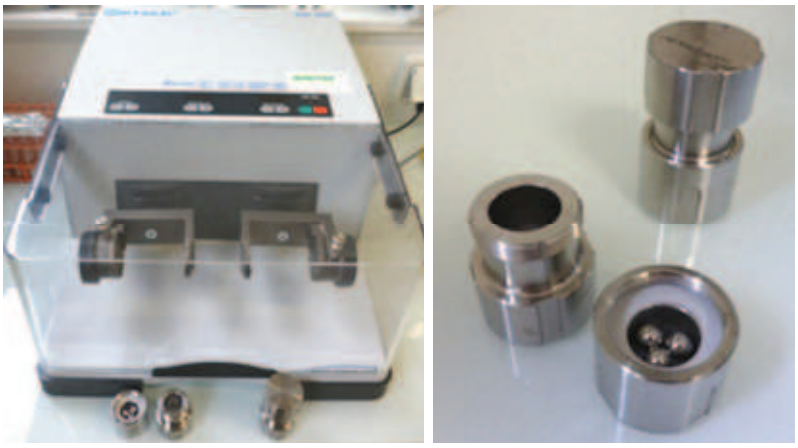


Figure 46. Broyeur vibrant (MM400, Retsch) et les pôts à billes dans lesquels sont placés les échantillons à broyer

Par rapport aux broyeurs à tige de type ultra-turrax®, ce type de broyage présente certains avantages : (1) un broyage plus reproductible entre les lots de poissons, (2) la possibilité de broyer des échantillons congelés et à sec évitant tout risque de projection, et (3) la possibilité d'effectuer un broyage simultané de deux lots de poissons. Les différents paramètres de broyage ont été ajustés lors d'essais préliminaires sur poissons non exposés afin d'obtenir une poudre homogène : nombre de billes par bol, nombre et masse de poissons par bol, fréquence de vibration des bols (Hz) et durée du broyage. Au final les conditions retenues ont été les suivantes : 3 billes par bol, avec environ 1 g de poisson (2 poissons) par bol, une fréquence de 28,5 Hz, et une durée de 2 min 30s.

Extraction des molécules radiomarquées

Plusieurs essais ont été nécessaires afin de mettre au point les conditions d'extraction des molécules radiomarquées à partir d'échantillons des poissons zèbres. Au préalable, la poudre contenue dans les bols a été récupérée à la spatule dans des tubes en verre (Corex), puis un rinçage des bols au méthanol a été effectué en vue des comptages permettant d'établir les bilans de récupération de la radioactivité (bilans métaboliques).

Le premier essai a consisté en une extraction par une solution acétonitile/ méthanol/ tampon acétate d'ammonium 40 mM pH 3,5 (6:3:1, v/v/v). Après des étapes (1) de mélange au vortex et (2) de centrifugation, un précipité blanc et des gouttelettes lipidiques rendaient l'échantillon non homogène et donc inexploitable pour le profilage. La peau, assez riche en matière grasse, était apparemment à l'origine d'une quantité suffisante de matière grasse pour entrainer la formation de ces gouttelettes lipidiques.

Le deuxième essai a donc consisté en une méthode d'extraction, dérivée de la méthode de Folch (Folch et al. 1956), permettant la séparation des lipides, des protéines et des molécules solubles en

phase aqueuse. Une solution méthanol/ eau/ dichlorométhane (1:1:2, v/v/v) a alors été utilisée. A la suite d'un mélange (vortex) de 15 min, puis d'un refroidissement de l'homogénat à 4°C, et d'une étape de centrifugation (15 min, 4°C), les phases aqueuses (partie supérieure) et lipidiques (partie inférieure) ont été récupérées. Cette extraction a été répétée une nouvelle fois. Un comptage de radioactivité a alors été réalisé sur ces deux phases. Les phases aqueuses, telles quelles et après hydrolyses enzymatiques, ont fait l'objet d'une analyse par radio-CLHP.

II.6.3. Quantification de la radioactivité

La quantification de la radioactivité contenue dans les échantillons biologiques exposés (cellules, larves, poissons adultes) mais également dans les solutions de rinçage du matériel d'exposition est une étape indispensable à la réalisation du bilan de radioactivité, permettant ainsi de s'assurer que la totalité de la radioactivité introduite dans le milieu d'exposition est retrouvée en fin d'expérimentation.

Pour les échantillons liquides, la quantification de la radioactivité par scintillation liquide a été réalisée directement sur les milieux liquides (milieux de culture et milieux d'extraction des cellules) après une étape éventuelle d'évaporation afin de concentrer les molécules radiomarquées (eaux d'exposition).
Pour les échantillons solides (larves et poissons adultes) deux méthodes de quantification de la radioactivité ont été utilisées :

- une quantification de la radioactivité par scintillation liquide après brûlage des échantillons congelés (poissons adultes)
- une quantification de la radioactivité par scintillation liquide après des étapes de broyage et d'extraction (larves et poissons adultes).

Une fois le bilan de radioactivité obtenu, le profilage métabolique des différents milieux (milieux de culture, eaux d'exposition, extraits des larves, extraits des poissons adultes) a été réalisé par radio-CLHP avant et après hydrolyses enzymatiques spécifiques des conjugués glucuronides et sulfates. La confirmation de la structure des métabolites a été réalisée par spectrométrie de masse haute résolution.

II.6.3.1. Brûlage des échantillons tritiés à l'oxidizer

La radioactivité contenue dans les poissons adultes a été déterminée par brûlage à l'oxidizer (Model A307 Sample Oxidizer, PerkinElmer). Cette méthode permet une quantification de la radioactivité contenue dans des échantillons solides en s'affranchissant des étapes de broyage et d'extraction, pour déterminer avec exactitude les niveaux de résidus présents. Toutefois, le brûlage à l'oxidizer n'est pas compatible avec le profilage métabolique de l'échantillon. Il est donc nécessaire de procéder à cette

phase de travail en parallèle des extractions destinées au profilage radio-CLHP. Brièvement, à la suite de la combustion de l'échantillon organique (ici le poisson), les vapeurs de combustion sont récupérées par condensation et mélangées à un liquide scintillant (monophase® S, PerkinElmer) permettant un comptage de radioactivité au compteur à scintillation liquide. Les résultats obtenus au minimum en triplicat, sont moyennés et rapportés au poids d'échantillon brûlé, permettant le calcul de la concentration de radioactivité par unité de poids d'échantillon examiné.

II.6.3.2. Compteur à scintillation liquide

Le compteur à scintillation liquide permet de mesurer la quantité de radioactivité d'émetteurs (cas du tritium, mais aussi du carbone 14), contenue dans un échantillon liquide. Cette mesure nécessite une mise en solution des molécules radioactives dans un solvant contenant des molécules scintillantes (liquide scintillant ; Ultima Gold™ ou monophase® S (en cas de brûlage préalable), PerkinElmer). Lors de la désintégration des atomes radioactifs, les particules - libérées excitent les molécules du liquide scintillant. Lors du retour à un état stable, ces molécules émettent des photons. Ces derniers sont détectés par un photomultiplicateur. Le nombre de photons émis est proportionnel à l'énergie initiale des particules -. Les corrections de quenching sont effectuées automatiquement par l'appareil sur la base d'un standard interne. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) puis transformés en désintégrations par minutes (dpm).

II.6.4. Profilage métabolique et identification des métabolites

II.6.4.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur de radioactivité

L'approche analytique par radio-CLHP a permis de séparer les différentes molécules radiomarquées (métabolites et molécule parente) contenues dans les échantillons issus de l'exposition de nos modèles biologiques à la ^{3}H-BP2 et au ^{3}H-BPS. L'obtention de ces profils métaboliques a requis la mise au point d'un système CLHP spécifique pour chacun des deux xénobiotiques. En effet, le type de colonne, le débit, le choix des phases mobiles, le gradient de phases mobiles et la température, sont autant de facteurs pouvant influencer la bonne séparation des molécules, dont le comportement diffère compte tenu de leur différence structurale. Le type de colonne (dans notre cas une colonne avec greffage octadecyl (C18) de 25 cm), le débit, la température et les phases mobiles ont été choisis d'après l'expertise du laboratoire et l'expérience de ce type d'analyse pour des molécules chimiquement proches comme le bisphénol A et F par exemple.

Les gradients CLHP ont quant à eux fait l'objet de mises au point aussi bien pour la BP2 que pour le BPS. J'ai réalisé ce développement dans les premières étapes de mon travail sur le métabolisme à l'INRA, à partir d'échantillons issus de la synthèse biochimique des métabolites oxydés et conjugués de chacune des molécules. L'utilisation de ces échantillons, contenant une grande diversité de métabolites a été utile afin de mettre au point le gradient permettant une séparation satisfaisante de l'ensemble de ces molécules. Pour l'obtention des métabolites glucuronoconjugués et sulfoconjugués, des microsomes de foie de cobaye en présence d'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) ou de cytosol de cobaye en présence de 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) ont été utilisés, respectivement. Ce travail préliminaire a également permis d'explorer les phases I et II mises en jeu pour la BP2 et le BPS.

L'analyse radio-chromatographique a été rendue possible par l'utilisation d'un détecteur de radioactivité (Flo-One A500, PerkinElmer) placé en sortie de colonne. Au fur et à mesure de la sortie de l'échantillon, ce dernier a été mélangé, au niveau du Flo-One à un liquide scintillant (Flo Scint II^{TM}, PerkinElmer) permettant une mesure de la radioactivité couplée à la séparation chromatographique.
Au final, les différents paramètres chromatographiques qui ont été retenus pour la BP2 et le BPS sont les suivants :
Pompe : Spectra P1000, Thermo Separation Products
Pré-colonne : C18 (18x4 mm, 5 µm), Macherey-Nagel
Colonne : Zorbax SB-C18 (250x4.8 mm, 5 µm), Agilent technologies
Débit : 1 ml/min
Température : 30°C
Phase mobile A : tampon acétate d'ammonium (20 mM, pH 3,5) et acétonitrile, 95:5 v/v
Phase mobile B : tampon acétate d'ammonium (20 mM, pH 3,5) et acétonitrile, 10:90 v/v

Les mises au point ont conduit à l'établissement des gradients présentés dans la figure suivante (Figure 47). Dans ces systèmes analytiques en phase inverse (phase stationnaire moins polaire que la phase mobile initiale), les composés les plus polaires sont élués les premiers. Dans leur système respectif, le temps de rétention de la BP2 est de 42,5 min et celui du BPS de 27,7 min.

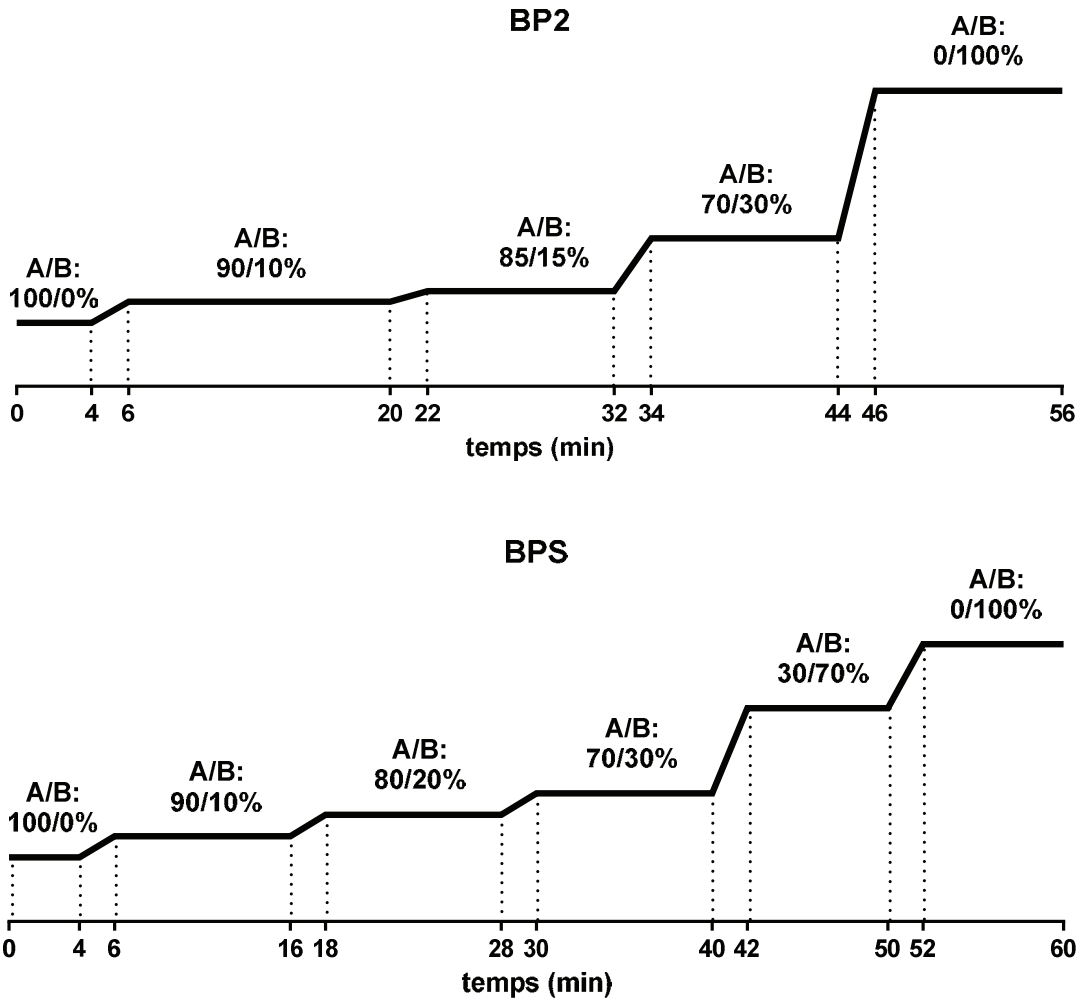


Figure 47. Gradients analytiques développés pour les analyses respectives de la BP2 et du BPS

A et B sont les phases mobiles polaires. Dans ce système analytique en phase inverse, les métabolites les plus polaires sont élués les premiers.

II.6.4.2. Hydrolyses enzymatiques

Les techniques biochimiques d'hydrolyse enzymatique permettent de déterminer la nature glucurono- ou sulfo-conjuguée des métabolites formés. Les échantillons (surnageants de culture cellulaire, extraits des larves, phases aqueuses des extraits poissons adultes, eaux d'exposition) ont été incubés avec l'enzyme aryl-sulfatase provenant d'*Aerobacter aerogenes* ou avec l'enzyme -glucuronidase pendant 3 heures à 37°C sous agitation douce. Ces incubations ont nécessité au préalable une évaporation sous flux d'azote des solvants non aqueux (méthanol et acétonitrile) pour les échantillons concernés (extraits des larves et phase aqueuse des extraits de poissons). Pour chaque hydrolyse, un témoin correspondant à une incubation dans les mêmes conditions mais sans enzyme a été réalisé. L'hydrolyse a été arrêtée par refroidissement de l'échantillon à 4°C. Ces échantillons ont alors été

mélangés à la phase mobile A afin d'être analysés par radio-CLHP. Avec ce type de protocole, en présence d'un conjugué sulfate et de la sulfatase, les pics éventuels correspondants à des conjugués sulfate diminuent ou disparaissent du profil métabolique (contrairement aux incubations témoins), pour redonner la molécule parent (en cas de conjugué « direct ») ou un autre métabolite (s'il s'agit d'un métabolite secondaire). Le principe est le même pour les incubations examinées après incubation avec de la ß-glucuronidase, pour les conjugués à l'acide glucuronique éventuellement formés lors des expérimentations de métabolisme *in vitro* ou *in vivo*.

II.6.4.3. Spectrométrie de masse haute résolution

Suite aux étapes de quantification et de profilage métabolique ainsi qu'aux premiers éléments de caractérisation structurale fournis par les études biochimiques, nous avons procédé à la confirmation de l'identification des métabolites par spectrométrie de masse haute résolution. Le choix s'est porté sur une approche en chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution LTQ (Linear Trap Quadropole) Orbitrap XL hybrid (Thermo Scientific). Ces analyses ont été réalisées sur les surnageants de culture cellulaire. Ce travail spécifique a été réalisé sous la supervision de Laurent Debrauwer, responsable de la plateforme Axiom Metatoul de l'INRA. Afin de réaliser le couplage entre le chromatographe et le spectromètre, un fractionnement d'un quart de l'éluât issu de la colonne chromatographique et entrant dans le spectromètre a été réalisé (« split »), ce qui correspond aux conditions standard du laboratoire pour le couplage radio-CLHP. Des études précédentes sur le BPA et le BPF et les premiers essais réalisés sur la BP2 et le BPS, ont conduit à choisir le mode d'ionisation par électrospray en mode négatif (ESI -). Les différents paramètres de spectrométrie (MS et MS/MS) utilisés afin de déterminer les rapports masse/ charge (m/z) sont précisés dans l'article 3 (paragraphe IV de la partie résultats).

Tableau 27. Ensemble des paramètres des expérimentations menées dans les modèles biologiques *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre et d'Homme pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des xénobiotiques et de leur biotransformation
BP2 : benzophénone 2, BPA : bisphénol A, BPF : bisphénol F, BPS : bisphénol S

			Modèle biologique	Molécule et concentration (µM)				Volume d'exposition par condition (ou par puits (p))	Biomasse par condition ou nombre de cellules/puits (c/p)	Milieu d'exposition	Durée de l'exposition	Renouvellement du milieu	Paramètres mesurés	Techniques utilisées
				BP2	BPA	BPF	BPS							
ACTIVITE OESTROGENIQUE	Poisson zèbre	*In vivo*	**Adulte mâle**	4 – 20	-	0,1 – 20	-	4 L	1 g/L	Eau claire	168 h	100% toutes les 24 h	Vtg plasmatique Transcrits des *ERs*	ELISA RT-qPCR
			Larve *cyp19a1b*-GFP	0,01 – 20	0,25 – 10	0,01 – 20	0,25 – 30	100 mL	15 œufs fécondés	Eau claire	96 h	50% toutes les 24 h	GFP	Microscopie à fluorescence
			Larve sauvage	10	-	0,1 – 10	-	100 mL	25 œufs fécondés	Eau claire	96 h	50% toutes les 24 h	Transcrits du *cyp19a1b*	RT-qPCR
		In vitro	**PZFH**	3 – 30	-	0,1 – 10	-	150 µL/p Plaque 96 puits	150 000 c/p	LDF SVF-DCC	96 h	50% à 48 h	Vtg	ELISA
			ZELH-zfER	0,01 – 10	0,01 – 10	0,01 – 10	0,01 – 10	150 µL/p Plaque 96 puits	25 000 c/p	LDF SVF-DCC	72 h	Aucun	Activité luciférase	Luminométrie
			ZELH-zfER 1						25 000 c/p					
			ZELH-zfER 2						75 000 c/p					
BIOTRANSFORMATION		*In vivo*	**Adulte mâle**	1	-	-	1	1,5 L	5 g/L (entre 14 et 16 poissons)	Eau claire /eau d'élevage	168 h (96 h en non-radioactif puis 72 h en radioactif	100% toutes les 24 h les 4 premiers jours. 0% les jours suivants	Radioactivité	Compteur à scintillation liquide Broyages et extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP Oxidizer
			Larve sauvage	1	-	-	1	50 mL	60 œufs fécondés	Eau claire /eau d'élevage	96 h (24 h en non-radioactif puis 72 h en radioactif)	100% après les 24 premières heures. 0% ensuite		Compteur à scintillation liquide Broyages et extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP
		In vitro	**PZFH (foie)**	0,1 – 200	-	-	1 – 200	310 µL/p Plaque 24 puits	195 000 c/p	LDF SVF-DCC	24 h	Aucun	Radioactivité Rapport *m/z*	Compteur à scintillation liquide Extractions Hydrolyses enzymatiques Radio-CLHP Spectrométrie SMHR
			ZFL (foie)	0,1 – 200	-	-	0,1 – 200	1 mL/p Plaque 12 puits	350 000 c/p	LDF SVF-DCC	24 h	Aucun		
			ZELH-zfER (foie)		-	-								
			ZELH-zfER 2 (foie)		-	-								
	Homme		**MELN (sein)**	0,1 – 200	-	-	0,1 – 200	1 mL/p Plaque 12 puits	350 000 c/p	DMEM SVF-DCC	24 h	Aucun		
			T47D-KBLuc (sein)		-	-								
			HepG2 (foie)		-	-				MEM				
			HepaRG (foie)		-	-				William's E				

Résultats

I. Effets œstrogéniques de benzophénones chez le poisson zèbre

I.1. Article 1

Evaluation of estrogenic effects of benzophenone derivatives in zebrafish (*Danio rerio*) using *in vitro* and *in vivo* models.

A. Cosnefroy[1 §], S. Aït-Aïssa[1*§], **V. Le Fol[1]**, E. Maillot-Maréchal[1], B. Piccini[1], O. Palluel[1], O. Kah[2], P. Balaguer[3], F. Pakdel[2], JM. Porcher[1] and F. Brion[1*]

[1]INERIS, Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc Alata, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

[2]IRSET, Rennes, France

[3]INSERM, Rennes, France

Durant la première partie de ma thèse, qui s'est déroulée à l'INERIS, mon travail a notamment permis de contribuer à l'obtention et à la confirmation de certains résultats présentés dans cet article. Ces données, en particulier celles relatives à la BP2, représentent pour partie, le point de départ de la problématique de thèse.

Présentation de l'article

Les benzophénones sont des filtres chimiques anti ultra-violets utilisés dans des cosmétiques, des emballages alimentaires et dans de nombreux produits plastiques. Les benzophénones sont retrouvées depuis quelques années dans les milieux aquatiques. L'effet oestrogénique des benzophénones peut varier selon l'origine des récepteurs aux œstrogènes avec lesquels elles interagissent. En effet, il a été montré que la benzophénone 2 (BP2), la 2,3,4-trihydroxy-benzophénone (THB) et la benzophénone 1 (BP1) présentaient un potentiel œstrogénique plus élevé pour les récepteurs aux œstrogènes de poisson (truite arc-en-ciel) que pour ceux de l'Homme (Cosnefroy et al. 2009). Afin d'évaluer le potentiel œstrogénique des benzophénones chez le poisson zèbre, une dizaine d'entre-elles a été sélectionnée et testée sur des modèles *in vivo* et *in vitro* complémentaires chez le poisson zèbre. *In vitro*, les BPs ont été testées sur les lignées cellulaires gène rapporteur ZELH-zfERs. *In vivo*, deux modèles ont été utilisés : (1) le modèle de larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) dans lequel la GFP est sous le contrôle du promoteur de l'aromatase b (Brion et al. 2012), et (2) le poisson zèbre adulte chez qui l'expression de la Vtg circulante par ELISA et l'expression hépatique de la vtg1 et de la vtg2 par RT-PCR quantitative ont été mesurées.

De manière générale, les EC50 des benzophénones testées *in vitro* sont plus faibles dans la lignée transfectée avec le zfER que celles transfectées avec les zfER . Les benzophénones présentent de fortes différences de capacité d'activation des 3 types de récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre. Par exemple, seuls 5 des benzophénones testées (BP2, THB, BP1, 4BP (4-hydroxybenzophénone) et 44'BP (4,4'-dihydroxybenzophénone)) sont actives sur les 3 récepteurs à savoir zfER , zfER 1 et zfER 2. Seule la BP2 présente des EC50 parmi les plus élevées dans les trois lignées cellulaires. Quant à la BP3, sa capacité d'activation de ces récepteurs des œstrogènes est faible et uniquement observée dans la lignée ZELH-zfER 2.

Dans le modèle de larve transgénique *cypa19a1b*-GFP, les résultats d'expositions réalisées sur une durée de 5 jours dès les premières heures après fécondation montrent des inductions significatives de la GFP pour la 4BP, la BP1, la 44'BP, le THB. Les réponses obtenues dans ce modèle de larve sont donc davantage similaires avec celles obtenues dans les lignées cellulaires ZELH-zfER s que ZELH-zfER . Il est à noter que la BP3 est responsable d'une induction significative de la GFP, bien que

relativement faible. La BP3 semble donc plus active dans le modèle larvaire que dans les modèles cellulaires. De manière surprenante, la BP2 qui est la plus fortement active des benzophénones testées dans les modèles cellulaires, ne présente pas d'activité œstrogénique dans ce modèle larvaire.

L'activité œstrogénique de la BP2 et de la BP3 (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 mg/L) a été évaluée chez le poisson zèbre adulte en raison des différences d'effet observées entre les modèles cellulaires et le modèle larve transgénique. La BP2 et la BP3 entrainent une augmentation significative de la concentration plasmatique en Vtg après 7 jours d'exposition à 10 mg/L. Par ailleurs, la BP2 est responsable d'une augmentation du taux d'expression des transcrits du gène *vtg2* mais pas *vtg1* dans le foie de poissons mâles adultes. Enfin, l'expression des transcrits des zfERs issus du foie de poissons zèbres mâles adultes n'est pas modifiée par la BP2.

Ce travail s'inscrit dans une démarche globale intégrant des modèles *in vitro* et *in vivo* permettant l'évaluation du potentiel œstrogénique de composés chimiques. La capacité de ces modèles biologiques, caractérisés par des niveaux de complexité biologiques différents, à mettre en évidence les effets œstrogéniques des benzophénones a été vérifiée pour la plupart des composés étudiés. Les résultats obtenus sur les modèles ZELH-zfERβs sont en adéquation avec les effets neurogliaux (activation de l'aromatase b) au stade larvaire, stade au cours duquel les sous-formes β du récepteur sont préférentiellement exprimées. Il reste toutefois le cas surprenant et inattendu de la BP2. Alors que sa capacité à induire une réponse œstrogénique dans les modèles cellulaires d'origine hépatique et chez l'adulte est forte, elle devient inexistante dans le modèle transgénique au stade embryo-larvaire. Etant donné des différences importantes de complexité biologique entre les modèles, des différences de comportement pharmacocinétique et en particulier propres au métabolisme des xénobiotiques peuvent être envisagées. Pour exemple, l'activité œstrogénique observée dans le cas de la BP3 semble principalement liée à la BP1, provenant de la biotransformation de la BP3.

Evaluation of estrogenic effects of benzophenone derivatives in zebrafish (Danio rerio) using *in vitro* and *in vivo* models.

A. Cosnefroy[1 §], S. Aït-Aïssa[1*§], **V. Le Fol[1]**, E. Maillot-Maréchal[1], B. Piccini[1], O. Palluel[1], O. Kah[2], P. Balaguer[3], F. Pakdel[2], JM. Porcher[1] and F. Brion[1*]

[1]INERIS, Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc Alata, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

[2]IRSET, Rennes, France

[3]INSERM, Rennes, France

Abstract

Several aquatic pollutants are suspected to act as endocrine disruptor compounds (EDCs). The benzophenone derivates (BPs), are used as UV filters in many different personal care product, paints or plastics used for food packaging and were recently found to be ubiquitous in aquatic systems and to contaminate freshwater species, including fish. In this study, we evaluated estrogenic activity of ten BPs in zebrafish using an *in vitro* / *in vivo* approach. Recently we developed three *in vitro* specific zebrafish gene reporter models expressing zebrafish estrogen receptors (zfERs) in a zebrafish cell line. In order to compare *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of BPs, we exposed transgenic zebrafish to the 10 BPs from 0 to 5 dpf. The transgenic model expressed green fluorescent protein (GFP) driven by the zebrafish brain aromatase *cyp19a1b* promoter. Our results showed that among the ten BPs, two were non active and five were active in the three cell lines. In transgenic *cyp19a1b*-GFP fish, all the compounds that were inactive *in vitro* did not induce GFP expression in zebrafish embryos. Some estrogenic compounds *in vitro* were not able to induced GFP expression. For instance, we observed that BP2 which is the most estrogenic compound *in vitro* did not induced GFP expression. However, this compound induced in concentration dependant manner vitellogenin gene expression and protein synthesis in male fish. Conversely, we found that BP3 elicited weak estrogenic activity *in vivo* in both *in vitro* model but while only a weak estrogenic activity was found on ZELH-ZFERβ2 cell line. Taken together, our approach allows to characterize the EDC potency of emerging pollutant using *in vitro* and *in vivo* assay within a unique model fish species, the zebrafish. The differences observed between assays deserve further studies to characterize the behavior of compounds in the different biological systems in term of bioavailability and metabolism but also to better consider the importance of the cellular context in the biological responses measured.

Keywords: Estrogen receptors, benzophenone, aromatase b, zebrafish, GFP, vitellogenin

I. INTRODUCTION

Endocrine disruptor compounds (EDCs) are present in the aquatic environment (Barcelo 2003; Kinani et al., 2010). EDCs are natural or synthetic chemicals issued from different anthropogenic activities and have the ability to interfere with the endocrine system, leading to disturb normal sexual development and reproduction of aquatic species. Among these pollutants, several have been described as xeno-estrogen as they have the ability to interfere with the estrogen receptors (ER) by mimicking or blocking action of estrogen hormones. Some benzophenone derivatives (BPs), emerging pollutants, have been described as xeno-estrogens in both mammalian and fish cells and organisms (Schlumpf et al., 2001; Kunz et al., 2006; Molina-Molina et al., 2008). These chemicals are used as UV filters in many products like personals care products (cream, shampoos, sunscreen cream, lipsticks...), food packaging, textiles and paints. Because of their growing utilization in several applications, together with their persistent character due to hydrophobic properties, they increasingly occur and accumulate in the aquatic environment (Díaz-Cruz et al., 2008). Indeed, these emerging aquatic pollutants have been detected in surface waters, waste waters and biota (fish tissue) (Balmer et al., 2005; Jeon et al., 2006; Fent et al., 2009).

To assess the EDCs effect of chemicals, tiered approaches have been proposed for the screening (Tier 1) and testing (Tier 2) (Hotchkiss et al., 2008). Tier 1 includes both *in vitro* and short term *in vivo* assays. Several *in vitro* and *in vivo* models have been developed to study estrogenic properties of compounds. *In vitro*, among the commonly used assays are those based on reporter gene assay either based on yeast cells, such as the YES assay (Kunz et al., 2006), or on mammalian cultured cells, such as ER-CALUX (Legler et al., 1999) or MELN (Balaguer et al., 1999) cells that endogenously express the human ERα (hERα). More recently a growing interest has been paid to the development and the evaluation of non mammalian *in vitro* models to assess species specific effect (Hotchkiss et al, 2008). For instance, fish ER were used in stable (Ackermann et al., 2002; Molina-Molina et al., 2008; Cosnefroy et al., 2009) and transient transfection (Le Page et al., 2006; Katsu et al., 2007; Sabo-Attwood et al., 2007) in either human or fish cell lines. The comparison of fish and mammalian specific models has highlighted inter-species differences in the estrogenic response to certain chemicals. These differences may depend on the species origin of the ER and/or on the cellular context wherein ER is expressed, i.e. cell type, tissue or species origin of cell line (Le Guevel et al., 2001; Matthews et al., 2002; Molina-Molina et al., 2008; Cosnefroy et al., 2009). For instance, some benzophenone derivatives (BP1, BP3, THB) were shown to exert higher affinity to the rainbow trout ER (rtERα) than to hERs (Molina-Molina et al., 2008) while their estrogenic potency relative to estradiol was higher in fish than in human cells (Cosnefroy et al., 2009). Such studies argue for the use of specific *in vitro* fish models to assess estrogenic hazard of chemicals in fish. However there is still a scarcity of studies that have evaluated this assumption by using integrated approaches, i.e. including

effect assessment at different biological levels including cellular (*in vitro*) and organism (*in vivo*) levels.

The zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used as biological model in toxicology because of the many advantages of this specie. Regarding EDCs, it has been proposed as a useful model fish species in identifying targets and mode of action of EDCs at molecular, cellular and organism level as well as in screening and testing (Segner 2009). In zebrafish, three different isoforms of the ER has been isolated and characterized zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 (Menuet et al., 2002). Their pattern of expression and regulation by E2 in adult and in developing zebrafish has been well studied (Menuet et al., 2002; Mouriec et al., 2009). Further, the expression of ER-regulated genes in brain (i.e., brain aromatase) and in liver (i.e., vitellogenin) are well characterized and appropriate methods has been developed (Brion et al., 2002; Brion et al., 2004; Menuet et al., 2005; Hinfray et al., 2006), making the zebrafish as a relevant model to study the effect of xenobiotic on ER-signaling pathway.

In the present study, we propose the use of a multi-level approach, using *in vitro* and *in vivo* assays, to assess estrogenic impact of ten BP derivatives (Figure 1) in the zebrafish. For such purpose, *in vitro* zebrafish cell lines that stably express the luciferase reporter gene under the control of different subtypes of recombinant zebrafish ER (zfER), i.e. zfERα, zfERβ1 and zfERβ2, have been developed from the ZFL hepatic cell line (Cosnefroy et al., in prep). These three cell lines allow easy detection of zfERs activation in zebrafish liver cell context, within the same clonal context and thus permit to identify SERMs (selective estrogenic receptor modulator) (Cosnefroy et al., in prep). In addition to cellular effects, estrogenic activity of BPs was quantify *in vivo*, by using a newly developed transgenic zebrafish line that expresses green fluorescent protein (GFP) under the control of the zebrafish brain aromatase *cyp19a1b* promoter. The *cyp19a1b* gene codes for the brain aromatase B that is expressed exclusively in radial glial cells under the control of estrogens. The extreme sensitivity of this gene to exogenous estrogens during zebrafish embryogenesis has been well characterized (Vosges et al., 2010). Further we showed that exposure of tg(*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryo to various chemical compounds allowed rapid (120 h), sensitive and easy detection of *in vivo* estrogenic activity, illustrating the usefulness and the suitability of this model for screening purpose (Brion et al., in prep). Although globally correlated, comparison of *in vitro* and *in vivo* screening showed some differences for certain BPs. These were further tested for their potential estrogenic effect in adult male zebrafish by analyzing hepatic mRNA levels of zf-ER isoforms, Zf-Vtg1 and Zf-Vtg2 and by quantifying circulating concentrations of vitellogenin, a well-known marker of estrogenic compound.

II. Materials and methods

II. 1. Chemicals, materials and reagents

17β-estradiol (E2), 17α-ethynylestradiol (EE2), Benzophenone (BP), 4-hydroxybenzophenone (4BP), 44'-dihydroxybenzophenone (44'BP), 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3), 2,4,4'-trihydroxybenzophenone (THB), 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (23'44'BP), 2,3,4-trihydroxybenzophenone (234BP), 22'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP8) were purchased from Sigma-Aldrich (France)(Figure 1). Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM and stored at –20°C. Fresh dilutions of test chemicals were prepared before each experiment. Leibovitz 15 culture medium (L15), HEPES, fetal calf serum (FCS), epidermic growth factor (EGF), G418 and D-luciferin were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France). Insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France), F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (D-MEM hg) powder, penicillin streptomycin were purchased from Gibco (France). Cell culture plastics were obtained from BD Bioscience (France), except 96-well white opaque plates which were purchased from Greiner (France). Trizol reagent was purchased from Invitrogen (France), SYBR green from Quiagen (France). Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), random hexamers, dNTPs, RNAsin and MMLV-RT buffer were obtained from Promega (France).

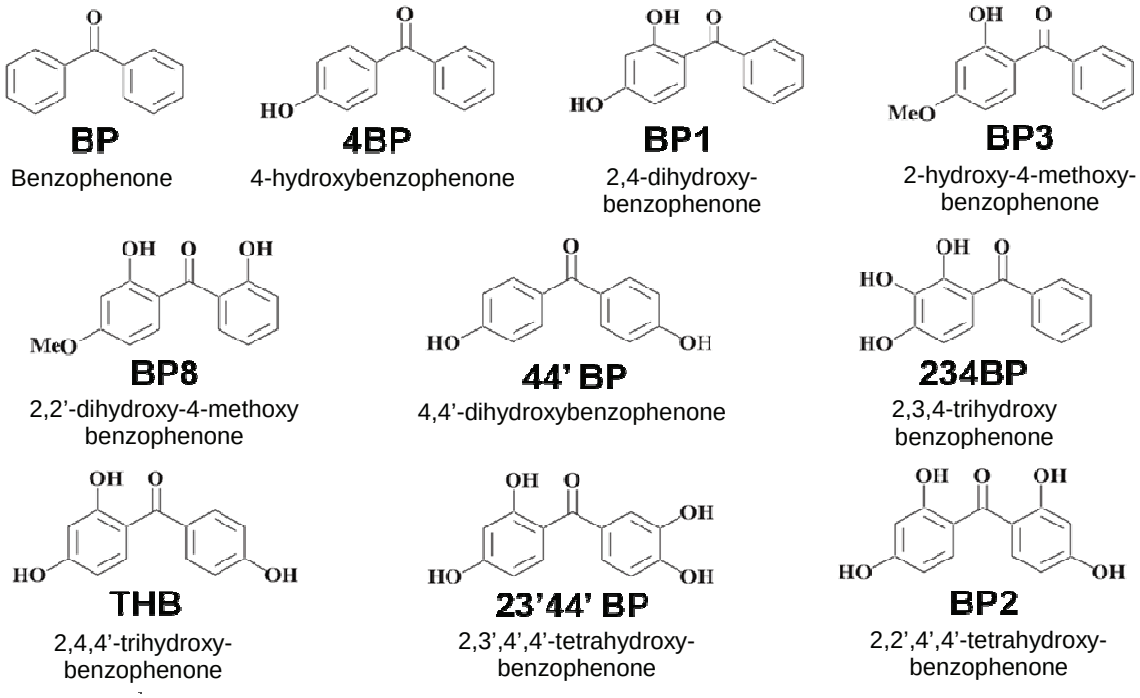


Figure 1 : Structure of benzophenone and derivatives

II. 2. ZELH-zfERs cell lines: culture conditions

ZFL cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-2643) and is derived from a pool of approximately normal adult zebrafish (***Brachydanio rerio***) livers ES, 0.01 mg/ml of insulin, 50 ng/ml of EGF and 50 U/ml of penicillin and streptomycin antibiotics. This medium was supplemented with 5% v/v decomplemented fetal calf serum (FCS, Sigma). ZFL cells were grown at 28°C under humidified air atmosphere.

ZELH-zfERs cell lines (for ZFL-ERE-Luc-hygromicyn-zfERs) were previously described by (Cosnefroy et al., in prep). Briefly, the ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ1, ZELH-zfERβ2 cells lines obtained by a two steps stable transfection in ZFL cell line (zebrafish liver). ZFL were first stably transfected with an ERE-βGlob-Luc-SV-hygro plasmide yielding the ZELH cell line. ZELH were then stably transfected with Topo-pcDNA3 expression vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA) containing cDNA of zebrafish estrogen receptors (zfERα, zfERβ1, zfERβ2) expressing the Geneticin resistance gene, as previously described (Menuet et al., 2002). These plasmids were given by Dr Farzad Pakdel.

The ZELH-zfERs cell lines were routinely cultured at 28°C in LDF medium supplemented with hygomycin b (0.35 µg/ml), G418 (3 mg/ml) and 5% v/v dextran-coated charcoal treated fetal calf serum (LDF-DCC medium).

II. 3. Luciferase induction assay

Cells were seeded on 96 well plates (at 25,000 cells per well for ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ1 cell lines and 50,000 cells per well for ZELH and ZELH-zfERβ2) in LDF-DCC medium and left to incubate for 24 h before chemical exposure. Solvent content was always 0.1 % v/v in the culture medium. Cells were exposed to test chemicals for 72 hours at 28°C. Luciferase activity was then determined in living cells as follows. The culture medium was removed, cells were washed with 150 µl of PBS and then replaced by 50 µl of D-luciferin 0.3 mM in LFD-DCC medium without phenol red. After 5 min allowing a stabilization of the luminescent signal, luminescence counts were determined in a microplate luminometer (µBeta, Wallac). Results were expressed as percentage of maximal luciferase induced by E2, the reference ligand.

II. 4. Adult zebrafish experiments: chemical exposure and sampling

Wild type adult zebrafish (Danio rerio) were obtained from our own breeding unit. Male zebrafish were exposed for 7 days to 17β-estradiol (E2 10 nM, 0.27 ng/L), BP2 and BP 3 (0.1, 1, 5 and 10 mg/l), or solvent alone (DMSO). Exposures were carried out in semi-static conditions with total renewal of water every day. From 6 to ten fish per concentration were used. After exposure, adult fish were euthanized by total immersion in ice. Approximately 5 µL of blood samples were sampled per fish and diluted in 45 µl of PBS containing 20 % heparin. Diluted blood samples were stored at -20°C until

vitellogenin ELISA measurement. Livers were removed and kept at 4°C over night in a solution of RNAlaterRM and then stored at -20°C until vitellogenin and zfERs mRNA measurement.

II. 5. Transgenic zebrafish cyp19a1b-GFP: chemical exposure and GFP analysis

Eggs were obtained from adult *Cyp19a1b*-GFP transgenic fish in our breeding unit. Transgenic *cyp19a1b*-GFP embryos were exposed to different concentration of BPs (0.1 to 10 µM), EE2 (0.05 nM) or solvent (DMSO) from 0 to 5 days post-fertilization (dpf). Each experimental group was constituted of n=10 embryos exposed in 100 ml of water. Embryos were kept in an incubator at 28 °C, with no renewal of water. Each concentration was tested in two independent experiments.

At the end of the experiments, the fluorescence was analysed in 10 live larvae for each condition of exposure using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Fluorescence signals were then quantified using the Image J free software (available at http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html) and were expressed as integrated density which represented the sum of the values of all pixels within the region of interest. Induction factor were then calculated by the ratio of integrated density of each fish on the mean of solvent group (DMSO).

II. 6. RNA extraction and real-time RT-PCR

RNA extractions from liver samples were realized using trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was quantified using a NanoDrop system (Thermo Scientific).

Real-Time RT-PCR was then performed as described by Mouriec et al., (2009). Briefly, retro-transcription was realized using 1 µg of total liver RNA with Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), random hexamers, dNTPs, RNAsin and MMLV-RT buffer in a Thermocycler (Biometra GmbH, Germany). Real-Time PCR was then carried out on Mastercycler Realplex (Eppendorf) using SYBR according the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers for zfERα, zfERβ1, zfERβ2 were those described by Mouriec et al., (2009) and are given in the (Table 1). Oligonucleotide primers for Vtg 1 and Vtg 2 were designed using the Primer3 software. The sequences and working concentrations are described in the Table 1. Briefly, a 20 µL of reaction mix was set up with 5 µL of ten times diluted reverse transcripted sample, 4 µL of primers, 10 µL SYBR green mix and 1 µL of water. The reaction program was 15 min at 95°C followed by 40 two-step cycles 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Specific amplification of single products was controlled through the establishment of melting curves. Range of dilutions of target DNA fragments (10^{-4} to 10^{-11} µg/µL) were analyzed to build standard curves and permit to determine concentration of transcript. PCR reactions were realized in duplicate. Each target DNA fragment, zfERα, zfERβ1, zfERβ2, Vtg 1 and Vtg 2, were analyzed in each sample. Results were analyzed using (Realplex software 2.2). mRNA concentration were normalized by GAPDH expression, and results were expressed as ratio of

mean of exposed fish on DMSO. Each result was expressed as mean ± standard deviation. Water samples were used as negative control to monitor DNA contamination.

Gene *GenBank accession no*.	Primer sequences	Concentrations	References
zfERα (ESR1) *AB037185*	Fw : 5 -CTGGAGATGCTGGACGCTCA- 3 Rev : 5 - GCTGCAGCTCCTCCTCTTGG-3	600 nM	(Mouriec et al., 2009)
zfERβ1 (ESR2b) *AJ414566*	Fw : 5 - TGATCCTGCTCAACTCTAATAAC-3 Rev : 5 -TCCAGCAGATTCAGCACCTTCCC-3	600 nM	
zfERβ2 (ESR2a) *AJ414567*	Fw : 5 -TGATCCTCCTGAACTCCAACATG-3 Rev : 5 -TCCAGCAGACACAGCAGCTTGGA-3	200 nM	
Vtg 1 559475	Fw : 5 - AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG -3 Rev : 5 - GATGGGAACAGCGACAGGA -3	600 nM	This study
Vtg 2 559931	Fwd : 5'-GGCTCAGTTCAAGGACAAGC-3' Rev : 5'-TTGCAAAGCAACCACAAGAG-3'	400 nM	This study
GAPDH 317743	Fw : 5' - -GAGCACCAGGTTGTGTCCA-3' REV : 5' - TGTCATACCATGTGACCAGCTT-3'	400 nM	This study

Table 1 : Sequences of the oligonucleotides used in Real-Time Polymerase Chain Reaction

II. 7. Vitellogenin Competitive Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Quantification of circulating concentration of vitellogenin concentration in blood samples was determined by using a specific competitive ELISA using the method already described by Brion et al. (2002).

II. 8. Data analysis

For ***in vitro*** assays, a range of concentrations of each chemical was tested in triplicates in at least three independent experiments. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Data were analyzed for significant luciferase induction in treated cells over cell control using one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test (Graph-Pad Prism 5, version 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA). Dose–response curves were modeled by using the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro (available at http://eric.vindimian.9online.fr/), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC_{50} and EC_5 (chemical concentration leading to 50 and 5 % of maximal effect, respectively). Relative estrogenic potencies (REP) were determined as the ratio of EC_{50} of E2 to that of test chemical.

Concerning ***in vivo*** experiment, GFP expression, Vtg and zfERs mRNA quantification and Vtg protein expression, normality and homogeneity of variance was first checked using Kolmogorov-Smirnov tests. Then statistical significance of estrogenic effect between control group and exposed fish was

analyzed using the non-parametric Kruskals Wallis test followed by a Dunn's post-comparison test (Graph-Pad Prism 5, version 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA).

III. RESULTS

III. 1. In vitro estrogenic activity of benzophenone derivatives in the ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ1, ZELH-zfERβ2 cell lines

The ability of reference estrogens (E2 and EE2) and benzophenone derivatives to activate *in vitro* the three zfERs in zebrafish cells is presented on Figure 2 and their EC50, EC5 and estrogenic potency relative to E2 (REP) determined in the three cell models are given in the Table 2. In these experiments, estrogenic activity of E2 and EE2 were very similar in each models, with a higher affinity of these two compounds in the ZELH-zfERβ1 and ZELH-zfERβ2 cell lines.

BPs induced different estrogenic responses in the three models. Overall, out of the ten molecules tested, five were active on the three receptors (BP2, THB, BP1, 4BP and 44'BP), one was active on two receptors (23'44'BP), two (BP8 and BP3) only weakly activated one receptor (*i.e*. zfERβ2), and BP and 234BP had no effect on any assay (Figure 2, Table 2).

	Alpha				Beta 1				Beta 2			
	EC_{50} (nM)	SD	n	REP	EC_{50} (nM)	SD	n	REP	EC_{50} (nM)	SD	n	REP
E2	0.205	0.05	15	1	0.03	0.01	14	1	0.051	0.023	15	1.00
EE2	0.134	0.039	4	1.52	0.03	0.01	4	1	0.033	0.004	3	1.53
BP1	2195	1395	5	9.32E-05	w.e		3		3859	1618	4	1.31E-05
BP2	991	780	4	1.89E-04	2216	909	4	1.23E-05	1477	694	4	3.43E-05
BP3	n.e		3		n.e		3		w.e		3	
THB	1062	429	4	1.93E-04	3718	757	3	7.35E-06	3902	1285	4	1.30E-05
BP	n.e		3		n.e		3		n.e		3	
BP8	n.e		3		n.e		3		w.e		3	
4BP	30216	24143	5	6.77E-06	2131	1436	5	8.66E-06	2950	2372	6	1.72E-05
44'BP	2968	2285	4	6.90E-05	6752	5415	4	2.73E-06	4985	3018	4	1.02E-05
234BP	n.e		3		n.e		3		n.e		3	
2344'BP	4831	4321	3	4.24E-05	n.e		3		3874	531	4	1.31E-05

Table 2: Effective concentrations (EC50 and EC5) and relative estrogenic potencies (REP) of E2, EE2 and benzophenone derivatives in ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ1 and ZELH-zfERβ2 cell lines luciferase

BP2 was the strongest active BPs, in terms of both effective concentration (EC50) and luciferase induction with a slight over-expression in ZELH-zfERα (Figure 2A). Based on its EC50, THB was 3 or 4 fold more potent in ZELH-zfERα than in ZELH-zfERβ1 and ZELH-zfERβ2 cell lines, respectively. A similar pattern was observed with 44'BP. Conversely, a lower number of BPs was active in the ZELH-zfERb1 assay as compared to the two other assays. BP1 elicited 80 % of transactivation in ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ2 whereas it acted as weak estrogenic compound in ZELH-zfERβ1 cell line. Similarly, 23'44'BP was active in ZELH-zfERα and -zfERβ2 but not on -zfERβ1 cells. These results could be related either to a selective action of these two compounds towards this receptor, and/or to a lower expression of zfERβ1 in ZELH-zfERβ1 as compared to the two other cell lines, which impedes detection of weak estrogen in this assay (Cosnefroy et al., in prep). Finally, it is noteworthy that some differences in BPs ranking were noted depending on the zfER subtype. In ZELH-zfERα, active BPs ranked as follows: BP2 = THB > BP1 > 44'BP > 23'44'BP >> 4BP (Figures 2A and 2B); while in ZELH-zfERβ1: BP2 = 4BP > THB > 44'BP (Figures 2C and 2D); and in ZELH-zfERβ2: BP2 > 4BP > BP1 = THB = 23'44'BP > 44'BP >> BP3 (Figures 2E and 2F). In light of these results, alpha/beta selectivity is suggested regarding 4BP towards zfERβ subtypes and, to a lesser extent, 44'BP, BP1 and THB towards zfERα. Those compounds may thus represent *in vitro* selective ER modulators (SERM) of zebrafish estrogen receptors. It is also noted that the preferential action of BPs on zfERα contrasts with the preferential affinity of steroid estrogens E2 and EE2 for zfERβ subtypes.

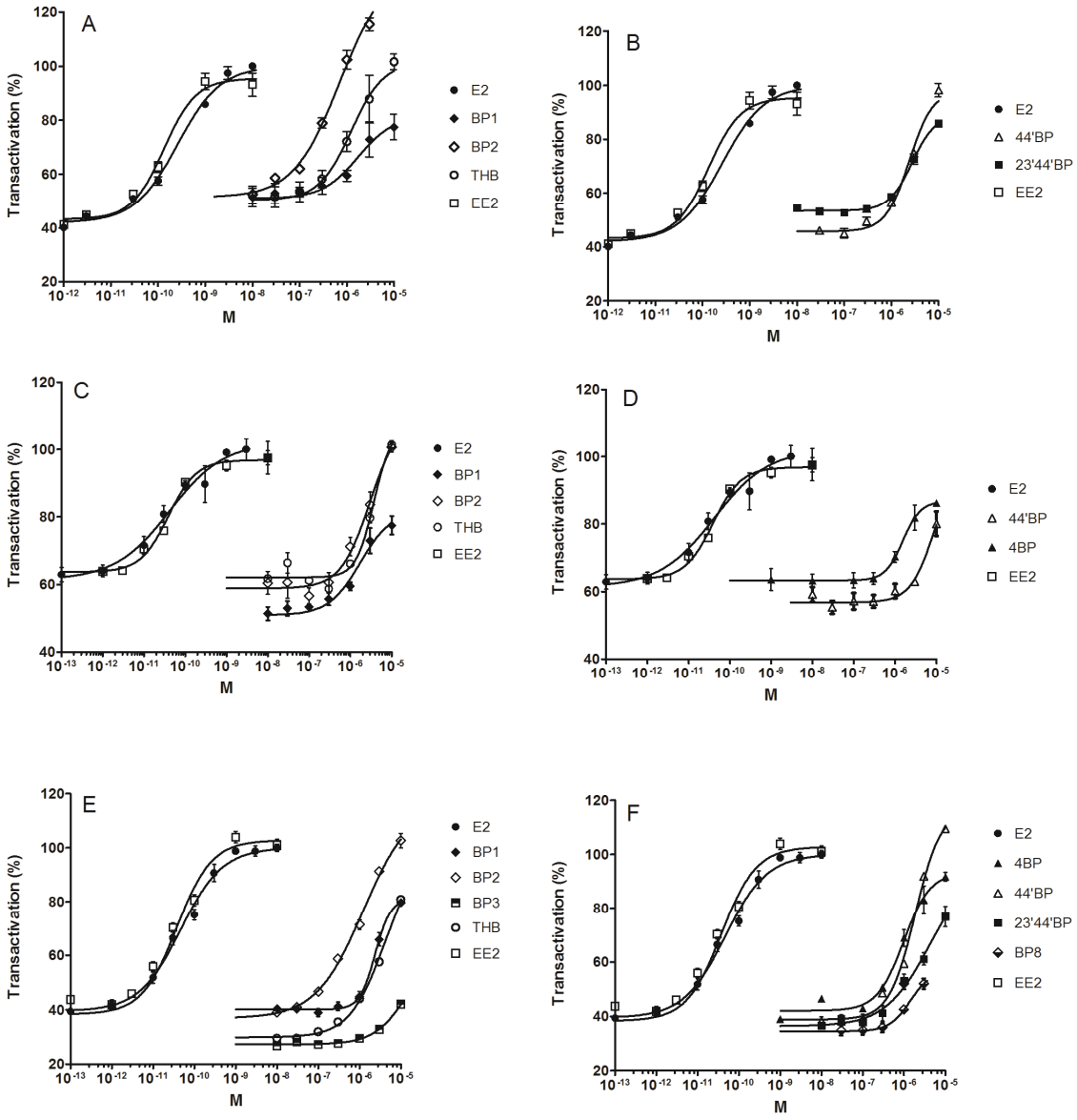


Figure 2 : Dose response curves of luciferase induction in (A, B) ZELH-zfERα, (C, D) ZELH-zfERβ1 and (E, F) ZELH-zfERβ2 cells by xeno-estrogens. *17β-estradiol (E2), 17α-ethynylestradiol (EE2) and benzophenone derivatives: 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2), 2,4,4'- trihydroxybenzophenone (THB), 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (23'44'BP), 2,3,4-trihydroxybenzophenone (234BP), 4-hydroxybenzophenone (4BP), 44'-dihydroxybenzophenone (44'BP). Results were expressed as percentage of luciferase activity induction by E2 10 nM in ZELH-zfERα and E2 3 nM in ZELH-zfERβ1 and ZELH-zfERβ2. Cells were exposed for 72 hours at 28°C; values are expressed as means ± SD of triplicates.*

III. 2. In vivo estrogenic activity of benzophenone derivatives in cyp19a1b-GFP transgenic zebrafish

All benzophenone derivatives were tested for their ability to induce the GFP reporter gene in the *Cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line exposed at embryo stage. We showed that embryos treated to the positive control EE2 (0.05 nM) from 0 to 5 dpf exhibited strong GFP expression in the telencephalon, the preoptic area and the inferior lobe of the hypothalamus while in control embryo, GFP signal was very weak and restricted to the preoptic area. Quantification of GFP expression further demonstrated that EE2 lead to a tremendous 20-fold induction of the reporter gene compared to control group. Among the ten BPs tested, BP1, THB, 4BP and 44'BP significantly induced GFP expression in various brain region, the distribution of GFP signal being comparable to EE2. Quantification of GFP, further demonstrated that these compounds induced GFP expression in a concentration dependant manner yielding a maximal GFP signal at the higher tested concentration (10 µM) for all four BPs (Figure 3). 4BP was the strongest active chemical with a maximal GFP induction factor of 18, very close to EE2 one. BP1 also markedly induced GFP by 12 fold over DMSO control, and then THB and 44'BP induced a less moderate GFP response by 5 and 3 fold, respectively. Surprisingly, no effect was observed with BP2, which was among the most active BPs in our *in vitro* experiments. Finally, BP3 was found weakly active in a first experiment (Figure 4) and additional experiments have to be done to confirm this effect.

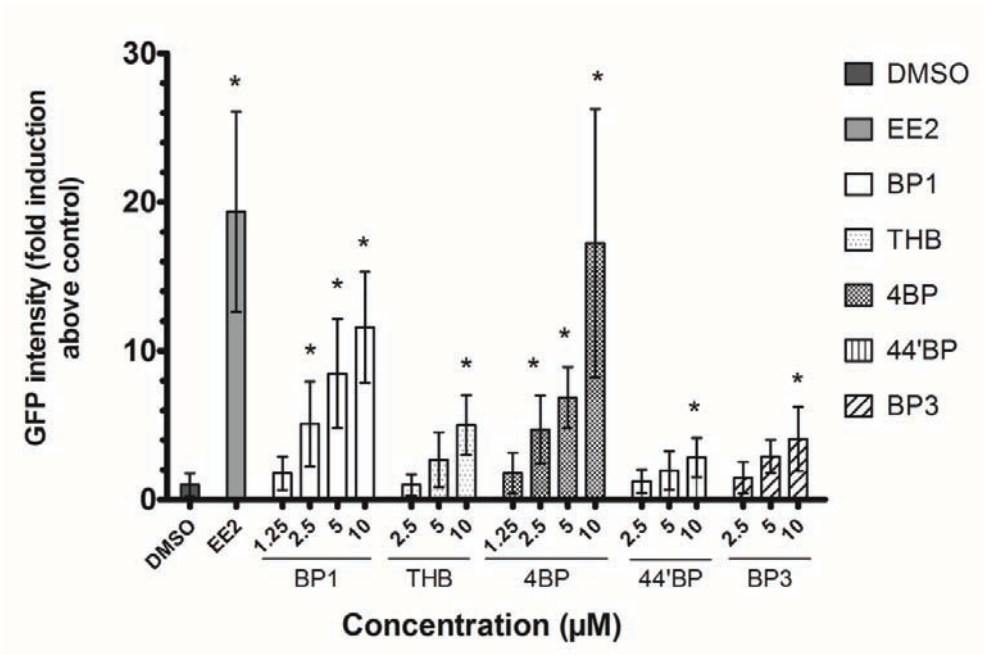


Figure 3: Expression of GFP in larvae of *cyp19a1b*-GFP zebrafish exposed for 120 h (0 to 5 dpf) to EE2 (0.5 nM) and BPs (1.25, 2.5, 5 and 10 µM). *Only BPs that significantly induce GFP in our experiments are presented in this figure. Values are means ±SEM of two independent experiments (n= 10-20 embryos per condition), except for BP3 (one experiment; n=5-6); *: p<0.05.*

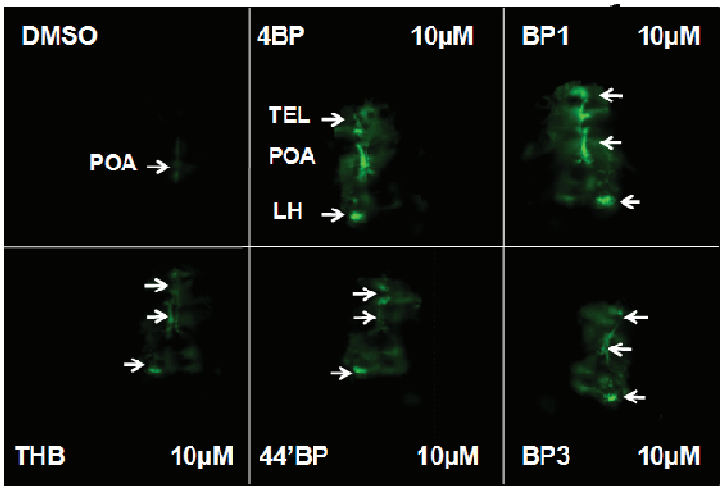


Figure 4: In vivo effects of several BPs on GFP expression in transgenic zebrafish embryos. *BPs cause an increase of GFP in the telencephalon (Tel), the preoptic area (POA), and the inferior lobe of the hypothalamus (LH) at 5 dpf. Dorsal views of the embryos with anterior to the top.*

III. 3. Effects of BP2 and BP3 on circulating concentrations of vitellogenin in male zebrafish

Based on data obtained *in vitro* using the three ZELH-zfERs cell lines and *in vivo* using the transgenic *cyp19a1b*-GFP embryo assay, BP2 and BP3 were further tested for their estrogenicity in adult male fish by measuring zf-ERs (Figure 5) and zf-VTG gene expressions (BP2) (Figure 6) as well as circulating concentrations of Vtg (BP2 and BP3) (Figure 7). In each experiment E2 10nM was used as a positive control. During the experiments, no mortality was recorded in fish exposed to E2, BP2 or BP3.

We found that E2 affect differently the zfER expressions with a strong 150 fold up-regulation of zfERα gene and a moderate induction of both zfERβ1 and zfERβ2 (5 and 8-fold above control respectively) (Figure 5). In contrast to E2, BP2 did not induce any significant changes in zfERs expressions. As expected, exposure of male fish to E2 leads to a tremendous induction of gene expressions and vitellogenin synthesis. Interestingly, BP2 induced in a concentration-dependant manner Vtg 1 and Vtg 2 gene expressions leading to a concentration-dependant induction of circulating concentrations of Vtg with a significant effect from 10 mg/L of BP2 (Figure 6A) . At the highest concentration, the mean measured concentration of vitellogenin reached 460 µg/ml corresponding to an almost 7000 fold induction above control. In a second experiment exposing male fish to E2 10 nM and to increasing concentrations of BP3, we found that E2 induced vitellogenin at similar concentrations to those measured in the first experiment. Further, BP3 lead to a concentration-

dependant induction of vitellogenin synthesis (Figure 7B). The mean measured concentration of vitellogenin in the group exposed to 10 mg/L of BP3 reached 3200 ng/ml of total blood corresponding to a significant 32 fold increase of vitellogenin compared to the control group. This corresponds to weak vitellogenin inductions compared to those measured in BP2-exposed fish. Overall, our data demonstrate that BP2 and BP3 induced vitellogenin expression in male fish, BP2 being the most estrogenic active compound.

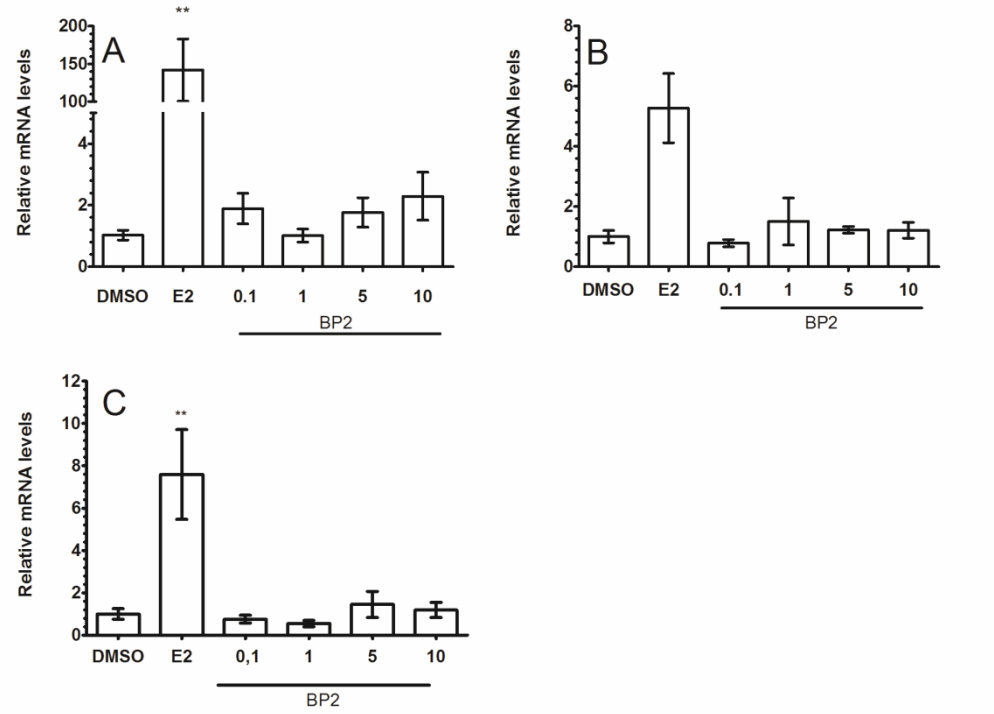


Figure 5 : Expression of zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 in liver of adult male zebrafish exposed to E2 (10 nM) and BP2 (0.1; 1; 5; 10 mg/L). *(A) Expression of zfERα, (B) zfERβ1 and (C) zfERβ2. The results were normalized using GAPDH housekeeping gene and represented as ratio of mean mRNA expression of exposed fishes on DMSO exposed fishes ± S.E.M (n=6-7). The asterisk represents a statistically significant difference when compared with controls (DMSO), * at P<0.05, ** at P< at 0.01 and *** at P< at 0.001.*

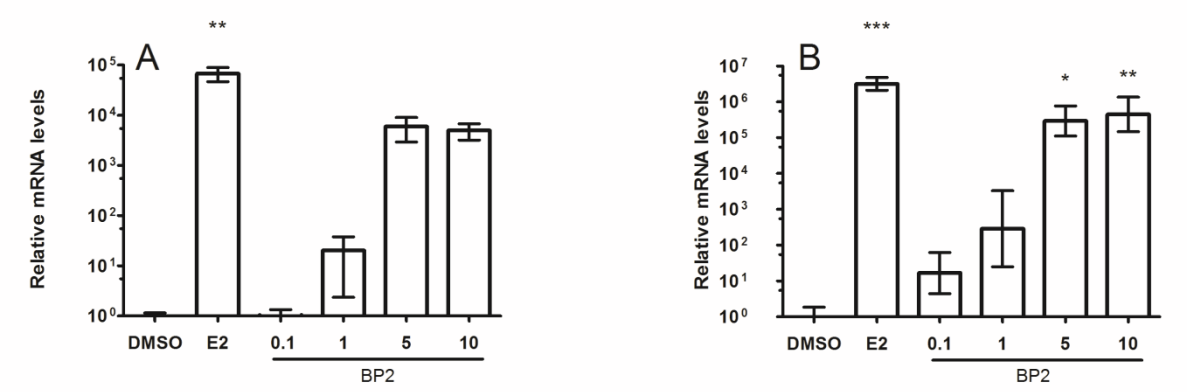


Figure 6: Expression of Vtg1 and Vtg2 in liver of adult male zebrafish exposed to E2 (10 nM) and BP2 (0.1; 1; 5; 10 mg/L). *(A) Expression of Vtg1 and (B) expression of Vtg2. The results were normalized using GAPDH housekeeping gene and represented as ratio of mean mRNA expression of exposed fishes on DMSO exposed fishes ± S.E.M (n=6-7). The asterisk represents a statistically significant difference when compared with controls (DMSO), * at P<0.05, ** at P< at 0.01 and *** at P< at 0.001.*

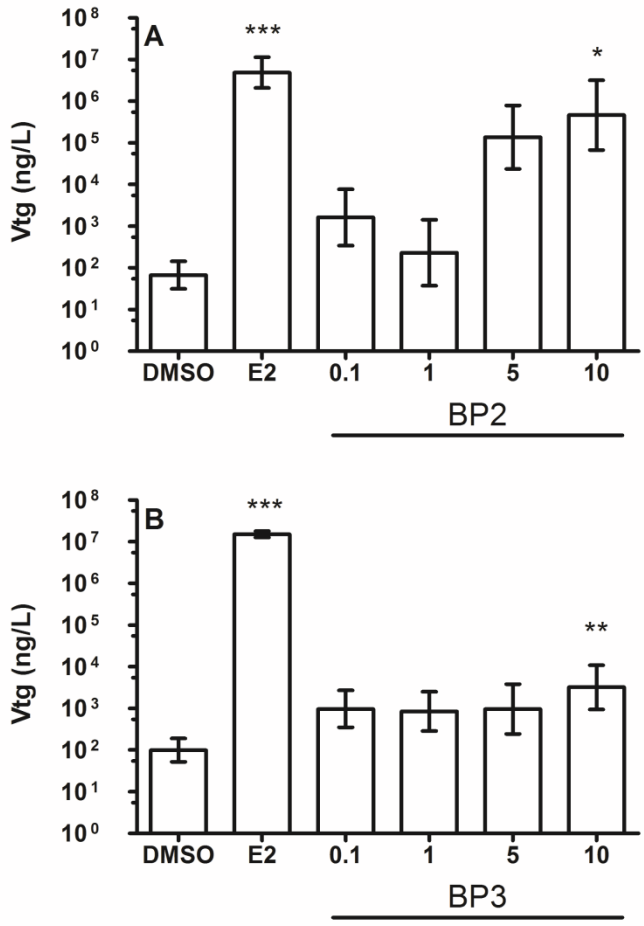


Figure 7: Effect of BP2 (A) and BP3 (B) on Vtg expression on adult fishes measured by ELISA. Exposure concentration of E2 was 10 nM and BP2 (1.25, 2.5, 5 and 10mg/L). *Values are means as SD (n= 6-8 adult fish per condition) - * at P<0.05, ** at P< at 0.01 and *** at P< at 0.001.*

IV. DISCUSSION

In this study, estrogenic activity of several benzophenone derivatives was assessed in a model fish species, the zebrafish by using a combination of newly developed *in vitro* and *in vivo* biological models, namely ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ1, ZELH-zfERβ2 cell lines and *cyp19a1b*-GFP embryos. For the first time, the ability of these compounds to interact as agonist on the three zebrafish estrogen receptor isoforms is reported, yielding different patterns of estrogenic activation according to zfER subtype or the biological system (*i.e.* cell, embryo or adult).

IV. 1. Estrogenic activity of benzophenone derivatives on the ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ1, ZELH-zfERβ2 cell lines.

We studied the estrogenic activity of 10 BPs in zebrafish-specific cell lines which expressed the three zfERs in the same hepatic context. These models allowed to compare affinity of chemicals for each zfER subtypes and potentially identify receptor selective ligands. Five of 10 BPs induced an estrogenic activity on the three models: BP2, THB, BP1, 4BP, 44'BP, while BP and 234BP were non active. These two former compounds have been described as weakly active in transient transfection (ERE-Luc) in MCF-7 cells (Suzuki et al., 2005). These compounds have also been tested in yeast-hERα model (Schultz et al., 2000), showing BP inactive and 234BP as estrogenic (EC_{50} 5 μM).

BP8 and BP3, both containing a methoxy group (Figure 1), were weakly active on ZELH-zfERβ2, as they induced partial luciferase activity at high concentrations, but inactive on the two others cell lines. These weak activities have been reported for BP8 in MCF-7 cells (Suzuki et al., 2005). For BP3, published results showed generally an EC_{50} > 10 μM (Suzuki et al., 2005; Kunz et al., 2006; Cosnefroy et al., 2009), except in the study by Schlumpf et al., (2001) using a proliferation assay in MCF-7 cells and reporting an EC_{50} of 3.73 μM. Schreurs et al., (2002) also obtained a strong luciferase signal induction in HEK293 stably transfected with the hER at 10^5M. In order to check the ER specificity of luciferase induction in luminescent cell lines, all BPs were tested in ZELH cells (ZFL transfected only with ERE-Luc-Hygro but expressing no ER). These experiments showed that none of the tested BPs induced significant luciferase signal in ZELH (data not shown), which confirmed the specificity of the weak luciferase induction in ZELH-zfERβ2 cell lines by BP3 and BP8.

23'44'BP and 44'BP were the two less estrogenic compounds tested in our models. These results were different from those obtained by Suzuki et al., (2005), who found these two BPs estrogenic with EC_{50} of 0.14 μM for 23'44'BP and 44'BP in human MCF-7 cells.

THB and BP1 have a higher affinity for zfERα than zfERβ1 and zfERβ2 and moreover for THB which elicited EC_{50} of 3 or 4 fold higher in ZELH-zfERα. In human ER subtype, the results were different. BP1 and THB have higher affinity for hERβ than hERα (Molina-Molina et al., 2008). Moreover, in zebrafish zfERβ2 model, THB did not induced 100 percent of maximal transactivation (80 %).

BP2 was the most active in ZELH-zfERα (EC_{50} 1.08 μM), ZELH-zfERβ2 (EC_{50} 1.47 μM) and the second most estrogenic in ZELH-zfERβ1 (EC_{50} 2.2 μM). The estrogenicity of this compound has been demonstrated in different models, *in vitro* using transient transfection in MCF-7 (EC_{50} 0.3 μM) (Suzuki et al., 2005), stable transfection in MELN cells (EC_{50} 3.2 μM) (Molina-Molina et al., 2008) and also in fish *in vitro* models like yeast-rtERα (EC_{50} 24.9 μM), HELN-rtERα (EC_{50} 0.16 μM) and PELN- rtERα (EC_{50} 0.38 μM) (Kunz et al., 2006; Cosnefroy et al., 2009). We also noticed that 4BP have a clear higher affinity for ZELH-zfERβ1 and ZELH-zfERβ2 than ZELH-zfERα (Table 2).

Finally, the established *in vitro* models can serve to highlight preferential affinity of ligands towards receptor subtypes. We noted differences in BPs ranking depending on the zfER subtype suggested alpha/beta receptor selectivity by certain BPs, notably for 4BP towards zfERβ subtypes and, to a lesser extent, 44'BP, BP1 and THB towards zfER□. Those compounds may thus represent *in vitro* selective

ligands of zebrafish estrogen receptors. It is noted that the preferential action of BPs on zfER□ contrasts with the preferential affinity of steroid estrogens E2 and EE2 for zfERβ subtypes. Molina-Molina et al., (2008) reported similar preferential activity for the human β receptor than for the alpha subtype for BP2, THB and BP1.

IV. 2. Effect of BPs on GFP expression at larval stage using Aro b-GFP transgenic zebrafish

In order to gain further information regarding the estrogenic potency of benzophenone derivatives, we assessed their effect on ***in vivo*** expression of ***cyp19a1b*** in zebrafish embryo. For that purpose, we used a newly established tg-(***cyp19a1b***-GFP) embryo assay which has been shown as a reliable and sensitive assay to quantify estrogenic activity of chemical substances (Brion in prep). By quantifying GFP expression in live 5-dpf old zebrafish larvae, we confirm the estrogenic potency of some BP (***i.e.***, BP1, THB, 4BP and 44'BP) as shown by their ability to induce GFP expression in a concentration-dependant manner. However, the ranking of these molecules as a function of their potential estrogenic activity in the cellular models or in the tg-(***cyp19a1b***-GFP) embryo assay is different. For instance, 4BP was the most estrogenic compound ***in vivo*** but not ***in vitro***. Interestingly, this compound presents a strong affinity for zfERβ1 and zfERβ2 while its estrogenic potency in the ZELH-zfERα cell line is very weak. Interestingly, it has been recently shown by means of whole-mount in situ hybridization, that that fERβ1 and zfERβ2 are early expressed in the developing brain, while zfERα are not detected in the brain before two weeks post fertilization. Based on these data, it can be suggested that the effect of 4BP on brain aromatase expression is mediated by zfERβs. Given the very weak estrogenic potency of BP1 in ZELH-zfERβ1 cell line and the strong GFP expression induced by this compound in transgenic embryos, it can be suggested that involvement of zfERβ2 is predominant in the effect mediated by these compounds on brain aromatase expression. This hypothesis is further illustrated by BP3 which exhibited no estrogenic activity in ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ1 cell lines and a weak estrogenic ***in vitro*** in ZELH-zfERβ2 as well as ***in vivo*** in the in transgenic embryo assay. However, in the specific case of BP3, metabolisation of the parent compound into estrogenic metabolites may also take into account. Indeed, it has been shown that BP3 is metabolized into BP1, whom estrogenic effect has been shown both ***in vitro*** in the three ZELH-ZfERs cell line and ***in vivo*** in transgenic embryos as well as in adult fish as shown by the significant vitellogenin induction measured in male fish. Regarding BP2, we showed that this compound has strong estrogenic activity ***in vitro*** in both ZELH-zfERs models, had no effect of GFP expression in tg(***cyp19a1b***-GFP) embryo model, but induced marked estrogenic effect in adult male fish has shown by the concentration-dependant induction of Vtg expression and synthesis confirming previous data obtained in male fathead minnow (Kunz et al., 2006; Weisbrod et al., 2007). The lack of estrogenic effect of BP2 at embryonic stage of development may be related to difference of biodisponibilty and /or metabolisation of this compound between

embryos and adult fish. Such difference may also rely on the cellular context in which the estrogenic effect has been measured. In this way, it would advisable to determine whether BP2 can induced estrogenic response in glial cell line U251-MG transfected with the three zebrafish ER subtypes and the Aro-B promoter linked to a luciferase reporter gene (Le Page et al., 2006). All together, these data deserve further study to explain the difference of responses obtained between the different zebrafish biological models used in this study. Whatever, our study highlighted the interest of using in a testing strategy the combination of *in vitro* and *in vivo* models which possess both their advantages and their limits.

V. Conclusion

Our approach allows to characterize the estrogenic potency of emerging pollutants, the benzophenone derivatives, using *in vitro* and *in vivo* assays within a unique model fish species, the zebrafish. The differences observed between assays deserve further studies to characterize the behavior of compounds in the different biological systems in term of bioavailability and metabolism but also to better consider the importance of the cellular context in the biological responses measured. Whatever, our study demonstrates the interest in combining various assays to assess the hazard and risk of EDCs.

REFERENCES

Ackermann, G. E., Brombacher, E. and Fent, K. (2002). "Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(9): 1864-1875.

Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A. M., Pons, M., Nicolas, J. C. and Casellas, C. (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." Science of the Total Environment **233**(1-3): 47-56.

Balmer, M. E., Buser, H. R., Muller, M. D. and Poiger, T. (2005). "Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes." Environmental Science & Technology **39**(4): 953-962.

Barcelo, D. (2003). "Emerging pollutants in water analysis." Trac-Trends in Analytical Chemistry **22**(10): XIV-XVI.

Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A. and Porcher, J. M. (2002). "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(8): 1699-1708.

Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J. and Flammarion, P. (2004). "Impacts of 17[beta]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (Danio rerio)." Aquatic Toxicology **68**(3): 193-217.

Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J. M., Balaguer, P. and Ait-Aissa, S. (2009). "A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens." Toxicology in Vitro **23**(8): 1450-1454.

Díaz-Cruz, M. S., Llorca, M. and Barceló, D. (2008). "Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment." TrAC Trends in Analytical Chemistry **27**(10): 873-887.

Fent, K., Zenker, A. and Rapp, M. (2009). "Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland." Environ Pollut **158**(5): 1817-24.

Hinfray, N., Porcher, J. M. and Brion, F. (2006). "Inhibition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **144**(3): 252-262.

Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., Foster, P. M., Gray, C. L. and Gray, L. E. (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." Toxicological Sciences **105**(2): 235-259.

Jeon, H. K., Chung, Y. and Ryu, J. C. (2006). "Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1131**(1-2): 192-202.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J. M. and Ait-Aissa, S. (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." Environ Pollut **158**(1): 74-83.

Kunz, P. Y. and Fent, K. (2006). "Agonistic and antagonistic activities of UV filters towards the human estrogen and androgen receptor and activities of UV filter combinations in vitro." Marine Environmental Research **62**: S241-S241.

Kunz, P. Y. and Fent, K. (2006). "Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish." Aquatic Toxicology **79**(4): 305-324.

Kunz, P. Y., Galicia, H. F. and Fent, K. (2006). "Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish." Toxicological Sciences **90**(2): 349-361.

Le Guevel, R. and Pakdel, F. (2001). "Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods." Apmis **109**: S473-S479.

Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O. and Pakdell, F. (2006). "Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system." Environmental Health Perspectives **114**(5): 752-758.

Legler, J., van den Brink, C. E., Brouwer, A., Murk, A. J., van der Saag, P. T., Vethaak, A. D. and van der Burg, B. (1999). "Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line." Toxicol Sci **48**(1): 55-66.

Matthews, J. B., Fertuck, K. C., Celius, T., Huang, Y. W., Fong, C. J. and Zacharewski, T. R. (2002). "Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **82**(2-3): 181-194.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O. and Pakdel, F. (2002). "Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions." Biology of Reproduction **66**(6): 1881-1892.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F. and Kah, O. (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene." Journal of Comparative Neurology **485**(4): 304-320.

Molina-Molina, J. M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Aissa, S. and Balaguer, P. (2008). "Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays." Toxicology and Applied Pharmacology **232**(3): 384-395.

Mouriec, K., Lareyre, J. J., Tong, S. K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B. C., Kah, O. and Anglade, I. (2009). "Early Regulation of Brain Aromatase (cyp19a1b) by Estrogen Receptors During Zebrafish Development." Developmental Dynamics **238**(10): 2641-2651.

Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B. and Lichtensteiger, W. (2001). "In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens." Environmental Health Perspectives **109**(3): 239-244.

Schreurs, R., Lanser, P., Seinen, W. and van der Burg, B. (2002). "Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay." Archives of Toxicology **76**(5-6): 257-261.

Schultz, T. W., Seward, J. R. and Sinks, G. D. (2000). "Estrogenicity of benzophenones evaluated with a recombinant yeast assay: Comparison of experimental and rules-based predicted activity." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(2): 301-304.

Segner, H. (2009). "Zebrafish (Danio rerio) as a model organism for investigating endocrine disruption." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **149**(2): 187-95.

Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N. and Ohta, S. (2005). "Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens." Toxicology and Applied Pharmacology **203**(1): 9-17.

Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K. and Fent, K. (2007). "Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish." Toxicology and Applied Pharmacology **225**(3): 255-266.

I.2. Effet œstrogénique de la Benzophénone-2 chez la larve : données complémentaires à l'article 1

Afin de compléter les résultats relatifs à l'effet œstrogénique de la BP2 obtenus lors des travaux relatifs à l'article 1, deux études complémentaires ont été menées.

La première étude s'est intéressée à la quantification des transcrits des gènes *vtg1* et *vtg2* chez la larve de poisson zèbre exposée à une gamme de concentrations de BP2 allant de 1,25. 10^{-6} à 5,0. 10^{-5} M de 0 à 4 dpf (Figure 48). Contrairement au contrôle positif (E2, $p<0,005$), la BP2 n'a pas entrainé d'augmentation des taux de transcrits des gènes *vtg1* et *vtg2*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'article 1, à savoir une absence d'augmentation des transcrits des différents ERs chez la larve. En effet, la modulation de l'expression des gènes de la Vtg est sous l'influence d'un mécanisme dépendant des ERs.

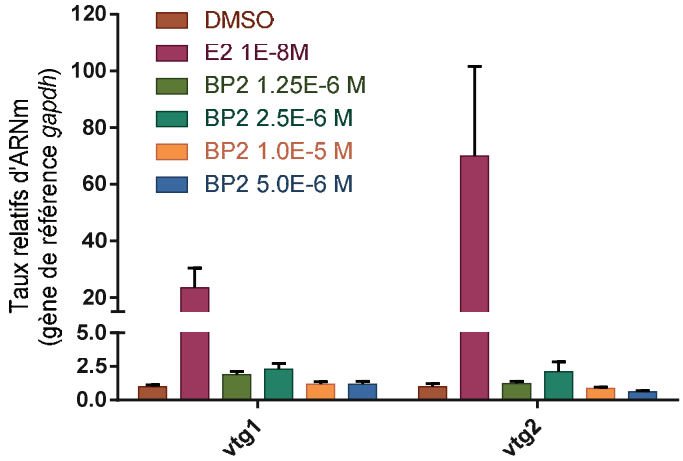


Figure 48. Effet de la BP2 sur l'expression des transcrits des gènes vtg1 et vtg2 chez la larve

La deuxième étude menée chez la larve a porté sur l'effet de la BP2 sur l'expression des transcrits du gène œstrogéno-régulé, *cyp19a1b*. Après 4 jours d'exposition à la BP2 à la concentration de 5,0. 10^{-5} M, aucune augmentation des transcrits de ce gène n'a été observée, contrairement au contrôle positif (E2, Figure 49). Ce résultat confirme ceux obtenus dans la larve transgénique *cyp19a1b*-GFP dans laquelle la BP2 n'avait pas entrainé d'augmentation de fluorescence à cette concentration.

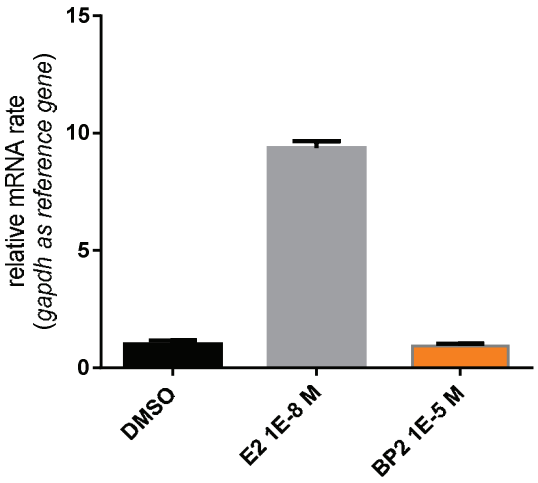


Figure 49. Effet de la BP2 sur l'expression du gène cyp19a1b chez la larve

Par conséquent, d'après l'ensemble des résultats obtenus dans l'article 1 et les études complémentaires, la BP2 est responsable d'une activité œstrogénique dans les lignées cellulaires ZELH-zfERs et chez le poisson zèbre adulte, mais ne perturbe pas l'expression de gènes régulés par les œstrogènes chez la larve à 10 µM.

II. Activité œstrogénique des bisphénols A, F et S chez le poisson zèbre

Article 2

An integrated *in vitro* and *in vivo* approach to assess the estrogenic activity of Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F in the zebrafish.

Vincent Le Fol[a,b,c], Manoj Sonavane[a], Selim Aït-Aïssa[a,*], Benjamin Piccini[a], Emmanuelle Maillot-Maréchal[a], Olivier Palluel[a], Daniel Zalko[b,c], François Brion[a,*]

[a] *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

[b] *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

[c] *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

* : corresponding authors :

E-mail: françois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 512, fax +33 344 556 767

Selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33 344 556 511, fax +33 344 556 767

Présentation de l'article

De part ses nombreuses applications et sa forte production (Geens et al. 2010; Michalowicz 2014), le BPA est largement répondu dans l'environnement (Careghini et al. 2015). L'exposition de l'Homme au BPA via différentes voies d'exposition (alimentaire, cutanée, pulmonaire) a été bien caractérisée (Yamada et al. 2002; Calafat et al. 2008; Lee et al. 2008; Jimenez-Diaz et al. 2010; Chou et al. 2011; Cao et al. 2012; Edlow et al. 2012). L'exposition au BPA serait responsable de troubles multiples et délétères sur la faune (Oehlmann et al. 2009) et chez l'Homme (Rochester 2013). Il est notamment incriminé dans les troubles de la masculinisation (Rouiller-Fabre et al. 2015) et du développement du cerveau (Negri-Cesi 2015) suite à une exposition fœtale. Etant donné le danger que représente ce composé, le BPA est en voie d'être remplacé par d'autres bisphénols de substitution, notamment le BPF et le BPS, pour lesquels se pose la question de l'évaluation de leurs effets sur le système endocrinien chez l'Homme et l'environnement. Le BPS a déjà été retrouvé dans des papiers thermiques (Becerra et Odermatt 2012) et des produits alimentaires (Gallart-Ayala et al. 2011). L'exposition humaine du BPS a aussi été mise en évidence chez la population américaine (Liao et al. 2012a). Etant donné la probable utilisation croissante de ces substituts au BPA, il est probable de voir augmenter les concentrations environnementales de ces contaminants dans les années à venir. De plus, la proximité structurale de ces composés peut faire craindre des effets délétères similaires à ceux du BPA soulignant la nécessité de recueillir des données toxicologiques afin de caractériser leurs activités biologiques et d'évaluer le risque qu'ils représentent.

Il a été montré que le BPA, BPF et le BPS sont capables d'interagir avec des récepteurs nucléaires dont les récepteurs des œstrogènes, ainsi que d'entrainer des perturbations de sécrétions hormonales dans différents modèles *in vitro* (Hashimoto et al. 2001; Chen et al. 2002; Kitamura et al. 2005; Kuruto-Niwa et al. 2005; Grignard et al. 2012; Molina-Molina et al. 2013; Eladak et al. 2015). Les données *in vivo* bien que moins nombreuses, montrent cependant des perturbations de l'expression de gènes hormono-régulés ainsi que des troubles du développement et de la reproduction (Yamasaki et al. 2002; Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014; Kinch et al. 2015). Les études portant sur l'interaction du BPA, BPS et BPF avec les récepteurs des œstrogènes ont montré des affinités et des activités différentes selon les sous-types des ER humains. Contrairement à l'Homme, chez les poissons dont le poisson zèbre, trois sous-types d'ER à savoir l'ER , ER 1 et ER 2 sont différemment exprimés et régulés dans les tissus (Menuet et al. 2002). Aucune donnée n'existe sur la capacité des substituts du BPA à interagir avec les récepteurs de poisson. Or l'espèce d'origine ainsi que le contexte cellulaire sont des facteurs pouvant influencer les activités oestrogéniques des composés chimiques (Matthews et al. 2000; Wilson et al. 2007; Hotchkiss et al. 2008). Dans ce contexte, nous avons entrepris d'évaluer l'activité de substituts du bisphénol A, à savoir le BPF et le BPS, à travers l'utilisation de deux modèles complémentaires du poisson zèbre. Il s'agit de tests *in vitro* basés sur l'expression des différents récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (zfERs) dans la lignée cellulaire hépatique ZFL

(ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012), ainsi que de la larve transgénique exprimant la GFP placée sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* dont l'expression est cérébrale et œstrogéno-régulée (EASZY assay) (Brion et al. 2012).

Nos résultats confirment que la capacité d'activation du BPA est supérieure vis-à-vis du zfER . Contrairement au BPA, les EC50 montrent que la capacité d'activation du BPF et du BPS est supérieure pour le zfER 2 et zfER 1, respectivement. D'autres études réalisées dans le modèle MELN exprimant le hER , ont monté que l'activité du BPA était suéprieure à celle du BPF et BPS (Molina-Molina et al. 2013) ou bien proches de celle du BPS (Grignard et al. 2012).
Dans le modèle embryo-larvaire cyp19a1b-GFP (test EASZY), le BPA et le BPF sont responsables d'une augmentation significative de l'induction de GFP à partir de 5 et 1 µM respectivement. Pour le BPS, des concentrations supérieures sont nécessaires (30 et 60 µM). L'effet maximum du BPS est d'environ 4,3 fois moins important que celui obtenu pour le BPA et le BPF. Cette différence d'activité œstrogénique n'était pas attendu étant donné la proximité structurale de ces composés ainsi que de leur activité proche dans les modèles cellulaires du poisson zèbre (ZELH-zfERs) ou provenant de mammifères (Molina-Molina et al. 2013). La capacité du BPA et du BPS à induire la production de vitellogénine plasmatique dans différentes espèces de poissons dont le poisson zèbre a déjà fait l'objet d'investigation (Van den Belt et al. 2003; Tabata 2004; Brian et al. 2005; Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014; Song et al. 2014). Nous avons choisis d'explorer la capacité du BPF à induire cette protéine œstrogéno-régulée chez le poisson zèbre adulte. Le BPF est responsable d'une augmentation de la vitellogénine plasmatique à 0.1 et 1 µM.
La comparaison des LOEC obtenues par le modèle EASZY et des LOEC obtenues *in vivo* par la mesure de la vitellogénine plasmatique, montre un potentiel œstrogénique semblable pour le BPA entre les deux modèles. Pour le BPS et le BPF, ces LOEC sont beaucoup plus faibles dans le modèle du poisson zèbre adulte qu'elles ne le sont dans le modèle larvaire. Par conséquent, ces données montrent la difficulté à prédire quantitativement le potentiel œstrogénique de ces composés sur la base des seules données *in vitro*. Des paramètres comme l'absorption, la distribution et le métabolisme des xénobiotiques peuvent influencer les réponses biologiques. Par conséquent, ces différences de réponse peuvent reposer, du moins en partie, sur des différences d'ordre pharmacocinétique.

En résumé, nous avons montré que les trois bisphénols sont capables d'exercer une activité sur les sous-types des zfER dans un contexte hépatique avec toutefois, des efficacités différentes selon les sou-types de récepteurs. Nous avons également montré que le BPA et le BPF possèdent une plus forte capacité à induire l'expression de la GFP que ne la possède le BPS dans un contexte cérébral. La comparaison de ces activités entre des modèles de complexité biologique différente pose la question du rôle des paramètres pharmacocinétiques dans l'évaluation du danger des contaminants environnementaux.

An integrated *in vitro* and *in vivo* approach to assess the estrogenic activity of Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F in the zebrafish.

Vincent Le Fol[a,b,c], Manoj Sonavane[a], Selim Aït-Aïssa[a,*], Benjamin Piccini[a], Emmanuelle Maillot-Maréchal[a], Olivier Palluel[a], Daniel Zalko[b,c], François Brion[a,*]

[a] *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

[b] *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

[c] *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

* : corresponding authors :

E-mail: françois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 512, fax +33 344 556 767

E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33 344 556 511, fax +33 344 556 767

Abstract

Bisphenol A (BPA) is a widely used chemical that has been extensively studied for its endocrine-disrupting properties. Several other bisphenols are already used or are planned to be used as alternatives to BPA, raising the necessity to assess their hazard as regards the endocrine system. In the present study, the estrogenic activity of BPA, BPS and BPF was quantified by using zebrafish-specific mechanism-based *in vitro* and *in vivo* assays. All the bisphenols tested were efficient in transactivating the three zebrafish ER subtypes expressed in ZFL zebrafish hepatic cell line stably expressing luciferase under the control of estrogen responsive elements (ERE). BPA was more active toward ER while BPS and BPF were more efficient to induce an estrogenic response in ZELH-ZfER s cell lines. We further investigated the estrogenic effect at the individual level, by quantifying the expression of brain aromatase using a transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryo assay (EASZY). Using the EASZY assay, we found that BPF was the most active compound, followed by BPA and BPS. BPF and BPA induced GFP in a concentration-dependant manner up to a similar level as EE2 (positive control). In contrast, BPS only partially induced brain aromatase, which occurred solely at the highest concentrations tested (>30µM). Overall, this study confirms the relevance of combing cellular and whole-organism bioassay in a unique model species within an integrated approach devoted to the hazard assessment of chemicals. The differences in terms of estrogenic activity between *in vitro* and *in vivo* assays further support the necessity to assess the fate of chemicals in biological models used for the hazard assessment of endocrine disrupting chemicals.

Keywords: zebrafish, endocrine disruptors, bisphenols, estrogenic activity

1. Introduction

Bisphenol A (BPA: 2,2,-bis(4-hydroxyphenol)propane) is one of the man-made chemicals produced at the highest volume. It is used to synthesize polycarbonate plastics employed to manufacture a wide variety of industrial and consumer goods), epoxy resins (paints, lacquers, including can-coating lacquers) and as a color revelator in some thermal papers. It is now well established that Human are exposed to BPA (Calafat et al., 2008; Cao et al., 2012; Chou et al., 2011; Edlow et al., 2012; Jimenez-Diaz et al., 2010; Lee et al., 2008; Yamada et al., 2002; Zalko et al., 2011), which is also an environmental contaminant (Careghini et al., 2015). In addition, exposure of human populations to BPA can occur through different routes of exposure (food, skin, air), with specific concerns raised about BPA exposure during the fetal life. The latter scenario has been associated with many reports of adverse effects on the reproductive system, metabolism and development in animals and with masculinization defects (Rouiller-Fabre et al., 2015) and neuro-development disorders in human (Negri-Cesi, 2015). All these adverse effects and studies suggest disorders involving a complex interaction with different hormonal and/or epigenetics signaling pathways in the developing fetus. In the case of BPA, the lack of fetal UFP glucuronosyltransferase (UGT) enzyme (Nishikawa et al., 2010) may explain the higher risk of negative outcomes during fetal development as compared to adult. Although, a large amount of literature data supports that BPA would cause adverse health effects in human (Rochester, 2013) and wildlife (Oehlmann et al., 2009), controversies still remain as regards the risk assessment of BPA. Given the already implemented or upcoming specific BPA regulations in several countries, it is obvious that other bisphenols are intended to replace BPA for specific industrial and consumer's goods applications, raising the question of the potential adverse effects of these lesser known bisphenols on the endocrine system in vertebrates, in human, and in the context of environmental hazard and risk assessment.

BPS (2,2-bis [4-hydroxyphenol]sulfone) and BPF (2,2-bis [4-hydroxyphenol]methane) are already used as substitutes to BPA. BPS has already been found in beverage and food cans (Gallart-Ayala et al., 2011; Vinas et al., 2010) and in thermal receipt papers (Becerra and Odermatt, 2012; Liao et al., 2012b). It has been identified in more than 81% of urinary samples from American population (Liao et al., 2012a). Despite the environmental concentrations of BPS and BPF have so far been found to be lower than that of BPA (Fromme et al., 2002; Stachel et al., 2003), an increase of environmental and food-chain contamination by BPS and BPF can be expected in the next few years. Further, due to their structural similarity with BPA, one can reasonably expect that exposure BPS and BPF may produce a large span of developmental effects, which would partly overlap the effects of other xeno-estrogens. This underlines the necessity to acquire sound and detailed data about the properties and toxicology of BPS and BPF. To achieve this goal, the use of species-specific *in vitro* mechanism-based bioassays is a prerequisite. Up to now, most of the data related to the endocrine potency of BPS and BPF have been obtained in mammalian *in vitro* models demonstrating that BPS and BPF are able to activate multiple nuclear receptors (Chen et al., 2002; Grignard et al., 2012; Hashimoto et al., 2001; Kitamura

et al., 2005; Kuruto-Niwa et al., 2005; Molina-Molina et al., 2013), with an induction of cell proliferation (Molina-Molina et al., 2013) or an alteration of testosterone secretion in fetal testis assay (Eladak et al., 2015). *In vivo* studies in mammalian and non-mammalian models are scarcer but have shown that these compounds can affect the expression of hormone-regulated genes and induce developmental and reproductive impairments (Ji et al., 2013; Kinch et al., 2015; Naderi et al., 2014; Yamasaki et al., 2002). Among the molecular targets of bisphenols, the ER interaction of BPA as well as BPS and BPF has been extensively studied showing differential binding affinities and activities depending of human ER subtypes (Molina-Molina et al., 2013). In contrast to human, fish possess three ER subtypes, namely ER , ER 1 and ER 2 which are differently expressed and regulated by estrogens (Menuet et al., 2002). Since the estrogenic activity is known to be influenced by the species of origin as well as the cellular context (Hotchkiss et al., 2008; Matthews et al., 2000; Wilson et al., 2007), we aimed to further investigate the capacity of BPA substitutes to transactivate zfERs using reporter gene assays based on a stable expression of subtypes of zebrafish ER (zfER , zfER 1 and zfER 2) coupled to an estrogen response element (ERE)-driven luciferase in a zebrafish liver cell line (ZFL), that we previously developed (Cosnefroy et al., 2012). In addition to *in vitro* cellular effects of bisphenol congeners, estrogenic activity was further evaluated by using a newly developed *in vivo* zebrafish embryos assay that uses transgenic zebrafish expressing the Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the ER-regulated cyp19a1b gene (Tong et al., 2009). This assay, called EASZY (Detection of Endocrine Active Substances acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos) is a rapid and cost-effective *in vivo* mechanism-based embryo fish assay providing information regarding the capacity of chemicals to activate the ER-signaling pathway in radial glial cells in the developing brain of fish, while considering the bioavailability and pharmacodynamics of test chemicals (Brion et al., 2012).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (BPA, CAS number 80-05-7), 4,4′-Sulfonyldiphenol (BPS, CAS number 80-09-1), Bis(4-hydroxyphenyl)methane (BPF, CAS number 620-92-8), 17β-estradiol (E2, CAS number 50-28-2), 17α-ethynylestradiol (EE2, CAS number 57-63-6) were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France). Leibovitz 15 culture medium (L15), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, G418, hygromycin B, penicillin and streptomycin were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Fetal calf serum (FCS) and epidermal growth factor (EGF) were purchased from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France) and sodium bicarbonate and insulin from Dominique Dutscher (Brumath, France). ICI 182-780 (ICI) was purchased from Tocris (Bristol, UK) and Flutamide (FLU) was obtained from Sigma-Aldrich (Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture, chemical exposure and luciferase induction assay

ZELH-zfERs cell lines were established by a two-step stable transfection of the zebrafish hepatic cell line ZFL (ATCC CRL-2643) with 1) the luciferase gene under the control of ERE (yielding stable ZELH cells) and 2) each of the three zebrafish estrogen receptors (yielding stable ZELH-zfER , ZELH-zfER 1 or ZELH-zfER 2 cells) (Cosnefroy et al., 2012). Because the initially established ZELH-zfER 1 clone showed a loss of the receptor and of luciferase induction factor over passages, we improved this model in the present study by establishing new stably transfected clones from the ZELH cell line. For this purpose, we used puromycin instead of geneticin (G418) as the selection antibiotic, in order to enhance the efficiency of the clone selection step, as ZFL were weakly sensitive to G418. The newly developed ZELH-zfER 1 cell line showed a basal level at *ca.* 40%, improving luciferase signal induction along with its stability over passages (data not shown).

ZELH-zfERs cells were routinely cultured at 28°C in a LDF-SVF culture medium, exactly as previously described (Cosnefroy et al., 2012). For chemical exposures, cells were cultured in phenol red free LDF complemented with dextran-coated charcoal treated serum. The cells, seeded in 96-well plates at 25,000 cells per well for ZELH-zfER and ZELH-zfER 1, and at 75,000 cells per well for ZELH-zfER 2, were cultured for 24h before exposure. BPA, BPS and BPF were freshly diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to get a range of concentrations from 3 nM to 10 µM and with a final solvent concentration of 0.1% v/v. After 72h of exposure, luciferase activity was assessed in living cells as previously described (Cosnefroy et al., 2012). Results were expressed as percentage of maximal luciferase signal by the positive control chemical, E2 10 nM.

2.3. Zebrafish embryos, chemical exposure and *in vivo* imaging

Newly fertilized *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish (*Danio rario*, from AB strain) eggs were collected from the breeding stock of adult zebrafish that had been maintained under controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle) in charcoal filtrated water at 28 ± 1°C and fed SDS-400 (Special Diet Services, Dietex, Argenteuil, France) twice a day and live brine shrimp (Artemia spp.; Europrix, Lens, France). Chemical exposures were performed from 0 to 4 dpf (day post-fertilization) in an incubator at 28°C under semi-static conditions. Each condition consisted of a minimum of 10 embryos in 100 ml of water contaminated with the diluted chemical in DMSO to get a final solvent concentration of 0.01% v/v. The exposure protocol comprised the following conditions: BPA: 0.0039 to 10 µM; BPA (10 µM) mixed to flutamide or ICI 182-780 (1 µM); BPS: 0.25 to 60 µM, BPS (30 µM) mixed to flutamide or ICI (1 µM), BPF: 0.01 µM to 20 µM, BPF (5 µM) mixed to flutamide or ICI (1 µM). Ethinylestradiol (EE2) at 0.05 nm was used as the positive control for estrogenic effects. At the end of exposure, transgenic zebrafish larvae were collected for fluorescence measurement by image analysis. Each larva was observed and photographed in dorsal view under a fluorescence microscope combined with AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). All photographs were taken with the same parameters as previously described (Brion et al., 2012) and

analyzed using the Axiovision Imaging Software. Fluorescence quantification was based on the measurement of integrated density of the region of interest for each picture using the ImageJ software as previously described (Brion et al., 2012). Results were expressed as mean fold of induction above control.

2.4. Data analysis

For cell exposure, each chemical was tested in triplicates in at least two independent experiments. Dose–response curves were modeled by using the Regtox EV7.0.7 Microsoft ExcelTM macro (available at http://eric.vindimian.9online.fr/), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC50 (the concentration of a test chemical which induces 50% of its maximal effect) and PC50 (the concentration of a test chemical which induces a response which is 50% of the maximal positive control response). Graphics have been performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). In the case of no full dose response curves with any plateau, the maximal effect was adjusted to 100%. In the other case, e.g. a full dose response with a plateau and partial or full agonist pattern, no maximal effect was adjusted. Data were expressed as mean ± SD. Depending of the situation, EC50 or PC50 was calculated. For larva, GFP induction by BPA, BPS and BPF was expressed as mean ± SEM and values were compared to DMSO using the one way ANOVA test. Dose-response of GFP induction in transgenic larva was modeled by using the Regtox EV7.0.7 Microsoft ExcelTM macro. Co-exposures of each bisphenol with ICI 182-780 or flutamide were analyzed using the Mann-Withney test.

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* estrogenic activity of BPA, BPS and BPF in ZELH-zfERs cells

Effective concentrations of BPA, BPF and BPS were determined in ZELH-zfERs models after 72h of exposure by measuring luciferase activity. To improve the detection of zfER 1 activation in ZELH, a new clone was for the present study. Regarding the positive control 17 -estradiol (E2), a very similar EC50 was found using the new ZELH-zfER 1 clone (Fig 1) and the one described previously (Cosnefroy et al., 2012), which supported the relevance of the newly established model and validated its further use in the study. Regarding ZELH-zfER and ZELH-zfER 2, the respective EC50s calculated for E2 were also found to be similar in this study and in the previous one (Cosnefroy et al., 2012).

The results regarding the estrogenic potency of BPA on the three zfERs models confirmed its selectivity towards zfER (EC50 1 µM), compared to zfER 1 (EC50 17 µM) and zfER 2 (EC20 18 µM) (Fig 1, Table 1). Depending on the cellular context and the ER subtype, differential transactivation activities of bisphenols towards ERs were previously reported. Using the MELN cell line stably expressing hER , (Grignard et al., 2012) reported that BPA and BPS have similar activities. Conversely, in another study using the HELN-hER cell line, the most effective compound

was BPA, closely followed by BPF and BPS (Molina-Molina et al., 2013). In this latter study, authors demonstrated that unlike BPF and BPA, BPS was more active on hER than hER while BPA and BPS were equally active on both receptors. Overall, our data demonstrate that BPA, BPS and BPF are agonist ligands of all three zfERs subtypes. Interestingly, BPS and BPF are more active toward zfERβs, while BPA is clearly more active toward zfER .

	ZELH-zfER	ZELH-zfER 1	ZELH-zfER 2
E2	0.15 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02
BPA	807 #	17154 #	18918 *#
BPF	5795 ± 4747 *	5337 *#	2418 ± 342 *
BPS	4058 #	1016 ± 126	2468 #

Table 1. Effective concentrations (nM) of BPA, BPF and BPS in ZELH-zfERs zebrafish cell models

Each chemical was tested in triplicates in at least two independent experiments.
no SD available in the case of two independent experiments.
Values are expressed as EC50 except those marked by an asterisk (*) which are expressed as PC50 (the concentration of a test chemical which induces a response which is 50% of the maximal response of positive controls)

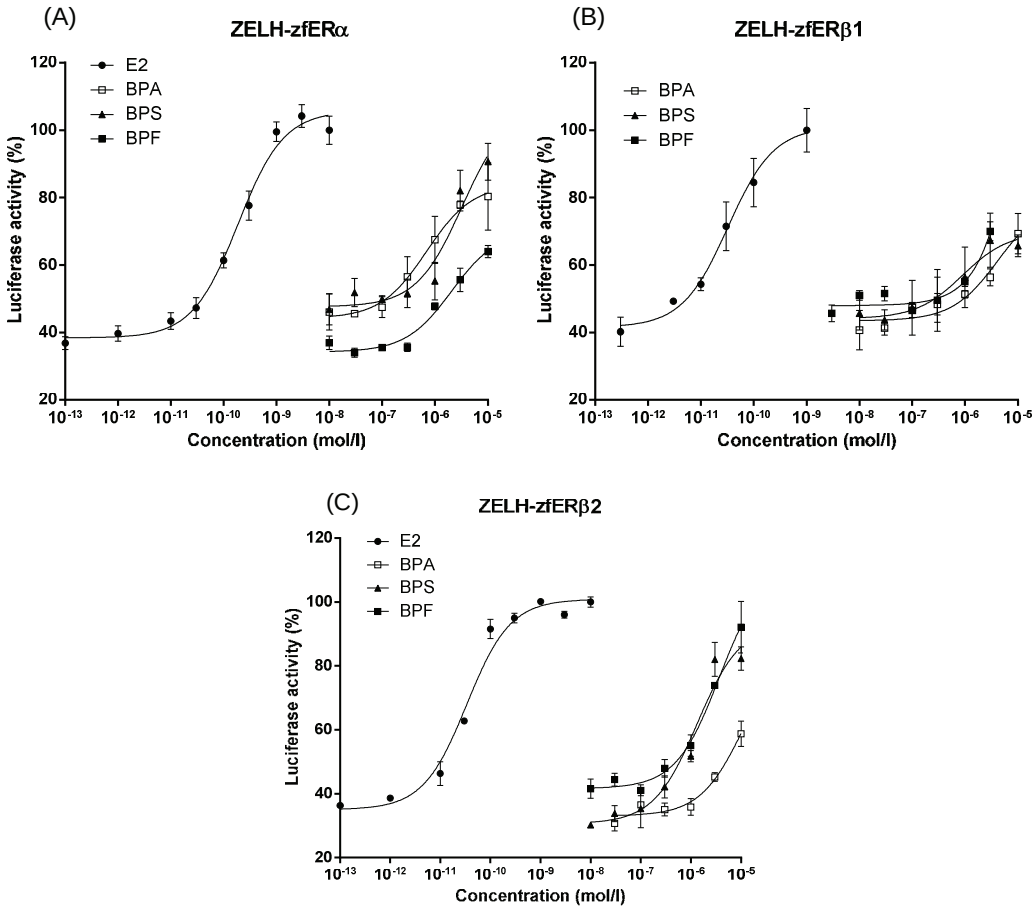


Figure 1. Dose response curves of luciferase induction by BPA, BPS and BPF in (A) ZELH-zfERa, (B) ZELH-zfERb1, (C) ZELH-zfERb2. Cells were exposed for 72h. Values are expressed as percentage of luciferase induction by E2 10^{-8} mol/L (mean ± SD).

3.2. *In vivo* estrogenic activity of BPA, BPS and BPF in transgenic cyp19a1b-GFP embryos (EASZY assay)

In the EASZY assay, estrogenic activity was assessed by quantifying the fluorescence intensities *in vivo* in the developing brain of each 4-dpf old transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish (Fig 2). BPA exposure led to significant inductions of the fluorescence intensity at 5 and 10 µM ($p<0.001$; Fig 2). The mean fold of induction of GFP for BPA 10 µM was similar to that measured in zebrafish exposed to EE2 0.05 nM (the lowest concentration of EE2 leading to a maximum induction of the brain aromatase gene (Brion et al., 2012). The mean EC50 derived from these experiments for BPA was 5.7 µM. Interestingly, in zebrafish exposed to the lowest concentrations of BPA, a weak but not significant 2-fold increase of GFP was found. In BPF-exposed zebrafish embryos, a concentration-dependent induction of GFP was observed with a significant effect from 1 µM (Fig 2). At the highest concentrations tested, the GFP intensity reached rapidly a plateau from 5 µM to 20 µM with a maximum fold of induction similar to BPA 10 µM and EE2 0.05 nM. The calculated EC50 for BPF was 1.2 µM.

BPS exposure did not result in a significant fluorescence induction for concentrations ranging from 0.25 to 20 µM (Fig 2). Among the bisphenols tested, BPS was the less efficient in inducing GFP intensity in zebrafish embryos. Indeed, BPS was effective in inducing the brain aromatase gene at 30 and 60 µM with a 4.3-fold less important maximum induction compared to BPA and BPF. This marked difference between the estrogenic activities of BPS and other bisphenols in the EASZY assay was not expected, given the close structural similarity of the three compounds, as well as their similar *in vitro* estrogenic activities in zebrafish ZELH-ZfERs cell lines (this study) or mammalian cells (Molina-Molina et al., 2013). In adult or juvenile fish, BPA and BPS have already been tested for their ability to induce vitellogenin synthesis. This has been shown in various fish species (Brian et al., 2005; Tabata, 2004) including the zebrafish (Ji et al., 2013; Naderi et al., 2014; Song et al., 2014; Van den Belt et al., 2003) (table S1). In the present study, we further documented the estrogenic activity of BPF (which was lacking in the literature) by measuring the induction of the circulating concentrations of VTG in males after 7 days of exposure (Fig S1). We demonstrated that BPF significantly induced VTG in adult males at 0.1 µM and 1µM ($p < 0.001$) after 7 days of exposure while the highest concentration tested led to a high mortality rate in male, an effect which had not been observed when using in the embryo EASZY assay.

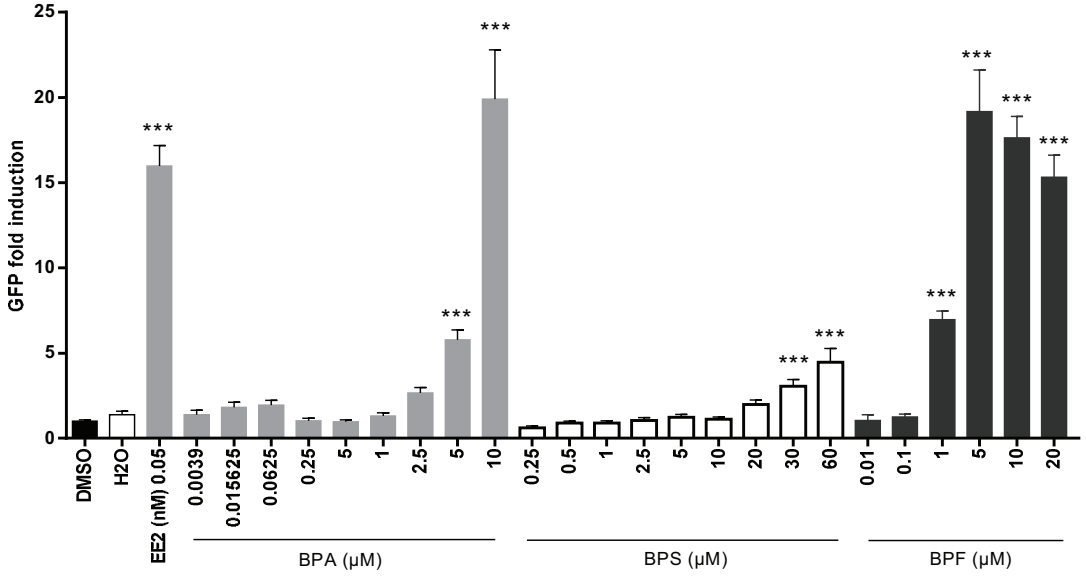


Figure 2. GFP induction by BPA, BPS and BPF in cyp19a1b-GFP transgenic larva after 96 h of exposure. Values are expressed as mean ± SEM. One way ANOVA was used for DMSO comparison (***: $p<0.001$).

Direct comparison of LOEC obtained in the EASZY assay and LOEC collected from *in vivo* fish VTG assays revealed that the estrogenic potency of BPA was similar in the EASZY assay and the adult fish assay. In contrast, for BPF and BPS the LOEC were much lower in the VTG assay, compared to the EASZY assay. While our *in vitro* and *in vivo* data demonstrate that BPA, BPS and BPF are all efficient to activate ER and to induce the tissue-specific expression of ER-regulated genes in liver (VTG) and brain (aromatase B), they elicited differential relative estrogenic potencies depending on the model used.

Parameters like absorption, distribution and metabolism are known to influence the biological response observed. Consequently, the difference in estrogenic response between BPS and the two others bisphenols may rely on a different fate of these chemicals in ZELH-zfERs cells lines and the zebrafish embryo model. Both phase I and II drug-metabolizing enzymes are expressed in zebrafish, and functional metabolic activities have already been characterized in zebrafish larvae (Alderton et al., 2010; Creusot et al., 2014; Jones et al., 2010; Kurogi et al., 2013; Noury et al., 2006; Wang et al., 2014). In a recent study, the metabolism of BPS was evaluated in zebrafish embryos using similar exposure conditions in term of concentrations and duration of exposure, showing a low bioavailability of BPS and an efficient metabolism of BPS into phase II metabolites (Le Fol et al., in prep). In terms of metabolic capabilities, less data are available for ZELH-zfERs and ZFL cells, e.g. the cell line from which ZELH-zfERs cells are derived.

Notwithstanding, sulfation and glucuronidation of BPS have been characterized in ZFL and ZELH-zfERs cells (Le Fol et al., 2015) with similar metabolic profiles as observed when using zebrafish embryos, suggesting that the qualitative metabolic profiles observed in zebrafish models cannot explain the differential estrogenic activity recorded in ZELH-zfERs and zebrafish embryos experiments. Anyway, it is clear that marked differences were observed between the *in vitro* and the *in vivo* models, highlighting the need to combined cellular and whole-organism assays in hazard assessment.

3.3. Mechanistic information and toxicological relevance of the estrogenic effect of bisphenols found in zebrafish models.

In our study, we found that BPA, BPS and BPF were all effective in activating the three zfERs sub-types and in inducing the expression of the brain aromatase gene, as revealed by the induction of GFP intensity in the developing brain. These data confirm the capacity of BPA and BPS to activate ER in mammalian and non-mammalian species (Molina-Molina et al., 2013); this study), to induce brain aromatase in zebrafish (Brion et al., 2012; Chung et al., 2011; Kinch et al., 2015) and extend this finding to BPF. When co-exposing zebrafish to the pure antagonist of the estrogen receptor ICI 182-780, BPA and BPF-induced aromatase expressions were partially suppressed, demonstrating that functional ERs are involved in the effect mediated by these compounds (Fig 3). However, ICI 1µM was unable to block the effect of BPS. In a recent experiment, Kinch et al., (2015) found that co-exposure to BPA and flutamide (6.17 µM) reduced cyp19a1b expression when these compounds were

administered from 8 to 48 hpf, showing that BPA can induce the transcription of AroB (cyp19a1b) via a specific ARs pathway, when exposure occurs during this developmental period. In our study, co-exposure to either BPA (10 µM), BPF (5 µM) or BPS (30 µM) and flutamide (1µM) from 0 to 96 hpf, failed to down-regulate the bisphenol-induced GFP intensity. Previous studies have shown that (xeno-estrogen) can strongly stimulate *cyp19a1b*'s expression in zebrafish larvae (Brion et al., 2012; Cheshenko et al., 2007; Menuet et al., 2005; Mouriec et al., 2009). It has been clearly demonstrated that the estrogen-dependent regulation of the brain aromatase gene expression involves functional ERs and the binding of liganded-ER on ERE and ½ERE located in the promoter region of the cyp19a1b gene (Le Page et al., 2006; Menuet et al., 2005). The regulation of *cyp19a1b* also requires glial specific factor(s) that bind to a glial x responsive element (GxRE) acting synergistically with the ERE sequences (Le Page et al., 2008). Furthermore, it has been established that the up-regulation of the brain aromatase gene by some androgens such as testosterone or dihydrotestosterone (Brion et al., 2012; Mouriec et al., 2009) do not involve a direct effect of AR on the regulation of *cyp19a1b* expression (Mouriec et al., 2009). Overall, our data support that the up-regulation of the brain aromatase by BPA and BPF imply ER at the developmental stages studied.

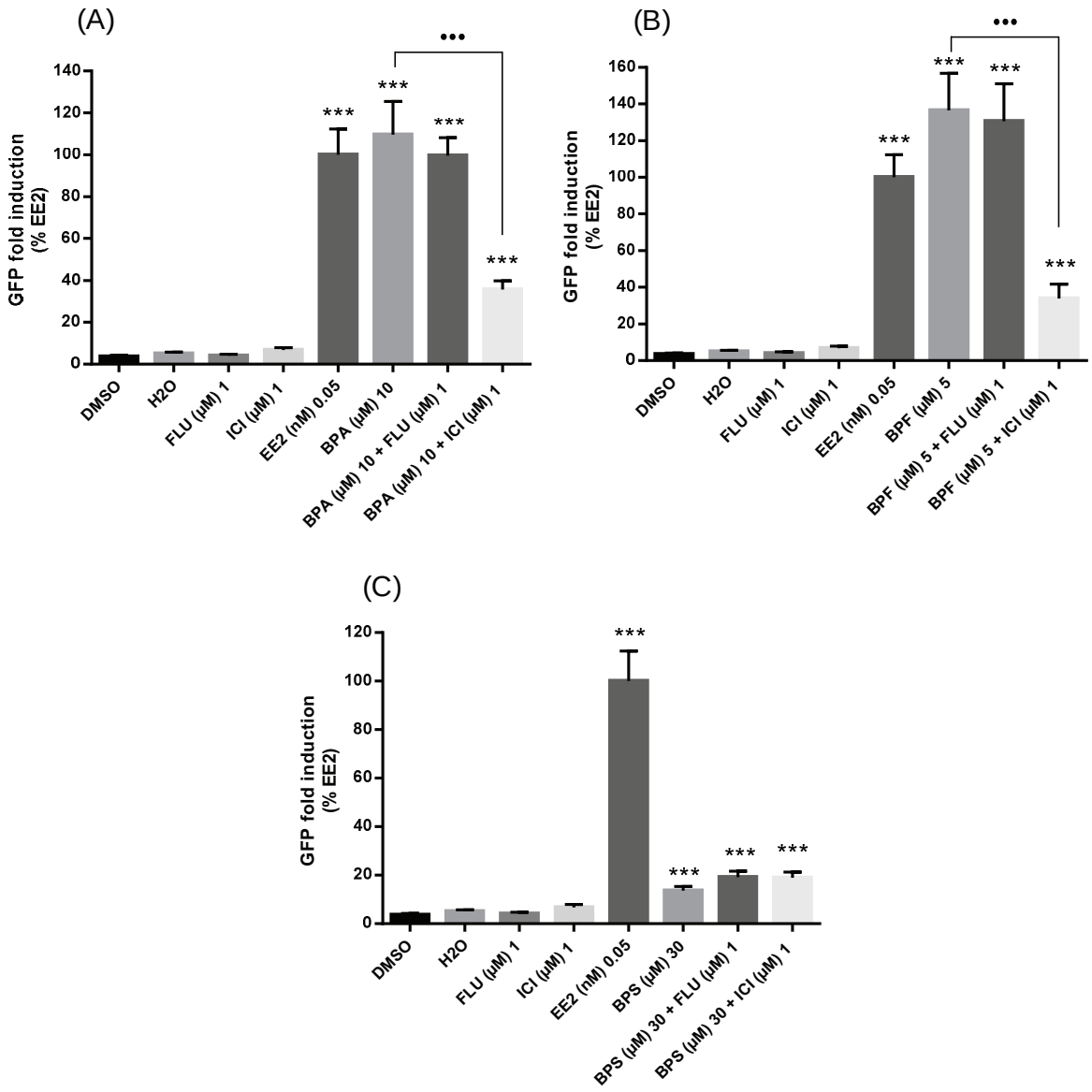


Figure 3. GFP induction by BPA (A), BPS (B) and BPF (C) co-exposed with ICI 182-780 (ICI) or flutamide (FLU) in cyp19a1b-GFP transgenic larva after 96 h of exposure. Values are expressed as mean ± SEM. One way ANOVA was used for DMSO comparison (***: $p<0.001$). Mann-Whitney test was used for coexposure (•••: $p<0.001$).

In addition to provide a quantification of the estrogenic activity of BPA, BPS and BPF, the EASZY assay can potentially provide important toxicological information regarding the impact of bisphenols on key developmental processes in the brain, which are known to be adversely affected in mammals (Brion et al., 2012; Negri-Cesi, 2015). Indeed, an attractive advantage of the EASZY assay is to provide a true physiological response (disruption of cyp19a1b gene expression through measurement of GFP) in radial glial cells. Brion et al., (2012) demonstrated that many chemicals do target the radial glial cells in the developing brain of fish. Since radial glial cells are progenitor cells of neurons in all vertebrates, information provided by the EASZY assay using zebrafish could be relevant for other vertebrate models, notably mammals, as regards neurogenesis. Recently, Kinch et al., (2015) have shown that BPA and BPS induce a precocious neurogenesis in the hypothalamus of zebrafish

embryos, an effect linked to the up-regulation of the brain aromatase, and responsible for an altered behavior in larvae.

4. Conclusion

In the present study, the estrogenic activities of BPA and BPS and BPF have been evaluated in zebrafish-specific cellular and *in vivo* models. We demonstrated that all the tested compounds were effective in activating the three ER-subtypes in an hepatic cellular context. Remarkably, BPA was more efficient to activate zfER while BPS and BPF were more active towards zfER 1 and zfER 2, respectively. We further confirm that BPA and BPS are able to induce the ER-regulated expression of the brain aromatase gene in zebrafish embryos, as well as hepatic vitellogenin synthesis in adults, and extend this findings to BPF. Comparison of the estrogenic activity towards the different models revealed marked differences in term of effective concentrations leading to a significant estrogenic effect, suggesting that the bioavailability, metabolism and pharmacodynamics of the tested compounds can account for such differences. The latter observation argues for a better consideration of the fate of tested compounds in these respective models, with the aim to efficiently predict *in vivo* effects based on *in vitro* data.

References

Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Richards, F., Gardner, I., 2010. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. Xenobiotica 40, 547-557.

Becerra, V., Odermatt, J., 2012. Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS. Analyst 137, 2250-2259.

Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfa, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. Environ Health Perspect 113, 721-728.

Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. PLoS One 7, e36069.

Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environ Toxicol Chem 21, 1699-1708.

Calafat, A.M., Wong, L.Y., Ye, X., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004. Environ Health Perspect 116, 893-897.

Cao, M., Yang, Y., Xu, H., Duan, J., Cheng, N., Wang, J., Hu, W., Zhao, H., 2012. Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, Gobiocypris rarus. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 162, 163-170.

Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E., 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. Environ Sci Pollut Res Int 22, 5711-5741.

Chen, M.Y., Ike, M., Fujita, M., 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. Environ Toxicol 17, 80-86.

Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I., 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.

Chou, W.C., Chen, J.L., Lin, C.F., Chen, Y.C., Shih, F.C., Chuang, C.Y., 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. Environ Health 10, 94.

Chung, E., Genco, M.C., Megrelis, L., Ruderman, J.V., 2011. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 17732-17737.

Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. Toxicol. Sci. 125, 439-449.

Creusot, N., Ait-Aissa, 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.

Edlow, A.G., Chen, M., Smith, N.A., Lu, C., McElrath, T.F., 2012. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. Reprod Toxicol 34, 1-7.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertil. Steril. 103, 11-21.

Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. Water Res 36, 1429-1438.

Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2011. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 683, 227-233.

Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S., 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. Toxicol. In Vitro 26, 727-731.

Hashimoto, Y., Moriguchi, Y., Oshima, H., Kawaguchi, M., Miyazaki, K., Nakamura, M., 2001. Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. Toxicol In Vitro 15, 421-425.

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 disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. Toxicol Sci 105, 235-259.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K., 2013. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ. Sci. Technol. 47, 8793-8800.

Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M.F., Olea, N., Vilchez, J.L., 2010. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 3363-3369.

Jones, H.S., Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Chipman, J.K., 2010. Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae in vivo. Zebrafish 7, 23-30.

Kinch, C.D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.H., Habibi, H.R., Kurrasch, D.M., 2015. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 1475-1480.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S., 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. Toxicol. Sci. 84, 249-259.

Kurogi, K., Liu, T.A., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.C., 2013. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. Drug. Metab. Rev. 45, 431-440.

Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., Terao, Y., 2005. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19, 121-130.

Le Fol, V., Ait-Aissa, 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.

Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. Mol. Reprod. Dev. 75, 1549-1557.

Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. Environ Health Perspect 114, 752-758.

Lee, Y.J., Ryu, H.Y., Kim, H.K., Min, C.S., Lee, J.H., Kim, E., Nam, B.H., Park, J.H., Jung, J.Y., Jang, D.D., Park, E.Y., Lee, K.H., Ma, J.Y., Won, H.S., Im, M.W., Leem, J.H., Hong, Y.C., Yoon, H.S., 2008. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. Reprod Toxicol 25, 413-419.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.B., Nakata, H., Kannan, K., 2012a. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. Environ Sci Technol 46, 6860-6866.

Liao, C., Liu, F., Kannan, K., 2012b. Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. Environ Sci Technol 46, 6515-6522.

Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 74, 223-234.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol. Reprod. 66, 1881-1892.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol 485, 304-320.

Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J.M., Real, M., Fernandez, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. Toxicol. Appl. Pharmacol. 272, 127-136.

Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (cyp19a1b) by estrogen receptors during zebrafish development. Dev. Dyn. 238, 2641-2651.

Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquat. Toxicol. 148, 195-203.

Negri-Cesi, P., 2015. Bisphenol A interaction with brain development and functions. Dose-Response 13, 1-13.

Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H., 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. Environ Health Perspect 118, 1196-1203.

Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R., Garric, J., 2006. Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. Environ Toxicol 21, 324-331.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 2047-2062.

Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. Reprod Toxicol 42, 132-155.

Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., Livera, G., 2015. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. Frontiers in Endocrinology 6, 58.

Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G., 2014. Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (Danio rerio). Chemosphere 112, 275-281.

Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G., Theobald, N., 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environ Pollut 124, 497-507.

Tabata, A., 2004. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (Oryzias latipes). Water Sci Technol 50, 125-132.

Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis 47, 67-73.

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 271-281.

Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N., Hernandez-Cordoba, M., 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. Anal Bioanal Chem 397, 115-125.

Wang, Y., Huang, H., Wu, Q., 2014. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. Mol. Pharmacol. 86, 62-75.

Wilson, V.S., Cardon, M.C., Gray, L.E., Jr., Hartig, P.C., 2007. Competitive binding comparison of endocrine-disrupting compounds to recombinant androgen receptor from fathead minnow, rainbow trout, and human. Environ Toxicol Chem 26, 1793-1802.

Yamada, H., Furuta, I., Kato, E.H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F., Kishi, R., Fujimoto, S., 2002. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. Reprod Toxicol 16, 735-739.

Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, N., Takatsuki, M., 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. Toxicology 170, 21-30.

Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., Perdu, E., 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere 82, 424-430.

Supporting information

BPF exposure and plasmatic vitellogenin measurement in adult zebrafish

Experiments were performed in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 86/609/EEC). Male adult zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were maintained and fed as mentioned in section 2.3. Six months old zebrafish were exposed to BPS or E2 diluted in DMSO to reach a final concentration of solvent of 0.006% in water. For each condition, eight zebrafish were exposed during 7 days in 4 liters of water with a complete water renewal every 24 h. At the end of exposure and after zebrafish were euthanized in a water/ice mix, blood was collected and stored at -80°C until vitellogenin concentration measurement. This quantitative analysis was performed using a competitive zebrafish vitellogenin enzyme linked immune-sorbent assay (zf-Vtg ELISA), as previously described (Brion et al., 2002). Briefly, this assay is based on a competition reaction for the anti-vitellogenin antibodies (DR-264 polyclonal antibodies raised against zebrafish vitellogenin, zf-Vtg) between the vitellogenin in the sample and the purified zf-Vtg coated on the microtiter plate. A standard calibration curve was obtained using purified zf-Vtg. Results were expressed as mean ng per ml of plasmatic vitellogenin, with a confidence interval of 95%. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test.

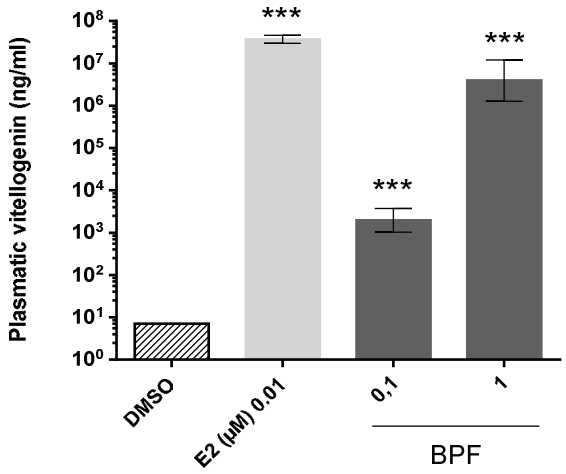


Figure S1. Plasmatic vitellogenin concentration in adult male zebrafish after a 7-days exposure to BPF. Eight fish were exposed for each condition and blood Vtg was measured for each animal (***: $p<0.001$, Mann-Whitney test).

Table S1. Summary of the currently available data regarding vitellogenin induction in zebrafish *in vivo* models

	From young to adult zebrafish		EASZY assay	
	Exposure parameters	Lowest chemical concentration (mg/L in water) reported to be responsible for a significant induction of plasmatic vitellogenin production	Exposure parameters	Lowest chemical concentration (mg/L in water) reported to be responsible for a significant induction of GFP
BPA	3 weeks exposure	Male: 1.0 (Van den Belt et al. 2003)	From 0 to 4 days post fertilization	1.4 (this paper)
	21 days exposure	Male: 0.5 (Song et al. 2014)		
BPS	75 days exposure from young to adult	Male: 0.1 (Naderi et al. 2014) Female: 0.01 (Naderi et al. 2014)		7.5 (this paper)
BPF	7 days exposure	Male: 0.02 (this paper)		0.2 (this paper)

References

Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environ Toxicol Chem 21, 1699-1708.

Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquat. Toxicol. 148, 195-203.

Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G., 2014. Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (Danio rerio). Chemosphere 112, 275-281.

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 271-281.

III. Réponse œstrogénique et expression de l'activité CYP1A dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire

1. Contexte et objectifs

La mise en place d'un modèle de culture primaire d'hépatocytes issu du poisson zèbre adulte mâle (PZFH) était un prérecquis nécessaire, pour pouvoir ultérieurement mettre en perspective les résultats concernant le devenir métabolique de xénobiotiques d'intérêt dans des modèles biologiques *in vivo* et *in vitro* utilisés dans le criblage des xénobiotiques. Les capacités de biotransformation des hépatocytes en primo-culture sont en général assez proches de celles exprimées dans le foie *in vivo*, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour des lignées cellulaires. Les cultures primaires possèdent en général de plus grandes capacités de biotransformation que les lignées cellulaires, que ce soit sur le plan quantitatif ou sur le plan qualitatif. Elles constituent pour cette raison une bonne base de comparaison pour évaluer si les lignées hépatocytaires correspondantes ont conservé des capacités métaboliques suffisantes. Afin d'utiliser ce modèle de primocultures hépatiques dans les études de biotransformation des xénobiotiques, il a tout d'abord été nécessaire de s'assurer de sa capacité à répondre à une stimulation œstrogénique par l'utilisation de composés de référence et d'intérêt pour l'environnement.

2. Expérimentations

Après la mise en place technique de la culture primaire décrite dans le paragraphe II.4.1.1., deux séries d'expérimentations ont été menées afin d'évaluer (1) sa capacité à répondre à une stimulation œstrogénique par la mesure du taux de vitellogénine dans le milieu de culture par ELISA à la suite d'une exposition à l'E2, à la BP2 ou au BPF, et (2) sa capacité enzymatique CYP1A par la mesure de l'activité EROD à la suite d'une exposition à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et à l'E2. Le matériel et les méthodes utilisés sont décrits dans les paragraphes II.4.1.1, II.5.1. et II.5.2. de la partie démarche expérimentale et choix méthodologiques.

3. *Résultats et discussion*

3.1. Viabilité et organisation cellulaire

La viabilité des hépatocytes en culture primaire s'est maintenue au dessus de 93 ± 2,4 % (96h). Au cours du temps, des modifications morphologiques des cellules ont été observées (Figure 50). A la mise en culture, les cellules étaient totalement séparées les unes des autres, présentaient une forme arrondie et flottaient dans le milieu de culture. Après 5 heures de culture, les cellules ont commencé à adhérer à la plaque et à se regrouper. Après 24h, des amas cellulaires étaient formés. Les cellules perdant progressivement leur forme arrondie pour prendre une apparence plus oblongue. Après 96 heures de culture, un réseau de cellules était formé sur la plaque.

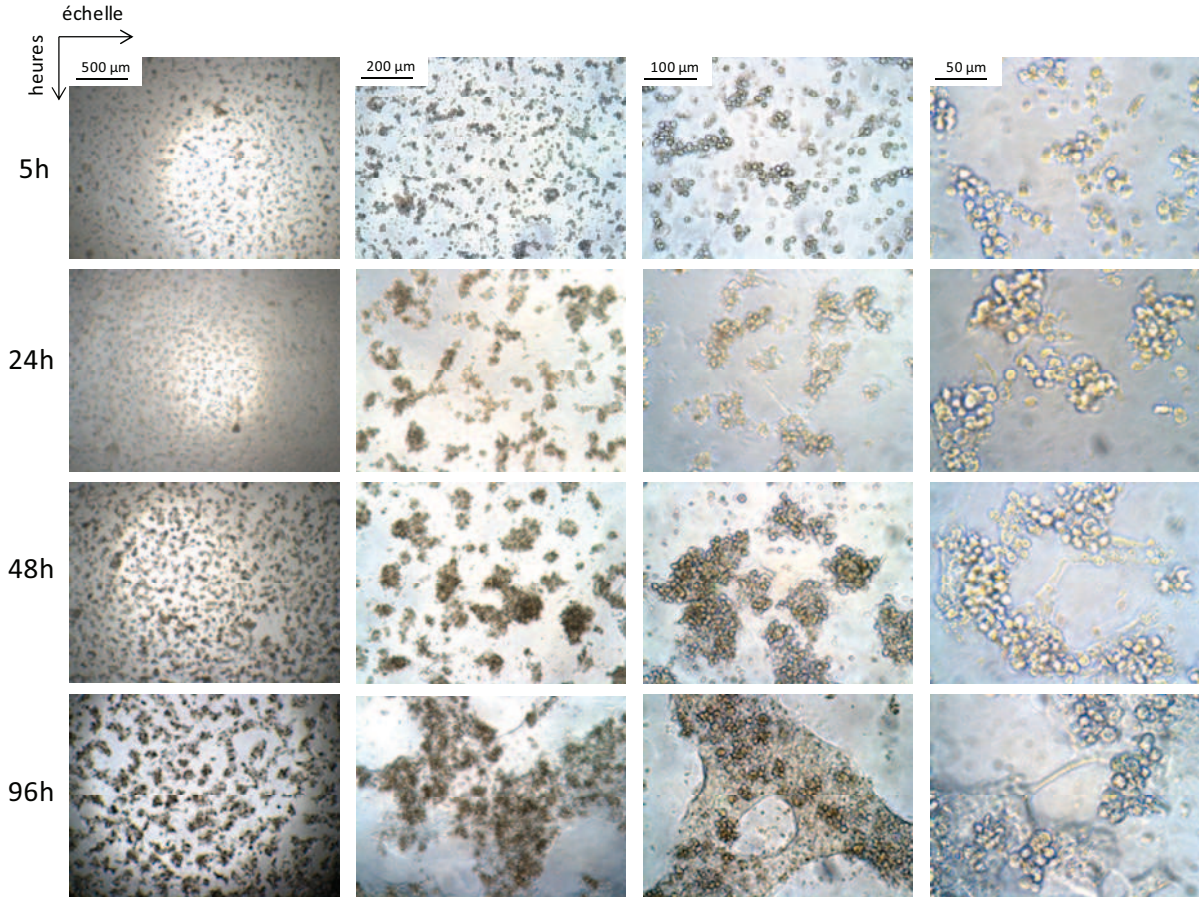


Figure 50. Evolution de la culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre au cours du temps

3.2. Effet de l'E2, de la BP2 ainsi que du BPF sur la production de vitellogénine

L'exposition des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire pendant 4 jours à l'E2 à entrainé une production dose dépendante de vitellogénine. L'EC50 correspondant est de 3,5 ± 1,4 nM (Figure 51A et 51B). Ce résultat montre la capacité de ce modèle à répondre à une stimulation œstrogénique suite à l'exposition d'un composé œstrogénique de référence.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux d'autres études est à considérer avec prudence, compte tenu de différences méthodologiques relatives aux méthodes analytiques, à l'espèce et à l'âge des poissons utilisés, et en fonction des paramètres de culture. D'après les informations rapportées par Navas et Segner (Navas et Segner 2006) les plus faibles concentrations qui entrainent une production significative de vtg dans les cultures d'hépatocytes provenant de différentes espèces de poissons sont comprises entre 1 pM et 1 µM. Une grande variabilité des EC50 a également été retrouvée, avec des valeurs comprises entre 0.01 et 1000 nM. Cependant, pour la plupart ces EC50 sont de l'ordre du micromolaire au nanomolaire, ce qui est du même ordre de grandeur que les résultats établis dans notre travail.

Les EC50 de l'E2 obtenues dans les lignées cellulaires du poisson zèbre ZELH-zfERs vont de 0.20 ± 0.05 à 0.03 ± 0.01 nM (Cosnefroy et al. 2012). Des différences de nature de modèle et de méthode de détermination de l'activité œstrogénique peuvent en partie expliquer les différences d'EC50 observées. En effet, les lignées cellulaires de criblage ont été obtenues par une double transfection permettant de mesurer la fluorescence liée à l'activité luciférase pour l'un des trois récepteurs œstrogéniques du poisson zèbre. Une méthode ELISA permettant la détermination de la concentration en vtg a été utilisée dans les hépatocytes en culture primaire qui par définition n'avaient subi aucune modification. Enfin, la variabilité inhérente aux modèles *in vivo* desquelles proviennent les cellules en culture primaire, peut expliquer un écart-type plus important dans le cas des cultures primaires que dans celui des lignées cellulaires.

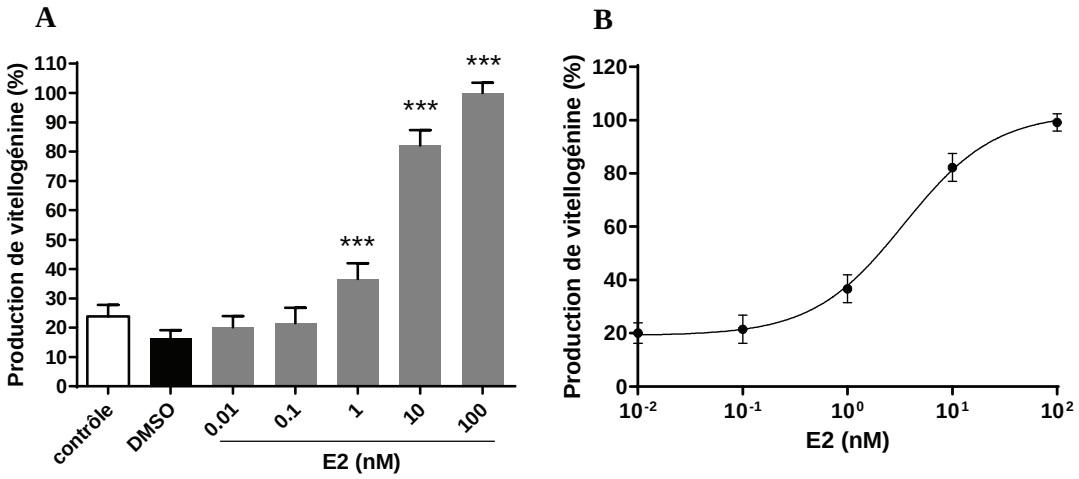


Figure 51. Réponse œstrogénique des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire après une exposition à l'E2
*** p<0,001 ; ** p<0,01 (ANOVA).

La BP2 et le BPF ont également été responsables d'une augmentation significative de la production de la Vtg (Figure 52A et 52B). Ces résultats montrent la capacité de ce modèle à répondre à une

stimulation œstrogénique par des xénobiotiques dont l'activité œstrogénique a également été démontrée dans différents modèles cellulaires humains (Molina-Molina et al. 2008; Molina-Molina et al. 2013) et de poisson zèbre (Cosnefroy et al. 2012).

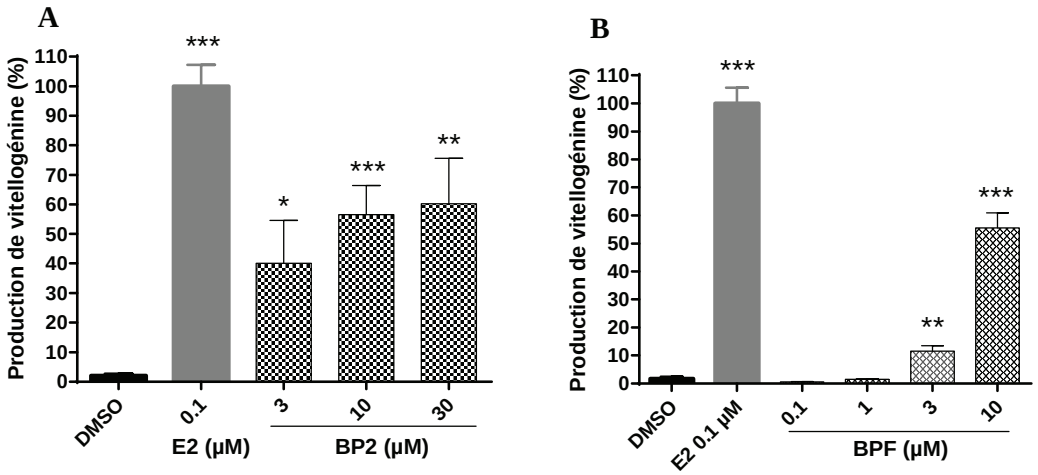


Figure 52. Effet de la BP2 (A) et du BPF (B) sur la production de vitellogénine par les hépatoctes de poissons zèbres en culture primaire
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (test de Mann-Whitney)

3.3. Effet de la TCDD sur la production de vitellogénine induite par l'E2

L'exposition d'une cellule à un xénobiotique peut entraîner la mise en jeu de différentes voies de signalisation. Les interactions entre voies de signalisation (crosstalks) passent par l'activation de différents récepteurs nucléaires et aboutissent à une réponse cellulaire globale prenant en compte l'ensemble des messages chimiques. Le crosstalk ER/AhR est l'un des mieux décrits aussi bien chez les mammifères que chez les poissons téléostéens (Coumoul et al. 2001; Mortensen et al. 2006). C'est ainsi que la dioxine (agoniste AhR) peut non seulement antagoniser l'effet des œstrogènes endogènes (Safe et al. 2000) mais également exercer un effet pro-œstrogénique (Ohtake et al. 2003).

La fonctionnalité de ce crosstalk AhR/ER a été mise en évidence dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire. En effet, l'exposition de ces cellules à mélange E2 et TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine) a diminué la capacité des cellules à produire la vtg (Figure 53).

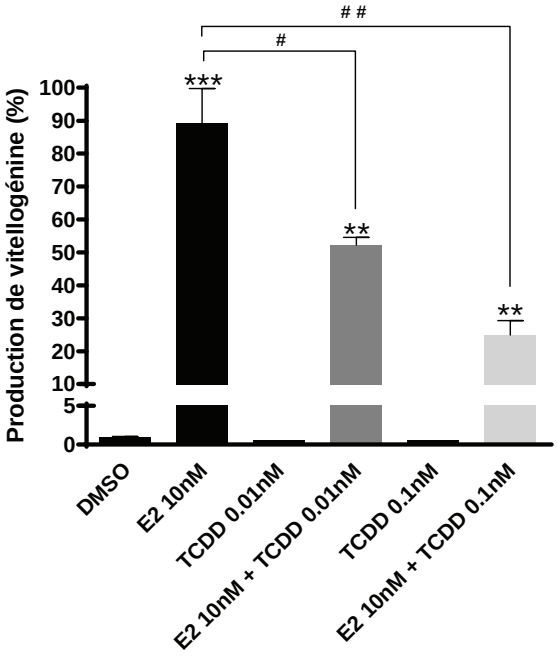


Figure 53. Fonctionnalité du crosstalk AhR/ER dans les hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire

*** p<0,001, ** p<0,01 (test de Mann-Whitney par rapport au solvant DMSO); ## p<0,01, # p<0,05 (test de Mann-Whitney)

3.4. Effet de la TCDD et de l'E2 sur l'activité EROD

L'expression génique des enzymes CYP1A fait notamment suite à l'activation du AhR. Cette expression peut être induite suite à l'exposition à un xénobiotique ligand du AhR. Le test enzymatique EROD (éthoxyrésorufine-O-deéthylase) qui permet de mesurer l'activité CYP1A d'un modèle biologique, a été réalisé dans les cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre.

L'activité basale EROD mesurée dans ce travail (6 pmol/min/mg, Figure 54) est du même ordre de grandeur que celle trouvée par Halden et al. (Halden et al. 2011) dans des fractions microsomales S9 provenant du foie du poisson zèbre mâle (10 pmol/min/mg). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le travail de Collodi et al. (Collodi et al. 1992) dans lequel aucune activité EROD n'avait été détectée dans les fractions subcellulaires d'hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire. Chez la truite arc-en-ciel, une activité basale EROD de 1 à 4 fois supérieure par rapport à celle obtenue dans cette étude a été mesurée (Laville et al. 2004). L'exposition des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire à la TCDD à la concentration de 0.1 et 1 nM a conduit à une augmentation significative de l'activité EROD avec un maximum de 515 pmol/min/mg (Figure 54). Ce résultat met en évidence la présence d'une activité CYP1A fonctionnelle dans ces hépatocytes après 4 jours de culture. L'activité maximale EROD diffère de celle obtenue par Collodi et al. (Collodi et al. 1992) qui avaient observé une activité EROD de l'ordre de 80 pmol/min/mg après 48h d'exposition. Quant à Halden et al. (Halden et al. 2011), une activité EROD de l'ordre de 700 pmol/min/mg avait été

retrouvée lors de l'exposition de fractions S9 hépatiques de poissons zèbres mâles par la (2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxine (TBDD).

Enfin, afin d'évaluer une interaction éventuelle entre voies AhR et ER sur l'activité EROD, les cellules ont été exposées à un mélange TCDD et E2. Cette co-exposition est à l'origine d'une diminution de l'induction de l'activité EROD observée en présence de la TCDD seule. Ce résultat démontre l'effet inhibiteur de l'E2 sur l'activité CYP1A induite par la TCDD.

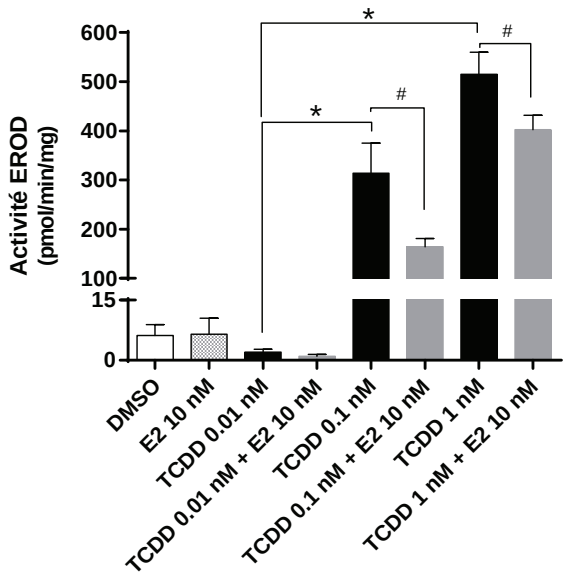


Figure 54. Activité EROD des hépatocytes de poisson zèbre en culture primaire

4. Conclusion

Les hépatocytes en culture primaire provenant du poisson zèbre adulte mâle (1) présentent une bonne viabilité cellulaire, (2) répondent à une stimulation œstrogénique, (3) présentent une activité CYP1A et (4) un crosstalk ER/AhR fonctionnels. Les résultats de cette caractérisation cellulaire sont favorables à l'utilisation de ce modèle dans l'étude comparée de la capacité de biotransformation de modèles *in vivo* et *in vitro*.

IV. Métabolisme de la BP2 et du BPS dans des modèles *in vitro* issus de l'Homme et du poisson zèbre utilisés dans l'évaluation toxicologique et le criblage des substances à activité œstrogénique

Article 3

Cell-specific biotransformation of benzophenone 2 and Bisphenol-S in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening

Vincent Le Fol[a,b,c], Selim Aït-Aïssa[a,*], Nicolas Cabaton[b,c], Laurence Dolo[b,c], Marina Grimaldi[d], Patrick Balaguer[d], Elisabeth Perdu[b,c], Laurent Debrauwer[b,c], François Brion[a], Daniel Zalko[b,c,*]

[a] *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

[b] *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France*

[c] *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

[d] *Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U896, Institut Régional de Cancérologie de Montpellier, Université Montpellier 1, F-34298 Montpellier, France.*

* corresponding authors:

E-mail: daniel.zalko@toulouse.inra.fr, phone +33 561 285 004, fax +33 561 285 244

E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33 344 556 511, fax +33 344 556 767

L'étude du devenir de la BP2 et du BPS dans différents modèles *in vitro* du poisson zèbre fait suite à la mise en évidence des différences de réponse œstrogénique observées entre les modèles cellulaires, larvaires et adultes. En complément de ces modèles poisson zèbre, cette étude de devenir de la BP2 et du BPS a également été conduite dans des modèles *in vitro* humain d'origine hépatique ou mammaire et couramment utilisés dans l'évaluation toxicologique du potentiel œstrogénique des xénobiotiques.

Présentation de l'article

Plusieurs bio-essais *in vitro* ont été développés dans différentes espèces afin de mettre en évidence le potentiel œstrogénique de composés chimiques. Il a été montré que l'espèce de laquelle provienne les cellules, les sous-types d'ER correspondants et le contexte cellulaire sont des paramètres influençant le degré d'activation des ER par des composés chimiques (Matthews et al. 2000; Menuet et al. 2002; Cosnefroy et al. 2009; Cosnefroy et al. 2012; Miyagawa et al. 2014). Alors que l'absorption cellulaire et la biotransformation des xénobiotiques sont également des paramètres clefs pouvant modifier le potentiel œstrogénique de ces substances (Jacobs et al. 2013), très peu d'études rendent compte de la caractérisation des capacités de biotransformation des bio-essais utilisés. C'est pourquoi nous avons caractérisés les capacités de biotransformation de huit modèles *in vitro* issus du poisson zèbre et de l'Homme par l'étude du devenir de deux substances chimiques « émergeantes », la benzophénone 2 et le bisphénol S. Quatre modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre ont été utilisés à savoir la culture primaire d'hépatocytes (PZFH), les lignées cellulaires transfectées ZELH-zfER et ZELH-zfER , et la lignée cellulaire ZFL de laquelle sont issues les cellules transfectées ZELH-zfERs. Concernant les modèles cellulaires hépatiques humains, les lignées HepG2 et HepaRG ont été utilisées. Enfin, cette étude comparative de biotransformation a intégré deux modèles d'origine humaine de criblage des xéno-œstrogènes, à savoir les lignées mammaires MELN et T47D-KBLuc. L'étude de la biotransformation de la BP2 et du BPS radiomarqués a été réalisée au moyen de techniques analytiques (radio-CLHP, spectrométrie de masse haute résolution) et biochimiques (hydrolyses enzymatiques).

L'étude du devenir de la BP2 et du BPS a mis en évidence la nature glucurono- et sulfoconjuguée de l'ensemble de métabolites produits, bien que la formation d'un métabolite hydroxylé de la BP2 ne puisse être écartée pour la lignée cellulaire T47D-KBLuc. Bien que des enzymes de phase I fonctionnelles aient été rapportées pour certains de ces modèles cellulaires, la nature conjuguée prépondérante peut s'expliquer facilement par la présence de groupements hydroxyles libres pour la BP2 et le BPS, qui facilite les réactions de phase II sans fonctionnalisation préalable via des réactions de phase I.

Deux modèles cellulaires se distinguent des autres par leur forte capacité de biotransformation, à savoir le modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH) et la lignée cellulaire

HepaRG. Ce résultat, logique, tient à la nature même des cultures primaires, qui sont généralement dotées de capacités enzymatiques mieux préservées que celles des lignées cellulaires issues du même tissu. Le modèle de lignée HepaRG est quant à lui de mieux en mieux reconnu pour ses capacités de biotransformation proches de celles observées *in vivo* (Aninat et al. 2006; Antherieu et al. 2012).

Bien que les réactions de sulfatation soient fonctionnelles dans les modèles cellulaires du poisson zèbre, une proportion plus importante de métabolites sulfo-conjugués a été retrouvée dans les modèles cellulaires d'origine humaine. Toutefois, des différences de capacités de biotransformation aussi bien qualitatives que quantitatives ont été retrouvées aussi parmi les modèles d'origine humaine. Contrairement au modèle HepaRG, les modèles HepG2, MELN et T47D-KBLuc sont caractérisés par une capacité de sulfatation majoritaire. Les modèles cellulaires du poisson zèbre sont, quant à eux, caractérisés par des capacités de biotransformation davantage homogènes, prédominées par des réactions de glucuronoconjugaison. Les doubles transfections dans la lignée ZFL n'ont pas modifié les capacités de biotransformation des cellules ZELH-zfERs résultantes.

De manière intéressante, la BP2 a été plus fortement biotransformée que le BPS quel que soit le modèle de culture cellulaire, à l'exception des modèles PZFH et HepaRG dotés des plus fortes capacités de biotransformation. Etant donné la similitude de structures chimiques entre les deux composés, ce résultat n'était pas attendu.

En résumé, il est à noter que les modèles cellulaires hépatiques du poisson zèbre (PZFH, ZFL, ZELH-zfER , ZELH-zfER 2) et le modèle hépatique d'origine humaine HepaRG sont caractérisés par des réactions du glucuronoconjugaison majoritaires. A l'inverse, les modèles cellulaires humains hépatiques et mammaires (HepG2, MELN, T47D-KBLuc) sont caractérisés par des réactions de sulfonconjugaison majoritaires. Par conséquent, en terme de biotransformation de la BP2 et du BPS, les modèles cellulaires du poisson zèbre se rapprochent davantage du modèle cellulaire humain HepaRG que des autres modèles. Il convient de noter que pour le BPA, molécule xéno-œstrogène de référence, des travaux encore non publiés de l'INRA en collaboration avec l'université de Davis (CA, USA) montrent que les profils obtenus *in vivo* chez le primate (macaque Rhésus ; Vandevoort, Zalko et al. non publié) et les profils HepaRG soulignent la prédominance de la voie de glucuronidation, et qu'HepaRG est donc bien plus « fidèle » à la situation *in vivo* chez le primate, que ne le seraient des lignées exprimant davantage l'activité sulfo-transférase, vraisemblablement parce qu'elles ont perdu une partie de leurs capacités de glucuronidation (Perdu et Zalko, non publié).

Bien qu'il soit reconnu que les capacités de biotransformation déterminent en partie les quantités de molécules actives atteignant leur(s) cible(s) moléculaire(s) et ainsi influencent les réponses biologiques et leur interprétation, très peu de modèles *in vitro* utilisés dans le criblage des xéno-œstrogènes n'ont fait l'objet d'une telle caractérisation. Par l'étude du devenir de la BP2 et du BPS, ce travail a contribué à caractériser les capacités de biotransformation de huit modèles cellulaires issus de l'Homme et du poisson zèbre et pour certains utilisés comme outil de criblage des xéno-œstrogènes.

En termes de biotransformation, ces résultats montrent, par ailleurs, l'intérêt que représentent ces modèles hépatiques du poisson zèbre dans l'étude du potentiel œstrogénique des composés chimiques.

Environmental Science & Technology

Article

pubs.acs.org/est

Cell-Specific Biotransformation of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in Zebrafish and Human in Vitro Models Used for Toxicity and Estrogenicity Screening

Vincent Le Fol,[†,‡,§] Selim Aït-Aïssa,[*,†] Nicolas Cabaton,[‡,§] Laurence Dolo,[‡,§] Marina Grimaldi,[∥] Patrick Balaguer,[∥] Elisabeth Perdu,[‡,§] Laurent Debrauwer,[‡,§] François Brion,[†] and Daniel Zalko[*,‡,§]

[†]Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

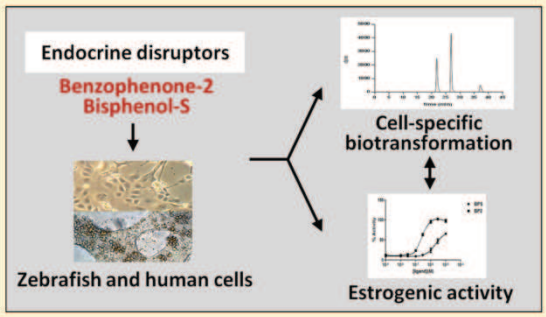
[‡]INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

[§]Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France

[∥]IRCM, INSERM U1194, Université Montpellier, ICM, F-34298 Montpellier, France

Supporting Information

ABSTRACT: Several human and fish bioassays have been designed to characterize the toxicity and the estrogenic activity of chemicals. However, their biotransformation capability (bioactivation/detoxification processes) is rarely reported, although this can influence the estrogenic potency of test compounds. The fate of two estrogenic chemicals, the UV filter benzophenone-2 (BP2) and the bisphenol A substitute bisphenol S (BPS) was deciphered in eight human and zebrafish in vitro cell models, encompassing hepatic and mammary cellular contexts. BP2 and BPS were metabolized into a variety of gluco- and sulfo-conjugated metabolites. Similar patterns of BP2 and BPS biotransformation were observed among zebrafish models (primary hepatocytes, ZFL and ZELH-zfER cell lines). Interestingly, metabolic patterns in zebrafish models and in the human hepatic cell line HepaRG shared many similarities, while biotransformation rates in cell lines widely used for estrogenicity testing (MELN and T47D-KBLuc) were quantitatively low and qualitatively different. This study provides new data on the comparative metabolism of BP2 and BPS in human and fish cellular models that will help characterize their metabolic capabilities, and underlines the relevance of using in vitro zebrafish-based bioassays when screening for endocrine disrupting chemicals.



1. INTRODUCTION

Several endocrine-disrupting chemicals (EDC) have been shown to disrupt hormone-regulated processes in exposed organisms.[1] Among the different mechanisms of action of EDCs, their capability to bind and activate nuclear receptors (NR) is widely recognized, and many EDCs target estrogen receptors (ER). To assess the estrogenic activity of chemicals, bioassays have been established in different model species. In particular, in vitro assays based on the stable expression of a reporter gene under the control of the ER have proven to be sensitive and specific tools for the screening of estrogenic chemicals.

Human in vitro models were the first to be established, but recent studies highlighted differences in ER transactivation, depending on the cellular context, the ER subtype, and the species of origin. For instance, using zebrafish liver cells (ZFL) stably transfected by the different zebrafish ER (zfER) subtypes (zfERα, zfERβ1, or zfERβ2), we reported subtype selectivity in ER transactivation for various chemicals including steroids, benzophenones, phyto- and myco-estrogens.[2] This differs from the known selectivity of the same ligands toward the human ER subtypes (i.e., hERα and hERβ). Similar interspecies variations have been reported in vitro when using human cells transfected with fish ER or with ER from other nonmammalian vertebrates.[3,4] There is now evidence that interspecies variations in ER amino acid sequence can influence the ER binding affinity of chemicals, and thereby the structure of the ligand bound-receptor and its potency to activate target genes.[2−6] In addition, it has been suggested that the cell context in which the reporter system is expressed may also influence ER transactivation by chemicals. For instance,

Received: October 30, 2014
Revised: February 7, 2015
Accepted: February 13, 2015
Published: February 13, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

endogenous transcriptional cofactors that contribute to the transcriptional machinery can vary among cell lines, thereby influencing transcription efficiency.[2,5,7] Another important factor is cellular uptake and the metabolism of the chemicals being tested, which influences the amount of active compound (or metabolite) that target ER and may depend on the type and the origin of a given cell line. However, the fate of xenobiotics within cellular models is seldom investigated, despite having been identified as a key issue in toxicity assessment.[8] In this context, we characterized the biotransformation capabilities of a range of zebrafish and human cell models, and studied the fate of two model compounds, bisphenol S (BPS) and benzophenone 2 (BP2), using radio-labeled molecules. Benzophenones are emerging environmental contaminants, used as UV filters in sunscreens and in other products such as perfumes or food packaging, to which they are added to prevent UV degradation. BP2 exhibits EDC properties. It has previously been found to activate fish and human ER, in cellular human[6] and fish bioassays.[2,5] In addition, BP2 was found to disrupt in vivo the estrogenic hormonal function in fish[9] and male mice.[10] BPS, a molecule increasingly used as a substitute for bisphenol A, was also shown to activate ER in human in vitro models.[11] It was reported to disrupt hormonal regulation in zebrafish and impair the development of zebrafish offspring.[12,13]

The metabolic fate of BP2 and BPS was consequently studied in zebrafish and human cellular models derived from liver and mammary tissue. Hepatic zebrafish models included the parental ZFL cell line, the ZFL cells stably transfected by a reporter gene and either zfERα (ZELH-zfERα) or zfERβ2 (ZELH-zfERβ2),[5] and primary cultures of zebrafish hepatocytes (PZFH). The human hepatic cell lines used were HepG2[14] and HepaRG,[15] the latter being known for its high biotransformation capabilities. In addition, comparative studies were also performed using human cell lines widely used for screening estrogenic activity, that is, the breast cancer cell lines MELN[16] and T47D-KBLuc.[17]

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and Cell Culture Reagents. Ring-labeled [^{3}H]-Benzophenone-2 (2,2′,4,4′-tetrahydroxybenzophenone; radiochemical purity: 99%, specific activity: 740 GBq/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint-Louis, MO). Ring-labeled [^{3}H]-Bisphenol-S (4,4′-sulfonyldiphenol; radiochemical purity: 99.7%, specific activity 62.9 GBq/mmol) was supplied by Moravek Biochemicals, Inc. (Brea, CA). Unlabeled benzophenone-2 (BP2, CAS #131−55−5, chemical purity: 97%) and bisphenol-S (BPS, CAS #80−09−1, chemical purity: 98%) were purchased from Sigma−Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Flo-Scint II and Ultima Gold liquid scintillation cocktails were purchased from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Courtaboeuf, France). HPLC-grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Leibovitz 15 culture medium (L15) with Glutamax, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with Glutamax, Minimum Essential Medium alpha (αMEM), William's E Medium, Ham's F-12 (F-12, powder), DMEM/F12, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), MEM nonessential amino acid solution (MEM NEAA), L-glutamine (200 mM) and collagenase type I were purchased from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from PAN Biotech (Aidenbach, Germany). Ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA), calcium chloride ($CaCl_2$) and human insulin were purchased from Sigma−Aldrich. Hydrocortisone hemisuccinate was purchased from SERB laboratories (Paris, France) and ammonium acetate from Merck (Briare-Le-Canal, France).

2.2. Cell Cultures. The ZFL cell line (ATCC CRL-2643) was derived from a primary culture of zebrafish hepatocytes.[18] Zebrafish hepatic reporter cell lines (ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ2) were cultured exactly as previously described.[5] The MELN[16] and T47D-KBLuc[17] cells derived from human breast cancer MCF-7 and T47D cell lines, respectively, were cultured as previously described.[6] HepaRG cells, obtained from human hepatocarcinoma,[15] were a kind gift from Christiane Guillouzo (INSERM 991, Rennes, France) and were cultured as previously described.[19]

2.3. Zebrafish Housing and Primary Culture of Zebrafish Hepatocytes. Experiments were performed in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 86/609/EEC). Mature wild type zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were maintained in charcoal filtrated water at 28 ± 1 °C with a controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle) and were fed SDS-400 (Special Diet Services, Dietex, Argenteuil, France) twice a day. Six-month old male zebrafish were used for primary hepatic cell cultures (PZFH), which were prepared following a protocol adapted from Bjorkblom et al. (2007)[20] and Ibabe et al. (2005).[21] Briefly, fish were euthanized using ice-cold water, then externally washed with an ethanol solution. Livers were rinsed to remove excess blood in a PBS solution containing EGTA (0.5 mM), HEPES (25 mM), penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 μg/mL), then finely cut in a sterile digestion buffer solution containing PBS, HEPES (0.05 M), $CaCl_2$ (0.05 mM), collagenase type I (0.25 mg/mL), penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 μg/mL). Disassociation of hepatic cells was improved by mixing the resulting suspension with fresh sterile digestion buffer, at 28 °C for 20 min with periodic pipetting. The cell suspension was then filtered through a 70 μm cell strainer (BD Falcon, Le Pont de Claix, France) and centrifuged at 150 g for 5 min. Following an additional rinsing/centrifugation cycle, the cell pellet was suspended in culture medium and the cells were counted. Viability was assessed using trypan blue in a hemocytometer (Countess, Life technologies), before seeding and exposing the hepatocytes.

2.4. In Vitro Biotransformation Studies. All experiments were carried out in phenol red free culture media. ZFL, ZELH-zfERs, MELN, T47D-KBLuc and HepaRG cells were seeded at 3.5×10^5 cells per well in 12-well tissue culture plates (Dutscher) containing 2 mL/well culture medium. PZFH cells were seeded at 1.95×10^5 cells per well in 24-well (Corning Primaria) tissue culture plates (Dutscher) containing 500 μL/well medium. Thus, a similar cell number/well surface ratio was used for all models. Zebrafish cells were incubated at 28 °C in a humidified air atmosphere. Human cells were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 humidified air atmosphere. After 24 h, culture media were replaced by 1 mL FBS-free media (HepG2 and HepaRG), dextran-coated charcoal treated serum (DCC-FBS) (ZFL, ZELH-zfERs, MELN and T47D-KBLuc), or 310 μL DCC-FBS (PZFH), to ensure a similar ratio between the bottom surface of the well and the height of the culture medium. [^{3}H]-BP2 or [^{3}H]-BPS (5045 Bq per well, corresponding to 6.81 pmol and 80.20 pmol of radiolabeled BP2 and BPS, respectively), adjusted with unlabeled BP2 or BPS, respectively, were dissolved in DMSO to reach final concentrations of 0.1, 1, 10, 20, 50, 100, 150, and 200 μM in

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

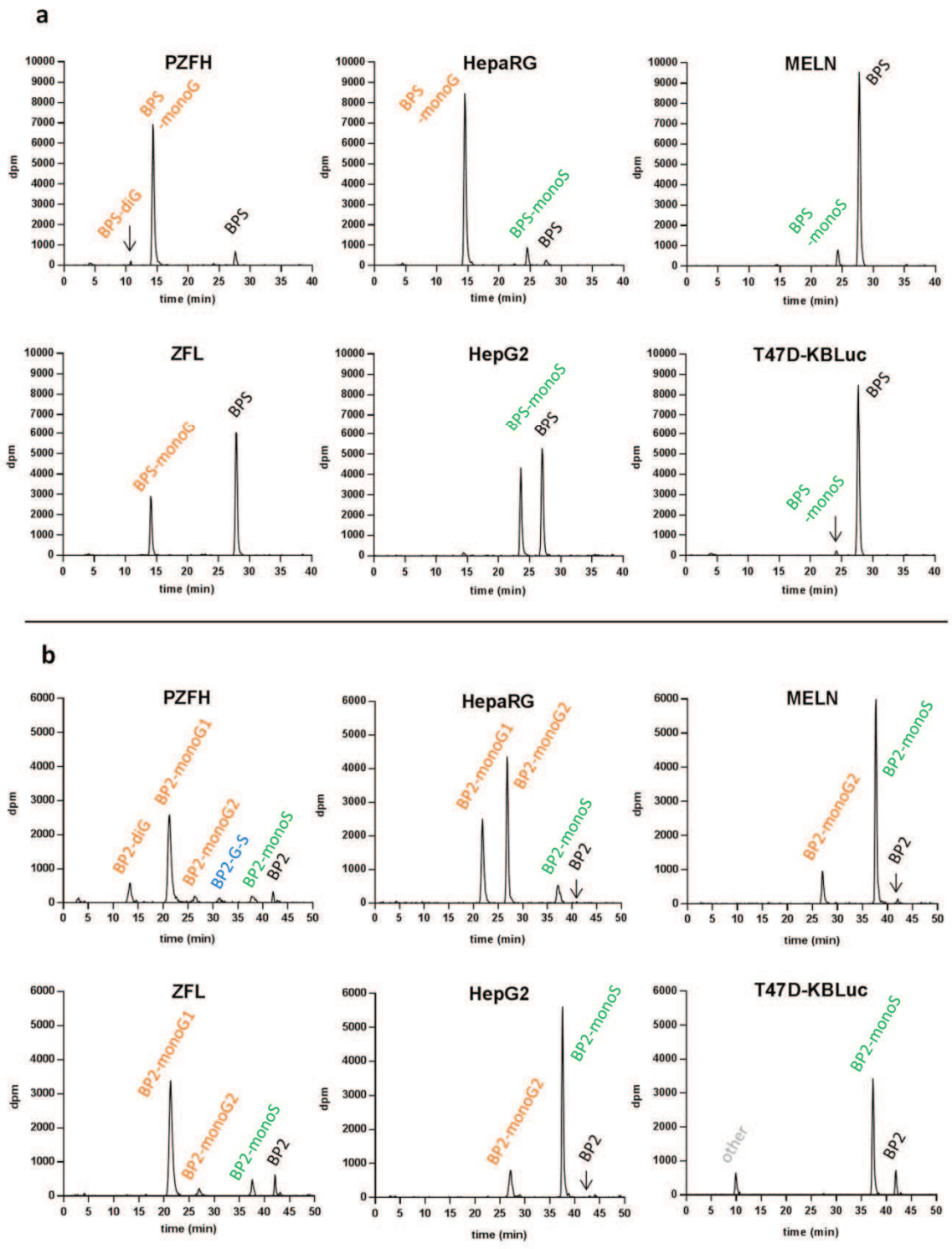


Figure 1. Typical radio-HPLC metabolic profiles obtained after 24 h incubation of 1 μM [^{3}H]-BPS (a) or [^{3}H]- BP2 (b) with the different in vitro models.

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

culture media. For PZFH, at 1 μM, the ratios of radiolabeled to nonlabeled chemicals in the incubations were 2.2:97.8 (BP2) and 25.9:74.1 (BPS). For all other cell models, at 1 μM, these ratios were 0.7:99.3 (BP2) and 8.0:92.0 (BPS). Control incubations were carried out in the same conditions for each compound and culture medium, at 200 μM, without cells. The final concentration of DMSO did not exceed 0.1% (v/v). After a 24 h incubation period, culture media were removed and stored at −20 °C until analysis. Cells were recovered by washing each well with 1 mL water/acetonitrile (50:50, v/v) and were stored at −20 °C until analysis. Radioactivity in the media and in the cells was quantified by direct counting in a Packard scintillation counter (model Tri-Carb 2200CA; PerkinElmer) using an Ultima Gold scintillation cocktail. For all vials, sample quenching was compensated by the use of quench curves and external standardization. All experiments were carried out at least in triplicate.

2.5. Cell Viability. We used the PrestoBlue assay (Life technologies). Each cell model was seeded in 96-well tissue culture plates (Dutscher) in the same conditions as described above, with a density of 2.5 × 10^4 cells per well (ZFL and ZELH-zfERα), 7.5 × 10^4 cells per well (ZELH-zfERβ2) or 5.0 × 10^4 cells per well (MELN, T47D-KBLuc, HepG2 and HepaRG). After 24 h, culture media were replaced by the corresponding medium. Cells were exposed to BP2 or BPS at 0.1, 1, 10, 20, 50, 100, 150, and 200 μM for 24 h. The culture media were then replaced with PrestoBlue diluted (1×) in the corresponding culture medium. After 2 h, fluorescence was read on a Tecan infinite 200 (Lyon, France) at 535 and 615 nm. Viability was expressed as a percentage of the control (DMSO).

2.6. Radio-HPLC Profiling. [^{3}H]-BP2 and [^{3}H]-BPS culture media were analyzed on a Spectra P1000 HPLC pump (Thermo Separation Products, Les Ulis, France) coupled to a radiometric flow scintillation analyzer (Flo-One A500, PerkinElmer) for online radioactivity detection. The HPLC system consisted of a Zorbax SB-C18 column (250 × 4.8 mm, 5 μm, Agilent technologies) coupled to a C18 guard precolumn (18 × 4.5 mm, 5 μm, Macherey-Nagel) maintained at 30 °C. Mobile phases A and B (1 mL/min) consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 95:5 v/v in A and 10:90 v/v in B. For BP2, the following five-step gradient was used: 0−4 min 100% A; 4−6 min linear gradient from 100% A to A:B 90:10 v/v; 6−20 min A:B 90:10 v/v; 20−22 min linear gradient from 10% B to 15% B; 22−32 min A:B 85:15 v/v; 32−34 min linear gradient from 15% B to 30% B; 34−44 A:B 70:30 v/v; 44−46 min linear gradient from 30% B to 100% B; 46−56 min 100% B. For BPS, the following five-step gradient was used: 0−4 min 100% A; 4−6 min linear gradient from 100% A to A:B 90:10 v/v; 6−16 min A:B 90:10 v/v; 16−18 min linear gradient from 10% B to 20% B; 18−28 min A:B 80:20 v/v; 28−30 min linear gradient from 20% B to 30% B; 30−40 min A:B 70:30 v/v; 40−42 min linear gradient from 30% B to 70% B; 42−50 min A:B 30:70 v/v. Metabolites were quantified by integrating the area under the peaks monitored by radioactivity detection.

2.7. Enzymatic Hydrolyses. Aryl-sulfatase from *Aerobacter aerogenes* (type IV, Sigma) and bovine liver β-glucuronidase (type B1, Sigma) were used to assess the formation of corresponding conjugates. Bovine liver β-glucuronidase (150 IU in 300 μL 0.2 M sodium acetate buffer, pH 5) or aryl-sulfatase (0.15 IU in 300 μL of 0.01 M Tris buffer, pH 7.1) were added to 100 μL cell medium. After 3 h at 37 °C under gentle shaking, hydrolysis assays were stopped by lowering the temperature of tubes in ice. Samples were mixed to 100 μL of mobile phase A prior to radio-HPLC analysis.

2.8. Identification of Metabolites by Mass Spectrometry. The structural characterization of the metabolites was performed by HPLC coupled to a LTQ Orbitrap XL hybrid high resolution mass spectrometer (Thermo Scientific, Les Ulis, France) fitted with an electrospray ionization source operating in the negative mode, using the HPLC conditions described for radio-HPLC profiling, and a 1/4 postcolumn splitting. Typical operating parameters used for ion production were as follows: spray voltage (−3.8 kV), sheath gas (N_2) flow rate (30 arbitrary units (au)), auxiliary gas (N_2) flow rate (5 au), heated transfer capillary temperature (300 °C), heated transfer capillary voltage (−4 V), tube lens voltage (−58 V). High resolution mass spectra were acquired at a resolution power of 60 000 from m/z 100 to 800. Identifications were performed by tandem MS experiments using the ion-trap mass analyzer of the LTQ-Orbitrap spectrometer. For MS/MS experiments, resolution power was reduced to 7.500, and the excitation parameters (isolation width (1.5 amu), normalized collision energy (35%), excitation time (30 ms)) were adjusted to obtain the maximum structural information on the compound of interest. All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

2.9. Data Analysis. Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad software, La Jolla, CA). Values are expressed as mean ± SEM. Cell viability data were analyzed with the nonparametric Mann−Whitney test. Cellular metabolism is represented as curves obtained using a nonlinear regression analysis, as indicated by Loft and Poulsen (1989).[22]

3. RESULTS AND DISCUSSION

BP2 or BPS had no impact on cell viability, whatever their concentration. After 24 h of exposure, radioactivity levels were measured in culture media, water/acetonitrile cell extracts and empty wells (rinsed with solvent), for all assays and cellular models. Total radioactivity recovery, that is to say, the radioactivity recovered from culture media, cells, and well rinsing solution averaged a total of 99.1 ± 1.1% and 98.8 ± 0.9% in the experiments carried out with [^{3}H]-BP2 or [^{3}H]-BPS, respectively. Since most of the radioactivity was in the culture media (BP2:97.3 ± 1.0%; BPS: 97.8 ± 0.9%), only culture media were further profiled by radio-HPLC.

3.1. Identification of BPS and BP2 Metabolites Produced by Human and Zebrafish Cell Models. Culture media were analyzed by specific enzymatic hydrolysis and liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry (LC/HRMS). In the radio-HPLC system developed for this study, the retention time (R_T) of parent BPS was 27.7 min (Figure 1a). No degradation of BPS occurred in control incubations. All the zebrafish cell models (PZFH, ZFL, ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ2) produced a similar BPS metabolite eluting at 14.6 min, which was hydrolyzed by β-glucuronidase, suggesting the occurrence of a glucuronide conjugate of BPS (BPS-monoG). This monoglucuronide structure was further confirmed by negative electrospray mass spectrometry (ESI-MS), revealing a $[M\text{-}H]^-$ ion at m/z 425.0540 ($C_{18}H_{17}O_{10}S$, calc. 425.0548, −1.8 ppm), which underwent the diagnostic elimination of 176.0314 ($C_6H_8O_6$) of a glucuronide conjugate to give the m/z 249.0226 fragment ion. An additional metabolite eluting at 10.7 min, was observed in PZFH culture media. MS analysis of this metabolite was not possible due to

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

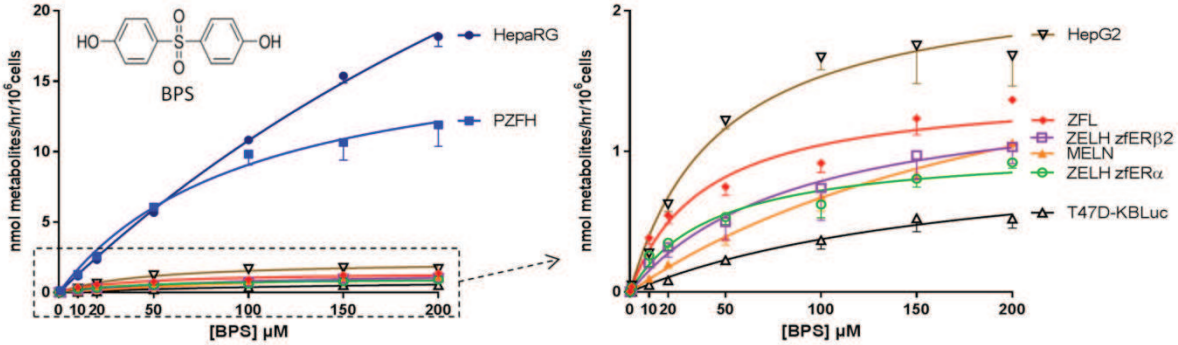


Figure 2. Production of BPS metabolites in zebrafish and human cell models at different concentrations (0.1−200 μM). Each curve represents the total production of all BPS metabolites after 24 h of exposure. Values are mean ± SEM from three incubations.

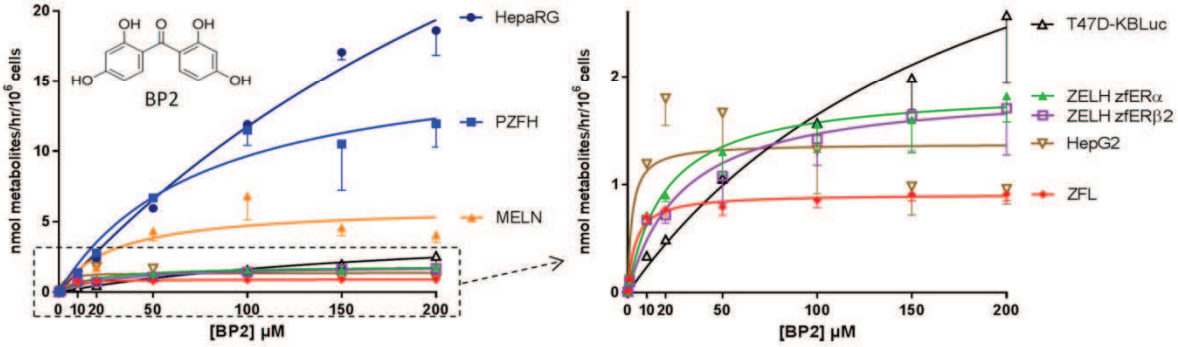


Figure 3. Production of BP2 metabolites in zebrafish and human cell models at different concentrations (0.1−200 μM). Each curve represents the total production of all BP2 metabolites after 24 h of exposure. Values are mean ± SEM from three incubations.

the low amounts produced. This peak shifted to the R_T of BPS after incubation with β-glucuronidase, suggesting the formation of another glucuronide conjugate of BPS. Given the chemical structure of BPS (the same monoglucuronide would be produced by the conjugation of either hydroxyl function) and the previous identification of a monoglucuronide (BPS-monoG) at a R_T of 14.6 min, this metabolite was tentatively identified as a diglucuronide (BPS-diG), consistent with a more water-soluble metabolite (R_T = 10.7 min) than BPS-monoG. Human HepG2, MELN and T47D-KBLuc cells produced a metabolite eluted at R_T of 24.5 min, identified as a monosulfate (BPS-monoS) based on its specific enzymatic deconjugation and confirmed by LC-HRMS ($[M-H]^-$ ion at m/z 328.9788 ($C_{12}H_9O_7S_2$, calc. 328.9795, −2.2 ppm), m/z 249.0225 fragment ion corresponding to the diagnostic elimination of SO_3). The human HepaRG cell line metabolized BPS into both BPS-monoG (as in zebrafish cells), and BPS-monoS (as in human HepG2, MELN and T47D-KBLuc cells).

With the radio-HPLC system developed for BP2, parent (unchanged) BP2 eluted at 42.5 min (Figure 1b). Like with BPS, radio-HPLC analyses of control incubations (no cells) demonstrated no degradation of BP2. The metabolite common to all cell models was eluted at R_T of 38.1 min and was characterized as a monosulfate conjugate of BP2 (BP2-monoS), based on sulfatase hydrolysis into BPS and on LC-HRMS confirmation, with an $[M-H]^-$ ion at m/z 325.0015 ($C_{13}H_9O_8S$, calc. 325.0024, −2.7 ppm), and a characteristic loss of 80 atomic mass units (m/z 245.0451 fragment ion ($C_{13}H_9O_5$, calc. 245.0455, −1.9 ppm)). Except T47D-KBLuc cells, all cell models produced a metabolite with a R_T of 27.3, characterized as a monoglucuronide (BP2-monoG2), based on a complete deconjugation into BP2 when incubated with β-glucuronidase, and on HRMS ($[M-H]^-$ ion at m/z 421.0767 ($C_{19}H_{17}O_{11}$, calc. 421.0776, −2.6 ppm), MS/MS fragmentation of the m/z 421.1 precursor ion yielding two diagnostic complementary daughter ions at m/z 245.0451 ($C_{13}H_9O_5$, calc. 245.0455, −1.7 ppm), and m/z 175.0245 ($C_6H_7O_6$, calc. 175.0248, −1.7 ppm)). Another monoglucuronide of BP2 (BP2-monoG1, R_T = 22.1 min) was formed by all zebrafish models and by HepaRG cells. BP2 bears two nonequivalent hydroxyl moieties on each cycle, which explains the formation of two distinct glucuronic acid conjugates. The characterization of the respective conjugation positions was not attempted, since it would require nuclear magnetic resonance analyses, based on much larger quantities of analytes than produced in vitro. Two additional metabolites were produced by PZFH. One, eluted at a R_T of 13.8 min, was identified as a BP2 diglucuronide, based on m/z 597.1079 ($C_{25}H_{25}O_{17}$, calc. 597.1097, −3.0 ppm) and on two consecutive losses of glucuronic acid (m/z 421.0768 and 245.0453 fragment ions) when subjected to resonant excitation in the linear ion trap device (in MS^2). The second one (R_T = 32.8 min) was tentatively identified by enzymatic hydrolysis assays as a double conjugate of BP2 (glucuronic acid + sulfate). Finally, a very polar metabolite (R_T = 9.8 min) formed in T47D-KBLuc cells, in addition to BP2 monosulfate, could not be identified. It was not hydrolyzed by aryl-sulfatase nor β-glucuronidase, suggesting the occurrence of a nonconjugated metabolite of BP2. In summary, zebrafish cell lines (ZFL, ZELH-zfERα and ZELH-

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

zfERβ2) and human HepaRG cells produced the same BP2 metabolites (BP2-monoG1, BP2-monoG2, BP2-monoS). The human HepG2 and MELN cells produced BP2-monoG2 and BP2-monoS, whereas T47D-KBLuc cells produced a very polar metabolite and BP2-monoS.

3.2. Comparative Biotransformation Capability of Zebrafish and Human Cell Models. The overall biotransformation capability of the different cell models was assessed by monitoring the production of BP2 and BPS metabolites in 24-h incubations. The total production of metabolites is presented in Figures 2 and 3. HepaRG and PZFH displayed the highest biotransformation rates for BPS, roughly 10-fold higher than the rates observed for all other cell lines, including ZFL, stably transfected ZFL cell lines (ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ2), and human cell lines (MELN and T47D-KBluc, Figure 2). Similar results were obtained for BP2, with the exception of the MELN cell line, whose biotransformation capability was closer to that of HepaRG and PZFH (Figure 3), compared to BPS experiments. As expected, biotransformation capabilities were quantitatively higher for zebrafish primary hepatocyte cultures than for zebrafish cell lines (ZFL, ZELH-zfERα and ZELH-zfERβ2), but the biotransformation capability of ZFL and transfected ZFL cell lines was very similar, demonstrating that stable transfections did not alter their metabolic capabilities.

3.3. Pattern of BPS and BP2 Biotransformation in Zebrafish and Human Cell Models. The biotransformation of BPS and BP2 was compared at different concentrations. Figure 4 summarizes the proportion of BPS and BP2 metabolites produced in the eight models.

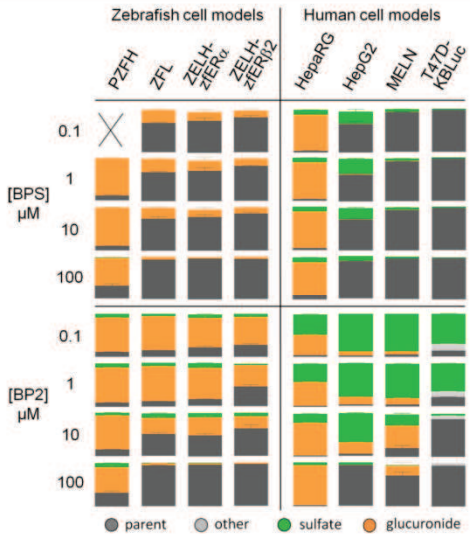


Figure 4. Rates (%) of the different BPS and BP2 metabolites produced with 0.1, 1, 10, and 100 μM concentrations in the different in vitro models after a 24 h incubation period.

3.3.1. PZFH and HepaRG Cells: Two Highly Metabolically Competent Models. BP2 and BPS were extensively metabolized by PZFH and HepaRG cells. For instance, at 1 μM, only 9.2 $\pm$ 1.5% and 1.8 $\pm$ 0.5% of BP2 remained unchanged in PZFH and HepaRG, respectively, and the percentages of unchanged BPS were 11.5 $\pm$ 2.3% and 3.7 $\pm$ 1.1% (Figure 4). Primary cultures are usually more competent (quantitatively and qualitatively) in terms of biotransformation than the corresponding cell lines. Fish liver primary cultures express stable levels of phase I and II enzymes, and their metabolic capabilities can be triggered by exposure to xenobiotics.[23] The HepaRG cell line, although not a primary culture, is known to express high levels of genes related to both phase I and II drug-metabolizing enzymes.[24,25] The expression of genes coding for cytochrome P450 (CYP), sulfotransferase (SULT) and glucuronosyltransferase (UGT) enzymes in HepaRG, primary human hepatocytes and human liver tissues have also been found to be quite similar.[26]

3.3.2. Significant Differences in Metabolic Capabilities among Human Cell Models. Differences in metabolic capabilities were observed between human cell models (Figure 4). At 1 μM, 24 h, 62.7 $\pm$ 3.2% of BPS remained unchanged in HepG2 liver cells, and most of it remained unchanged in mammary cell lines (MELN: 93.6 $\pm$ 1.4%; T47D-KBluc: 98.5 $\pm$ 0.2%). HepaRG predominantly produced glucuronidated metabolites (85.8 $\pm$ 0.8%), and a lower proportion of BPS-sulfate (10.5 $\pm$ 1.3%), whereas HepG2, MELN and T47D-KBLuc mostly produced BPS-sulfate (36.1 $\pm$ 2.9%, 5.7 $\pm$ 1.2% and 1.6 $\pm$ 0.2%, respectively), but nearly no glucuronides (1.2 $\pm$ 0.3%, 0.9 $\pm$ 0.1% and none, respectively). For BP2, at 1 μM, unchanged BP2 accounted for only 1.8 $\pm$ 0.5%, 2.7 $\pm$ 1.0% and 3.9 $\pm$ 1.3% in HepaRG, HepG2 and MELN, respectively. Metabolism was less extensive in T47D-KBLuc cells (20.5 $\pm$ 2.2% of unchanged BP2). In addition, whereas HepaRG produced both BP2 sulfate (42.6 $\pm$ 1.9%) and glucuronide (55.6 $\pm$ 1.7%), HepG2, MELN and T47D-KBLuc mainly produced BP2-sulfates (79.3 $\pm$ 1.5%, 80.7 $\pm$ 3.9% and 65.6 $\pm$ 2.3%, respectively). These observations reveal qualitative as well as quantitative differences in the metabolic capabilities of the human cell lines used in this study. The metabolic pattern of BPS and BPA, at least in HepG2 and MELN cell lines, appears to be very similar. Indeed, the biotransformation of bisphenol A (BPA) by HepG2 cells was previously shown to result in the production of BPA-sulfate,[27] with respective amounts of sulfated and unchanged BPA quite similar to those determined for BPS in the present study. In MCF-7 cells, from which MELN cell are derived, the amount of unchanged BPA found by Bursztyka et al. (2008),[27] is also consistent with the amount of unchanged BPS we found in the present study. UGT activities and mRNA levels of UGT1A1 and UGT1A6 have previously been documented in HepG2 cells, although less than in human primary hepatocytes.[28] The same authors also reported that mRNA levels of SULT genes (SULT1A1, 1A2, 1E1) were similarly expressed in cryopreserved human hepatocytes and in HepG2 cells. Regarding estrogenic potency, it was previously reported that depending on the hER in vitro assay used, BPS displayed either lower estrogenic potency than BPA[11] or similar estrogenic potency.[29−31] The similarity between BPA and BPS regarding their fate in cell lines and their quite similar estrogenic potency suggests that the substitution of BPA by BPS would raise similar endocrine disruption issues.

3.3.3. Homogenous Metabolic Patterns in Zebrafish Cell Lines. Unlike human cell models, the three zebrafish cell lines (ZFL, ZELH-zfERα, ZELH-zfERβ2) produced quite similar metabolic patterns (Figure 4). For instance, the proportion of unchanged BPS at 1 μM/24 h was similar in ZFL (68.3 $\pm$ 3.2%), ZELH-zfERα (74.4 $\pm$ 8.8%) and ZELH-zfERβ2 (81.9 $\pm$ 3.1%) incubations, and the metabolic pattern was almost

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

identical. Glucuronidation was the major phase II pathway involved in the metabolism of BPS as well as BP2 in zebrafish cell models. Sulfation, although a minor pathway, was found to be functional, as illustrated by the results obtained for BP2. Thus, the stable transfection of ERE-Luc and zfERα (ZELH-zfERα) or of ERE-Luc and zfERβ2 (ZELH-zfERβ2) did not qualitatively modify the metabolic capability of these cells toward BP2 and BPS, providing solid support for their use in testing endocrine disruptors.

3.3.4. Distinct Patterns of Metabolites between Human and Fish Cell Models. Sulfation activities were better expressed in human than in fish cell models, both for BP2 and BPS (Figure 4). As for UGTs, several zebrafish SULTs have been identified based on molecular cloning, and both xenobiotics and endogenous substrates of these zebrafish phase II enzymes have already been identified.[32−34] Comparative metabolic studies of drugs (troglitazone, 4-methylumbilliferone, acetaminophen, dobutamine, ambroxol) have been carried out using ZFL and HepG2 cells with sulfate free medium containing [^{35}S]-sulfate,[35] and revealed an identical pattern of metabolism in the two cell lines. In zebrafish, sulfate conjugates can also be produced in vivo and excreted through the gills, as demonstrated for pentachlorophenol.[36] We cannot rule out the possibility that metabolically competent cells other than hepatocytes, including gill cells, could be involved in vivo in the metabolism of BP2 and BPS. Additional studies of the fate of BP2 and BPS in adult zebrafish would be required to answer this specific question.

3.3.5. High Predominance of Conjugated BP2 and BPS Metabolites. All metabolites produced by zebrafish or human cell models were characterized as conjugates (Figures 1, 4), although we cannot rule out the possibility that a phase I reaction may be involved in the formation of hydroxylated BP2 for the T47D-KBLuc cell line. Fish liver cells and fish liver microsomes have previously been shown to display functional phase I metabolic capabilities,[23,37,38] and zebrafish larvae are capable of metabolizing compounds both through phase I and phase II enzymatic pathways.[39,40] Human HepG2 also express phase I and phase II activities,[41] and some CYPs have been found to be expressed by T47D cells.[42] The absence of hydroxylated BP2 and BPS metabolites in our study is likely explained by the fact that both molecules already carry hydroxyl moieties on the aromatic rings, and do not require phase I functionalization. The predominance of conjugative pathways is already well established for other bisphenols[43,44] as well as BP2.[45]

3.3.6. Differences in Phase II Metabolism Between BP2 and BPS. Interestingly, in all our zebrafish and human models, with the exception of PZFH and HepaRG cells, BP2 was more extensively metabolized than BPS, whatever the concentration used. This was not expected, since BP2 and BPS share common chemical features (two phenol rings linked by a cetone or a sulfonyl functional group, respectively). BP2 was more readily conjugated than BPS (all cell lines). Thus, according to the hypothesis that the same enzymes are involved for both molecules, the binding affinity of BP2 and BPS to these conjugation enzymes would be expected to be higher for BP2. Another hypothesis is that different SULT and UGT families or subfamilies are involved in the metabolism of these two chemicals. It would be interesting to further explore these hypotheses using in vitro models expressing specific phase II human and zebrafish isozymes. To date, it has been shown that UGT enzymes involved in the glucuronidation of BPA are the zebrafish UGT 1A1[34] and the human UGT 2B15 and, to a lesser extent, UGT 1A1, 1A3, 1A9, 2B4, 2B7.[46] Zebrafish SULT1 ST5, SULT3 ST1, ST3[47−49] and human SULT 1A1, 1B2, 1C2, 1E1, 2A1[50,51] have been shown to be involved in BPA sulfation. A recent study showed that the main human UGTs involved in BPS glucuronidation are UGTs 1A9 and 2A1.[52]

3.3.7. Influence of Cellular Metabolism in the Context of Estrogenicity Screening. We used a large range of concentrations, which enabled us to assess the limits of the metabolic capabilities of our biological models. Enzymatic activities involved in the metabolism of BP2 and BPS started to saturate around 10 μM in zebrafish as well as in human cell models, with the exception of HepaRG and PZFH (Figures 2, 3, and 4). The human mammary gland cell lines MELN and T47D-KBLuc, as well as novel zebrafish hepatic cell lines (ZELH-zfERs), are used to test endocrine disruptors. In this context, the concentrations tested usually range between 1 pM and 10 μM. Biotransformation data obtained for concentrations below 10 μM can be used to better interpret estrogenic activity. In previous studies, it was determined that BP2 EC50 (nM) was 3284 ± 231 in MELN,[6] 1084 ± 780 in ZELH-zfERα and 1477 ± 694 in ZELH-zfERβ2 cells.[5] On these bases, it seems that the estrogenic activity of BP2 is not directly related to the proportion of unchanged BP2 at 0.1, 1, and 10 μM. In addition to biotransformation capabilities, the cellular context (transcriptional cofactors and ERs structures) may explain, at least partly, the differences in relative estrogenic activity. Although conjugated metabolites sometimes have a biological activity,[43] the glucurono- and sulfo-conjugated metabolites found in this study did not exhibit hERα activity (SI Figure S1).

The fate of xenobiotics can influence the responses measured in biological models, since the rate of active compounds reaching cellular targets is partly determined by the metabolic capability of each model. Very few in vitro assays used to detect endocrine active substance have had their biotransformation capabilities characterized, even though it is well-known that insufficient knowledge of chemical metabolism and metabolic capacities of in vitro systems limits the interpretation and/or extrapolation of data generated by in vitro models.[8] In this work, the biotransformation capabilities of eight fish and human cell models was examined using two endocrine active substances (BP2 and BPS) that raise toxicological concerns due to their estrogenic activity. Comparative studies were carried out using primary zebrafish hepatocytes, ZFL liver cells, and zfERs transfected ZFL, as well as several human cells including mammary gland cell lines routinely used for screening xenoestrogens. Major phase II pathways (sulfation and glucuronidation) were functional in all zebrafish and human cell models. In the human cell lines HepG2, MELN and T47DK-BLuc, sulfation predominated over glucuronidation at least until sulfation saturation occurred. In HepaRG, glucuronidation was found to be predominant, like in the zebrafish hepatic cell models PZFH, ZFL, ZELH-zfERα, and ZELH-zfERβ2. Therefore, regarding the pattern of BP2 and BPS metabolism, zebrafish cell models are closer to HepaRG than to the other human cell lines routinely used to assess the estrogenic activity of substances. Since HepaRG is a human cell line known to be highly metabolically competent, these findings provide interesting support for the use of these zebrafish cell lines to detect endocrine active substances in a hazard assessment approach, while taking into account the qualitative and quantitative metabolic capacity of in vitro systems. Our

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

results highlight the importance of characterizing the metabolic capacities of the in vitro models used to screen xenobiotics. Together with pharmacodynamics models, our data should help advance our understanding, and therefore lead to the better use of in vitro models, within the framework of a testing strategy for endocrine disrupting chemicals.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Estrogenicity testing of unchanged chemicals (BP2 and BPS) and their glucuronide and sulfate conjugated in HELN-hERα bioassay (Figure S1). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org/.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*(S.A.-A.) Phone: +33 344 556 511; fax: +33 344 556 767; e-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr.
*(D.Z.) Phone: + 33 561 285 004; fax: + 33 561 285 244; e-mail: dzalko@toulouse.inra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the French Ministry of Ecology (P190 program, NEMO project) to François Brion and Selim Aït-Aïssa. Vincent Le Fol acknowledges INERIS for funding his doctoral fellowship.

■ REFERENCES

(1) Vandenberg, L. N.; Colborn, T.; Hayes, T. B.; Heindel, J. J.; Jacobs, D. R., Jr.; Lee, D. H.; Shioda, T.; Soto, A. M.; vom Saal, F. S.; Welshons, W. V.; Zoeller, R. T.; Myers, J. P. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* **2012**, *33* (3), 378−455.

(2) Cosnefroy, A.; Brion, F.; Guillet, B.; Laville, N.; Porcher, J. M.; Balaguer, P.; Ait-Aissa, S. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23* (8), 1450−1454.

(3) Matthews, J.; Celius, T.; Halgren, R.; Zacharewski, T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: A species comparison. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *74* (4), 223−234.

(4) Miyagawa, S.; Lange, A.; Hirakawa, I.; Tohyama, S.; Ogino, Y.; Mizutani, T.; Kagami, Y.; Kusano, T.; Ihara, M.; Tanaka, H.; Tatarazako, N.; Ohta, Y.; Katsu, Y.; Tyler, C. R.; Iguchi, T. Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (9), 5254−5263.

(5) Cosnefroy, A.; Brion, F.; Maillot-Marechal, E.; Porcher, J. M.; Pakdel, F.; Balaguer, P.; Ait-Aissa, S. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci.* **2012**, *125* (2), 439−449.

(6) Molina-Molina, J. M.; Escande, A.; Pillon, A.; Gomez, E.; Pakdel, F.; Cavailles, V.; Olea, N.; Ait-Aissa, S.; Balaguer, P. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232* (3), 384−395.

(7) Menuet, A.; Pellegrini, E.; Anglade, I.; Blaise, O.; Laudet, V.; Kah, O.; Pakdel, F. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* **2002**, *66* (6), 1881−1892.

(8) Jacobs, M. N.; Laws, S. C.; Willett, K.; Schmieder, P.; Odum, J.; Bovee, T. F. In vitro metabolism and bioavailability tests for endocrine active substances: What is needed next for regulatory purposes? *ALTEX* **2013**, *30* (3), 331−351.

(9) Weisbrod, C. J.; Kunz, P. Y.; Zenker, A. K.; Fent, K. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *225* (3), 255−266.

(10) Hsieh, M. H.; Grantham, E. C.; Liu, B.; Macapagal, R.; Willingham, E.; Baskin, L. S. In utero exposure to benzophenone-2 causes hypospadias through an estrogen receptor dependent mechanism. *J. Urol.* **2007**, *178* (4 Pt 2), 1637−1642.

(11) Molina-Molina, J. M.; Amaya, E.; Grimaldi, M.; Saenz, J. M.; Real, M.; Fernandez, M. F.; Balaguer, P.; Olea, N. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272* (1), 127−136.

(12) Ji, K.; Hong, S.; Kho, Y.; Choi, K. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (15), 8793−8800.

(13) Naderi, M.; Wong, M. Y.; Gholami, F. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol.* **2014**, *148*, 195−203.

(14) Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **1980**, *209* (4455), 497−499.

(15) Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Le Seyec, J.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C.; Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (24), 15655−15660.

(16) Balaguer, P.; Francois, F.; Comunale, F.; Fenet, H.; Boussioux, A. M.; Pons, M.; Nicolas, J. C.; Casellas, C. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* **1999**, *233* (1−3), 47−56.

(17) Wilson, V. S.; Bobseine, K.; Gray, L. E., Jr. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol. Sci.* **2004**, *81* (1), 69−77.

(18) Ghosh, C.; Zhou, Y. L.; Collodi, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell. Biol. Toxicol.* **1994**, *10* (3), 167−176.

(19) Aninat, C.; Piton, A.; Glaise, D.; Le Charpentier, T.; Langouet, S.; Morel, F.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug. Metab. Dispos.* **2006**, *34* (1), 75−83.

(20) Bjorkblom, C.; Olsson, P. E.; Katsiadaki, I.; Wiklund, T. 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.* **2007**, *146* (3), 431−442.

(21) Ibabe, A.; Herrero, A.; Cajaraville, M. P. 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* **2005**, *19* (6), 725−735.

(22) Loft, S.; Poulsen, H. E. Metabolism of metronidazole and antipyrine in isolated rat hepatocytes. Influence of sex and enzyme induction and inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38* (7), 1125−1136.

(23) Segner, H.; Cravedi, J. P. Metabolic activity in primary cultures of fish hepatocytes. *Altern. Lab. Anim.* **2001**, *29* (3), 251−257.

(24) Antherieu, S.; Chesne, C.; Li, R.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26* (8), 1278−1285.

(25) Kanebratt, K. P.; Andersson, T. B. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug. Metab. Dispos.* **2008**, *36* (7), 1444−1452.

(26) Hart, S. N.; Li, Y.; Nakamoto, K.; Subileau, E. A.; Steen, D.; Zhong, X. B. A comparison of whole genome gene expression profiles

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug. Metab. Dispos.* **2010**, *38* (6), 988−994.
(27) Bursztyka, J.; Perdu, E.; Pettersson, K.; Pongratz, I.; Fernandez-Cabrera, M.; Olea, N.; Debrauwer, L.; Zalko, D.; Cravedi, J. P. Biotransformation of genistein and bisphenol A in cell lines used for screening endocrine disruptors. *Toxicol. In Vitro* **2008**, *22* (6), 1595−1604.
(28) Westerink, W. M.; Schoonen, W. G. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21* (8), 1592−1602.
(29) Grignard, E.; Lapenna, S.; Bremer, S. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26* (5), 727−731.
(30) Kitamura, S.; Suzuki, T.; Sanoh, S.; Kohta, R.; Jinno, N.; Sugihara, K.; Yoshihara, S.; Fujimoto, N.; Watanabe, H.; Ohta, S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* **2005**, *84* (2), 249−259.
(31) Kuruto-Niwa, R.; Nozawa, R.; Miyakoshi, T.; Shiozawa, T.; Terao, Y. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *19* (1), 121−130.
(32) Huang, H.; Wu, Q. Cloning and comparative analyses of the zebrafish Ugt repertoire reveal its evolutionary diversity. *PLoS One* **2010**, *5* (2), e9144.
(33) Kurogi, K.; Liu, T. A.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Liu, M. C. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. *Drug. Metab. Rev.* **2013**, *45* (4), 431−440.
(34) Wang, Y.; Huang, H.; Wu, Q. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *86* (1), 62−75.
(35) Kurogi, K.; Dillon, J.; Nasser, A.; Liu, M. Y.; Williams, F. E.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Liu, M. C. Sulfation of drug compounds by the Zebrafish cytosolic sulfotransferases (SULTs). *Drug. Metab. Lett.* **2010**, *4* (2), 62−68.
(36) Kobayashi, K. Metabolism of pentachlorophenol in Fish. In *Pesticide and Xenobiotic Metabolism in Aquatic Organisms*; Khan, M. A. Q., Lech, J. J., Menn, J. J., Eds.; ACS symposium series 99: Washington D.C., 1979; pp 131.
(37) Collodi, P.; Miranda, C. L.; Zhao, X.; Buhler, D. R.; Barnes, D. W. Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) P450 in vivo and in cell culture. *Xenobiotica* **1994**, *24* (6), 487−493.
(38) Funari, E.; Zoppini, A.; Verdina, A.; De Angelis, G.; Vittozzi, L. Xenobiotic-metabolizing enzyme systems in test fish. I. Comparative studies of liver microsomal monooxygenases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1987**, *13* (1), 24−31.
(39) Alderton, W.; Berghmans, S.; Butler, P.; Chassaing, H.; Fleming, A.; Golder, Z.; Richards, F.; Gardner, I. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica* **2010**, *40* (8), 547−557.
(40) Jones, H. S.; Panter, G. H.; Hutchinson, T. H.; Chipman, J. K. Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae in vivo. *Zebrafish* **2010**, *7* (1), 23−30.
(41) Hewitt, N. J.; Hewitt, P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* **2004**, *34* (3), 243−256.
(42) Angus, W. G.; Larsen, M. C.; Jefcoate, C. R. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: Role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (6), 947−955.
(43) Riu, A.; Grimaldi, M.; le Maire, A.; Bey, G.; Phillips, K.; Boulahtouf, A.; Perdu, E.; Zalko, D.; Bourguet, W.; Balaguer, P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ. Health. Perspect.* **2011**, *119* (9), 1227−1232.
(44) Zalko, D.; Soto, A. M.; Dolo, L.; Dorio, C.; Rathahao, E.; Debrauwer, L.; Faure, R.; Cravedi, J. P. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: Answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health. Perspect.* **2003**, *111* (3), 309−319.
(45) Schlecht, C.; Klammer, H.; Frauendorf, H.; Wuttke, W.; Jarry, H. Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. *Toxicology* **2008**, *245* (1−2), 11−17.
(46) Hanioka, N.; Naito, T.; Narimatsu, S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* **2008**, *74* (1), 33−36.
(47) Yasuda, S.; Burgess, M.; Yasuda, T.; Liu, M. Y.; Bhuiyan, S.; Williams, F. E.; Kurogi, K.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Liu, M. C. A novel hydroxysteroid-sulfating cytosolic sulfotransferase, SULT3 ST3, from zebrafish: Identification, characterization, and ontogenic study. *Drug. Metab. Lett.* **2009**, *3* (4), 217−227.
(48) Yasuda, S.; Liu, C. C.; Takahashi, S.; Suiko, M.; Chen, L.; Snow, R.; Liu, M. C. Identification of a novel estrogen-sulfating cytosolic SULT from zebrafish: Molecular cloning, expression, characterization, and ontogeny study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330* (1), 219−225.
(49) Yasuda, T.; Yasuda, S.; Williams, F. E.; Liu, M. Y.; Sakakibara, Y.; Bhuiyan, S.; Snow, R.; Carter, G.; Liu, M. C. Characterization and ontogenic study of novel steroid-sulfating SULT3 sulfotransferases from zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2008**, *294* (1−2), 29−36.
(50) Nishiyama, T.; Ogura, K.; Nakano, H.; Kaku, T.; Takahashi, E.; Ohkubo, Y.; Sekine, K.; Hiratsuka, A.; Kadota, S.; Watabe, T. Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17* (3), 221−228.
(51) Suiko, M.; Sakakibara, Y.; Liu, M. C. Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267* (1), 80−84.
(52) Gramec Skledar, D.; Troberg, J.; Lavdas, J.; Peterlin Masic, L.; Finel, M. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica* **2014**, 1−9.

DOI: 10.1021/es505302c
Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 3860−3868

Supplemental information

In vitro assay

HELN-hER cells[1] were used for luciferase assay to assess human ER estrogenic potency of BP2 and BPS metabolites (BPS-monoG, BPS-monoS, BP2-monoG1, BP2-monoG2 and BP2-monoS). The metabolites were biochemically synthesized as previously described[2]. Synthesized [^{3}H]-BP2 and [^{3}H]-BPS glucuronides and sulfates were analyzed by the same HPLC systems as already described.

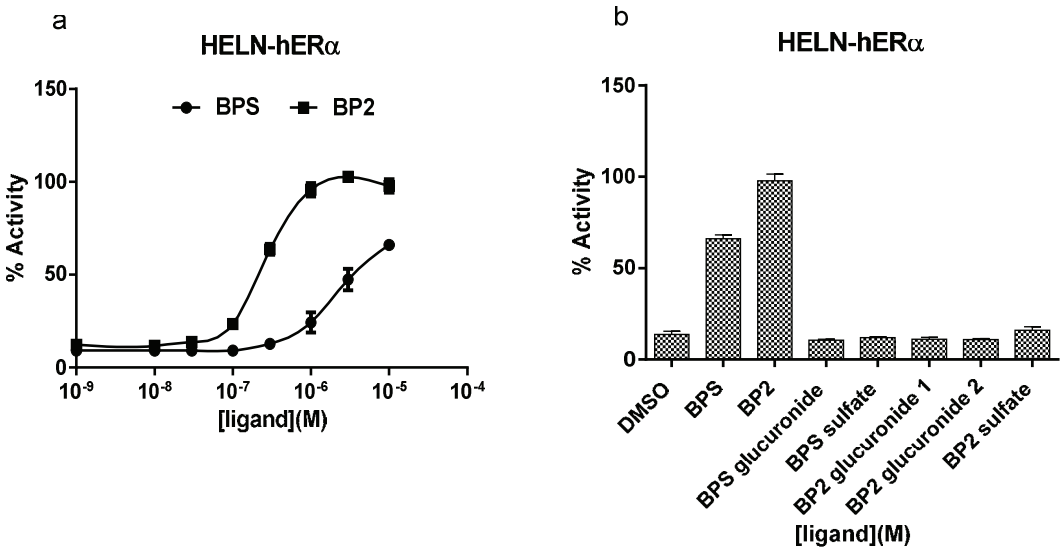


Figure S1. Estrogenic activity of parent compounds (BP2 and BPS) (a) and their conjugated metabolites (b) in HELN-hER assay.

References

1. Escande, A.; Pillon, A.; Servant, N.; Cravedi, J. P.; Larrea, F.; Muhn, P.; Nicolas, J. C.; Cavailles, V.; Balaguer, P. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. Biochem. Pharmacol. 2006, 71 (10), 1459-1469.

2. Cabaton, N.; Zalko, D.; Rathahao, E.; Canlet, C.; Delous, G.; Chagnon, M. C.; Cravedi, J. P.; Perdu, E. Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. Toxicol. In Vitro 2008, 22 (7), 1697-1704.

V. Métabolisme de la Benzophénone-2 et du Bisphénol S chez le poisson zèbre aux stades larvaires et adultes

Article 4

Life-stage dependant biotransformation of BP2 and BPS in zebrafish supports the use of embryo model as an alternative to adult fish.

Vincent Le Fol[a,b,c], François Brion[a*], Anne Hillenweck[b,c], Elisabeth Perdu[b,c], Sandrine Bruel[b,c] Selim Aït-Aïssa[a], Jean-Pierre Cravedi[b,c], Daniel Zalko[b,c,*]

[a] *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

[b] *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

[c] *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

*: corresponding author:

E-mail: daniel.zalko@toulouse.inra.fr, phone +33 582 066 304, fax +33 561 285 244

E-mail: francois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 612, fax +33 344 556 610

Présentation de l'article

L'implication des perturbateurs endocriniens dans les troubles et les perturbations observés à l'échelle de la santé humaine et environnementale souligne l'importance de la caractérisation du danger que représentent ces produits chimiques (Colborn et al. 1993; Ankley et al. 2009). Des tests *in vitro* et *in vivo*, mammaliens ou non, ont alors été développés afin de répondre à la nécessité de cribler et d'évaluer les activités endocriniennes de ces substances chimiques (Hotchkiss et al. 2008). Le poisson zèbre est aujourd'hui un modèle biologique reconnu et utilisé dans des domaines allant de la biologie du développement à la toxicologie. Le développement et l'utilisation de modèles *in vivo* et *in vitro* spécifiques du poisson zèbre ont conduit à des avancées notables dans la compréhension des mécanismes d'action de PE agissant notamment par l'activation de récepteurs nucléaires (Segner 2009). C'est le cas de modèles spécifiquement développés permettant de mettre en évidence les composés chimiques agissant par des voies ER dépendantes. Il s'agit de la larve transgénique basée sur l'expression de la GFP placée sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* dont l'expression est œstrogéno-régulée (EASZY assay) (Brion et al. 2012) et de lignées cellulaires ZFL transfectées avec l'un des sous-types des ER du poisson zèbre (ZELH-zfERs) (Cosnefroy et al. 2012). L'utilisation combinée de ces tests *in vitro* et *in vivo* constitue une approche très précieuse et prometteuse dans l'évaluation de l'activité œstrogénique de produits chimiques, de part la fiabilité et la précision que cette combinaison peut apporter tout en répondant aux exigences des 3R (réduction, raffinement, remplacement) relatives à l'expérimentation animale. Il est aujourd'hui reconnu que le devenir des produits chimiques est un des facteurs clefs dans l'évaluation de la toxicité de substances (Jacobs et al. 2013) puisque la nature et la concentration des produits atteignant les cibles cellulaires sont en partie déterminées par les processus de biotransformation. A cet égard, le devenir de deux contaminants émergeants de l'environnement à savoir la Benzophénone-2 (BP2) et un substitut possible du Bisphénol A (BPA), le Bisphénol S (BPS) a été caractérisé dans un ensemble de modèles cellulaires issus du poisson zèbre (primo-cultures d'hépatocytes, lignées ZFL et ZELH-zfERs) et de l'Homme (HepG2, HepaRG, MELN, T47D-KBLuc) (Le Fol et al. 2015). Les modèles embryonnaires de poissons, et en particulier celui du poisson zèbre, peuvent constituer, une alternative à l'utilisation de modèles adultes de part un degré de complexité voisin. Toutefois, nos connaissances actuelles sur les capacités de biotransformation du poisson zèbre à différents stades de développement sont parcellaires alors qu'elles pourraient participer à la compréhension des activités œstrogéniques mesurées des PE. Dans l'objectif de mieux caractériser et comparer le métabolisme de PE dans les modèles du poisson zèbre, nous avons élargi notre travail précédent à l'étude du devenir de la BP2 et du BPS chez le poisson zèbre à l'état larvaire et adulte.

Ce travail a mis en évidence une différence importante entre le devenir de la BP2 et du BPS dans ces modèles du poisson zèbre, soulignant des différences de capacités de ces modèles à prendre en charge ces deux contaminants aux caractéristiques chimiques pourtant proches.

La BP2 et le BPS ont été absorbés et transformés par le poisson adulte ainsi que par la larve à un stade de développement précoce (96 heures après fécondation ou hpf). Les bilans métaboliques ont montré une absorption du BPS et de la BP2 de l'ordre de 0,2 – 0,3 % chez la larve, et de 0,9 % chez l'adulte. Rapportées aux poids frais, les concentrations en équivalent BP2 et BPS se sont avérées 50 fois plus élevées chez la larve que chez l'adulte étant donné la biomasse plus faible dans le cas des larves, ainsi que la concentration d'exposition identique entre larves et adultes (1 µM). Les facteurs de bioconcentration apparents étaient également plus élevés chez les larves que chez les adultes. Celui de la BP2 (de l'ordre de 90) était significativement plus important que celui calculé pour le BPS (de l'ordre de 20). Ce dernier semble, pour autant, être du même ordre de grandeur que ceux précédemment trouvés pour le BPA (27) et le BPF (11) dans une autre étude (Gibert et al. 2011). Ces résultats soulignent les interactions étroites entre les poissons (larve ou adulte) et leur environnement aussi bien en termes d'absorption que d'exposition à ces PE. Ces interactions sont non seulement liées aux caractéristiques physico-chimiques des contaminants mais aussi à leurs voies d'entrée (absorption après ingestion, passage tégumentaire, passage branchial) selon les modèles biologiques.

La BP2 et le BPS ont été transformés en une variété de métabolites de phase II, glucurono- et sulfo-conjugués. L'absence de métabolites de phase I peut s'expliquer par l'état déjà hydroxylé de la BP2 et du BPS permettant l'action d'enzymes de phase II sans l'intervention préalable d'enzymes de phase I. Ces réactions préférentielles de phase II ont d'ailleurs auparavant été mises en évidence pour la BP2 chez le rat ainsi que pour différents bisphénols (Zalko et al. 2003; Schlecht et al. 2008; Riu et al. 2011; Le Fol et al. 2015). Ces réactions de phase II n'excluent pas la survenue de réactions de phase I pour d'autres types de composés chimiques comme par exemple le paracétamol et le bupropion (Alderton et al. 2010). Excepté dans le cas du poisson adulte et de la BP2 dans lequel la sulfatation est majoritaire, les réactions de glucuronoconjugaison ont été prédominantes dans la larve pour le BPS et la BP2, ainsi que chez le poisson adulte exposé au BPS. La prise en charge par différentes isoformes de glucuronotransférases (UGT) et sulfotransférases (SULT) peut expliquer les différences de profils métaboliques entre la BP2 et le BPS. Toutefois, peu d'études font état de résultats détaillés et exploitables quant à la fonctionnalité des enzymes impliquées dans la prise en charge des composés chimiques modèles chez le poisson zèbre. Il a été montré que le BPA était préférentiellement pris en charge par certaines UGT et SULT du poisson zèbre (Liu et al. 2010; Kurogi et al. 2013; Wang et al. 2014). L'évolution de l'expression des UGT et des SULT du poisson zèbre au cours des stades de développement peut également expliquer en partie les différences de profils métaboliques (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008). Il est également à remarquer que la BP2 est davantage transformée en métabolite sulfoconjugué que ne l'est le BPS que ce soit chez la larve ou l'adulte. Ce résultat avait également été obtenu dans les modèles cellulaires du poisson

zèbre mais également de l'Homme lors de notre précédente étude (Le Fol et al. 2015) suggérant une plus grande facilité de la BP2 à être pris en charge par les EMX et notamment les sulfotransférases. En outre, il n'est pas exclu que des sulfotransférases branchiales ait pris préférentiellement en charge la BP2 par rapport au BPS, dans le cadre du modèle adulte.

Dans le cas des larves, seuls les composés parents inchangés (BP2 ou BPS) ont été retrouvés dans l'eau d'exposition. Les profils chromatographiques ont montré une biotransformation bien plus importante de la BP2 (87% environ) que du BPS (34% environ) après 72 h d'exposition. Ce taux de biotransformation plus élevé pour la BP2 que le BPS avait également été observé dans les modèles cellulaires ZFL et ZELH-zfERs comme précédemment évoqué (Le Fol et al. 2015). L'une des grandes différences dans le devenir de ces deux composés chez le poisson adulte est la présence de métabolites dans l'eau d'exposition dans le cas de la BP2, contrairement au BPS. La part de biotransformation du BPS correspond simplement aux métabolites trouvés dans le poisson, soit 0,3% de la radioactivité, environ. Pour la BP2, l'ensemble des métabolites (excepté les mono-glucuronides) retrouvé dans l'eau d'exposition, représente environ 40% de la radioactivité initialement présente sous forme de molécule parent. Par conséquent, la biotransformation de la BP2 a été plus massive que celle du BPS chez le poisson adulte. La même tendance dans une proportion beaucoup moindre a été retrouvée dans le cas de la larve, mais aussi dans les modèles cellulaires du poisson zèbre (ZFL et ZELH-zfERs).

Ce travail a donc démontré les capacités d'absorption, de biotransformation et d'excrétion de nos modèles *in vivo* de poisson zèbre, pour les molécules modèles étudiées. Alors que BP2 et BPS partagent plusieurs caractéristiques chimiques, des différences notables du devenir des deux molécules ont été mises en évidence. Ce travail a contribué à la caractérisation des capacités métaboliques du poisson zèbre à différents stades de développement (larvaires et adultes) par l'étude du devenir de ces deux substances. Ces données sont essentielles eu égard au statut du modèle embryo-larvaire aujourd'hui reconnu comme une alternative au modèle adulte dans l'évaluation de la toxicité des substances chimiques (Strahle et al. 2012; Busquet et al. 2014). Des différences d'absorption, de biotransformation et de toxicocinétique font souvent l'objet d'hypothèse expliquant en partie les différences d'activité toxicologique observées à différents stades de développement, sans pour autant être expérimentalement étayées (Massei et al. 2015) (Cosnefroy et al. *in prep* ; Le fol et al. *in prep*). Ce travail souligne également la nécessité de caractériser non seulement le devenir de substances chimiques selon les stades de développement, mais aussi de caratcériser la distribution tissulaire des composés parents et des métabolites afin de mieux apprécier les mécanismes toxicocinétiques associés aux activités biologiques des substances chimiques.

Life-stage dependant biotransformation of BP2 and BPS in zebrafish supports the use of embryo model as an alternative to adult fish.

Vincent Le Fol[a,b,c], François Brion[a*], Anne Hillenweck[b,c], Elisabeth Perdu[b,c], Sandrine Bruel[b,c] Selim Aït-Aïssa[a], Jean-Pierre Cravedi[b,c], Daniel Zalko[b,c,*]

[a] *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

[b] *INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, , F-31027 Toulouse, France*

[c] *Toulouse University, INP, UMR 1331 TOXALIM, F-31000 Toulouse, France.*

*: corresponding author:

E-mail: daniel.zalko@toulouse.inra.fr, phone +33 582 066 304, fax +33 561 285 244

E-mail: francois.brion@ineris.fr, phone +33 344 556 612, fax +33 344 556 610

Abstract

Fish embryo assays, in particular those based on the zebrafish model, are increasingly used in the toxicological assessment of environmental contaminants, including endocrine activity screening. Among other advantages, these models are 3R-compliant and are fit for high throughput screening purposes. Although biotransformation processes are well-recognized as critical factors influencing toxic responses, detailed metabolic capabilities regarding key toxicological models are seldom reported, including for zebrafish models. Comparative life-stage dependent comparative metabolic studies (embryos *vs.* adults) are even scarcer, resulting in significant data gaps, and possible differences in the response to tested chemicals. In this study, we examined the fate of two estrogenic emerging contaminants, benzophenone-2 (BP2) and bisphenol S (BPS) in 4-days embryos and adult zebrafish using ^{3}H-labeled chemicals. Despite BP2 and BPS share structural similarities, our study underlined important differences in their metabolic fate, with extensive biotransformation into a variety of phase II metabolites. Glucuronidation was the predominant pathway in adults and larvae for BPS, and in larvae for BP2. Sulfation was the major pathway in adults for BP2, with an extensive (40%) conversion of parent BP2 into metabolites released into water, while for all other exposure conditions and models, metabolites were mainly restricted to animals. Higher body burden and bioconcentration factors were observed in larvae compared to adults, underlining close interactions between fish and environment regarding uptake and chemical exposure, even at a very early stage of development. Marked differences in the metabolism and uptake of BP2 and BPS were observed in adults *vs.* larvae, despite the structural proximity of these compounds, contributing to the characterization of the metabolic capabilities of zebrafish models used in toxicological studies.

Keywords: metabolism of xenobiotics, zebrafish, endocrine disruptors, benzophenone-2, bisphenol S

1. Introduction

The involvement of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the onset of adverse developmental and reproductive health effects in human and wildlife has been extensively documented, underlining the necessity to characterize the risk related to these compounds (Colborn et al. 1993; Ankley et al. 2009). In this context, mammalian and non-mammalian *in vitro* and *in vivo* species-specific bio-assays have been developed and implemented for the screening and testing of the endocrine activity of chemical substances, with both research and regulatory perspectives (Hotchkiss et al. 2008).

Zebrafish (*Danio rerio*) is a recognized model which is now widely used in a variety of biological disciplines ranging from basic developmental biology to applied toxicology. Notably, zebrafish has been found useful in studies related to EDCs, with important research efforts conducted over the past few years, which have led to significant advances in the assessment of the mode of action of EDCs on steroid receptor-regulated pathways, based on *in vivo* assays recognized at the international level, as well as on both *in vitro* and *in vivo* reporter gene models (Segner 2009). Regarding EDCs which act through ER signaling pathways, new zebrafish-specific *in vitro* and *in vivo* embryo assays have been recently developed. These are, on the one hand, hepatic cell lines (ZFL), stably transfected with the zebrafish estrogen receptor subtypes (ZELH-zfERs cell lines) and expressing luciferase under the control of the estrogen responsive elements (ERE) (Cosnefroy et al. 2012) and, on the other hand, the EASZY assay (detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos), based on transgenic zebrafish embryos expressing the Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the ER-regulated cyp19a1b promoter (Brion et al. 2012). The combined use of these *in vitro* and *in vivo* methods in a tiered- approach is extremely promising for the assessment of the estrogenic activity of chemicals in fish, since they provide reliable and accurate EDC potency screening of substances, while being 3R (Reduction, Refinement and Replacement) compliant. Ideally, these *in vitro* and *in vivo* models should mimic as closely as possible the metabolic fate of candidate EDCs in human, which, like other chemicals may be activated or deactivated through biotransformation carried out by xenobiotic metabolizing enzymes (XME). The fate of xenobiotics within biological models is a key factor in toxicity assessment (Jacobs et al. 2013) and it is acknowledged that the nature and concentration of active compounds ultimately reaching cellular targets is largely determined by metabolic processes. In this regard, we recently characterized the comparative fate of the candidate EDCs bisphenol S (BPS) and benzophenone-2 (BP2) in human and zebrafish cellular models. Benzophenones are emerging environmental contaminants used as UV filters in sunscreens and in other products such as perfumes or food packaging, to which they are added to prevent UV degradation. BP2 exhibits EDC properties in fish (Weisbrod et al. 2007; Cosnefroy et al. 2009; Cosnefroy et al. 2012), in mice (Hsieh et al. 2007) and in human models (Molina-Molina et al. 2008). BPS, a molecule increasingly used as a substitute for bisphenol A, was also shown to be an estrogenic compound in fish and human models (Ji et al. 2013; Molina-Molina et al. 2013; Naderi et al. 2014). The comparative metabolic study of BP2 and BPS in primary zebrafish

hepatocyte cultures, and in ZFL and ZELH-zfERs cell lines, demonstrated that these systems are metabolically competent (Le Fol et al. 2015). While the (zebra)fish embryo assays may provide an alternative small scale analysis system with a complexity close to an adult organism (Embry et al. 2010; Halder et al. 2010; Strahle et al. 2012), the current knowledge of the biotransformation capabilities expressed by zebrafish at different developmental stages remains very fragmentary, resulting in a lack of data about chemical's fate, although the latter information could explain differences in the estrogenic activity measured for EDCs using *in vitro* and *in vivo* zebrafish models, including adults. Whether adult fish can absorb and metabolize environmental contaminants is not a matter of debate (Cravedi 2002; Arnot et al. 2008). However, the actual expression of functional xenobiotic metabolizing enzymes (XME) at early developmental stages remains largely unexplored. In addition, although we found that zebrafish hepatocytes and hepatic cell lines were close to hepatic human cell lines (HepaRG) regarding a large part of the metabolic pathways followed by BPS and BP2 (Le Fol et al. 2015), adult zebrafish metabolism itself may not necessarily reflect human metabolism. In an attempt to better characterize and compare the metabolism of EDCs in zebrafish models, we therefore extend our work by characterizing the biotransformation capabilities of bisphenol S and benzophenone-2 in zebrafish embryo and adult models. The possibility to use radio-labeled molecules (^{3}H-BPS, ^{3}H-BP2) allowed to set a full metabolic balance study of investigating the fate of BP2 and BPS in *in vivo* zebrafish models both in zebrafish larvae and in adult zebrafish, followed by the radio-HPLC profiling of metabolites present in water as well as in zebrafish themselves.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ring-labeled [^{3}H]-benzophenone-2 (2,2′,4,4′-tetrahydroxybenzophenone; radiochemical purity: 99%, specific activity: 740 GBq/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint-Louis, MO). Ring-radiolabeled [^{3}H]-bisphenol-S (4,4′- sulfonyldiphenol; radiochemical purity: 99.7%, specific activity 62.9 GBq/mmol) was supplied by Moravek Biochemicals, Inc. (Brea, CA). Unlabeled benzophenone-2 (BP2, CAS #131−55−5, chemical purity: 97%) and bisphenol S (BPS, CAS #80−09−1, chemical purity: 98%) were purchased from Sigma−Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Flo-Scint II and Ultima Gold liquid scintillation cocktails were purchased from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Courtaboeuf, France). HPLC-grade solvents (ethanol, methanol, dichloromethane, acetonitrile) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Ammonium acetate was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ultrapure water produced with the Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin En Yvelines, France) was used for preparing HPLC mobile phases.

2.2. Zebrafish Housing

Experiments were performed in accordance with the European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 86/609/EEC). Mature wild type zebrafish (*Danio rerio*,

AB strain) were maintained in charcoal filtrated water at 28 ± 1 °C with a controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle). Water conductivity and water pH were regularly checked. Fishes were fed SDS-400 (Special Diet Services, Dietex, Argenteuil, France) twice a day, seven days per week.

2.3. Biotransformation studies in zebrafish larvae

After the egg-laying, fertilized zebrafish eggs were selected under a binocular magnifier. Each experimental group, consisting of 60 embryos, was exposed to BP2 or BPS dissolved in 50 mL water. Eggs were exposed with a controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle) in beakers placed in a water-bath to keep the temperature of exposure at 28 ± 2 °C. During the first 24 h, exposure consisted of either unlabelled BP2 or unlabelled BPS, at 1 µM. Water was renewed at 24 h, and from this time-point eggs were exposed for 72 additional hours, either to ^{3}H-BP2 or to ^{3}H-BPS, adjusted with unlabelled BP2 or BPS, respectively, to reach final concentrations of 1 µM and 8.41 10^{5} Bq per beaker aquarium. To reach these conditions, the ratios of radiolabeled to nonlabeled chemicals in the incubations were 2.2:97.8 (BP2) and 26.7:73.3 (BPS). Chemicals were diluted in DMSO before they were mixed with water to reach a final concentration of 0.01% DMSO. The overall length of larvae exposure (96 h), was chosen to parallel the duration of exposure previously used with *cyp19a1b*-GFP transgenic larvae (EASZY assay), in a study which assessed the estrogenic activity of EDC chemicals (Brion et al. 2012). Control experiments were carried out in the same conditions with fish-farming water, without eggs, to assess the potential degradation and/or microbial biotransformation of radiolabeled BP2 or BPS by micro-organisms, if any. All experiments were performed in triplicate.

After 96 h of exposure, water was collected and stored at -20°C until radioactivity determination by direct counting using a Packard scintillation counter (model Tri-Carb 2200CA; Perkin-Elmer, scintillation cocktail: Ultima Gold) and radio-HPLC analysis. Larvae were euthanized in beakers using ice-cold water and then transferred into lysing Matrix D tubes containing ceramic spheres (MP Biomedicals) and 500 µL acetonitrile:methanol:acetate ammonium buffer 40 mM pH 3.5 (6:3:1, v/v/v). They were crushed for 30 seconds using a high-speed homogenizer (FastPrep®-24™, MP Biomedicals). After a centrifugation step (15 min, 4°C, 1500 *g*) the supernatant was recovered. Two additional extractions were performed on the pellet using the same procedure. Supernatants were stored at -20°C before radioactivity quantification and radio-HPLC analysis. Incubation beakers were rinsed with an ethanol/water solution which radioactivity content was quantified using the scintillation counter, to complete the metabolic balance study.

2.4. Biotransformation studies in adult zebrafish

2.4.1. Exposure

The study of the fate of BP2 and of BPS in adult male zebrafish was carried out in fishes housed in 1.5 l tanks placed in an incubator, at 28±2 °C, with a controlled photoperiod (14/10 h light/dark cycle). A biomass of 5 g of fish per liter of water was used, corresponding to 14-16 fishes / 1.5 L. This biomass was selected based on preliminary experiments carried out to ensure an optimal balance between fish concentration and the use of a sufficient amount of radioactivity to perform further radio-HPLC

analysis. With this biomass, preliminary studies demonstrated no changes in water parameters (dissolved oxygen, conductivity, pH and temperature), no mortality and no signs of suffering. During the first 4 days of exposure, fishes were exposed to unlabeled BP2 or BPS at 1 µM with a complete renewal of water every day. During the last 3 days of exposure, fishes were exposed either to ^{3}H-BP2 or ^{3}H-BPS adjusted with unlabeled BP2 or BPS to reach the final concentration of 1 µM and an amount of radioactivity of 1 009 000 Bq per tank. The ratios of radiolabeled to nonlabeled chemicals for these assays were 0.06:99.94 (BP2) and 0.71:99.29 (BPS). Chemicals were diluted in DMSO before being mixed with water. The final concentration of DMSO in water was 0.005 %. Control assays were carried out for each radio-labeled molecule in the absence of fish, but using fish-farming water, to assess the potential degradation and/or biotransformation of labeled parent compounds by micro-organisms.

At the end of the exposure period, fish were pooled and euthanized in 100 ml ice-cold water, then were weighed and stored at -80°C. Water was collected and stored at -20°C. An ethanol/water solution (70:30, v/v) was used to rinse tanks and utensils. The quantification of radioactivity was carried out for tanks water samples, water samples used to euthanized fishes, as well as ethanol/water rinsing solutions. All experiments were performed in triplicate.

2.4.2. Samples preparation for radio-HPLC profiling

Tank water samples (2 mL each) were concentrated using a vacuum evaporator (speed Vac plus SC110A, Savant instruments), with no heating, up to a volume of 100 µL. Evaporated water samples were taken up in HPLC mobile phase A and were analyzed by radio-HPLC. Adult fish were extracted as follows: for each molecule and replicate separately, *ca.* 1g of zebrafish (2 fishes) previously stored at -80°C was crushed into powder in a ball grinder (ball mills MM400, Retsch®, Fisher Scientific, France) during 2 min 30 sec at 28.5 Hz. The resulting powder was taken up with 8 mL/g $CH_3OH/H20/CH_2Cl_2$ (1:1:2 v/v), was agitated 15 min, and finally centrifugated for 15 min (4°C, 5000 g). The resulting aqueous and lipid phases were collected. This extraction was repeated twice. After radioactivity was quantified in both types of phases, samples were stored at -20°C until analysis.

2.5. Radio-HPLC profiling

A Spectra P1000 HPLC pump (Thermo Separation Products, Les Ulis, France), coupled to an on-line radioactivity detector (radiometric flow scintillation analyzer Flo-One A500, PerkinElmer), were used to perform the radio-HPLC profiling of BPS and BP2 metabolites. Analyzed samples included water (larvae exposure experiments, adult exposure experiments, controls), as well as the aqueous phases of zebrafish larvae and adult zebrafish extracts. Organic phases and pellets from adult extracts were stored at -20°C. The HPLC system, developed previously (Le Fol et al. 2015) consisted of a Zorbax SB-C18 column (250 × 4.8 mm, 5 µm, Agilent technologies) coupled to a C18 guard precolumn (18 × 4.5 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) maintained at 30 °C. Mobile phases A and B (1 mL/min) consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 95:5 v/v in A and 10:90 v/v in B. For BP2 and BPS, two distinct five-step gradients were developed, as detailed in our previous work (Le Fol et

al. 2015). Metabolites were quantified by integrating the area under the peaks monitored by radioactivity detection.

2.6. Enzymatic hydrolyses

Aryl-sulfatase from *Aerobacter aerogenes* (type IV, Sigma) and bovine liver β-glucuronidase (type B1, Sigma) were used to confirm the formation of sulfo- and glucurono-conjugates, respectively. Bovine liver β-glucuronidase (150 IU in 300 µL 0.2 M sodium acetate buffer, pH 5) or arylsulfatase (0.15 IU in 300 µL of 0.01 M Tris buffer, pH 7.1) were added to 100 µL of tested samples, namely: water from larvae exposure, water from adult exposure, water from controls, supernatant from larva extractions and hydrophilic phase from adult zebrafish extractions. After 3 h at 37 °C under gentle shaking, hydrolysis assays were stopped by lowering the temperature of tubes in ice. Samples were mixed to 100 µL of mobile phase A prior to radio-HPLC analysis.

2.7. Radioactivity quantification in adult zebrafish.

Radioactivity in the different liquid samples was quantified by direct counting in a Packard scintillation counter (Model Tri-Carb 2200CA; PerkinElmer) using Ultima Gold as the scintillation cocktail. For all vials, sample quenching was compensated by the use of quench curves and external standardization. Radioactivity in whole fishes was determined by complete combustion using a Packard oxidizer 306 (Perkin Elmer Life Sciences), prior to radioactivity quantification by liquid scintillation counting, as described above.

3. Results

No mortality and no signs of animal suffering were observed during the BP2 and BPS exposure experiments. All water samples and extracts of larvae, as well as adult zebrafish were analyzed by radio-HPLC for metabolic profiling, and were analyzed again after specific enzymatic hydrolysis tests for metabolite identity confirmation (control of radioactive peaks deconjugation).

3.1. Radioactivity metabolic balance

3.1.1. Exposure of zebrafish larvae to BPS and BP2.

Radioactivity recovery (exposure water + beakers' rinsing + larvae extracts), averaged 102.7 ± 1.8% (BPS) and 102.0 ± 2.4% (BP2) of the total radioactivity initially added to incubation beakers. Most of it was recovered in water samples (BPS: 100.6 ± 2.4%; BP2: 99.2 ± 3.7%). Larvae themselves contained 0.22 ± 0.06% (BPS) and 0.9 ± 0.07% (BP2) of the respective radioactive amounts initially put in beakers, at the end of the 72 h incubation. On wet weight bases, these values corresponded to 5.6 ± 1.0 µg of BPS equivalents per gram of larva, and to 22.9 ± 1.2 µg of BP2 equivalents per gram of larva. In water, percentages of radioactivity corresponded to 251.8 ± 3.0 µg of BPS per liter of water and 244.3 ± 4.5 µg of BP2 per liter of water. Thus, the apparent bioconcentration factors for BPS and BP2 were 22.0 ± 3.8 and 93.3 ± 5.0, respectively.

3.1.2. Exposure of adult zebrafish to BPS and BP2.

Radioactivity recovery (exposure water + tanks rinsing + adult extracts and extracts' pellets) averaged 100.3 ± 0.2% and 99.7 ± 0.4% of the total radioactivity added to incubation tanks for BPS and BP2, respectively. As for larvae, most of the radioactivity was recovered in water samples (99.7 ± 0.03% for BPS and 99.1 ± 0.2% for BP2). At the end of the 72 h exposure period, extracts represented 0.29 ± 0.03% (BPS) and 0.89 ± 0.20% (BP2) of the radioactivity put in tanks. On wet weight bases, these values corresponded to 0.14 ± 0.01 µg of BPS equivalents per gram of adult, and to 0.43 ± 0.1 µg of BP2 equivalents per gram of adult. The calculated concentrations of residues in water were 249.6 ± 0.1 µg of BPS per liter of water and 243.9 ± 5.4 µg of BP2 equivalents per liter of water. Apparent bioconcentration factors were 0.6 ± 0.1 for BPS and 1.7 ± 0.4 for BP2.

3.1.3. Metabolic profiling in zebrafish adults and larvae exposed to BPS

All water and extracts samples were profiled, with the exception of dichloromethane phases, for adults. Indeed, the latter fractions contained a very minor part of the radioactivity put in incubations (BPS: <0.03%; BP2: ca.0.11%). Accordingly, for adult extracts, only the aqueous phase was further analyzed.

Based on the radio-HPLC system developed for BPS in a previous work (Le Fol et al. 2015), the retention time (R_T) of parent BPS was 27.7 min (Fig 1). No degradation of BPS occurred in control incubations. In extracts from larvae and adult zebrafish, two conjugated metabolites of BPS were detected. The metabolite eluting at a R_T of 14.6 min was found to be fully hydrolyzed into BPS by □-glucuronidase, suggesting the occurrence of a BPS-glucuronide. The second metabolite, eluting at a R_T of 24.5 min, was deconjugated into BPS when incubated with sulfatase, suggesting the presence of a sulfate conjugate. No deconjugation occurred in control incubations, neither when the 14.6 min R_T metabolite was submitted to sulfatase hydrolysis, nor when the 24.5 min R_T metabolite was incubated with glucuronidase. This allowed ruling out the hypothesis of any double conjugate (sulfate+glucuronide) metabolite. Finally, the structures of BPS mono-glucuronide (R_T 14.6; BPS-monoG) and of BPS mono-sulfate (R_T of 24.5 min; BPS-monoS) were confirmed by co-elution assays with their respective authentic standards previously isolated from zebrafish hepatocyte incubations, and which structure had been confirmed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), as detailed in Le Fol et al., (2015).

In the water samples corresponding to adult and larvae assays, only the parent compound was detected (Fig 1, lower section). In extracts from larvae, 65.8 ± 5.3% of the BPS put in incubations remained unchanged at 72 h. For adults, the biotransformation of BPS was even more extensive, with only 12.1 ± 4.3% of the radioactivity recovered as parent compound in extracts by the end of the experiments (Fig 1). In both larvae and adults, BPS-monoG was the major metabolite (28.1 ± 4.8% and 78.5 ± 3.3%, respectively), while BPS-monoS was detected in lower amounts (5.72 ± 1.0% and 7.7 ± 0.7%, respectively).

3.1.4. Metabolic profiling in zebrafish adults and larvae exposed to BP2

Based on the original radio-HPLC system developed for BP2 in Le Fol et al., (2015), parent (unchanged) BP2 was eluted at R_T 42.5 min (Fig 2). As for BPS, no degradation of BP2 was observed in radio-HPLC analyses of control incubations. In adult extracts, 3 different glucuronide conjugates were identified. The metabolite eluted first (R_T: 13.8 min) was a diglucuronide of BP2 (BP2-diG), based on specific enzymatic deconjugation assays, followed by radio-HPLC co-elution with the authentic standard, which structure had previously been confirmed by LC-MS (Le Fol et al. 2015). The 2 other metabolites, eluted at R_T of 22.1 and 27.3 min, respectively, were identified as two distinct monoglucuronides (BP2-monoG1 and BP2-monoG2, respectively) based on complete deconjugation into BP2 when incubated with -glucuronidase, and on their co-elution with their respective authentic standards, previously isolated and confirmed by LC-MS experiments (Le Fol et al. 2015). The occurrence of 2 different mono-glucuronides can be explained by the presence of 2 hydroxyl groups in para and ortho position on each cycle of the BP2 molecule. The metabolite eluted at 38.1 min was characterized as a BP2 monosulfate (BP2-monoS), based on successful sulfatase hydrolysis, and confirmed by co-elution with the previously isolated and LC-MS controled metabolite. The occurrence of BP2 di-sulfate (R_T: 22.1 min) was suggested by co-elution with the authentic standard synthesized in parallel in incubations of BP2 with guinea pig cytosols, but the amounts of metabolite produced by fish did not allow a direct MS confirmation. Finally, the metabolite eluted at 32.8 min was tentatively identified as another double conjugate of BP2 (glucuronic acid + sulfate, BP2-G-S), based on enzymatic hydrolysis (deconjugation into BP2-G and BPS-S, in sulfatase and glucuronidase incubations, respectively). In larvae extracts, the same metabolites, with the exception of BP2-diG, were found to be formed (Fig 2, upper right). For BP2, all the metabolites detected and identified in adult extracts were also found to be present in water samples, with the exception of the two BP2 mono-glucuronides. Conversely, in water samples from larvae incubations, only unchanged BP2 was present (Fig 2, lower right).

3.1.5. Pattern of BP2 biotransformation in zebrafish adults and larvae

In adult zebrafish incubations, but also in larvae incubations, very low amounts of unchanged BP2 were found to be present in the aqueous phase of extracts (12.7 ± 3.7% and 4.5 ± 0.9%, respectively, Fig 3). BP2 metabolites produced in larva were mainly glucuronide conjugates (51.3 ± 2.2%). Conversely, sulfate conjugates were found to be predominant in adult extracts (63.0 ± 1.6%). However, both conjugation pathways were active in larva (28.4 ± 1.9% of BP2-sulfate and 7.4 ± 0.4% of BP2-glucurono-sulfate) as well as in adults (22.3 ± 3.7% of BP2- glucuronide and 9.7 ± 1.4 of BP2-glucurono-sulfate, Fig 3). For larva, only unchanged BP2 could be detected in water, but for adults, although water samples contained 56.2 ± 3.4% of parent BP2 by the end of the experiment, 3 metabolites, namely BP2-glucuronide (9.2 ± 1.5%), BP2-sulfate (13.6 ± 0.8%) and BP2-glucurono-sulfate (16.6 ± 0.9%) were identified as well (Fig 2 and 3).

As for both models (larvae, adults), metabolic balance results had shown that most of the radioactivity (> 99%) was located in water samples; these results in adults demonstrate that mature zebrafish extensively metabolized BP2.

4. Discussion

Zebrafish embryos represent a very promising model in the context toxicology studies, with an increasing span of utilizations ranging from the prediction of fish acute toxicity to the identification of endocrine disrupting chemicals. This model is 3-Rs compliant (up to 5 dpf) and offers high throughput screening possibilities. Notwithstanding these advantages, major knowledge gaps still remain regarding the actual metabolic capabilities expressed by zebrafish embryos and their comparison with adults, thus limiting their optimal use in the context of the assessment of chemicals toxicity.

Production of BP2 and BPS phase II metabolites by adult and larvae

In the present study, the metabolism of BP2 and BPS was thoroughly investigated in 4-dpf-old zebrafish and in adult zebrafish, using labeled molecules and radio-HPLC. Many among the chemicals produced in large volume and anticipated to be candidate EDCs feature, in their chemical structure, bear one or more hydroxyl moieties. Some of it have already been demonstrated to be present in the environment and/or the food-chain. This is true for preeminent families of man-made chemicals, including bisphenols, benzophenones, alkylphenols and parabens, as it is for single synthetic compounds (glyphosate, distylbene, oral contraceptives...) and natural estrogens (zearalenone, estradiol...). Such compounds are predominantly prone to undergo phase II (conjugative) rather than phase I (oxidative) metabolic reactions, as previously demonstrated for bisphenols (Zalko et al. 2003; Riu et al. 2011; Le Fol et al. 2015) and benzophenones (Schlecht et al. 2008; Le Fol et al. 2015) due to the presence of hydroxyl group(s) which are readily available for conjugation by phase II enzymes. Although the occurrence of phase I reactions was systematically checked, and despite limited oxidative metabolism has previously been evidenced for bisphenol A and 4-n-nonylphenol in vertebrates, including fish (Zalko et al. 2003; Cravedi et Zalko 2005), our experiments demonstrated that no oxidative pathways are involved in the metabolism of BPS and BP2 in larvae and adult zebrafish. This is fully consistent with previous studies of the metabolic fate of bisphenol F (Gibert et al. 2011) and of benzophenones in fish, in which only phase II metabolism was shown to be involved. However, our own findings do not question the functionality of phase I enzymes in zebrafish larvae, which have previously been demonstrated using chemicals such as paracetamol and hydroxybupropion, among others (Alderton et al. 2010).

Differences in the fate of BP2 and BPS in adult and larvae zebrafish models

BP2 and BPS share many chemical features, including the presence of two phenol rings, close pKa values (6.98 for BP2; 8.2 for BPS) and molecular weights (246.22 for BP2; 250.27 for BPS).

Nevertheless, our study underlined important differences in the fate of these xeno-estrogens, our data underlining significant differences between metabolic profiles as well as bio-concentration factors for the two compounds.

Adult and larvae exposure to BP2 and BPS

The use of radio-labeled compounds allowed providing unequivocal evidence for the absorption of both BP2 and BPS in zebrafish larvae as well as adults. Notably, the capability of larvae to uptake and biotransform these EDCs at early stages of development (96 hpf) was demonstrated. For BPS, metabolic balance studies showed the uptake of 0.22% (larvae) and 0.29% (adults) of the radioactivity put in water, which was very consistent with previous findings for bisphenol A (0.20% of uptake at 24 h) when using zebrafish larvae with a similar study design (Gibert et al. 2011). For BP2, the global uptake of radioactivity was higher in larvae (0.90%) than in adults (0.57%). However, for both molecules the corresponding levels of BPS and BP2 in fish, including metabolites were markedly higher in larvae compared to adults, given the much lower biomass of fish used in larvae experiments and identical concentrations (1 µM) in all bioassays. The concentration of residues in fish bodies were about 40 folds higher in larvae (5.6 µg/g) than in adults (0.14 µg/g) for BPS, and above 50 times higher for BP2 (22.9 µg/g and 0.43 µg/g, respectively, in larvae and adults). These results clearly emphasize the tight interaction between fish and their environment, as regards the uptake and exposure to EDCs, with uptake capabilities that start soon after hatching, even at non-feeding stages of development. In zebrafish larvae, contrary to adults, pathways allowing the uptake of chemicals from water are not yet fully functional. While gills constitute an important pathway of exchange and of detoxification in adults, they are not yet functional in 96 hpf larva. Zebrafish larvae possess a hollow intestine tube with an open mouth only by 74-76 hpf (Ng et al. 2005), but it seems that no chemical uptake from the digestive tract occurs before 120 hpf (Strahle et al. 2012). At theses stages of development, a passive diffusion from media into larvae represents the main chemical uptake pathway described so far (Diekmann et Hill 2013; Kais et al. 2013).

Differences in BP2 and BPS metabolic fate in adult and larvae

Our study highlighted marked differences in the metabolic fate of BPS and BP2 despite their chemical similarities. For larvae, total body burden was lower for BPS (5.6 µg/g of BPS equivalents, wet weight) than for BP2 (22.9 µg/g of BP2 equivalents, wet weight). The adjusted concentration factors (radioactivity in larvae/radioactivity in water) for BPS and BP2 were 22.0 ± 3.8 and 93.3 ± 5.0, respectively, these figures being quite close to the body burden values due to the use of 1 µM concentrations. For BPS experiments, the concentration factor (22) was in the same order of magnitude as previously established for BPA (27) and BPF (11) in a developmental toxicology study in which zebrafish larvae were exposed at a concentration of 50 µM (Gibert et al. 2011). Qualitatively, while water samples from larvae experiments only contained the parent compounds, radio-HPLC profiling of larvae extracts demonstrated a more extensive metabolism of BP2 (87.3 ± 3.7% of extracts recovered as conjugates) than of BPS (34.2 ± 5.3%) after 72 h of exposure. This mainly relied on

higher glucuronidation and sulfation conversion rates for BP2, and on the occurrence of a minor double conjugate of BP2, none of which was found to be excreted back into water. For this reason, when considering solely the respective parent compound's concentration in larvae extracts, closer figures were calculated for BPS and BP2 (14.7 ± 2.6 and 11.8 ± 0.6 nmol/g ww, respectively). Interestingly, a significantly higher rate of metabolic conversion of BP2, compared to BPS, was also previously observed in the zebrafish exposed hepatic cell lines ZFL and ZELH-zfERs (Le Fol et al. 2015). Likely enough, the higher Log P of BP2 (3.16, based on the American Chemical Society, 2007, calculated properties) compared to BPS (1.65 based on US EPA Estimation Program Interface (EPI) Suite; 1.9 based on XLogP3 from PubChem), may explain an easier uptake and bioavailability of BP2.
In adult zebrafish, BPS and BP2 uptake was slightly the same but marked qualitative differences were noticed between the two compounds. Glucuronidation was a major pathway for BPS, with more than 78.5 ± 3.3% of the absorbed BPS converted into BPS-glucuronide. Sulfation (7.7 ± 0.7%) was a less preeminent pathway, and 12.1 ± 4.3% of BPS was recovered as the parent molecule. Conversely, sulfation largely predominated over glucuronidation for BP2 in adults, with 63 ± 1.6% of the radioactivity recovered as BP2-monoS in extracts, and the formation of a double conjugate (glucuronide + sulfate). The latter double conjugation pathway was not detected in the case of BPS, despite this molecule also bears 2 hydroxyl moieties. Unchanged BP2 in adult extracts accounted for only 4.5 ± 0.9%. Glucuronidation, although fairly expressed in adult zebrafish (with a conversion of 22.3 ± 3.8% of parent BP2) was not in this case the predominant pathway of biotransformation, contrary to BP2/larvae experiments and to BPS experiments (larvae as well as adults).

Different xenobiotic metabolizing enzymes potentially involved in adult and larvae zebrafish models

Despite the chemical similarities of BP2 and BPS, comparison of their metabolic patterns suggests the involvement of different sulfotransferases (SULT) and glucuronidases (UGT) in their respective biotransformation. Zebrafish UGTs 1A1, 1A7 and 1B1, and in particular UGT1A1 in the case of BPA, have been shown to be the major isoforms involved in the conjugation of phenolic and carboxylic compounds in HEK293T modified cells (Wang et al. 2014), and SULTs are known to participate in the metabolism of both endogenous and exogenous substrates. BPA sulfation in zebrafish has been shown to involve three SULTs from two families, namely SULT1 ST5, SULT 3 ST1 and SULT3 ST3 (Liu et al. 2010; Kurogi et al. 2013). Although no direct analogy can be made with BPS, it was previously shown that the mRNA of SULT1 ST5 is weakly expressed from 0 to 72 hpf in zebrafish, whereas the mRNA of SULT3 ST1 is much better expressed at this developmental stage (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008). Temporal changes in genes expression encoding for XME could also explain, at least partly, the differences in BP2 and BPS metabolic patterns observed between larvae and adults. For SULTs, at 72 hpf, the mRNA of SULT1 ST1, SULT2 ST2, ST3, and SULT3 ST1, ST2 are strongly expressed. Conversely, at 3 months of age,

the mRNA of SULT1 ST3, ST4 and SULT3 ST1, ST2 are the most strongly expressed (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008).

BP2, a more readily metabolized compound than BPS in adult and larvae zebrafish models

Remarkably, BP2 was more extensively metabolized into sulfo-conjugates compound than was BPS, particularly in adult zebrafish. This latter observation is consistent with the results already established with zebrafish cell lines (hepatocytes in primo-culture, ZFL and ZELH-zfERs cell lines) and with human cell lines (HepaRG, HepG2, MELN and T47D-KBLUC) (Le Fol et al. 2015) suggesting that BP2 may be more readily sulfated than BPS. In addition, sulfotransferases activities specifically expressed in gills may well explain the more extensive production of BP2 sulfo-conjugated metabolites in adult zebrafish, compared to BPS. For the latter molecule, no metabolites were found in water. The overall proportion of BPS converted into metabolites was solely related to the metabolites found in the adult extracts (i.e. 0.3 ± 0.03% of the total radioactivity). The fate of BP2 was totally different, since all BP2 metabolites (except BP2 mono-glucuronides) were found in adult extracts as well as in water, in which they accounted for nearly 40% of the radioactivity. Consequently, despite structural similarities, BP2 was much more metabolized than BPS in adult zebrafish.

Implication of these data for toxicity and estrogenic activity testing in the zebrafish embryo model.

In addition to provide relevant and novel information regarding the metabolism of BP2 and BPS, this study, allowed to better characterize the life-stage dependant metabolic capacity of zebrafish. This aspect is critical since zebrafish embryo is now considered as an alternative model to adult experiments for toxicity testing (Strahle et al. 2012; Busquet et al. 2014) as well as estrogenic activity (Brion et al. 2012). Differences in uptake, metabolism and toxicokinetics of xenobiotics between embryos and adults have been often hypothesized to explain the life-stage dependant toxicity or estrogenic activity of tested compounds, but have seldom been addressed experimentally (Massei et al. 2015); Cosnefroy et al., *in prep*; Le Fol et al., *in prep*) While the uptake was low whatever the molecule and the life stage of development, marked differences in the concentration of residues in fish bodies were noticed with 40- and 50-fold higher concentrations of radioactivity per g of fish in larvae as compared to adults for BP2 and BPS, respectively. Based on this data, higher estrogenic activity of BP2 and BPS should be expected to be measured in zebrafish embryo assays, compared to adults. Recent experiments have revealed, in contrast, that effective concentrations (ECx) for the up-regulation of ER-regulated genes in larvae (brain aromatase B) and adult (hepatic vitellogenin) are much higher in zebrafish embryos than in adults for both compounds (Cosnefroy et al., *in prep*; Le Fol et al., *in prep*). It is likely that the toxicodynamics and toxicokinetics of the parent compounds may account for such differences. In this regards, development of physiologically based toxicokinetic (PBTK) models describing the uptake, metabolism and disposition of organic chemicals in zebrafish embryo and adult should help to predict the effect of chemicals at various life-stage of development

(Pery et al. 2014). An important outcome of our study relies on the fact that they demonstrate the metabolic competence of the zebrafish embryo model, with extensive phase II metabolization capabilities, and qualitatively similar sulfo- and glucurono-conjugated pathways for BPS as well as BP2, in embryos and adults. The ratio between sulfo- and glucurono-conjugation was clearly dependent upon the developmental life-stage (larvae *vs.* adult), reflecting the fact that phase II metabolic pathways could be differently activated in adult and larvae. Notwithstanding, in none of zebrafish models were phase I metabolites observed. This contrasts with sub-cellular models such as microsomes, which favor (in classical conditions of use) the formation of Phase I metabolites, but are not necessarily representative of in vivo models. The comparative analysis of the metabolic profile between zebrafish models for BP2 and BPS thus further support the use zebrafish embryo as a relevant alternative and integrative system in which toxicity and estrogenic activity can be assessed while still taking into account absorption and active metabolism of the tested substances.

References

Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Richards, F., Gardner, I., 2010. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. Xenobiotica 40, 547-557.

Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, N.D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovic, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.L., Watanabe, K.H., 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. Aquat Toxicol 92, 168-178.

Arnot, J.A., Mackay, D., Parkerton, T.E., Bonnell, M., 2008. A database of fish biotransformation rates for organic chemicals. Environ Toxicol Chem 27, 2263-2270.

Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. PLoS One 7, e36069.

Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Carr, G.J., Cenijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hubler, N., Kleensang, A., Knobel, M., Kussatz, C., Legler, J., Lillicrap, A., Martinez-Jeronimo, F., Polleichtner, C., Rzodeczko, H., Salinas, E., Schneider, K.E., Scholz, S., van den Brandhof, E.J., van der Ven, L.T., Walter-Rohde, S., Weigt, S., Witters, H., Halder, M., 2014. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. Regul. Toxicol. Pharmacol. 69, 496-511.

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.

Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J.M., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2009. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. Toxicol. In Vitro 23, 1450-1454.

Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. Toxicol. Sci. 125, 439-449.

Cravedi, J.P., 2002. Role of biotransformation in the fate and toxicity of chemicals : consequences for the assessment of residues in fish. Rev Med Vet 153, 419-424.

Cravedi, J.P., Zalko, D., 2005. Metabolic fate of nonylphenols and related phenolic compounds in fish, in: Moon, T.P.M.a.T.W. (Ed.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, pp. 153-169.

Diekmann, H., Hill, A., 2013. ADMETox in zebrafish. Drug Discovery Today: Disease Models 10, e31-e35.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Leonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. Aquat Toxicol 97, 79-87.

Gibert, Y., Sassi-Messai, S., Fini, J.B., Bernard, L., Zalko, D., Cravedi, J.P., Balaguer, P., Andersson-Lendahl, M., Demeneix, B., Laudet, V., 2011. Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. BMC Dev Biol 11.

Halder, M., Leonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T., Lillicrap, A., 2010. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. Integr Environ Assess Manag 6, 484-491.

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 disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. Toxicol Sci 105, 235-259.

Hsieh, M.H., Grantham, E.C., Liu, B., Macapagal, R., Willingham, E., Baskin, L.S., 2007. In utero exposure to benzophenone-2 causes hypospadias through an estrogen receptor dependent mechanism. J. Urol. 178, 1637-1642.

Jacobs, M.N., Laws, S.C., Willett, K., Schmieder, P., Odum, J., Bovee, T.F., 2013. In vitro metabolism and bioavailability tests for endocrine active substances: what is needed next for regulatory purposes? ALTEX 30, 331-351.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K., 2013. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ. Sci. Technol. 47, 8793-8800.

Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (Danio rerio) chorion-implications for the fish embryo test (FET). Aquat Toxicol 140-141, 229-238.

Kurogi, K., Liu, T.A., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.C., 2013. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. Drug. Metab. Rev. 45, 431-440.

Le Fol, V., Ait-Aissa, 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.

Liu, T.A., Bhuiyan, S., Liu, M.Y., Sugahara, T., Sakakibara, Y., Suiko, M., Yasuda, S., Kakuta, Y., Kimura, M., Williams, F.E., Liu, M.C., 2010. Zebrafish as a model for the study of the phase II cytosolic sulfotransferases. Curr Drug Metab 11, 538-546.

Massei, R., Vogs, C., Renner, P., Altenburger, R., Scholz, S., 2015. Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (Danio rerio): The role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. Aquat Toxicol 166, 36-41.

Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J.M., Real, M., Fernandez, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. Toxicol. Appl. Pharmacol. 272, 127-136.

Molina-Molina, J.M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Aissa, S., Balaguer, P., 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. Toxicol. Appl. Pharmacol. 232, 384-395.

Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquat. Toxicol. 148, 195-203.

Ng, A.N., de Jong-Curtain, T.A., Mawdsley, D.J., White, S.J., Shin, J., Appel, B., Dong, P.D., Stainier, D.Y., Heath, J.K., 2005. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. Dev. Biol. 286, 114-135.

Pery, A.R., Devillers, J., Brochot, C., Mombelli, E., Palluel, O., Piccini, B., Brion, F., Beaudouin, R., 2014. A physiologically based toxicokinetic model for the zebrafish Danio rerio. Environ Sci Technol 48, 781-790.

Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., Balaguer, P., Zalko, D., 2011. Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. Toxicol Sci 122, 372-382.

Schlecht, C., Klammer, H., Frauendorf, H., Wuttke, W., Jarry, H., 2008. Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. Toxicology 245, 11-17.

Segner, H., 2009. Zebrafish (Danio rerio) as a model organism for investigating endocrine disruption. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 149, 187-195.

Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod Toxicol 33, 128-132.

Wang, Y., Huang, H., Wu, Q., 2014. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. Mol. Pharmacol. 86, 62-75.

Weisbrod, C.J., Kunz, P.Y., Zenker, A.K., Fent, K., 2007. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. Toxicol. Appl. Pharmacol. 225, 255-266.

Yasuda, S., Kumar, A.P., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Chen, L., Liu, M.C., 2005a. Identification of a novel thyroid hormone-sulfating cytosolic sulfotransferase, SULT1 ST5, from zebrafish. FEBS J 272, 3828-3837.

Yasuda, S., Liu, C.C., Takahashi, S., Suiko, M., Chen, L., Snow, R., Liu, M.C., 2005b. Identification of a novel estrogen-sulfating cytosolic SULT from zebrafish: molecular cloning, expression, characterization, and ontogeny study. Biochem. Biophys. Res. Commun. 330, 219-225.

Yasuda, S., Liu, M.Y., Yang, Y.S., Snow, R., Takahashi, S., Liu, M.C., 2006. Identification of novel hydroxysteroid-sulfating cytosolic SULTs, SULT2 ST2 and SULT2 ST3, from zebrafish: cloning, expression, characterization, and developmental expression. Arch. Biochem. Biophys. 455, 1-9.

Yasuda, T., Yasuda, S., Williams, F.E., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Bhuiyan, S., Snow, R., Carter, G., Liu, M.C., 2008. Characterization and ontogenic study of novel steroid-sulfating SULT3 sulfotransferases from zebrafish. Mol. Cell. Endocrinol. 294, 29-36.

Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., Cravedi, J.P., 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. Environ. Health. Perspect. 111, 309-319.

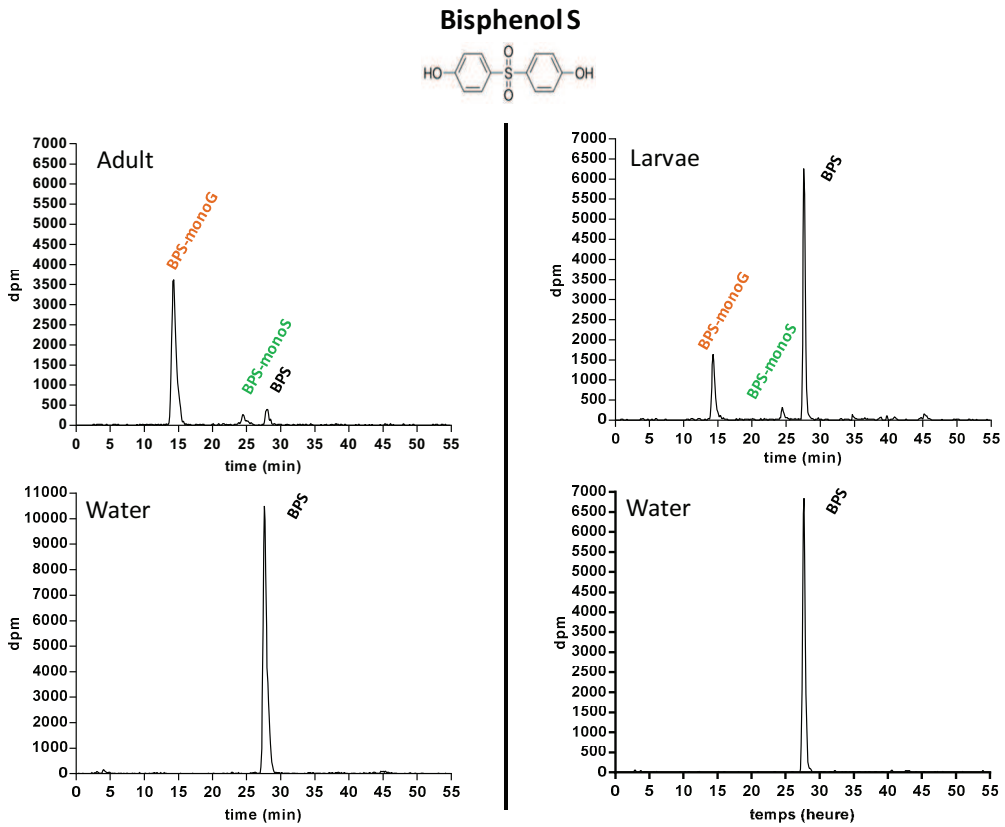


Figure 1. Typical radio-HPLC metabolic profiles obtained following the analysis of fish extracts and incubation water samples, after a 72 h incubation of 1 µM [^{3}H-BPS] with adult or larvae zebrafish.

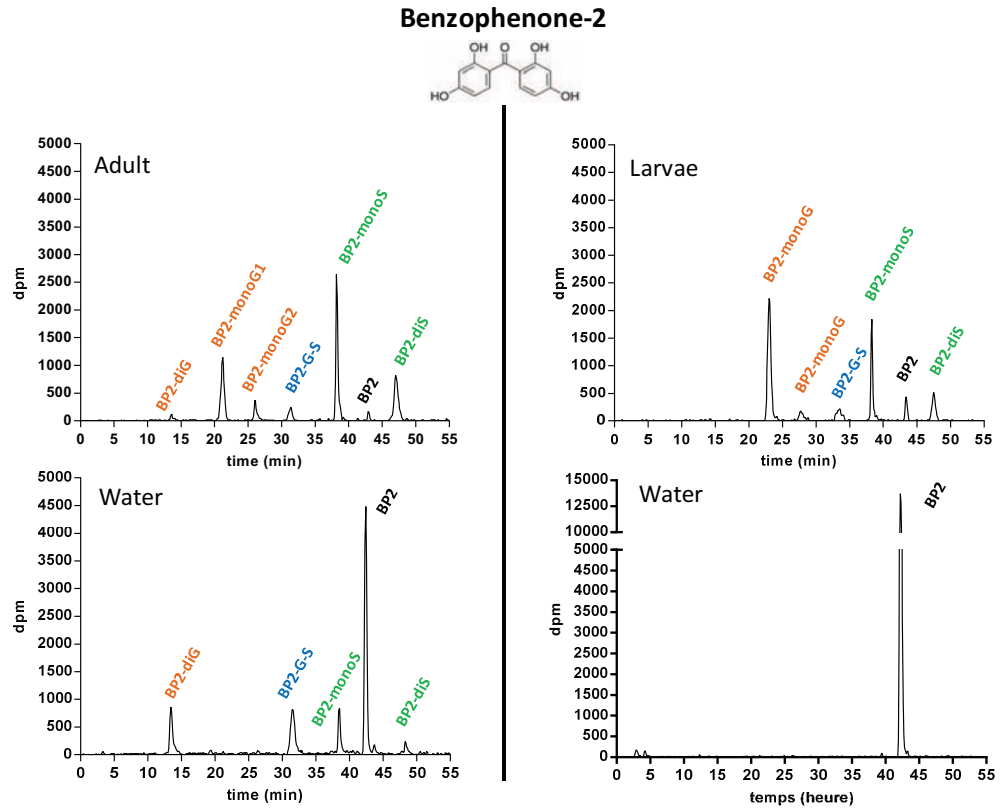


Figure 2. Typical radio-HPLC metabolic profiles obtained following the analysis of fish extracts and incubation water samples, after a 72 h incubation of 1 µM [^{3}H-BP2] with adult or larvae zebrafish.

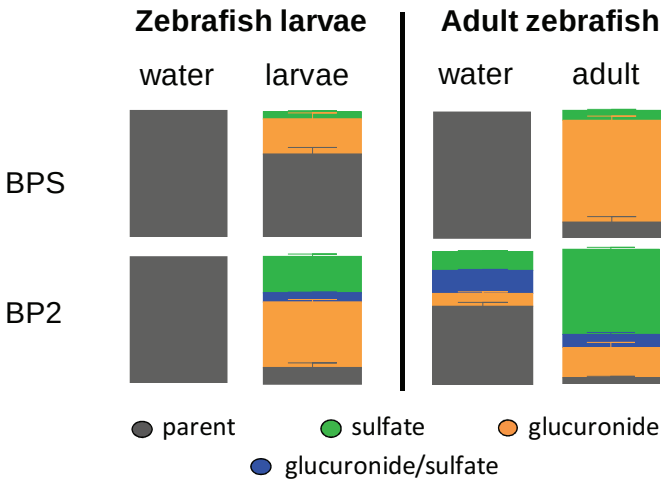


Figure 3. Metabolic balance of ^{3}H-BPS and ^{3}H-BP2 in larvae and adult zebrafish: respective proportions of parent molecules and their metabolites in water and animals samples at 72 h.

VI. Synthèse des résultats

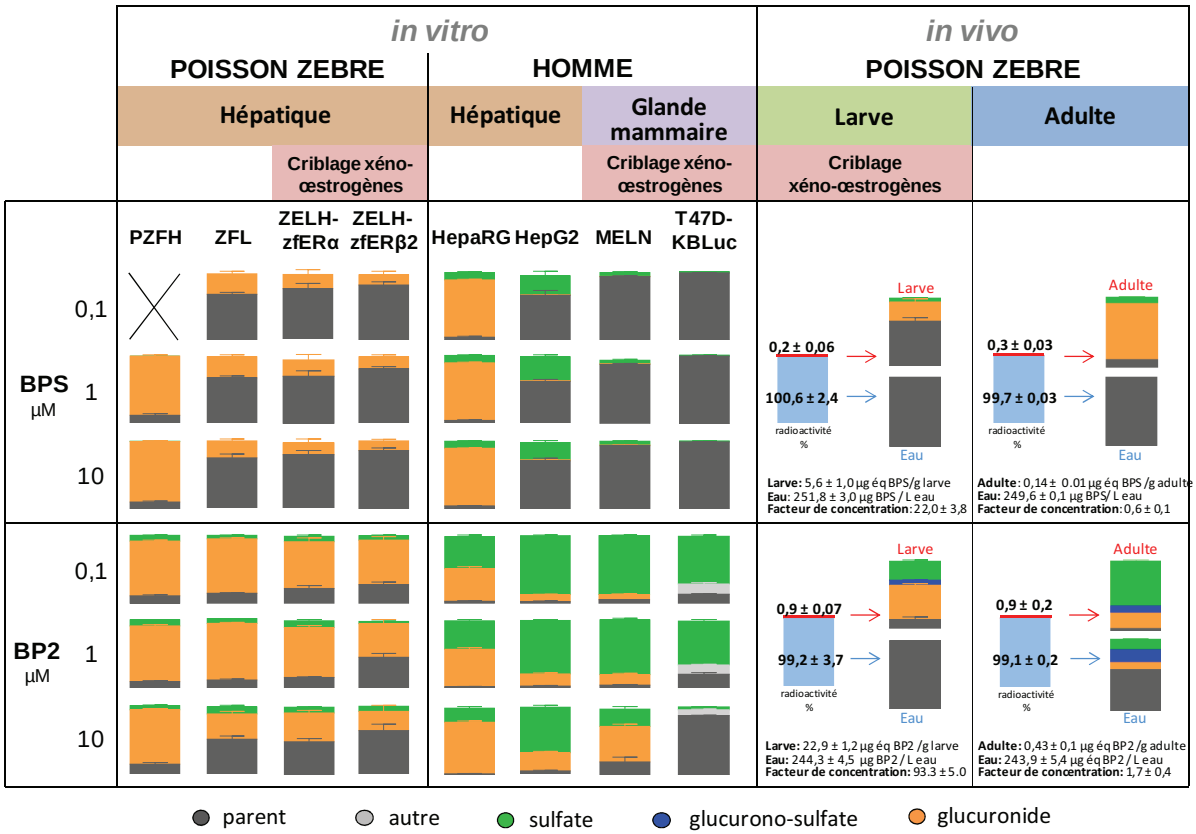
Les tableaux suivants reprennent les principaux résultats obtenus concernant la réponse œstrogénique des différents modèles abordés, et le métabolisme des composés d'intérêt dans les différents modèles du poisson zèbre, ainsi que dans certains modèles cellulaires humains.

Tableau 28. Bilan des réponses œstrogéniques obtenues après exposition des différents modèles du poisson zèbre à la benzophénone-2 (BP2) et aux bisphénols (BPA, BPS et BPF)

	ZELH-zfERs			PZFH	Larve		Adulte		
	zfER	zfER 1	zfER 2	Vtg (milieu de culture)	Transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay)	Sauvage cyp19a1b (ARNm)	Vtg plasmatique	vtg1 | vtg2 (ARNm foie)	
BP2	++	+	++	++	faiblement +	0 (à 10 µM)	+	0	+
BPA	++	+	+	n.e.	+	n.e.	n.e.	n.e.	
BPS	+	++	+	n.e.	faiblement +	n.e.	n.e.	n.e.	
BPF	+	+	++	+	++	n.e.	++	n.e.	

n.e. non évalué

Tableau 29. Bilan des biotransformations de la BP2 et du BPS dans les modèles poissons zèbres et humains



Discussion générale

La contamination de l'environnement par des composés chimiques n'a cessé d'augmenter depuis le début de l'ère industrielle, en parallèle de l'usage croissant de molécules issues de la synthèse organique et destinées à des usages variés (plastifiants, pesticides, ignifugeants, cosmétiques, médicaments…). Depuis une vingtaine d'années, il est graduellement apparu que nombre de ces contaminants sont des perturbateurs endocriniens (PE), avec en particulier (au moins pour les molécules dont l'activité a été caractérisée) une forte proportion de composés dotés de propriétés œstrogéniques (« xéno-œstrogènes »). De nombreuses espèces animales et notamment les espèces aquatiques sont fortement exposées à ces PE, dont il a été montré qu'ils pouvaient être à l'origine d'altérations et de perturbations du système hormonal (Colborn et al. 1993; Ankley et al. 2009). Des données épidémiologiques et expérimentales obtenues chez les mammifères soulignent également les effets potentiellement néfastes de ces composés chimiques pour l'Homme (Vandenberg et al. 2012). Il est donc indispensable de parvenir à évaluer avec précision le risque associé à ces contaminants, pour pouvoir caractériser le danger environnemental et sanitaire qui leur est associé. Or, les PE soulèvent de nouveaux paradigmes en toxicologie, comme l'illustre notamment la controverse sur les effets des xéno-œstrogènes (DES, Bisphénol A…) à de faibles doses/concentrations. En parallèle, la mise en place de la réglementation REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques) impose de nouvelles approches expérimentales, dans un contexte scientifique et sociétal promouvant le développement de stratégies expérimentales alternatives à celles utilisant un grand nombre d'animaux, compatibles avec la règle des 3R (Reduce, Refine, Replace). Dans l'objectif d'évaluer l'innocuité des produits chimiques de manière standardisée, l'OCDE a mis en place des lignes directrices qui regroupent l'ensemble des méthodes d'essai pertinentes et validées internationalement.

Le poisson zèbre, fort de ses avantages tant sur le plan biologique que zootechnique, a connu et continue à connaitre un essor important en tant que modèle biologique en toxicologie environnementale. La reconnaissance de ce modèle de poisson pour l'évaluation de l'activité des PE et de leurs mécanismes d'action (Segner 2009) a conduit à son utilisation dans des tests validés par l'OCDE tels que les essais numéro 229 (essai à court terme de reproduction des poissons), numéro 230 (essai de 21 jours sur les poissons : essai de dépistage à court terme de l'activité œstrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase) et numéro 234 (essai de développement sexuel des poissons). Toutefois ces tests concernent des durées d'exposition longues (21 et 60 jours). Or, les exigences toujours plus élevées en termes de capacité de criblage et de coût, poussent actuellement au développement de nouveaux tests biologiques, mieux adaptés à ce type de contrainte. Avant tout, ces systèmes doivent permettre une évaluation aussi précise et juste que possible des molécules testées, en termes de spécificité, de sensibilité et de pertinence biologique (tant au niveau de l'expression des cibles moléculaires que du devenir des composés testés : absorption, métabolisme).

Dans le prolongement logique des tests déjà validés, plusieurs équipes ont donc commencé à développer des modèles cellulaires spécifiques du poisson zèbre, ainsi que des modèles de criblage à court terme (***i.e.*** de l'ordre de quelques jours), avec comme objectif l'évaluation de l'activité des PE œstrogéniques. L'INERIS (institut national impliqué dans l'évaluation et la prévention des risques accidentels ou chroniques pour l'homme et l'environnement liés, notamment, aux substances chimiques), en particulier, a développé chez le poisson zèbre les lignées cellulaires ZELH-zfERs et la larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay). Les modèles de lignées cellulaires ZELH-zfERs reposent sur le principe du gène rapporteur (ERE-Luc) et sur la transfection de l'un des trois sous-types d'ER du poisson zèbre (zfER , zfER 1, zfER 2). Le modèle de larve transgénique repose sur l'expression de la GFP placée sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b*, œstrogéno-régulé et exprimé dans les cellules gliales radiaires. Il est important de noter que le contexte cellulaire associé à la mise en évidence de l'activité œstrogénique des PE est hépatique dans le cas des lignées cellulaires, et cérébral dans le cas de la larve transgénique. Ces modèles représentent un ensemble permettant d'évaluer l'activité œstrogénique des PE dans le cadre d'une stratégie globale combinant des tests *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, un autre point crucial est le fait que le modèle larvaire du poisson zèbre utilisé en expérimentation à un stade de développement inférieur à 5 jours après fécondation (période durant laquelle la larve se nourrit à partir du sac vitellin) est réglementairement considéré comme un modèle *in vitro* et donc alternatif aux modèles *in vivo* (UE 2010). Ceci constitue aujourd'hui un avantage très important, pourvu qu'il soit démontré que le modèle larvaire est capable de rendre compte de l'activité de la molécule testée, et donc qu'il soit suffisamment pertinent en termes d'absorption, de distribution et de prise en charge métabolique des xénobiotiques.

Les avantages des modèles *in vivo* sont nombreux, quel que soit leur statut réglementaire. Néanmoins, la caractérisation des paramètres pharmacocinétiques (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) propres à ces modèles constitue un élément clef en vue de leur utilisation. Il est aujourd'hui reconnu que le métabolisme des xénobiotiques détermine en grande partie la fraction active du produit chimique testé pouvant atteindre ses cibles cellulaires et moléculaires. Ce paramètre est susceptible d'influencer la réponse biologique mesurée dans ces modèles biologiques, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Jacobs et al. 2013). Plus généralement, comme pour bien des modèles biologiques utilisés en toxicologie, la fonctionnalité des enzymes de biotransformation est souvent déterminante quant au devenir métabolique des molécules d'essai. Les capacités métaboliques des systèmes d'essai sont souvent méconnues ou absentes dans les dossiers toxicologiques, alors que les métabolites formés peuvent être dotés d'une activité biologique différente de celle du composé parent. Pour ces raisons, la complémentarité entre tests *in vivo* et *in vitro* basés sur le modèle du poisson zèbre doit répondre aux exigences réglementaires du criblage, mais aussi à une caractérisation en termes de devenir des xénobiotiques testés : capacités globales de biotransformation, métabolisme comparé *in vivo*/*in vitro*, pertinence des modèles au regard des modèles humains (métabolisme comparé inter-espèce, *in vitro*).

Mon travail de thèse s'inscrit donc dans une démarche intégrée de caractérisation des modèles de poisson zèbre destinés à être validés dans le cadre du criblage des xéno-œstrogènes (lignées cellulaires, larve et poisson adulte). Il est centré sur l'évaluation détaillée de la capacité de ces modèles à rendre compte le plus fidèlement possible de l'effet œstrogénique mesuré, en prenant en considération les déterminants métaboliques propres à ces systèmes (capacités de biotransformation). Plus précisément, ce travail a consisté, d'une part, en l'étude du potentiel œstrogénique de contaminants environnementaux émergeants ou de référence (bisphénol A, bisphénol S, bisphénol F et benzophénone-2) à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre et, d'autre part, en l'étude du métabolisme de ces contaminants dans les différents systèmes d'essai *in vivo* et *in vitro* de poisson zèbre, complétée par une étude de métabolisme comparée avec des modèles cellulaires d'origine humaine.

Dans un premier temps, j'ai pris appui sur les travaux précédents de l'INERIS, portant sur le développement des modèles cellulaires ZELH-zfERs et larvaire (EASZY assay) comprenant la capacité à mettre en évidence l'activité œstrogénique de substances chimiques dont, des dérivés de la benzophénone (Brion et al. 2012; Cosnefroy et al. 2012). Un travail complémentaire à ces études a été mis en place pour poursuivre la caractérisation de l'activité œstrogénique de la BP2 chez larve de poisson zèbre (**article 1 et complément**). L'étude de l'activité œstrogénique des bisphénols A, F et S a ensuite été réalisée dans les modèles *in vitro* et *in vivo* du poisson zèbre (**article 2**). Après avoir mis en place le modèle de culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre (PZFH), le potentiel œstrogénique des xénobiotiques modèles a été évalué afin de s'assurer de la capacité des cellules PZFH à rendre compte de l'activité œstrogénique propre aux composés testés (**résultats chapitre III**). Les cultures primaires étant des modèles exprimant presque toujours de meilleures capacités enzymatiques que les lignées cellulaires correspondantes, quant au métabolisme des xénobiotiques, et ce aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif, ces cultures primaires ont été utilisées comme une référence pour nos études *in vitro*, et comme un modèle « intermédiaire » entre lignées cellulaires et approches *in vivo*, en termes de capacités de biotransformation. Dans le prolongement de ce travail, le devenir de la BP2 et celui du BPS radiomarqués (^{3}H-BP2 et ^{3}H-BPS) ont été explorés dans les modèles cellulaires PZFH, ZFL et ZELH-zfERs du poisson zèbre, ainsi que dans des lignées cellulaires humaines hépatiques (HepG2, HepaRG) ou issues des glandes mammaires, ces dernières (MELN, T47D-KBLuc) étant utilisées régulièrement dans l'évaluation du potentiel œstrogénique des xénobiotiques (**article 3**). Enfin, l'exploration du devenir de la BP2 et du BPS radiomarqués a été complétée par une étude « *in vivo* » réalisée chez le poisson zèbre aux stades larvaires et adultes (**article 4**). Après exposition des différents modèles biologiques à la ^{3}H-BP2 et au ^{3}H-BPS, et suite à une étape de développement analytique, les profils métaboliques ont été étudiés par radio-CLHP. L'identification des métabolites a été menée à bien à l'aide d'outils de biochimie et de Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR).

1- Différentiel de réponse œstrogénique pour le BPS et la BP2 chez le poisson zèbre

Le BPS, un bisphénol alternatif au BPA, et les benzophénones, des filtres UV aux multiples usages, sont des molécules qui soulèvent de nombreux questionnements quant à leurs effets de PE, compte tenu de leurs tonnages de production conséquents. La capacité des lignées cellulaires ZELH-zfERs à rendre compte de l'activité œstrogénique de contaminants anthropogéniques connus pour leur activité a été le point départ de mes études. Un premier travail avait été mené à son terme par l'INERIS sur les lignées ZELH-zfERs au tout début de ma thèse. Dans ce cadre, l'INERIS s'est intéressée à un panel large de composés chimiques (pesticides, phyto-œstrogènes, benzophénones notamment) (Cosnefroy et al. 2012). Une seconde étude à laquelle j'ai été associé a davantage été centrée sur une famille de contaminants environnementaux et alimentaires « émergente » : les benzophénones (**article 1**). Dans le cas du modèle EASZY assay (larves transgéniques de poisson zèbre), la sensibilité du gène *cyp19a1b* aux composés œstrogéniques dans un contexte de cellules gliales radiaires a été démontrée avec l'utilisation de substances appartenant à différentes classes chimiques, utilisées seules ou en association (Brion et al. 2012; Petersen et al. 2013) (**article 1**).

Dans la majorité des cas, l'activité œstrogénique mesurée s'est révélée cohérente pour les essais réalisés avec les modèles cellulaires et larvaires, comme l'illustrent les résultats obtenus pour l'éthynilestradiol (EE2), la 17 -œstradiol (E2), le diéthylstilbestrol (DES), l'hexestrol (HEX), la génistéine (Gen), le bisphénol A (BPA), l' -zéaralanol (-Zea), l' -zéaralénol (-Zee), le -zéaralenol (-Zee), le 4-tert-octylphénol (4tOP) et la tétrahydroxybenzophénone (THB), notamment, soit un panel assez complet des principaux modèles de xéno-œstrogènes synthétiques ou naturels. Il en a été de même pour le Bisphénol F (BPF), un autre substitut avéré du BPA, testé sur les modèles biologiques cellulaires ZELH-zfERs et larvaire EASZY assay (**article 2**).

Toutefois, pour certains composés, des différentiels d'activité œstrogénique ont été observées lors de l'utilisation des modèles cellulaires et larvaires. Cela a été le cas en particulier pour la benzophénone-3 (BP3), la benzophénone-2 (BP2) (**article 1**) et le bisphénol S (BPS, **article 2**). Pour la BP3, la littérature rapporte une activité œstrogénique plus ou moins importante selon le test *in vitro* utilisé, (Nakagawa et Suzuki 2002; Schlumpf et al. 2004; Schreurs et al. 2005; Suzuki et al. 2005; Molina-Molina et al. 2008). Dans nos études basées sur des modèles de poisson zèbre, l'activité œstrogénique de la BP3 a été détectée dans le modèle larvaire mais pas dans les modèles cellulaires ZELH-zfERs (**article 1**). Pour le BPS et la BP2, alors que les lignées cellulaires ZELH-zfERs ont détecté une activité œstrogénique à des concentrations « classiques » (de l'ordre de 1 µM), seules des concentrations élevées (30 et 60 µM) sont parvenues à déclencher une induction significative de la GFP chez la larve transgénique *cyp19a1b*-GFP (EASZY assay) (**articles 1 et 2**). Plusieurs travaux ont bien rapporté l'activité œstrogénique de ces composés dans des modèles *in vitro* (Kitamura et al. 2005; Kunz et al. 2006; Molina-Molina et al. 2008) et *in vivo* (Yamasaki et al. 2003; Hsieh et al. 2007; Weisbrod et al. 2007; Ji et al. 2013; Naderi et al. 2014). Pour le BPS, nos résultats sont cohérents avec

ceux obtenus par d'autres auteurs sur la base de tests réalisés avec des cellules MELN, rapportant un faible potentiel œstrogénique du BPS, comparé au BPA et au BPF (Molina-Molina et al. 2013). Nos études indiquent donc que le BPS et la BP2 sont capables d'induire l'expression de gènes œstrogéno-régulés de ces modèles du poisson zèbre (le gène *cyp19a1b* dans le cas du modèle larvaire et le gène rapporteur luciférase placé sous l'ERE dans les modèles cellulaires ZELH-zfERs) que ce soit dans un contexte hépatique (modèle ZELH-zfERs) ou glial (modèle larve transgénique). Toutefois, leur potentiel œstrogénique, notamment à de faibles concentrations, n'a été décelé dans nos études qu'avec les modèles cellulaires ZELH-zfERs. Pour le modèle larvaire EASZY assay, cette contradiction apparente pourrait être imputée à un manque de sensibilité du modèle. Cette hypothèse est peu probable, compte tenu des similitudes de réponse observées pour les autres PE testés. Une autre hypothèse est que le devenir métabolique de certains bisphénols et/ou benzophénones soit différent dans les deux modèles, expliquant la différence de résultats. En résumé, pour la BP2 et le BPS, les concentrations utilisées dans les modèles cellulaires ZELH-zfERs et dans le modèle poisson adulte, sont responsables d'une activité œstrogénique, mais ne le sont pas dans le modèle de larve transgénique. Il y a donc un différentiel d'activité œstrogénique mesurée entre ces modèles du poisson zèbre pour des concentrations similaires en BP2 et BPS. Ces résultats ne sont pas si surprenants. L'équipe Métabolisme des Xénobiotiques de l'INRA, qui travaille sur le devenir métabolique des contaminants chimiques et qui a encadré mon travail en lien avec l'INERIS, a souvent démontré le rôle de la biotransformation dans la modulation des effets des xénobiotiques (détoxification ou bioactivation) (Zalko et al. 1997; Zalko et al. 2003; Jaeg et al. 2004; Cabaton et al. 2006; Molina-Molina et al. 2006; Bursztyka et al. 2008; Cabaton et al. 2008; Hillenweck et al. 2008; Dyer et al. 2009; Fini et al. 2009; Riu et al. 2011; Fini et al. 2012). Dans le cas des modèles poisson zèbre, comme pour d'autres modèles destinés à être validés, les toxicologues s'accordent sur le besoin de caractériser les capacités métaboliques des systèmes biologiques utilisés, et ont pour souci que ces systèmes reflètent autant que possible le devenir *in vivo* des molécules d'essai.

2- Complémentarité des modèles en termes de capacités de biotransformation

L'axe développé dans ce travail qui a consisté en l'étude du devenir de la BP2 et du BPS dans ces modèles du poisson zèbre, avait donc pour objectif (1) d'apporter des éléments permettant d'appréhender le différentiel d'activité œstrogénique observé et, (2) de contribuer à la caractérisation des capacités de biotransformation des ces modèles biologiques. Or, les informations relatives au métabolisme des xénobiotiques dans des modèles utilisés à des fins toxicologiques sont très souvent manquantes ou parcellaires. La caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques a fait et continue à faire l'objet de travaux de réflexion et de recommandations à l'OCDE afin de mieux intégrer ce paramètre dans l'évaluation toxicologique des xénobiotiques (Jacobs et al. 2013). Dans le cas de la BP3, la différence d'activité œstrogénique entre les cellules ZELH-zfERs et la larve transgénique trouve très probablement son explication dans les différences de capacités de

biotransformation des modèles. Il a été montré que la BP3 était transformée en benzophénone-1 (BP1) *in vivo* chez le rat (Jeon et al. 2008). Or, dans nos études, l'activité œstrogénique de la BP1 a été détectée dans les lignées cellulaires ZELH-zfERs et dans le modèle EASZY assay. Etant donnée, en revanche, l'absence de détection d'activité œstrogénique de la BP3 dans les cellules ZELH-zfERs, une hypothèse pourrait être que ces modèles cellulaires ne prennent pas en charge son métabolisme en BP1, contrairement au modèle larvaire.

- **Des modèles cellulaires du poisson zèbre homogènes et métaboliquement compétents**

Nos travaux démontrent la prise en charge de la BP2 aussi bien que le BPS par des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) dans tous les modèles de poisson zèbre que nous avons étudiés, y compris *in vitro*. Nos études montrent en particulier que les EMX dites de phase II sont fonctionnelles pour l'ensemble de ces modèles. La nature des métabolites formés pour la BP2 dans les modèles *in vitro* et *in vivo* du poisson zèbre (**articles 3 et 4**) est très cohérente avec les profils métaboliques obtenus chez le rat exposé *per os,* chez qui des métabolites glucuronoconjugués et sulfoconjugués ont été identifiés dans le sang et l'urine (Schlecht et al. 2008). Pour le BPS, notre travail aboutit aux premières données documentant le devenir de cette molécule « alternative » au bisphénol A, dans des modèles biologiques utilisés à des fins toxicologiques (**articles 3 et 4**). Même en l'absence de points de comparaison directs quant au BPS, les données relatives au métabolisme d'autres bisphénols confirment clairement une importance prépondérante des voies de phase II, *in vivo* et *in vitro* (Zalko et al. 2003; Bursztyka et al. 2008; Cabaton et al. 2008; Fini et al. 2009), ce qui est logique compte tenu de la présence de groupent hydroxylés libres, favorables à une conjugaison sans étape préalable de fonctionnalisation par des voies oxydatives de phase I.

Au niveau cellulaire, les résultats obtenus chez le poisson zèbre ont montré une grande homogénéité des profils métaboliques pour la BP2 et pour le BPS. Les quatre modèles hépatiques de poisson zèbre (primo-cultures, lignée ZELH, lignées ZELH modifiées exprimant l'ER , l'ER 1 ou l'ER 2) ont produit des métabolites de même nature, à savoir des glucuronoconjugués et des sulfoconjugués. Du point de vue du toxicologue, il en découle que la double transfection réalisée dans la lignée ZFL (à partir de laquelle ont été élaborées les cellules ZELH-zfER , ZELH-zfER 1 et ZELH-zfER 2) n'a pas modifié les capacités de biotransformation de cette lignée (au moins envers la BP2 et le BPS), ce qui conforte la possibilité d'utiliser les lignées ER , ER 1 et ER 2 comme des senseurs spécifiques des récepteurs à l'œstradiol correspondants, tout en conservant une capacité métabolique intacte (au moins en comparaison de la lignée « mère »). Par ailleurs, la pertinence du modèle ZELH-zfERs, du point de vue métabolique, a été renforcée par nos études de métabolisme comparé *in vitro*, puis par les études *in vivo*. *In vitro* (**article 3**), nous avons montré que selon l'espèce (poisson zèbre ou Homme) et le tissu d'origine (foie ou glande mammaire) les profils métaboliques différaient fortement. Plus précisément, concernant les modèles humains, la prise en charge de la BP2 et du BPS est très

différente entre les quatre modèles mis en œuvre, dont deux sont d'origine hépatique (HepG2 et HepaRG) et deux d'origine mammaire, ces derniers étant utilisés régulièrement dans l'évaluation de l'activité œstrogénique des composés chimiques (MELN et T47DKBLuc). La lignée humaine hépatique HepaRG est de mieux en mieux reconnue pour sa capacité à exprimer une variété très large d'EMX fonctionnelles (Aninat et al. 2006; Kanebratt et Andersson 2008; Antherieu et al. 2012). HepG2 est une lignée couramment utilisée, mais supposée exprimer une moindre étendue d'activités métaboliques (Aninat et al. 2006; Guillouzo et al. 2007). Enfin, très peu d'informations sur les capacités de biotransformation des modèles humains mammaires MELN et T47DKBLuc sont actuellement connues (Angus et al. 1999; AbuHammad et Zihlif 2013). En revanche, ils sont très largement utilisés pour la caractérisation de l'activité œstrogénique. Nos résultats démontrent la compétence des modèles cellulaires ZELH-zfERs en termes de capacités de biotransformation envers la BP2 et le BPS. De plus, les profils métaboliques observés pour les cellules ZFL ne sont pas altérés pour les lignées filles ER et ER 1 et ER 2. La similitude de ces profils métaboliques avec ceux obtenus pour HepaRG renforce considérablement l'intérêt de ces cellules en tant que modèles de criblage de l'activité œstrogénique des PE.

- **Spécificités des modèles *in vivo* adulte et larvaire dans la prise en charge de la BP2 et du BPS**

Dans le cas des modèles *in vivo,* les mêmes voies métaboliques ont été mises en jeu dans le devenir respectif de la BP2 et du BPS entre la larve et le poisson adulte (**article 3 et 4**). Pour le BPS, la nature des métabolites formés dans ces modèles *in vivo* (au sens organisme entier) et dans les modèles cellulaires était identique. Pour la BP2, bien que la formation d'un métabolite glucurono-sulfoconjugué ait été mise en évidence dans les modèles *in vivo* et dans la culture primaire d'hépatocytes de poisson zèrbe, les métabolites formés étaient par ailleurs qualitativement similaires. Pour le BPS, la comparaison des profils métaboliques met en évidence une forte similitude entre la larve et les lignées cellulaires ZFL et ZELH-zfERs. Concernant le poisson adulte le profil métabolique du BPS présente une homologie avec celui du modèle cellulaire HepaRG. Dans le cas de la BP2, le profil métabolique obtenu chez la larve est davantage proche de celui des cellules humaines HepaRG que des cellules du poisson zèbre. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des ces résultats démontre une capacité métabolique significative du poisson zèbre avec une expression précoce des EMX de phase II dès les premiers stades du développement larvaire.

Sur le plan quantitatif, les modèles larve et adulte ont révélé, comme l'on pouvait s'y attendre, des différences importantes dans la prise en charge de la BP2 et du BPS (**article 4**). Les taux de captation (passage de la molécule, de l'eau au milieu intérieur de l'organisme) calculés pour la BP2 et le BPS démontrent la faible biodisponibilité des ces composés, avec une absorption de 0,2 à 0,9% de la radioactivité présente dans l'eau. Pour le BPS, ce résultat est cohérent avec la biodisponibilité de 0,2% retrouvée lors d'une exposition du modèle larvaire au BPA (Gibert et al. 2011). Bien que ces taux

soient à première vue proches pour la larve et l'adulte, et ce dans le cas de la BP2 aussi bien que du BPS, il n'en reste pas moins que la quantité d'équivalent BP2 ou BPS rapporté au poids de poisson est très fortement supérieure chez les larves (respectivement 22,9 et 5,6 µg/g) que chez les adultes (respectivement 0,43 et 0,14 µg/g). Les niveaux d'exposition interne sont donc entre 40 et 50 fois plus importants chez la larve que chez l'adulte, pour une concentration d'exposition identique (1 µM), quelle que soit la molécule. Par ailleurs, pour le BPS, le facteur de concentration apparent calculé chez la larve (22,0) est cohérent avec ceux obtenus pour le BPA et le BPF par Gibert et al. (2011) (27,0 et 11,0 respectivement). Nos résultats indiquent que la dose interne de BP2 (ou de BPS) atteinte chez les larves est supérieure à celle détectée chez l'adulte. Les interactions étroites de la larve et du poisson adulte avec l'environnement conditionnent l'exposition de ces organismes modèles aux xénobiotiques. Au cours de son exposition (environ de 5 hpf jusqu'à 96 hpf), la larve poursuit son développement. Bien que le tube digestif soit entièrement formé et creux et qu'il soit admis qu'à partir de 74-76 hpf l'orifice buccal est ouvert chez les larves de poisson zèbre (Ng et al. 2005), il semble que la voie d'exposition orale ne soit réellement effective qu'à partir de 120 hpf (Strahle et al. 2012). La diffusion passive des xénobiotiques à travers le tégument de la larve constitue la voie majeure d'exposition aux xénobiotiques (Diekmann et Hill 2013; Kais et al. 2013). A la différence du poisson adulte, la larve ne possède pas de branchies, lesquelles expriment des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et peuvent jouer un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques (Gao et al. 2014; Liu et al. 2014; Wang et al. 2014). Bien que le foie soit également en développement à ce stade, il est considéré comme formé et fonctionnel vers 72 hpf (Ng et al. 2005; Diekmann et Hill 2013). La compétence des cellules hépatiques ZFL et ZELH-zfERs en termes de capacité de biotransformation, et les similitudes des profils métaboliques entre ces cellules et la larve, renforce l'hypothèse de la prédominance de l'origine hépatique des biotransformations observées.

- **Différentiel de prise en charge de composés chimiquement proches**

Quel que soit le modèle biologique (*in vivo* ou *in vitro*), les taux de biotransformation de la BP2 observés dans nos expérimentations étaient supérieurs à ceux du BPS. Ce résultat était assez inattendu, étant donné le degré de similitude sur le plan structurel de ces deux composés (pKa de la BP2 : 6,98 ; du BPS : 8,2 ; poids moléculaires peu différents, présence de groupements hydroxyles…). Dans la mesure où au cours de la première étape de la thèse, il avait fallu utiliser chez les larves des concentrations de 30-60 µM pour mettre en évidence une activité œstrogénique du BPS ou de la BP2, l'hypothèse d'une détoxication par formation de métabolites conjugués (non biologiquement actifs) pouvait être avancée. Comme c'est le cas pour le BPA-glucuronide (Matthews et al. 2001), il est vraisemblable en effet que les métabolites conjugués du BPS et de la BP2 ne soient pas capables d'activer les ER. Après production biochimique et purification de ces métabolites en quantité suffisante, nous avons vérifié cette absence d'activité des métabolites du BPS (monoglucuronide et monosulfate) et de la BP2 (monoglucuronide 1, monoglucuronide 2 et monosulfate) à l'aide du

modèle cellulaire HELN-hER , en collaboration avec l'INSERM de Montpellier. Pour les larves, les résultats obtenus montrent que le taux de captation de la BP2 est plus important que celui du BPS (0,9% et 0,2% respectivement), mais que le taux de biotransformation de la BP2 est également plus important que celui du BPS (22,9% et 5,6% respectivement). Au final, la quantité par unité de poids de BP2 et BPS « inchangés » (composés parents) dans la larve est donc quasiment identique pour les deux molécules (11,8 et 14,7 nmol/g de poids frais, respectivement ; **article 4**). Ceci suggère que malgré un comportement différent entre la BP2 et le BPS, l'exposition des larves à ces toxiques soit pondéralement relativement similaire pour les larves, dans les conditions expérimentales utilisées, et en prenant comme base de raisonnement la quantité de composé parent présente chez les animaux. A noter également que dans le cas des cellules ZELH-zfERs, le métabolisme était beaucoup plus important pour la BP2 que le BPS, donc la quantité de BP2 inchangée était là aussi beaucoup plus faible que dans le cas du BPS. Or les EC50 du BPS et de la BP2 mesurées dans les cellules ZELH-zfERs (environ 1 µM, **article 1 et 2**) sont quasiment identiques. Ceci suggère que la BP2 serait intrinsèquement plus active que le BPS, si l'on s'en tient à la concentration de composés parents, et si l'on considère que les métabolites formés sont tous inactifs vis-à-vis des ER. Ces résultats semblent apporter des éléments cohérents permettant d'approfondir la compréhension des processus en jeu dans la survenue de l'activité œstrogénique de ces composés dans ces modèles cellulaires.

Que la BP2 soit davantage métabolisée que le BPS soulève également la question d'une prise en charge enzymatique différentielle de ces deux composés. Bien que les voies enzymatiques des deux composés soient qualitativement identiques, cette observation suggère en effet une prise en charge par des enzymes de sous-familles différentes et/ou par des isoenzymes distinctes. Une quarantaine de gènes codant pour les UGT et une vingtaine pour les SULT ont été identifiés chez le poisson zèbre (Sugahara et al. 2003; Kurogi et al. 2013; Wang et al. 2014). Parmi les familles de composés modèles utilisés dans notre travail, les informations disponibles à ce jour dans la littérature se rapportent exclusivement au BPA, qui est pris en charge par l'UGT 1A1 et les SULT1 ST5, SULT3 ST1 et ST3 du poisson zèbre (Yasuda et al. 2005a; Yasuda et al. 2005b; Yasuda et al. 2006; Yasuda et al. 2008; Yasuda et al. 2009; Kurogi et al. 2013; Wang et al. 2014). Les autres caractérisations concernent la prise en charge par des UGT et les SULT du BPA et du BPS chez l'Homme (Suiko et al. 2000; Nishiyama et al. 2002; Hanioka et al. 2008; Gramec Skledar et al. 2014). Les différences d'expression tissulaires et temporelles des UGT et SULT rapportées chez le poisson zèbre constituent très probablement une explication à la différence de prise en charge de la BP2 et du BPS (cf Tableaux 13 et 15 du manuscrit). Le cas du poisson adulte illustre spectaculairement l'importance de l'ontogénie de l'expression des EMX chez le poisson zèbre, avec une prise en charge majeure de la BP2, attestée par les bilans métaboliques adossés aux mesures de la radioactivité. En effet, la proportion de métabolites retrouvés dans l'eau d'exposition des adultes exposés à la BP2 représentait près de 40% de la radioactivité retrouvée dans l'eau, contrairement au cas du BPS, pour lequel seule la molécule parente était présente dans l'eau (ce qui était également le cas, pour les deux molécules, dans le cas des

expérimentations larvaires). Le comportement de ces deux toxiques est donc très différent dans le modèle poisson adulte. Par rapport à la larve, les branchies représentent une voie d'entrée ainsi qu'un organe de prise en charge enzymatique supplémentaire pouvant être impliqué dans le devenir de ces composés. Afin d'explorer l'implication des isoformes d'enzymes dans la prise en charge différentielle de la BP2 et du BPS, il serait intéressant de disposer de modèles *in vitro* dans lesquels l'expression spécifique de chacune des isoformes des UGT et des SULT du poisson zèbre puisse être exprimées. Combinées à ces études, des informations complémentaires sur la répartition tissulaire de ces enzymes, permettraient également d'appréhender plus aisément les différences de prise en charge de ces contaminants environnementaux.

Nos études ont montré que ni la BP2, ni le BPS n'étaient pris en charge par des enzymes de phase I, à l'exception de traces d'un métabolite oxydé de la BP2, observées pour les incubations réalisées avec le modèle cellulaire T47D-KBLuc (hypothèse qui reste à confirmer compte tenu de la faible quantité de métabolite formé). Les résultats obtenus ne signifient cependant pas que les modèles de poisson zèbre n'expriment pas d'EMX de phase I. Pour le confirmer, il faudrait étendre nos approches à des composés chimiques (modèles ou contaminants) connus pour passer par des voies de fonctionnalisation préalablement (ou pas) à une conjugaison. Il serait par exemple intéressant de comparer les capacités oxydatives de nos modèles en prenant comme molécule d'étude la testostérone, ou un hydrocarbure aromatique polycyclique. Au cours de mes travaux de développement analytique spécifiquement dédiés à l'analyse chromatographique du BPS et de la BP2, des études préliminaires ont révélé la capacité de ces deux composés à être pris en charge par des enzymes de phase I suite à leur incubation avec à des fractions microsomales hépatiques de rat, avec une approche standard (2 mg de protéines, 37°C en présence d'un système générateur de NADPH). Dans ces conditions (excluant une conjugaison) le BPS est hydroxylé en catéchol-BPS, et la BP2 produit une série de métabolites oxydés (dont la structure est toujours en cours d'étude). Par ailleurs, plusieurs travaux ont par le passé mis en évidence la fonctionnalité des EMX de phase I chez différentes espèces de poisson, et notamment dans des modèles cellulaires et chez la larve du poisson zèbre (Funari et al. 1987; Collodi et al. 1994; Segner et Cravedi 2001; Alderton et al. 2010; Jones et al. 2010). L'absence de métabolites de phase I dans le devenir de la BP2 et du BPS s'explique donc très probablement par la présence de fonction hydroxyles sur leurs noyaux aromatiques, permettant l'action d'enzymes de phase II sans réactions de phase I préalables. Il est notable que pour les bisphénols, malgré un métabolisme microsomal oxydatif avéré (Jaeg et al. 2004), ces oxydations sont masquées par la prédominance des conjugaisons (Jaeg et al. 2004; Fini et al. 2009) quand sont utilisés des systèmes fonctionnels pour les phases II (fractions sub-cellulaires S9, lignées cellulaires métaboliquement compétentes, *in vivo*).

- **Approche intégrée de l'utilisation du modèle larvaire EASZY assay et du modèle cellulaire ZELH-zfERs de poisson zèbre**

Le niveau ou degré d'organisation d'un modèle biologique va nécessairement influencer la réponse biologique mesurée. *In vivo*, le paramètre biologique mesuré sera consécutif à une série d'événements d'ordre pharmacocinétique (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion), physiologique (régulation, contrôles et rétrocontrôles) et pharmacodynamique. Le stade de développement de l'organisme (adulte, embryon et larve par exemple) qui détermine le degré de maturité des organes, aura également un impact sur l'activité mesurée. *In vitro*, comme pour les modèles *in vivo*, différents paramètres tels que la perméabilité membranaire, les capacités de biotransformation des xénobiotiques, les systèmes de pompes d'efflux peuvent également influencer l'activité biologique mesurée. Le degré d'organisation cellulaire entre des modèles tels que des cultures d'explants d'organes (testicules et tranches de foie par exemple), des cultures primaires et des lignées cellulaires est à même de moduler la réponse biologique mesurée. Que ce soit dans un modèle *in vitro* ou *in vivo*, le contexte cellulaire est un facteur pouvant expliquer des différences de réponses biologiques entre modèles pour un même xénobiotique. Ce contexte cellulaire est déterminé par l'espèce de laquelle sont issues les cellules et par l'origine tissulaire de ces cellules. Plus précisément, parmi les principaux facteurs mis en jeu, on trouve les récepteurs des œstrogènes, qui sont caractérisés par leur séquence en acides aminés et par leur structure tridimensionnelle, lesquelles peuvent varier en fonction de l'espèce. De même, l'ensemble des cofacteurs participant aux mécanismes de transduction des messages n'est pas nécessairement transposable d'une espèce à l'autre. Dans une étude préalable à cette thèse, l'INERIS a démontré la sélectivité des sous-types de récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (zfER , zfER 1, zfER 2) vis-à-vis de différents composés tels que des stéroïdes, des benzophénones, des phyto- et myco-œstrogènes dans les modèles ZELH-zfERs (Cosnefroy et al. 2009). Or, sur la base des mêmes ligands modèles, cette sélectivité des ER s'est avérée différente pour les sous-types humains (hER et hER), en comparaison des sous types ichthyens. Des variations d'activités ont également été rapportées dans des modèles *in vitro* humains transfectés avec des ER de poissons ou d'autres vertébrés non mammaliens (Matthews et al. 2000; Miyagawa et al. 2014).

L'ensemble des résultats montrent que même si le devenir de la BP2 et du BPS fait intervenir des voies enzymatiques similaires entre les modèles et que certaines similarités sur le plan qualitatif ont été observées, ces derniers ne sont toutefois pas équivalents. Plutôt que d'envisager un changement d'échelle entre un modèle *in vitro* et *in vivo*, il semble plus approprié de les considérer, avec leurs avantages et leurs limites, comme des modèles complémentaires. Il semble plus bénéfique d'utiliser ces modèles dans une approche globale de criblage des activités œstrogéniques des xénobiotiques plutôt que d'envisager de les substituer les uns aux autres. Actuellement, les tests de l'OCDE validés chez le poisson zèbre sont utilisés dans le niveau 3 du cadre conceptuel d'évaluation des PE, c'est-à-dire le niveau des tests *in vivo* qui fournissent des informations sur les voies et mécanismes d'action de PE sélectionnés. Il n'existe pas actuellement de modèles de criblage de composés œstrogéniques

provenant du poisson zèbre et utilisables dans le niveau 2 (tests *in vitro* fournissant des informations sur les voies et mécanismes d'action de PE sélectionnés). En plus d'être adaptés au criblage et de provenir d'une même espèce, ces modèles ont l'avantage de présenter une cible œstrogéno-régulée différente (ERE-Luc, GFP sous le promoteur du *cyp19a1b*) dans un contexte cellulaire hépatique (ZELH-zfERs) ou glial (EASZY assay), ainsi que des paramètres ADME (ou apparentés pour les cellules) différents de part la nature même des modèles. Ces modèles pourraient alors apporter une contribution intéressante dans la hiérarchisation des composés chimiques à tester *in vivo* pour leurs potentiels effets délétères.

3- Vers l'intégration du métabolisme des xénobiotiques dans les tests *in vitro* destinés à évaluer les activités endocriniennes des substances chimiques

Comment mieux intégrer la prise en compte de la dimension « biotransformation » dans les tests d'activité biologique des PE ? L'approche méthodologique la plus simple est d'étudier le devenir de composés chimiques modèles et d'utiliser des standards correspondants à leurs métabolites connus (sur la base de la littérature), en procédant ultérieurement à une confirmation spectrale (temps de rétention, spectre UV, LC-MS…). Avec cette approche « ciblée », seuls les métabolites connus, pouvant être synthétisés et utilisés comme standards pourront être mis en évidence. Elle convient lorsque l'ensemble des métabolites potentiels sont connus, mais s'avère peu performante dans le cas de nouveaux composés, dont le devenir reste à explorer. L'alternative, choisie dans ce travail, consiste à utiliser une molécule radiomarquée permettant d'isoler chacun des métabolites formés sans *a priori*. Cette approche non ciblée, plus exhaustive, est la plus appropriée à l'étude de composés chimiques en l'absence de toute information disponible sur leur devenir métabolique. Toutefois, elle se heurte aux contraintes imposées par l'utilisation de la radioactivité et à la disponibilité de la molécule parente sous forme radiomarquée. Les seules informations existantes sur la biotransformation de la BP2 avant ce travail ont été rapportées dans une étude réalisée chez le rat exposé *per os* montrant la formation de deux métabolites : un glucuronoconjugué et un sulfoconjugué (Schlecht et al. 2008). Dans ce travail de thèse, de 3 à 6 métabolites de phase II ont été rapportés dans les modèles cellulaires, larvaires et adultes du poisson zèbre. La bonne sensibilité de la technique radio-CLHP permet une détection sans équivoque de l'ensemble des métabolites formés. La sensibilité de cette technique était d'environ 2,5 fmol dans le cas de la BP2 et de 30 fmol dans celui du BPS. Dans la pratique, la dimension métabolique n'est que rarement prise en compte dans les tests d'activité biologique des PE, que ce soit par des approches non ciblées (trop rarement intégrées) ou ciblées (encore plus rare). L'expertise toxicologique quant aux capacités métaboliques fonctionnelles dans un système d'essai donné, est pourtant indispensable pour progresser vers sa caractérisation et sa validation.

L'OCDE préconise de renforcer le développement de tests permettant l'étude et la prise en compte du métabolisme des xénobiotiques afin de les intégrer aux modèles d'évaluation des activités endocriniennes des substances chimiques (Jacobs et al. 2013). L'une des approches possibles est celle

suivie au cours de ce travail, à savoir la caractérisation directe des capacités de biotransformation et du devenir de composés chimiques dans des modèles biologiques développés pour le criblage d'activité biologique. Cette option est la plus pertinente pour acquérir une expertise poussée d'un modèle et de ses capacités, mais demande un investissement conséquent. Des alternatives existent, et notamment l'utilisation de fractions subcellulaires hépatiques (fractions S9, microsomes) seules ou association avec des modèles *in vitro* (exposition du système d'essai avec le produit d'incubation par des fractions hépatiques, ou supplémentation directe du système d'essai avec ces systèmes enzymatiques). Ces stratégies, qui ne permettent pas d'obtenir des informations sur les capacités intrinsèques de biotransformation d'un modèle biologique, sont certainement adaptées à des tests bactériens (comme le test d'Ames), mais leur pertinence reste très sujette à caution pour des lignées cellulaires eucaryotes, d'une part sur le plan de leur fonctionnalité, et d'autre part sur le plan des incontournables modifications que la supplémentation entraine au niveau de la physiologie cellulaire du système supplémenté. De plus, les biotransformations (éventuelles) obtenues avec l'utilisation de fractions S9 ou microsomales ne sont pas nécessairement prédictives de celles d'un modèle *in vivo*, ce qui pose question lorsque l'objectif est d'évaluer l'activité biologique d'une substance chimique. Une illustration de ce paradigme, dans notre étude, est que lorsque la BP2 et ou le BPS sont incubés avec des fractions hépatiques microsomales, des métabolites de phase I sont formées, mais que ces métabolites (a une exception près) ne sont retrouvés ni dans les modèles cellulaires ni dans les modèles *in vivo* de poisson zèbre utilisés. Donc, et bien que la supplémentation par des fractions sub-cellulaires exogènes se soit avérée pertinente dans quelques études précédentes, dans lesquelles des métabolites biomarqueurs d'une exposition *in vivo* à des SARMS ont été identifiés (Kuuranne et al. 2008; de Rijke et al. 2013), elle ne peut être utilisée « en aveugle ». De plus, si la supplémentation fait appel à des fractions subcellulaires humaines (disponibles dans le commerce) se pose le problème de la reproductibilité des résultats sur le plan temporel ou entre deux laboratoires, compte tenu de la variabilité des activités présentes dans ces fractions d'un lot à un autre. A mon sens, dans le contexte de l'évaluation de l'activité endocrinienne des produits chimiques, ces techniques permettent davantage de mettre en évidence la réactivité chimique de composés en présence de systèmes enzymatiques considérés comme complets, qu'elles ne permettent de conclure quant à la pertinence métabolique intrinsèque d'un système d'essai donné. L'intérêt d'utiliser des fractions subcellulaires est de faciliter les études mécanistiques, en déchiffrant les voies métaboliques. Mais cette approche ne se substitue pas à la caractérisation métabolique des systèmes de criblage des PE. En l'occurrence, nos études de métabolisme et de métabolisme comparé avec l'homme (en particulier : similitude avec les résultats obtenus sur la lignée HepaRG) indiquent que les modèles issus du poisson zèbre sont métaboliquement compétents, et très pertinents sur le plan qualitatif. Cette pertinence des modèles issus du poisson zèbre, qui par ailleurs est une espèce intéressante dans le cadre de l'évaluation de l'activité de contaminants environnementaux, est donc très satisfaisante si l'objectif est de travailler avec un système biologique représentatif du devenir de xéno-œstrogènes de la famille des bisphénols

ou des benzophénones, et probablement d'autres xéno-œstrogènes. En comparaison, des modèles classiques utilisés dans le criblage des PE (MELN, T47D-KBLuc) ont montré une capacité de métabolisation très faible. Ceci peut également être compris comme un avantage. En effet, de tels systèmes permettent une évaluation plus précise de l'activité intrinsèque de la molécule évaluée (qui n'est presque pas métabolisé) alors que les modèles métaboliquement compétents rendent davantage compte du devenir des molécules, et en fin de compte de leur activité attendue, métabolites compris. Les deux types de systèmes ont donc un intérêt complémentaire. La proximité des lignées ZELH avec l'homme, du point de vue qualitatif, constitue un avantage supplémentaire pour ces modèles (à confirmer avec un plus large panel de molécules).

L'utilisation combinée de tests visant à déterminer l'activité d'un xénobiotique, et des tests visant à évaluer son activité dans un système biologique davantage compétent en termes de biotransformation (dont ses capacités sont connues) apporte une complémentarité d'informations nécessaire à la priorisation des produits chimiques à évaluer *in vivo*. Le cas du méthoxychlore chez la truite arc-en-ciel (rainbow trout ; rt) illustre cette complémentarité de tests. Un test de liaison (binding) au rtER a révélé une plus faible affinité du MEX par rapport au métabolite HPTE. Dans un modèle de tranches de foie de la truite arc-en-ciel, il a été montré que l'HPTE était formé en quantité suffisante pour induire la majorité de l'induction de la Vtg observée, et ce, malgré une biotransformation en métabolites de phase II du méthoxychlore et de l'HPTE (Schmieder et al. 2004).

4- Des informations nouvelles pouvant contribuer au développement de modèles PBPK caractéristiques d'une exposition à des PE

Les résultats obtenus dans ce travail nous apportent des éléments nouveaux sur le devenir de la BP2 et du BPS dans un ensemble de modèles *in vitro* et *in vivo*, en complément des données sur la capacité de biotransformation de ces modèles. Pour les modèles *in vivo*, nos résultats apportent des données de biodisponibilité de ces substances, de biotransformation et d'excrétion dans des conditions expérimentales définies. Il serait intéressant de pouvoir accéder à des informations plus poussées sur la distribution de ces composés chimiques, pour mieux appréhender et évaluer l'exposition des tissus cibles. A cette fin, un travail consistant à analyser les profils métaboliques de la BP2 et du BPS radiomarqués dans chacun des principaux organes a été envisagé. Toutefois, les conditions expérimentales (volumes des aquariums, radioactivité spécifiques des traceurs), bien qu'optimisées, étaient incompatibles avec l'obtention d'une charge en radioactivité par organe suffisamment élevée pour pouvoir extraire ces tissus et envisager un profilage métabolique. Pour autant, nos données peuvent contribuer au développement et à l'ajustement de modèles pharmacocinétiques à fondement physiologique (PBPK). Chez le poisson, l'un des premiers modèles PBPK a été construit en 1990 chez la truite arc-en-ciel (Nichols et al. 1990). Les modèles mathématiques PBPK sont développés afin de prédire la distribution, l'absorption, le métabolisme et l'excrétion de composés chimiques. Ils reposent sur des données expérimentales obtenues *in vitro* ou *in vivo*. Le modèle PBTK (physiologically based

toxicokinetic) développé à l'INERIS chez le poisson zèbre adulte (Pery et al. 2014) intègre notamment des données QSAR, et sa prédictibilité a été évalué, entre autres, pour le BPA. Par conséquent, il serait particulièrement intéressant de mettre en perspective les informations du modèle PBTK et nos résultats, étant donné les différences de devenir observées dans ce travail entre la BP2 et le BPS chez le poisson adulte, malgré la similitude de leur structure chimique.

Conclusion et perspectives

La caractérisation du devenir et des capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés dans le cadre d'essais de criblage pour la détection et la quantification des activités endocriniennes des substances chimiques, constituent actuellement des objectifs scientifiques importants dans le domaine de la toxicologie des perturbateurs endocriniens. L'enjeu est de parvenir à prendre en compte les informations relatives à la biotransformation des xénobiotiques, le métabolisme pouvant influencer la réponse biologique lors de l'évaluation de l'activité biologique de ces substances.

Ce travail de thèse a contribué à la caractérisation du devenir de deux contaminants environnementaux émergents, la benzophénone 2 (BP2) et le Bisphénol S (BPS), et par voie de conséquence à la caractérisation des capacités de biotransformation des modèles biologiques utilisés. Il s'agissait spécifiquement de huit modèles cellulaires dont quatre provenant du poisson zèbre et quatre d'origine humaine, exposés à différentes concentrations en xénobiotiques, ainsi que de deux modèles *in vivo* du poisson zèbre (larve / adulte). L'ambition était d'avoir une approche la plus exhaustive possible afin de renseigner des différences inter-modèles potentielles et de comparer les réponses en tenant compte du métabolisme des xénobiotiques.

Notre travail s'est structuré autour de deux axes complémentaires (activité œstrogénique et devenir chimique). Globalement, outre l'apport de ce travail en termes de comparaison des modèles sur leur capacité de biotransformation, les résultats obtenus permettent de mieux appréhender le différentiel de réponse œstrogénique entre les modèles étudiés, ce qui apparait nécessaire dans le contexte de la validation de ces tests au niveau réglementaire :

(i) Les concentrations en BP2 et BPS qui sont responsables d'une activité œstrogénique dans les modèles cellulaires ZELH-zfERs du poisson zèbre ne le sont pas dans le modèle de larve transgénique. Il existe donc pour ces deux substances un différentiel de réponse œstrogénique entre ces modèles.

(ii) Les modèles cellulaires du poisson zèbre, primo-cultures, lignées hépatiques natives mais aussi transfectées (ER), sont homogènes en termes de capacités de biotransformations ce qui renforce l'intérêt de l'utilisation du modèle cellulaire ZELH-zfERs.

(iii) Nous avons mis en évidence une plus grande proximité de devenir de la BP2 et du BPS des modèles cellulaires du poisson zèbre avec le modèle humain HepaRG qu'avec d'autres modèles humains classiquement utilisés dans le criblage de l'activité œstrogénique.

(iv) Les voies de biotransformation entre les modèles cellulaires, larvaire et adulte sont semblables pour la BP2 et le BPS, et la nature des métabolites est qualitativement identique.

(v) Le degré de prise en charge enzymatique de la BP2 et du BPS varie selon les modèles utilisés, avec d'importantes différences dépendantes du contaminant, et ce malgré la proximité structurale de ces molécules.

Les résultats de ce travail ouvrent des perspectives de recherche qui, toutefois, n'ont pu être abordées dans le cadre de la thèse :

(i) L'un des axes de travail qui nous apparait opportun de développer concerne la caractérisation des enzymes de phase II des modèles du poisson zèbre, mais aussi des modèles cellulaires humains, prenant en charge la BP2 et le BPS, par l'utilisation de modèles exprimant spécifiquement une isoforme enzymatique des UGTs et des SULTs.

(ii) Il conviendrait aussi de procéder à l'analyse quantitative de l'expression des enzymes de phase II prenant en charge la BP2 et le BPS, dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre mais aussi dans les modèles cellulaires humains. Cette approche pourrait être étendue aux enzymes de phase I qui sont impliquées dans la biotransformation de la BP2 et du BPS dans des modèles subcellulaires.

(iii) L'intégration de ces données de métabolisme dans des modèles PBTK permettrait de progresser vers une approche prédictive du devenir et des effets des substances dans les systèmes biologiques utilisés. Il est clair que le développement et la validation de tels modèles nécessitent l'acquisition de données biologiques spécifiques. Ainsi, les résultats obtenus concernant le métabolisme de la BP2 et du BPS pourraient être mis en perspective avec le modèle PBTK du poisson zèbre adulte développé à l'INERIS. Le développement de modèles similaires chez l'embryon ou la larve s'avère nécessaire et fait l'objet de travaux de recherche au niveau international (Brinkmann et al. 2014). De même, la validation de ces approches combinant données biologiques et données ADME dans des modèles mathématiques ne peut se limiter à des ligands comme la BP2 et la BPS.

(iv) Il apparait donc indispensable de poursuivre les efforts expérimentaux engagés dans ce travail qui pose des bases méthodologiques solides, par l'étude du devenir d'autres composés chimiques ayant des profils métaboliques différents de ceux utilisés dans ce travail (notamment des molécules prises en charge par des enzymes de phase I) ou appartenant à des familles chimiques structurellement éloignées de celles des bisphénols et des benzophénones (zéaralénol, 4-tert-octylphenol par exemple).

Annexe 1

Liste des publications et des communications

Publications

- A. Cosnefroy, S. Aït-Aïssa, **V. Le Fol**, E. Maillot-Maréchal, B. Piccini, C. Turies, O. Palluel, JM. Porcher and F. Brion. Evaluation of estrogenic effects of benzophenone derivatives in zebrafish (*Danio rerio*) using *in vitro* and *in vivo* models. *En préparation*

- **V. Le Fol**, M. Sonavane, S. Aït-Aïssaa, B. Piccinia, E. Maillot-Maréchal, O. Palluel, D. Zalko, F. Brion. An integrated *in vitro* and *in vivo* approach to assess the estrogenic activity of Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F in the zebrafish. *En preparation*

- **V. Le Fol**, S. Aït-Aïssaa, N. Cabaton, L. Dolo, M. Grimaldi, P. Balaguer, E. Perdu, L. Debrauwer, F. Brion, D. Zalko. 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*. 2015 Mar 17;49(6):3860-3868. *Paru*

- **V. Le Fol**, F. Brion, A. Hillenweck, E. Perdu, S. Bruel, S. Aït-Aïssa, J.P. Cravedi, D. Zalko. Life-stage dependant biotransformation of BP2 and BPS in zebrafish supports the use of embryo model as an alternative to adult fish. *En préparation*

Congrès

- **V. Le Fol**, F. Brion, S. Aït-Aïssa, D. Zalko. Estrogenicity and metabolism of Benzophenone-2 in novel *in vitro* and *in vivo* zebrafish bioassays. *SETAC*. Mai 2013. Glasgow, Ecosse. (communication orale, orateur)

- **V. Le Fol**, S. Aït-Aïssa, E. Perdu, S. Bruel, L. Dolo, N. Cabaton, L. Debrauwer, F. Brion, D. Zalko. Biotransformation and biological activity of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in metabolically competent human and zebrafish cell-lines. *Gordon Research Conference, Environmental Endocrine Disruptors*. Mai 2014. Lucca, Italie. (poster)

- **V. Le Fol**, D. Zalko, S. Aït-Aïssa, F. Brion, L. Debrauwer. Metabolism of the two endocrine disruptors Benzophenone-2 and Bisphenol-S studied in zebrafish and human models using LC-HRMS. *62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Juin 2014. Baltimore, USA. (poster)

- **V. Le Fol**, S. Aït-Aïssa, E. Perdu, O. Palluel, B. Piccini, N. Cabaton, L. Debrauwer, F. Brion, D. Zalko. Biotransformation and estrogenic activity of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in zebrafish *in vitro* and *in vivo* models. *27th Conference of European Comparative Endocrinologists*. Août 2014. Rennes, France. (poster)

Annexe 2

Biotransformation of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in metabolically competent human and zebrafish cell-lines

Le Fol V.[1,2], Aït-Aïssa S.[1], Perdu E.[2], Bruel S.[2], Dolo L.[2], Cabaton N.[2], Debrauwer L.[3], Brion F.[1], Zalko D.[2]

1. INERIS, ECOT unit, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France
2. INRA TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Metabolism of Xenobiotics team, F-31027 Toulouse, France
3. INRA TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Axiom-Metatoul, F-31027 Toulouse, France

vincent.lefol@toulouse.inra.fr

Background & Aim

- Several human and aquatic vertebrate bioassays have been designed over the last years with the aim to characterize the estrogenic potency of chemicals [1, 2, 3].
- However, the characterization of the biotransformation capability of these biological models, which allows taking into account bioactivation/detoxification processes in effect assessment, is rarely reported.
- Benzophenones (UV filters) and Bisphenols are of major concern to human and wildlife health [4,5,6]. Benzophenone-2 (BP2) and Bisphenol-S (BPS, a substitute for Bisphenol A) are xeno-estrogens [7,8] and have been shown to disturb hormonal regulation in fish and/or rat models [9,10].
- In this study, we used a range of zebrafish and human cell models to examine the fate of BPS and BP2. The focus was placed upon novel zebrafish gene reporter assays (ZELH zfERs) designed to assess the estrogenic potency of chemicals [11].

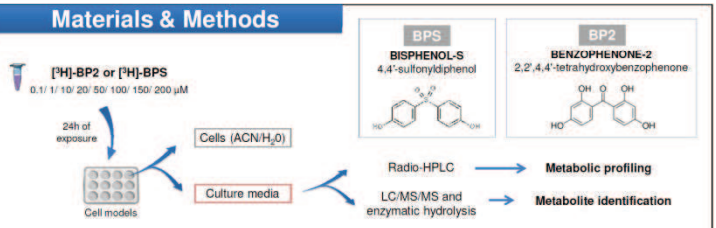
Materials & Methods

ZEBRAFISH cell models

Hepatic			
PZFH	ZFL	ZELH zfERα	ZELH zfERβ2
primary hepatocytes	hepatic cell line	ZFL + ERE-Luc + zfERα	ZFL + ERE-Luc + zfERβ2
		xeno-estrogens screening	

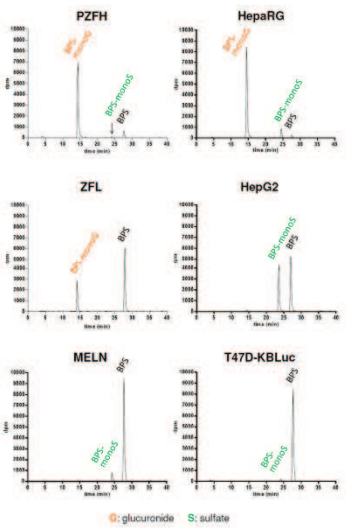
HUMAN cell models

Hepatic		Mammary gland	
HepaRG	HepG2	MELN	T47D-KBLuc
bi-potent hepatic cells	hepatic cell line	MCF-7 + ERE-Luc	T47D + ERE-Luc
		xeno-estrogens screening	

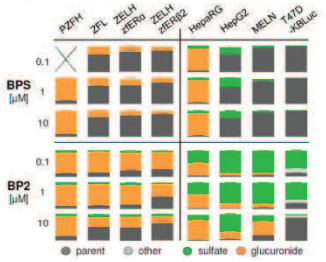


Results

1 Radio-HPLC metabolic profiles of [3H]-BPS incubated at 1 µM in zebrafish and human cell models

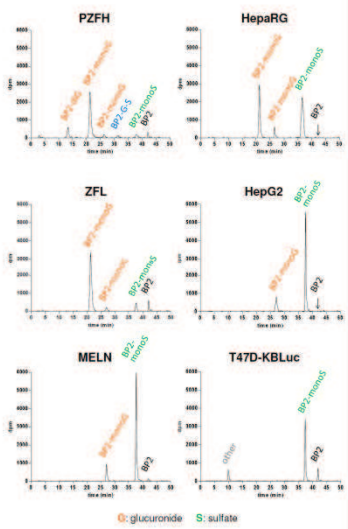


3 Biotransformation of BPS and BP2 in zebrafish and human cell models



- The stable transfections of ERE-Luc and zfERα or zfERβ2 in ZFL cell line did not modify the metabolic capability of the resulting ZELH zfERs cell lines.
- Sulfation was predominant in human cell models (with glucuronidation for HepaRG cells) whereas glucuronidation was predominant in zebrafish cell models. As for HepaRG, glucuronides were the major metabolites produced by zebrafish cell models.
- The human MELN and T47D-KBLuc cells from mammary gland used to screen xeno-estrogens, and the novel zebrafish assay (ZELH zfERs) also used to assess the estrogenic potency of chemicals, did not display the same metabolic capabilities.
- HepaRG is a highly metabolically competent cell line. MELN, T47D-KBLuc and HepG2 cells, did not produce similar metabolites as HepaRG cells.

2 Radio-HPLC metabolic profiles of [3H]-BP2 incubated at 1 µM in zebrafish and human cell models



Conclusions & Perspectives

- This study provides new and relevant data concerning the metabolism of BP2 and BPS in fish and human cell models, thus allowing a better characterization of the respective biotransformation capabilities of these models which thing is required for their use in the context of endocrine disruptors screening testing.
- This work is currently being extended through the characterization of the fate ant the estrogenic activity of BPS and BP2 in adult male zebrafish and in transgenic larva (EASZY assay, [12]) designed to assess the estrogenic potency of chemicals.

References

[1] Marin and Matozzo. 2004
[2] Segner. 2009
[3] Marty and O'Connor. 2014
[4] Fromme *et al.*, 2002
[5] Balmer *et al.*, 2005
[6] Fent *et al.*, 2009
[7] Molina-Molina *et al.*, 2008
[8] Molina-Molina *et al.*, 2013
[9] Hsieh *et al.*, 2007
[10] Naderi *et al.*, 2014
[11] Cosnefroy *et al.*, 2012
[12] Brion *et al.*, 2012

Acknowledgement

Thanks to C. Guillouzo (INSERM U991, Rennes, France) who kindly provided the HepaRG cells and P. Balaguer (INSERM U896, Montpellier, France) the MELN cells.

NEMO project

Metabolism of the two endocrine disruptors Benzophenone-2 and Bisphenol-S studied in zebrafish and human cell models using LC-HRMS.

Vincent LE FOL[1,2], Daniel ZALKO[1], Selim AÏT-AÏSSA[2], François BRION[2] and Laurent DEBRAUWER[1]

1 INRA TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, FRANCE

2 INERIS, ECOT Unit, Parc technologique Alata, F-60550 Verneuil-en-Halatte, FRANCE

Overview

- Biotransformation of two endocrine disruptors in zebrafish and human cell models
- Absolute quantitative data provided by use of radiolabeled compounds
- Use of LC coupled to high resolution MS for metabolite structural identification

Introduction

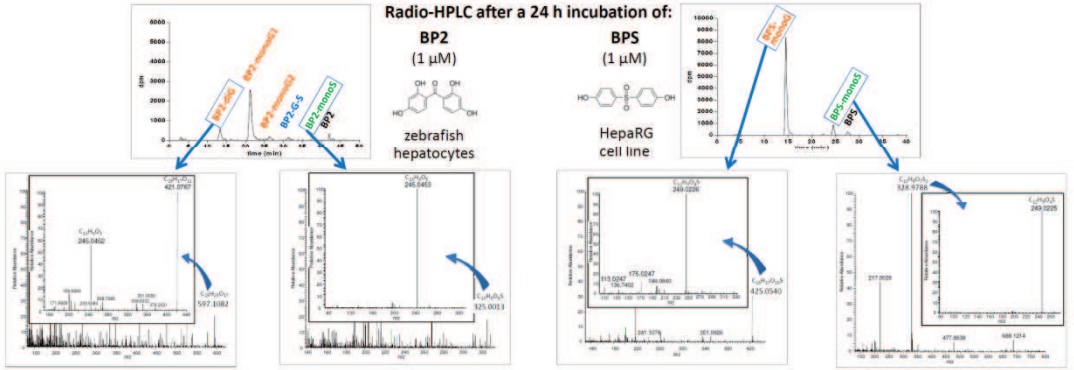
- **Several human and aquatic vertebrate bioassays** have been designed over the last years to **characterize the estrogenic potency of chemicals** [1].
- However, the characterization of the biotransformation capabilities of these biological models, enabling to take into account bioactivation and detoxification processes in effect assessment, is rarely reported.
- Xenoestrogens, **Benzophenone-2** (BP2; UV filters) and **Bisphenol-S** (BPS; a substitute for Bisphenol-A) are of major concern to human and wildlife health [2, 3].
- **In this study, a range of zebrafish and human cell models was used to examine the fate of BPS and BP2. The focus was placed upon novel zebrafish gene reporter assays (ZELH zfERs) designed to assess the estrogenic potency of chemicals [4].**
- **High resolution mass spectrometry and tandem MS** experiments were used to identify the structure of the metabolites on the basis of their exact mass measurement and their fragmentation patterns.

Methods

- Zebrafish hepatic and various human cell cultures were exposed to different concentrations of ^{3}H-radiolabeled Benzophenone-2 and Bisphenol-S. After 24 hours, the culture medium was collected for both on-line LC-radiochromatography and mass spectrometric analyses.
- LC-HRMS : LC separation was achieved on a Dionex RSLC 3000 system fitted with a Zorbax SB-C18 column (250 x 4 mm, 5µm). A 20mM ammonium acetate – acetonitrile gradient elution was used at 1mL/min flow rate with 1/4 post-column splitting.

High resolution MS analyses were carried out on a LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific) running under electrospray ionization. High resolution mass measurements were achieved at a resolution power of 60,000 (m/z 400). For MS/MS experiments, resolution power was lowered to 7,500 (m/z 400).

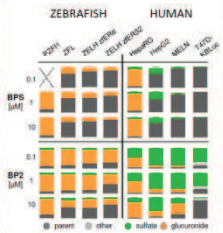
Results



Identification and rates (%) of metabolites produced in zebrafish and human cell models after 24 h incubation with BP2 or BPS.

Parent compound and metabolites	m/z [M-H]⁻	m/z Fragment ions	ZEBRAFISH			HUMAN			
			Hepatic			Hepatic		Mammary glands	
			Primary hepatocytes	ZFL	ZELH zfERα	HepaRG	HepG2	MELN	T47D -KBLuc
					Xenoestrogens screening			Xenoestrogens screening	
BP2 (1 µM)	245.0453		9.2 ± 1.5	11.1 ± 1.5	15.3 ± 1.3		2.7 ± 1.0	3.9 ± 1.3	20.5 ± 2.2
BP2-monoG1	421.0767	245.0451 175.0245	64.3 ± 1.2	77.0 ± 1.4	70.0 ± 1.1	48.8 ± 2.9			
BP2-monoG2	421.0768	245.0452 175.0246	5.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.8 ± 1.0	8.8 ± 0.6	18.0 ± 1.3	14.3 ± 1.8	
BP2-diG	597.1082	421.0767 245.0452	14.6 ± 0.5						
BP2-G-S			4.0 ± 0.5						
BP2-monoS	325.0013	245.0454	4.8 ± 0.4	7.0 ± 0.1	10.0 ± 2.0	43.6 ± 1.9	79.3 ± 1.5	81.2 ± 3.2	65.6 ± 2.3
other									13.9 ± 0.7
BPS (1 µM)	249.0226		11.5 ± 2.3	68.3 ± 3.2	74.4 ± 8.8	3.7 ± 1.1	63.7 ± 3.2	93.9 ± 1.4	98.5 ± 0.2
BPS-monoG	425.0540	249.0226 175.0247	88.9 ± 2.1	31.7 ± 5.2	25.6 ± 0.8	85.8 ± 0.6			
BPS-monoS	328.9788	249.0225	0.4 ± 0.2			10.5 ± 1.3	36.3 ± 2.9	6.1 ± 1.2	1.6 ± 0.2

G: glucuronide; S: sulfate; %: mean ± SEM



Conclusions

- This study provides new and relevant data concerning the **metabolism of BP2 and BPS in fish and human cell models**, enabling to **better characterize their biotransformation capabilities**, required for their use in the context of endocrine disruptors screening.
- BP2 and BPS are metabolized into **conjugated metabolites via phase 2 metabolism enzymes**. The identification of their metabolites indicate that cell models can be classified into **two groups**: **(1)** Human HepG2, MELN and T47D-KBLuc cells for which sulfate metabolites are predominant, **(2)** zebrafish and human HepaRG cells for which glucuronide metabolites are predominant. **Regarding the metabolism of BP2 and BPS, zebrafish cell models are closer to HepaRG, a human cell line known to be highly metabolically competent.**
- Work is now in progress to get complementary structural data by use of positive electrospray ionization for complete identification of minor metabolites.

References:

[1] Segner, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 149(2) (2009) 187-195
[2] Balmer et al., Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 953-962
[3] Fent et al., Environ Pollut., 158 (2010) 1817-1824
[4] Cosnefroy et al., Toxicol. Sci., 125(2) (2012) 439-449

Acknowledgements :

V. Le Fol doctoral fellowship was funded by INERIS and the NEMO project (French minister of environment)

Thanks to C. Guillouzo (INSERM U991, Rennes, France) who kindly provided the HepaRG cells and to P. Balaguer (INSERM U896, Montpellier, France) the MELN cells.

vincent.lefol@toulouse.inra.fr

Biotransformation and estrogenic activity of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in zebrafish *in vitro* and *in vivo* models

Le Fol V.[1,2], Aït-Aïssa S.[1], Perdu E.[2], Pallulel O.[1], Piccini B.[1], Cabaton N.[2], Debrauwer L.[3], Brion F.[1], Zalko D.[2]

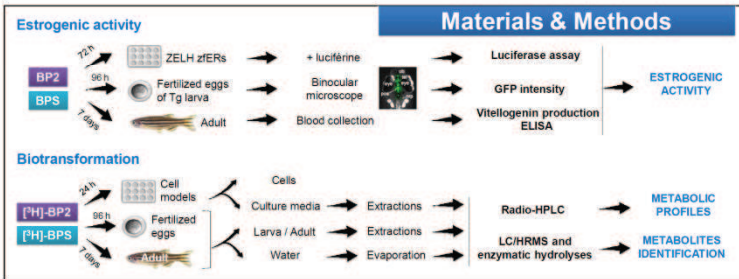
1. INERIS, ECOT unit, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France
2. INRA TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Metabolism of Xenobiotics team, F-31027 Toulouse, France
3. INRA TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Axiom-Metatoul, F-31027 Toulouse, France

vincent.lefol@toulouse.inra.fr

Background & Aim

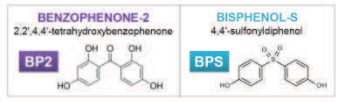
- Several human and aquatic vertebrate bioassays have been designed over the last years with the aim to **characterize the estrogenic potency of chemicals** [1]. However, the characterization of the **biotransformation capability of these biological models**, which enable taking into account bioactivation/detoxification processes in effect assessment, **is rarely reported**.
- INERIS lab has designed **novel zebrafish assays for xenoestrogens screening**: (1) **ZELH zfERs assays**: ERE-Luc and zebrafish ER transfected zebrafish hepatic cell line ZFL [2], (2) **EASZY assay**: transgenic larva expressing the GFP under the control of the *cyp19a1b* promoter, which gene is estrogeno-regulated an expressed in the brain [3].
- Benzophenones (UV filters) and Bisphenols are of major concern to human and wildlife health [4,5]. **Benzophenone-2** (BP2) and **Bisphenol-S** (BPS, a substitute for Bisphenol A) are xenoestrogens [6] and have been shown to disturb hormonal regulation in fish and/or rat models [7,8].
- **In this study, we used adult zebrafish, zebrafish hepatocytes in primary culture, ZELH-zfERs cells and the EASZY assay to examine in a global approach the fate and the estrogenic activity of BP2 and BPS.**

Materials & Methods



Zebrafish models					
In vivo		*In vitro*			
Adult	EASZY assay	PZFH	ZFL	ZELH zfERα	ZELH zfERβ2
Male	*cyp19a1b*-GFP larva	primary hepatocytes	hepatic cell line	ZFL + ERE-Luc + zfERα	ZFL + ERE-Luc + zfERβ2

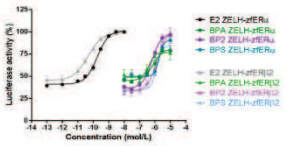
xenoestrogens screening assays



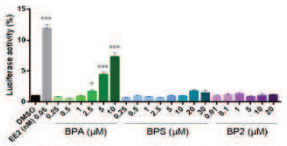
Results

Estrogenic activity of BP2 and BPS in zebrafish *in vivo* and *in vitro* assays

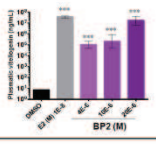
1. zfERα and zfERβ2 were activated by BP2 and BPS as Bisphenol A (BPA) in ZELH zfERs assays



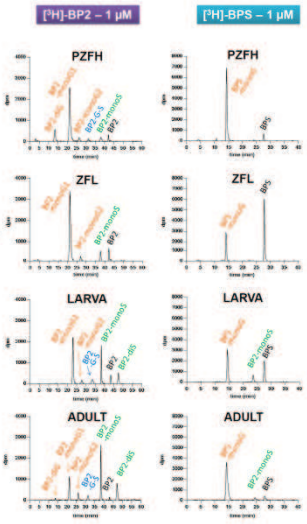
2. Contrary to BPA and other chemicals known to be estrogenic, BP2 and BPS did not induce estrogenic activity in the EASZY assay (*cyp19a1b*-GFP larva)



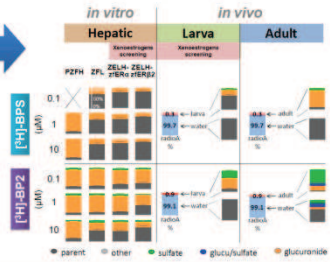
3. Vitellogenin plasmatic production was increased by BP2 in male adult zebrafish



Radio-HPLC metabolic profiles



Biotransformation of BP2 and BPS in zebrafish models



BP2 and BPS exhibited estrogenic activity in **ZELH zfERs** cells and **adult zebrafish** but did not disrupt estrogeno-regulated genes in **larva**.

May this be related to differences in biotransformation capabilities between zebrafish models ?

The rate of unchanged BP2 and BPS in ZELH zfERs and zebrafish larva is very similar.
For both chemicals, the similar biotransformation capabilities of zebrafish cells and larva did not explain the estrogenic difference.

For BP2 and BPS, metabolism was homogenous in zebrafish cell models. The stable transfections of ERE-Luc and zfERα or zfERβ2 in ZFL cell line did not modify the metabolic capability of the resulting ZELH zfERs cell lines.

Contrary to BPS, the rate of unchanged BP2 in ZELH-zfERs, larva and adult is similar.
In terms of biotransformation, are ZELH-zfERs and larva models substitutable to the adult model ?

Conclusions & Perspectives

- This study provides new data concerning the metabolism of BP2 and BPS in zebrafish *in vivo* and *in vitro* models, enabling a better characterization of the respective biotransformation capabilities of these models, as required for their use in the context of endocrine disruptors screening testing.
- Additional work on BP2 and BPS in zebrafish cells and larva models used for xenoestrogens screening demonstrates metabolic capabilities which are close to that of the highly metabolically competent human hepatic cell line HepaRG. Human MELN and T47D-KBLuc cells from mammary gland, also used for xenoestrogens testing, did not produce a similar pattern of metabolites.
- **These findings provide support for the use of these zebrafish cell lines and larva models in the testing of environmental contaminants which raise concerns in the field of endocrine disruption.**

References

[1] Segner, 2009
[2] Cosnefroy *et al.*, 2012
[3] Brion *et al.*, 2012
[4] Fromme *et al.*, 2002
[5] Fent *et al.*, 2009
[6] Molina-Molina *et al.*, 2013
[7] Hsieh *et al.*, 2007
[8] Naderi *et al.*, 2014

Bibliographie

AbuHammad, S. et Zihlif, M. (**2013**) Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics* 101, 213-220.

Ackermann, G.E., Brombacher, E. et Fent, K. (**2002**) Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environ Toxicol Chem* 21, 1864-1875.

Ahmed, S.A. (**2000**) The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* 150, 191-206.

Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R. et Hardy, M.P. (**2004**) Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145, 592-603.

Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Richards, F. et Gardner, I. (**2010**) Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica* 40, 547-557.

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquie, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E. et Nadal, A. (**2008**) Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 3, e2069.

AN. (**2014**) Commssion des affaires européennes de l'Assemblée Nationale, rapport d'information n° 1828. Perturbateurs endocriniens :l'urgence d'agir. DIAN 14/2014.

Andrade, A.J., Grande, S.W., Talsness, C.E., Gericke, C., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A. et Chahoud, I. (**2006**) A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* 228, 85-97.

Angus, W.G., Larsen, M.C. et Jefcoate, C.R. (**1999**) Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* 20, 947-955.

Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. et Panula, P. (**2006**) Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (Danio rerio). *J Comp Neurol* 498, 593-610.

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C. et Guillouzo, A. (**2006**) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug and Metabolism Disposition* 34, 75-83.

Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, N.D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovic, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.L. et Watanabe, K.H. (**2009**) Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat Toxicol* 92, 168-178.

ANSES. (**2009**) RAPPORT d'expertise collective Comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques». Groupe de travail « Perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3» 2009-SA-0331.

ANSES. (**2011**) Effets sanitaires du Bisphénol A. Saisines n° 2009-SA-0331 et n° 2010-SA-0197.

ANSES. (**2012**) AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,

de l'environnement et du travail relatif à une demande d'appui scientifique et technique concernant la révision de la stratégie européenne relative aux perturbateurs endocriniens. Saisine n° 2012-SA-0033.

ANSES. (**2013**) AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques liés au Bisphénol A (BPA) pour la santé humaine et aux données toxicologiques et d'usage des bisphénols S, F, M, B, AP, AF, et BADGE. Saisines n° 2009-SA-0331 et 2010-SA-0197.

Antherieu, S., Chesne, C., Li, R., Guguen-Guillouzo, C. et Guillouzo, A. (**2012**) Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 26, 1278-1285.

Anzenbacher, P. et Anzenbacherova, E. (**2001**) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 58, 737-747.

Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L. et Goldman, L.R. (**2007**) Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 115, 1670-1676.

Aranda, A. et Pascual, A. (**2001**) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269-1304.

Arnot, J.A., Mackay, D., Parkerton, T.E. et Bonnell, M. (**2008**) A database of fish biotransformation rates for organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 27, 2263-2270.

Arukwe, A. et Goksoyr, A. (**2003**) Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* 2, 4.

Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T.M., Mortensen, A.S. et Brakstad, O.G. (**2008**) Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (Danio rerio) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ Res* 107, 362-370.

Asakawa, A., Toyoshima, M., Harada, K.H., Fujimiya, M., Inoue, K. et Koizumi, A. (**2008**) The ubiquitous environmental pollutant perfluorooctanoicacid inhibits feeding behavior via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Int. J. Mol. Med.* 21, 439-445.

Atkinson, A. et Roy, D. (**1995**) In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 60-66.

Axelstad, M., Boberg, J., Hougaard, K.S., Christiansen, S., Jacobsen, P.R., Mandrup, K.R., Nellemann, C., Lund, S.P. et Hass, U. (**2011**) Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 250, 278-290.

Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C. et Casellas, C. (**1999**) Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total. Environ.* 233, 47-56.

Balmer, M.E., Buser, H.R., Muller, M.D. et Poiger, T. (**2005**) Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environ Sci Technol* 39, 953-962.

Barnhoorn, I.E., Bornman, M.S., Pieterse, G.M. et van Vuren, J.H. (**2004**) Histological evidence of intersex in feral sharptooth catfish (Clarias gariepinus) from an estrogen-polluted water source in Gauteng, South Africa. *Environ Toxicol* 19, 603-608.

Baudiffier, D., Hinfray, N., Vosges, M., Creusot, N., Chadili, E., Porcher, J.M., Schulz, R.W. et Brion, F. (**2012**) A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish. *Toxicology* 298, 30-39.

Becerra, V. et Odermatt, J. (**2012**) Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS. *Analyst* 137, 2250-2259.

Berry, M., Metzger, D. et Chambon, P. (**1990**) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811-2818.

Bertrand, S., Thisse, B., Tavares, R., Sachs, L., Chaumot, A., Bardet, P.L., Escriva, H., Duffraisse, M., Marchand, O., Safi, R., Thisse, C. et Laudet, V. (**2007**) Unexpected novel relational links uncovered by extensive developmental profiling of nuclear receptor expression. *PLoS Genet* 3, e188.

Bjorkblom, C., Olsson, P.E., Katsiadaki, I. et Wiklund, T. (**2007**) Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacolgy: CBP* 146, 431-442.

Bjornstrom, L. et Sjoberg, M. (**2005**) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19, 833-842.

Blum, J.L., Nyagode, B.A., James, M.O. et Denslow, N.D. (**2008**) Effects of the pesticide methoxychlor on gene expression in the liver and testes of the male largemouth bass (Micropterus salmoides). *Aquat Toxicol* 86, 459-469.

Blyler, G., Landreth, K.S. et Barnett, J.B. (**1994**) Gender-specific effects of prenatal chlordane exposure on myeloid cell development. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23, 188-193.

Board, P.G. et Menon, D. (**2013**) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3267-3288.

Boelsterli, A. (**2003**) Mechanistic toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets, *Taylor and Francis*, London and New York.

Borg, B., Timmers, R.J. et Lambert, J.G. (**1987**) Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus. I. Distribution and effects of season and photoperiod. *Exp. Biol.* 47, 63-68.

Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K.N. et Lanphear, B.P. (**2011**) Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* 128, 873-882.

Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfa, A., Marcomini, A. et Sumpter, J.P. (**2005**) Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 113, 721-728.

Brinkmann, M., Eichbaum, K., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Bui, T., Schaffer, A., Hollert, H. et Preuss, T.G. (**2014**) Understanding receptor-mediated effects in rainbow trout: in vitro-in vivo extrapolation using physiologically based toxicokinetic models. *Environ Sci Technol* 48, 3303-3309.

Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C. et Kah, O. (**2012**) Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS One* 7, e36069.

Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A. et Porcher, J.M. (**2002**) Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). *Environ Toxicol Chem* 21, 1699-1708.

Brucker-Davis, F., Thayer, K. et 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.

Bursztyka, J., Perdu, E., Pettersson, K., Pongratz, I., Fernandez-Cabrera, M., Olea, N., Debrauwer, L., Zalko, D. et Cravedi, J.P. (**2008**) Biotransformation of genistein and bisphenol A in cell lines used for screening endocrine disruptors. *Toxicol. In Vitro* 22, 1595-1604.

Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Carr, G.J., Cenijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hubler, N., Kleensang, A., Knobel, M., Kussatz, C., Legler, J., Lillicrap, A., Martinez-Jeronimo, F., Polleichtner, C., Rzodeczko, H., Salinas, E., Schneider, K.E., Scholz, S., van den Brandhof, E.J., van der Ven, L.T., Walter-Rohde, S., Weigt, S., Witters, H. et Halder, M. (**2014**) OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 496-511.

Cabaton, N., Chagnon, M.C., Lhuguenot, J.C., Cravedi, J.P. et Zalko, D. (**2006**) Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *J Agric Food Chem* 54, 10307-10314.

Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M. et Chagnon, M.C. (**2009**) Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 255, 15-24.

Cabaton, N., Zalko, D., Rathahao, E., Canlet, C., Delous, G., Chagnon, M.C., Cravedi, J.P. et Perdu, E. (**2008**) Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol In Vitro* 22, 1697-1704.

Cabaton, N.J., Canlet, C., Wadia, P.R., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., Sonnenschein, C., Cravedi, J.P., Rubin, B.S., Soto, A.M. et Zalko, D. (**2013**) Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 121, 586-593.

Cabaton, N.J., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Zalko, D., Schaeberle, C.M., Askenase, M.H., Gadbois, J.L., Tharp, A.P., Whitt, G.S., Sonnenschein, C. et Soto, A.M. (**2011**) Perinatal exposure to

environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119, 547-552.

Calafat, A.M., Wong, L.Y., Ye, X., Reidy, J.A. et Needham, L.L. (**2008**) Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004. *Environ Health Perspect* 116, 893-897.

Cao, M., Yang, Y., Xu, H., Duan, J., Cheng, N., Wang, J., Hu, W. et Zhao, H. (**2012**) Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, Gobiocypris rarus. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162, 163-170.

Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S. et Sezenna, E. (**2015**) Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 5711-5741.

Carou, M.E., Deguiz, M.L., Reynoso, R., Szwarcfarb, B., Carbone, S., Moguilevsky, J.A., Scacchi, P. et Ponzo, O.J. (**2009**) Impact of the UV-B filter 4-(Methylbenzylidene)-camphor (4-MBC) during prenatal development in the neuroendocrine regulation of gonadal axis in male and female adult rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 27, 410-414.

Casals-Casas, C. et Desvergne, B. (**2011**) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135-162.

Case, R.A. et Pearson, J.T. (**1954**) Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. II. Further consideration of the role of aniline and of the manufacture of auramine and magenta (fuchsine) as possible causative agents. *Br. J. Ind. Med.* 11, 213-216.

Chang, C.T., Chung, H.Y., Su, H.T., Tseng, H.P., Tzou, W.S. et Hu, C.H. (**2013**) Regulation of zebrafish CYP3A65 transcription by AHR2. *Toxicol Appl Pharmacol* 270, 174-184.

Chen, H., Hu, J., Yang, J., Wang, Y., Xu, H., Jiang, Q., Gong, Y., Gu, Y. et Song, H. (**2010**) Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat Toxicol* 96, 53-61.

Chen, M.Y., Ike, M. et Fujita, M. (**2002**) Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol* 17, 80-86.

Chighizola, C. et Meroni, P.L. (**2012**) The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 11, A493-501.

Chng, H.T., Ho, H.K., Yap, C.W., Lam, S.H. et Chan, E.C. (**2012**) An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of Zebrafish versus human. *J Biomol Screen* 17, 974-986.

Chou, W.C., Chen, J.L., Lin, C.F., Chen, Y.C., Shih, F.C. et Chuang, C.Y. (**2011**) Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ Health* 10, 94.

Christen, V. et Fent, K. (**2014**) Tissue-, sex- and development-specific transcription profiles of eight UDP-glucuronosyltransferase genes in zebrafish (Danio rerio) and their regulation by activator of aryl hydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol* 150, 93-102.

Colborn, T., vom Saal, F.S. et Soto, A.M. (**1993**) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.

Collodi, P., Kamei, Y., Ernst, T., Miranda, C., Buhler, D.R. et Barnes, D.W. (**1992**) Culture of cells from zebrafish (Brachydanio rerio) embryo and adult tissues. *Cell Biol Toxicol* 8, 43-61.

Collodi, P., Miranda, C.L., Zhao, X., Buhler, D.R. et Barnes, D.W. (**1994**) Induction of zebrafish (Brachydanio rerio) P450 in vivo and in cell culture. *Xenobiotica* 24, 487-493.

Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J.M., Balaguer, P. et Ait-Aissa, S. (**2009**) A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol. In Vitro* 23, 1450-1454.

Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P. et Ait-Aissa, S. (**2012**) Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci.* 125, 439-449.

Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C. et Barouki, R. (**2001**) Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res.* 61, 3942-3948.

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A. et Korach, K.S. (**1997**) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613-4621.

Cravedi, J.P. (**2002**) Role of biotransformation in the fate and toxicity of chemicals : consequences for the assessment of residues in fish. *Rev Med Vet* 153, 419-424.

Cravedi, J.P., Paris, A., Monod, G., Devaux, A., Flouriot, G. et Valotaire, Y. (**1996**) Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 241-246.

Cravedi, J.P. et Zalko, D. (**2005**) Metabolic fate of nonylphenols and related phenolic compounds in fish. In: T.P.M.a.T.W. Moon (Ed), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, *Elsevier*, pp. 153-169.

Creusot, N. (**2011**) Contribution de l'approche effect directred analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Chimie analytique et environnement, *Bordeaux I*.

Dasmahapatra, A.K., Doucet, H.L., Bhattacharyya, C. et Carvan, M.J., 3rd. (**2001**) Developmental expression of alcohol dehydrogenase (ADH3) in zebrafish (Danio rerio). *Biochem Biophys Res Commun* 286, 1082-1086.

De Guise, S., Lagace, A. et Beland, P. (**1994**) True hermaphroditism in a St. Lawrence beluga whale (Delphinapterus leucas). *J. Wildl. Dis.* 30, 287-290.

de Rijke, E., Essers, M.L., Rijk, J.C., Thevis, M., Bovee, T.F., van Ginkel, L.A. et Sterk, S.S. (**2013**) Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30, 1517-1526.

Della Torre, C., Monti, M., Focardi, S. et Corsi, I. (**2011**) Time-dependent modulation of cyp1a gene transcription and EROD activity by musk xylene in PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Toxicol In Vitro* 25, 1575-1580.

Dezentje, V.O., Guchelaar, H.J., Nortier, J.W., van de Velde, C.J. et Gelderblom, H. (**2009**) Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 15-21.

Diekmann, H. et Hill, A. (**2013**) ADMETox in zebrafish. *Drug Discovery Today: Disease Models* 10, e31-e35.

Dunn, J.F., Nisula, B.C. et Rodbard, D. (**1981**) Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 58-68.

Dyer, S.D., Bernhard, M.J., Cowan-Ellsberry, C., Perdu-Durand, E., Demmerle, S. et Cravedi, J.P. (**2009**) In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part II--Alcohol ethoxylate (C16EO8) and alcohol ethoxylate sulfate (C14EO2S) to estimate bioconcentration potential. *Chemosphere* 76, 989-998.

Eaton, D.L. et Gallagher, E.P. (**1994**) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 135-172.

Edlow, A.G., Chen, M., Smith, N.A., Lu, C. et McElrath, T.F. (**2012**) Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol* 34, 1-7.

EFSA. (**2010**) Scientific Report of the Endocrine Active Substances Task Force. In: E. Journal (Ed), *European Food Safety Authority*, p. 59 pp.

Eide, M., Rusten, M., Male, R., Jensen, K.H. et Goksoyr, 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* 147C, 7-17.

Ekins, S., Reschly, E.J., Hagey, L.R. et Krasowski, M.D. (**2008**) Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor. *BMC Evol Biol* 8, 103.

El-Sayed Ali, T., Abdel-Aziz, S.H., El-Sayed, A.F. et Zeid, S. (**2014**) Structural and functional effects of early exposure to 4-nonylphenol on gonadal development of Nile tilapia (Oreochromis niloticus): b-histological alterations in testes. *Fish Physiol Biochem* 40, 1495-1507.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V. et Habert, R. (**2015**) A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11-21.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Leonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T. et Whale, G. (**2010**) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97, 79-87.

Engel, S.M., Miodovnik, A., Canfield, R.L., Zhu, C., Silva, M.J., Calafat, A.M. et Wolff, M.S. (**2010**) Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ Health Perspect* 118, 565-571.

Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. et Rosenthal, O. (**1963**) The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex. *Biochem. Z.* 338, 741-755.

EU. (**2013**) Report on the protection of public health from endocrine disrupters (2012/2066(INI)). A7-0027/2013.

Facemire, C.F., Gross, T.S. et Guillette, L.J., Jr. (**1995**) Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4, 79-86.

Fent, K., Zenker, A. et Rapp, M. (**2010**) Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ Pollut* 158, 1817-1824.

Fini, J.B., Dolo, L., Cravedi, J.P., Demeneix, B. et Zalko, D. (**2009**) Metabolism of the endocrine disruptor BPA by Xenopus laevis tadpoles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1163, 394-397.

Fini, J.B., Riu, A., Debrauwer, L., Hillenweck, A., Le Mevel, S., Chevolleau, S., Boulahtouf, A., Palmier, K., Balaguer, P., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A. et Zalko, D. (**2012**) Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in Xenopus laevis and mammals: Xenopus as a model for endocrine perturbation studies. *Toxicol Sci* 125, 359-367.

Folch, J., Lees, M. et Stanley, G.H.S. (**1956**) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J. et Wenzel, A. (**2002**) Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 36, 1429-1438.

Frye, C.A., Bo, E., Calamandrei, G., Calza, L., Dessi-Fulgheri, F., Fernandez, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K. et Panzica, G.C. (**2012**) Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* 24, 144-159.

Funari, E., Zoppini, A., Verdina, A., De Angelis, G. et Vittozzi, L. (**1987**) Xenobiotic-metabolizing enzyme systems in test fish. I. Comparative studies of liver microsomal monooxygenases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13, 24-31.

Gallart-Ayala, H., Moyano, E. et Galceran, M.T. (**2011**) Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 683, 227-233.

Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L. et McManus, M.E. (**2006**) Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 90, 5-22.

Gao, J., Liu, S., Zhang, Y., Yuan, C., Yang, Y. et Wang, Z. (**2014**) Hepatic expression patterns of aryl hydrocarbon receptor, pregnane X receptor, two cytochrome P450s and five phase II metabolism genes responsive to 17alpha-methyltestosterone in rare minnow Gobiocypris rarus. *Environ Toxicol Pharmacol* 37, 1157-1168.

Garfinkel, D. (**1958**) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509.

Geens, T., Apelbaum, T.Z., Goeyens, L., Neels, H. et Covaci, A. (**2010**) Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 27, 1627-1637.

George, F.W. et Ojeda, S.R. (**1982**) Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology* 111, 522-529.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. et Laudet, V. (**2006**) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
Ghosh, C., Zhou, Y.L. et Collodi, P. (**1994**) Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell. Biol. Toxicol.* 10, 167-176.
Gibert, Y., Sassi-Messai, S., Fini, J.B., Bernard, L., Zalko, D., Cravedi, J.P., Balaguer, P., Andersson-Lendahl, M., Demeneix, B. et Laudet, V. (**2011**) Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. *BMC Dev Biol* 11.
Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Wuilloud, R.G., Clement, M.E. et Castro-Vazquez, A. (**2013**) Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail Pomacea canaliculata. *Environ Toxicol Chem* 32, 2365-2371.
Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jonsson, M.E., Nelson, D.R. et Stegeman, J.J. (**2010**) Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics* 11, 643.
Gorelick, D.A. et Halpern, M.E. (**2011**) Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish. *Endocrinology* 152, 2690-2703.
Gorelick, D.A., Iwanowicz, L.R., Hung, A.L., Blazer, V.S. et Halpern, M.E. (**2014**) Transgenic zebrafish reveal tissue-specific differences in estrogen signaling in response to environmental water samples. *Environ Health Perspect* 122, 356-362.
Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Masic, L. et Finel, M. (**2014**) Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*, 1-9.
Grans, J., Wassmur, B. et Celander, M.C. (**2010**) One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol* 100, 263-270.
Grignard, E., Lapenna, S. et Bremer, S. (**2012**) Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol. In Vitro* 26, 727-731.
Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. et Guguen-Guillouzo, C. (**2002**) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15655-15660.
Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. et Laudet, V. (**2004**) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
Guengerich, F.P. (**2003**) Activation of dihaloalkanes by thiol-dependent mechanisms. *J Biochem Mol Biol* 36, 20-27.
Guengerich, F.P. et Munro, A.W. (**2013**) Unusual cytochrome p450 enzymes and reactions. *J. Biol. Chem.* 288, 17065-17073.
Guillette, L.J., Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. et 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.
Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F. et Guguen-Guillouzo, C. (**2007**) The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 168, 66-73.
Guo, Y.L., Lambert, G.H. et Hsu, C.C. (**1995**) Growth abnormalities in the population exposed in utero and early postnatally to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6, 117-122.
Halden, A.N., Arnoldsson, K., Haglund, P., Mattsson, A., Ulleras, E., Sturve, J. et Norrgren, L. (**2011**) Retention and maternal transfer of brominated dioxins in zebrafish (Danio rerio) and effects on reproduction, aryl hydrocarbon receptor-regulated genes, and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. *Aquat Toxicol* 102, 150-161.
Halder, M., Leonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T. et Lillicrap, A. (**2010**) Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integr Environ Assess Manag* 6, 484-491.
Hall, J.M., Couse, J.F. et Korach, K.S. (**2001**) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869-36872.

Hall, J.M. et McDonnell, D.P. (**2005**) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5, 343-357.
Hanioka, N., Naito, T. et Narimatsu, S. (**2008**) Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74, 33-36.
Harrington, W.R., Sengupta, S. et Katzenellenbogen, B.S. (**2006**) Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Endocrinology* 147, 3843-3850.
Harris, R.M., Wood, D.M., Bottomley, L., Blagg, S., Owen, K., Hughes, P.J., Waring, R.H. et Kirk, C.J. (**2004**) Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1779-1787.
Hart, S.N., Li, Y., Nakamoto, K., Subileau, E.A., Steen, D. et Zhong, X.B. (**2010**) A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug and Metabolism Disposition* 38, 988-994.
Hashimoto, Y., Moriguchi, Y., Oshima, H., Kawaguchi, M., Miyazaki, K. et Nakamura, M. (**2001**) Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. *Toxicol In Vitro* 15, 421-425.
Hawkins, M.B. et Thomas, P. (**2004**) The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERbetaa are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, 2968-2977.
Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A. et Thomas, P. (**2000**) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10751-10756.
Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. et Vonk, A. (**2003**) Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (Rana pipiens): laboratory and field evidence. *Environ Health Perspect* 111, 568-575.
Hein, D.W., McQueen, C.A., Grant, D.M., Goodfellow, G.H., Kadlubar, F.F. et Weber, W.W. (**2000**) Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases: a symposium in honor of Wendell W. Weber. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1425-1432.
Hewitt, N.J. et Hewitt, P. (**2004**) Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34, 243-256.
Hillenweck, A., Canlet, C., Mauffret, A., Debrauwer, L., Claireaux, G. et Cravedi, J.P. (**2008**) Characterization of biliary metabolites of fluoranthene in the common sole (Solea solea). *Environ Toxicol Chem* 27, 2575-2581.
Hines, E.P., White, S.S., Stanko, J.P., Gibbs-Flournoy, E.A., Lau, C. et Fenton, S.E. (**2009**) Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 97-105.
Hinfray, N., Baudiffier, D., Leal, M.C., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., Le Gac, F., Schulz, R.W. et Brion, F. (**2011**) Characterization of testicular expression of P450 17alpha-hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 309-317.
Hinfray, N., Porcher, J.M. et Brion, F. (**2006**) Inhibition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144, 252-262.
Hohenberger, J., Ray, K. et Meyer, K. (**2012**) The biology and chemistry of high-valent iron-oxo and iron-nitrido complexes. *Nat Commun* 3, 720.
Hoppe, A.A. et Carey, G.B. (**2007**) Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 15, 2942-2950.
Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L. et Gray, L.E. (**2008**) Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105, 235-259.
Hsieh, M.H., Grantham, E.C., Liu, B., Macapagal, R., Willingham, E. et Baskin, L.S. (**2007**) In utero exposure to benzophenone-2 causes hypospadias through an estrogen receptor dependent mechanism. *J. Urol.* 178, 1637-1642.

Hsu, H.J., Lin, G. et Chung, B.C. (**2003**) Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and ff1b. *Development* 130, 2107-2116.
Huang, H. et Wu, Q. (**2010**) Cloning and comparative analyses of the zebrafish Ugt repertoire reveal its evolutionary diversity. *PLoS One* 5, e9144.
Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Woo, J.G., Loftus, J., Alexander, J.W. et Ben-Jonathan, N. (**2008**) Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 116, 1642-1647.
Huijbers, M.M., Montersino, S., Westphal, A.H., Tischler, D. et van Berkel, W.J. (**2014**) Flavin dependent monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 544, 2-17.
Ibabe, A., Herrero, A. et 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.
Jacobs, M.N., Laws, S.C., Willett, K., Schmieder, P., Odum, J. et Bovee, T.F. (**2013**) In vitro metabolism and bioavailability tests for endocrine active substances: what is needed next for regulatory purposes? *ALTEX* 30, 331-351.
Jaeg, J.P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Cravedi, J.P. et Zalko, D. (**2004**) Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J Agric Food Chem* 52, 4935-4942.
James, M.O., Lou, Z., Rowland-Faux, L. et Celander, M.C. (**2005**) Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. *Aquat Toxicol* 72, 361-371.
Jancova, P., Anzenbacher, P. et Anzenbacherova, E. (**2010**) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154, 103-116.
Janosek, J., Hilscherova, K., Blaha, L. et Holoubek, I. (**2006**) Environmental xenobiotics and nuclear receptors--interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol In Vitro* 20, 18-37.
Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., Kobori, L. et Vereczkey, L. (**2008**) Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 22, 961-967.
Jeng, H.A. (**2014**) Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Front Public Health* 2, 1-12.
Jeon, H.K., Chung, Y. et Ryu, J.C. (**2006**) Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1131, 192-202.
Jeon, H.K., Sarma, S.N., Kim, Y.J. et Ryu, J.C. (**2008**) Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats. *Toxicology* 248, 89-95.
Ji, K., Hong, S., Kho, Y. et Choi, K. (**2013**) Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8793-8800.
Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M.F., Olea, N. et Vilchez, J.L. (**2010**) Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 3363-3369.
Johanning, K., Hancock, G., Escher, B., Adekola, A., Bernhard, M.J., Cowan-Ellsberry, C., Domoradzki, J., Dyer, S., Eickhoff, C., Embry, M., Erhardt, S., Fitzsimmons, P., Halder, M., Hill, J., Holden, D., Johnson, R., Rutishauser, S., Segner, H., Schultz, I. et Nichols, J. (**2012**) Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver S9 fraction. *Current Protocols in Toxicology* Chapter 14, Unit 14 10 11-28.
Johansson, N., Viberg, H., Fredriksson, A. et Eriksson, P. (**2008**) Neonatal exposure to deca-brominated diphenyl ether (PBDE 209) causes dose-response changes in spontaneous behaviour and cholinergic susceptibility in adult mice. *Neurotoxicology* 29, 911-919.
Jones, H.S., Panter, G.H., Hutchinson, T.H. et Chipman, J.K. (**2010**) Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae in vivo. *Zebrafish* 7, 23-30.
Jones, H.S., Trollope, H.T., Hutchinson, T.H., Panter, G.H. et Chipman, J.K. (**2009**) Assessment of an ibuprofen metabolism by zebrafish larvae, using liquid chromatographyâ€“mass spectrometry (LCâ€“MS). *Toxicology* 262, 14-15.

Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C. et Braunbeck, T. (**2013**) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (Danio rerio) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquat Toxicol* 140-141, 229-238.

Kanebratt, K.P. et Andersson, T.B. (**2008**) Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug and Metabolism Disposition* 36, 1444-1452.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. et 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. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 715-740.

Kim, Y., Ryu, J.C., Choi, H.S. et Lee, K. (**2011**) Effect of 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2) on steroidogenesis in testicular Leydig cells. *Toxicology* 288, 18-26.

Kinch, C.D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.H., Habibi, H.R. et Kurrasch, D.M. (**2015**) Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1475-1480.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H. et Ohta, S. (**2005**) Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* 84, 249-259.

Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakamura, Y. et Zembutsu, H. (**2012**) Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet* 27, 122-131.

Kliewer, S.A., Lehmann, J.M. et Willson, T.M. (**1999**) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284, 757-760.

Klingenberg, M. (**1958**) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386.

Knowles, B.B., Howe, C.C. et Aden, D.P. (**1980**) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.

Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinlay, R., Orton, F. et Rosivatz, E. (**2011**) State of the art assessment of endocrine disrupters.

Kriegstein, A. et Alvarez-Buylla, A. (**2009**) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149-184.

Kubota, A., Bainy, A.C., Woodin, B.R., Goldstone, J.V. et 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.

Kunz, P.Y., Galicia, H.F. et Fent, K. (**2006**) Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicol Sci* 90, 349-361.

Kurogi, K., Dillon, J., Nasser, A., Liu, M.Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M. et Liu, M.C. (**2010**) Sulfation of Drug Compounds by the Zebrafish Cytosolic Sulfotransferases (SULTs). *Drug Metabolism Letters* 4, 62-68.

Kurogi, K., Liu, T.A., Sakakibara, Y., Suiko, M. et Liu, M.C. (**2013**) The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. *Drug. Metab. Rev.* 45, 431-440.

Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T. et Terao, Y. (**2005**) Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 121-130.

Kuuranne, T., Leinonen, A., Schanzer, W., Kamber, M., Kostiainen, R. et Thevis, M. (**2008**) Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes. *Drug Metab. Dispos.* 36, 571-581.

Kwok, H.F., So, W.K., Wang, Y. et Ge, W. (**2005**) Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors--evidence for their distinct functions in follicle development. *Biol. Reprod.* 72, 1370-1381.

Lahvis, G.P., Wells, R.S., Kuehl, D.W., Stewart, J.L., Rhinehart, H.L. et Via, C.S. (**1995**) Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4, 67-72.

Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B. et Melzer, D. (**2008**) Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300, 1303-1310.

Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R. et Iguchi, T. (**2012**) Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquat Toxicol* 109, 250-258.

Lassurguere, J., Livera, G., Habert, R. et Jegou, B. (**2003**) Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 73, 160-169.

Laudet, V. (**1997**) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207-226.

Laurenzana, E.M., Balasubramanian, G., Weis, C., Blaydes, B., Newbold, R.R. et Delclos, K.B. (**2002**) Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. *Chem. Biol. Interact.* 139, 23-41.

Lavado, R., Aparicio-Fabre, R. et Schlenk, D. (**2013**) Effects of salinity acclimation on the pesticide-metabolizing enzyme flavin-containing monooxygenase (FMO) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 157, 9-15.

Lavado, R., Aparicio-Fabre, R. et Schlenk, D. (**2014**) Effects of salinity acclimation on the expression and activity of Phase I enzymes (CYP450 and FMOs) in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Fish Physiol Biochem* 40, 267-278.

Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C. et Porcher, J.M. (**2004**) Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41-55.

Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J.M. et Ait-Aissa, S. (**2006**) Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98-108.

Le Fol, V., Ait-Aissa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F. et 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.

Lee, H.R., Jeung, E.B., Cho, M.H., Kim, T.H., Leung, P.C. et Choi, K.C. (**2013**) Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *J Cell Mol Med* 17, 1-11.

Lee, Y.J., Ryu, H.Y., Kim, H.K., Min, C.S., Lee, J.H., Kim, E., Nam, B.H., Park, J.H., Jung, J.Y., Jang, D.D., Park, E.Y., Lee, K.H., Ma, J.Y., Won, H.S., Im, M.W., Leem, J.H., Hong, Y.C. et Yoon, H.S. (**2008**) Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 25, 413-419.

Legler, J., Broekhof, J.L.M., Brouwer, A., Lanser, P.H., Murk, A.J., Van Der Saag, P., Vethaak, A.D., Wester, P., Zivkovic, D. et Van der Burg, B. (**2000**) A Novel in Vivo Bioassay for (Xeno-)estrogens Using Transgenic Zebrafish. *Environ Sci Technol* 34, 4410-4415.

Legler, J., van den Brink, C.E., Brouwer, A., Murk, A.J., van der Saag, P.T., Vethaak, A.D. et van der Burg, B. (**1999**) Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 48, 55-66.

Lephart, E.D., Simpson, E.R., McPhaul, M.J., Kilgore, M.W., Wilson, J.D. et Ojeda, S.R. (**1992**) Brain aromatase cytochrome P-450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 16, 187-192.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.B., Nakata, H. et Kannan, K. (**2012a**) Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol* 46, 6860-6866.

Liao, C., Liu, F. et Kannan, K. (**2012b**) Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ Sci Technol* 46, 6515-6522.

Lin, H.K., Altuwaijri, S., Lin, W.J., Kan, P.Y., Collins, L.L. et Chang, C. (**2002**) Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor

nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 36570-36576.
Lindholst, C., Wynne, P.M., Marriott, P., Pedersen, S.N. et Bjerregaard, P. (**2003**) Metabolism of bisphenol A in zebrafish (Danio rerio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in relation to estrogenic response. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135, 169-177.
Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y. et Miao, J. (**2014**) Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam Ruditapes philippinarum exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 251-259.
Liu, T.A., Bhuiyan, S., Liu, M.Y., Sugahara, T., Sakakibara, Y., Suiko, M., Yasuda, S., Kakuta, Y., Kimura, M., Williams, F.E. et Liu, M.C. (**2010**) Zebrafish as a model for the study of the phase II cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab* 11, 538-546.
Lohr, H. et Hammerschmidt, M. (**2011**) Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 183-211.
Lonard, D.M. et O'Malley, B.W. (**2012**) Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 8, 598-604.
Lorenzen, A. et Kennedy, S.W. (**1993**) A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214, 346-348.
Malatesta, P. et Gotz, M. (**2013**) Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* 140, 483-486.
Maltais, A. (**2006**) Analyse structurale et fonctionnelle du récepteur nucléaire orphelin NOR-1 et inactivation du gène chez la souris. *Université de Laval*, Laval.
Mansfield, K.G. et Land, E.D. (**2002**) Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence, features, and influence of genetic restoration. *J. Wildl. Dis.* 38, 693-698.
Mansuy, D. (**1998**) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 5-14.
Massei, R., Vogs, C., Renner, P., Altenburger, R. et Scholz, S. (**2015**) Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (Danio rerio): The role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. *Aquat Toxicol* 166, 36-41.
Matthews, J., Celius, T., Halgren, R. et Zacharewski, T. (**2000**) Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 223-234.
Matthews, J.B., Twomey, K. et Zacharewski, T.R. (**2001**) In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149-157.
Mayer, I., Borg, B., Berglund, I. et Lambert, J.G. (**1991**) Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 86-92.
McDonnell, D.P. et Wardell, S.E. (**2010**) The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. *Curr Opin Pharmacol* 10, 620-628.
McKinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N. et Voulvoulis, N. (**2008**) Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ Int* 34, 168-183.
Meeker, J.D. (**2012**) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 166, E1-7.
Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O. et Pakdel, F. (**2002**) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66, 1881-1892.
Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F. et Kah, O. (**2005**) Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485, 304-320.
Michalowicz, J. (**2014**) Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* 37, 738-758.
Michielsen, C.P., Bloksma, N., Ultee, A., van Mil, F. et Vos, J.G. (**1997**) Hexachlorobenzene-induced immunomodulation and skin and lung lesions: a comparison between brown Norway, Lewis, and Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 12-26.

Milnes, M.R., Garcia, A., Grossman, E., Grun, F., Shiotsugu, J., Tabb, M.M., Kawashima, Y., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T. et 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.

Miodovnik, A., Engel, S.M., Zhu, C., Ye, X., Soorya, L.V., Silva, M.J., Calafat, A.M. et Wolff, M.S. (**2011**) Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 32, 261-267.

Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W. et 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.

Miranda, C.L., Henderson, M.C. et Buhler, D.R. (**1998**) Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s. *Toxicol Appl Pharmacol* 148, 237-244.

Miyagawa, S., Lange, A., Hirakawa, I., Tohyama, S., Ogino, Y., Mizutani, T., Kagami, Y., Kusano, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Ohta, Y., Katsu, Y., Tyler, C.R. et Iguchi, T. (**2014**) Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5254-5263.

Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J.M., Real, M., Fernandez, M.F., Balaguer, P. et Olea, N. (**2013**) In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127-136.

Molina-Molina, J.M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Aissa, S. et Balaguer, P. (**2008**) Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 384-395.

Molina-Molina, J.M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J.P., Fernandez, M.F., Pillon, A., Nicolas, J.C., Olea, N. et Balaguer, P. (**2006**) Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 216, 44-54.

Mortensen, A.S., Tolfsen, C.C. et Arukwe, A. (**2006**) Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (Oncorhynchus Mykiss) primary hepatocyte culture. *J Toxicol Environ Health A* 69, 1-19.

Naderi, M., Wong, M.Y. et Gholami, F. (**2014**) Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol.* 148, 195-203.

Nagao, T., Kawachi, K., Kagawa, N. et Komada, M. (**2014**) Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. *J. Toxicol. Sci.* 39, 231-235.

Nagler, J.J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D.G. et Rexroad, C., 3rd. (**2007**) The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ERalpha2 and both ERbeta isoforms. *Gene* 392, 164-173.

Nakagawa, Y. et Suzuki, T. (**2002**) Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* 139, 115-128.

Nakagawa, Y., Suzuki, T. et Tayama, S. (**2000**) Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. *Toxicology* 156, 27-36.

Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T. et Ishikawa, T. (**2006**) Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 437-457.

Navas, J.M. et Segner, H. (**2006**) Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquat Toxicol* 80, 1-22.

Negri-Cesi, P. (**2015**) Bisphenol A interaction with brain development and functions. *Dose-Response* 13, 1-13.

Nelson, E.R. et Habibi, H.R. (**2010**) Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology* 151, 1668-1676.

Ng, A.N., de Jong-Curtain, T.A., Mawdsley, D.J., White, S.J., Shin, J., Appel, B., Dong, P.D., Stainier, D.Y. et Heath, J.K. (**2005**) Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev. Biol.* 286, 114-135.

Nichols, J.W., McKim, J.M., Andersen, M.E., Gargas, M.L., Clewell, H.J., 3rd et Erickson, R.J. (**1990**) A physiologically based toxicokinetic model for the uptake and disposition of waterborne organic chemicals in fish. *Toxicol Appl Pharmacol* 106, 433-447.

Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. et Gustafsson, J.A. (**2001**) Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535-1565.

Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Kaku, T., Takahashi, E., Ohkubo, Y., Sekine, K., Hiratsuka, A., Kadota, S. et Watabe, T. (**2002**) Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 17, 221-228.

North, T.E., Babu, I.R., Vedder, L.M., Lord, A.M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Zon, L.I. et Goessling, W. (**2010**) PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17315-17320.

Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R. et Garric, J. (**2006**) Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. *Environ Toxicol* 21, 324-331.

OCDE. (**2008**) The use of Metabolising systems for in vitro testing of endocrine disruptors. In: N. OECD series on testing and assessment (Ed).

OCDE. (**2012**) In vitro metabolism and bioavailability tests for endocrine active substances and endocrine disruptors: what is needed next for regulatory purposes ? , Paris, France.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J. et Tyler, C.R. (**2009**) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2047-2062.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. et Kato, S. (**2003**) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.

Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. et Sonnenschein, C. (**1996**) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104, 298-305.

OMS. (**2002**) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2.

OMS. (**2009**) World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. *Environmental Health Criteria 240*.

Omura, T. et Sato, R. (**1962**) A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375-1376.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (**1995**) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.

Ortiz de Montellano, P.R. (**2013**) Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Med Chem* 5, 213-228.

Oskam, I.C., Ropstad, E., Dahl, E., Lie, E., Derocher, A.E., Wiig, O., Larsen, S., Wiger, R. et Skaare, J.U. (**2003**) Organochlorines affect the major androgenic hormone, testosterone, in male polar bears (Ursus maritimus) at Svalbard. *J Toxicol Environ Health A* 66, 2119-2139.

Ottinger, M.A., Lavoie, E., Thompson, N., Barton, A., Whitehouse, K., Barton, M., Abdelnabi, M., Quinn, M., Jr., Panzica, G. et Viglietti-Panzica, C. (**2008**) Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Res Rev* 57, 376-385.

Pang, P.K. (**1971**) Calcitonin and ultimobranchial glands in fishes. *J. Exp. Zool.* 178, 89-99.

Panula, P., Chen, Y.C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M. et Sallinen, V. (**2010**) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* 40, 46-57.

Pappas, T.C., Gametchu, B. et Watson, C.S. (**1995**) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9, 404-410.

Park, S.K., Son, H.K., Lee, S.K., Kang, J.H., Chang, Y.S., Jacobs, D.R. et Lee, D.H. (**2010**) Relationship between serum concentrations of organochlorine pesticides and metabolic syndrome among non-diabetic adults. *J Prev Med Public Health* 43, 1-8.

Pearson, G. et Wienkers, L. (**2009**) Handbook of drug metabolism, *informa healthcare,* New York and London.

Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V. et Olea, N. (**1998**) The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 106, 167-174.

Pery, A.R., Devillers, J., Brochot, C., Mombelli, E., Palluel, O., Piccini, B., Brion, F. et Beaudouin, R. (**2014**) A physiologically based toxicokinetic model for the zebrafish Danio rerio. *Environ Sci Technol* 48, 781-790.

Pesonen, M. et Andersson, T. (**1991**) Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica* 21, 461-471.

Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S. et Tollefsen, K.E. (**2013**) Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquat Toxicol* 138-139, 88-97.

Pfeiffer, E. et Metzler, M. (**2004**) Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Arch Toxicol* 78, 369-377.

Pietras, R.J. et Szego, C.M. (**1977**) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265, 69-72.

Pinto, L. et Gotz, M. (**2007**) Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 83, 2-23.

Piotrowska, H., Kucinska, M. et Murias, M. (**2013**) Expression of CYP1A1, CYP1B1 and MnSOD in a panel of human cancer cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* 383, 95-102.

Pons, M., Gagne, D., Nicolas, J.C. et Mehtali, M. (**1990**) A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules. *BioTechniques* 9, 450-459.

Queiroz, M.L., Bincoletto, C., Perlingeiro, R.C., Quadros, M.R. et Souza, C.A. (**1998**) Immunoglobulin levels in workers exposed to hexachlorobenzene. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 172-175.

Queiroz, M.L., Bincoletto, C., Perlingeiro, R.C., Souza, C.A. et Toledo, H. (**1997**) Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 322-326.

Raldua, D., Thienpont, B. et Babin, P.J. (**2012**) Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reprod Toxicol* 33, 188-197.

Raut, S.A., Howell, W.M. et Angus, R.A. (**2011**) Endocrine-disrupting effects of spironolactone in female western mosquitofish, Gambusia affinis. *Environ Toxicol Chem* 30, 1376-1382.

Razandi, M., Alton, G., Pedram, A., Ghonshani, S., Webb, P. et Levin, E.R. (**2003**) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1633-1646.

Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L. et Levin, E.R. (**1999**) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13, 307-319.

Reimers, M.J., Hahn, M.E. et Tanguay, R.L. (**2004**) Two zebrafish alcohol dehydrogenases share common ancestry with mammalian class I, II, IV, and V alcohol dehydrogenase genes but have distinct functional characteristics. *J. Biol. Chem.* 279, 38303-38312.

Reschly, E.J., Bainy, A.C., Mattos, J.J., Hagey, L.R., Bahary, N., Mada, S.R., Ou, J., Venkataramanan, R. et Krasowski, M.D. (**2007**) Functional evolution of the vitamin D and pregnane X receptors. *BMC Evol Biol* 7, 222.

Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., Balaguer, P. et Zalko, D. (**2011**) Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci* 122, 372-382.

Rochester, J.R. (**2013**) Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42, 132-155.

Rogers, J.A., Metz, L. et Yong, V.W. (**2013**) Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 53, 421-430.
Rogers, J.M. et Denison, M.S. (**2000**) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitr Mol Toxicol* 13, 67-82.
Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R. et Livera, G. (**2015**) Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Frontiers in Endocrinology* 6, 58.
Routledge, E.J. et Sumpter, J.P. (**1996**) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15, 241-248.
Rubin, M.M. (**2007**) Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns. *Obstet. Gynecol. Surv.* 62, 548-555.
Safe, S., Wormke, M. et Samudio, I. (**2000**) Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 295-306.
Sanseverino, J., Eldridge, M.L., Layton, A.C., Easter, J.P., Yarbrough, J., Schultz, T.W. et Sayler, G.S. (**2009**) Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. *Toxicol Sci* 107, 122-134.
Schlecht, C., Klammer, H., Frauendorf, H., Wuttke, W. et Jarry, H. (**2008**) Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. *Toxicology* 245, 11-17.
Schlenk, D. (**1995**) Use of aquatic organisms as models to determine the in vivo contribution of flavin-containing monooxygenases in xenobiotic biotransformation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4, 323-330.
Schlenk, D. (**1998**) Occurrence of flavin-containing monooxygenases in non-mammalian eukaryotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 185-195.
Schlenk, D. et Buhler, D.R. (**1991**) Flavin-containing monooxygenase activity in liver microsomes from the rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *Aquat Toxicol* 20, 13-24.
Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B. et Lichtensteiger, W. (**2001**) In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 109, 239-244.
Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W. et Lichtensteiger, W. (**2004**) Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology* 205, 113-122.
Schmieder, P.K., Tapper, M.A., Denny, J.S., Kolanczyk, R.C., Sheedy, B.R., Henry, T.R. et Veith, G.D. (**2004**) Use of trout liver slices to enhance mechanistic interpretation of estrogen receptor binding for cost-effective prioritization of chemicals within large inventories. *Environ Sci Technol* 38, 6333-6342.
Schmutzler, C., Bacinski, A., Gotthardt, I., Huhne, K., Ambrugger, P., Klammer, H., Schlecht, C., Hoang-Vu, C., Gruters, A., Wuttke, W., Jarry, H. et Kohrle, J. (**2007**) The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148, 2835-2844.
Scholz, S. et Mayer, I. (**2008**) Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293, 57-70.
Schreurs, R.H., Sonneveld, E., Jansen, J.H., Seinen, W. et van der Burg, B. (**2005**) Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicol Sci* 83, 264-272.
Scornaienchi, M.L., Thornton, C., Willett, K.L. et Wilson, J.Y. (**2010a**) Cytochrome P450-mediated 17beta-estradiol metabolism in zebrafish (Danio rerio). *J Endocrinol* 206, 317-325.
Scornaienchi, M.L., Thornton, C., Willett, K.L. et Wilson, J.Y. (**2010b**) Functional differences in the cytochrome P450 1 family enzymes from zebrafish (Danio rerio) using heterologously expressed proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 502, 17-22.
Segner, H. (**2009**) Zebrafish (Danio rerio) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149, 187-195.
Segner, H. et Cravedi, J.P. (**2001**) Metabolic activity in primary cultures of fish hepatocytes. *Alternatives to Laboratory Animals* 29, 251-257.

Siiteri, P.K., Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. et Kuhn, R.W. (**1982**) The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 38, 457-510.
Simpson, E.R. (**2004**) Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin Reprod Med* 22, 11-23.
Smink, A., Ribas-Fito, N., Garcia, R., Torrent, M., Mendez, M.A., Grimalt, J.O. et Sunyer, J. (**2008**) Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy increases the risk of overweight in children aged 6 years. *Acta Paediatr.* 97, 1465-1469.
Smith, C.L., Nawaz, Z. et O'Malley, B.W. (**1997**) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11, 657-666.
Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H. et Jiang, G. (**2014**) Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere* 112, 275-281.
Song, W.C. (**2001**) Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 948, 43-50.
Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G. et Theobald, N. (**2003**) Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environ Pollut* 124, 497-507.
Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. et Braunbeck, T. (**2012**) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33, 128-132.
Stroheker, T., Picard, K., Lhuguenot, J.C., Canivenc-Lavier, M.C. et Chagnon, M.C. (**2004**) Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 42, 887-897.
Sugahara, T., Yang, Y.S., Liu, C.C., Pai, T.G. et Liu, M.C. (**2003**) Sulphonation of dehydroepiandrosterone and neurosteroids: molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel zebrafish SULT2 cytosolic sulphotransferase. *Biochem. J.* 375, 785-791.
Suiko, M., Sakakibara, Y. et Liu, M.C. (**2000**) Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 80-84.
Sunyer, J., Torrent, M., Garcia-Esteban, R., Ribas-Fito, N., Carrizo, D., Romieu, I., Anto, J.M. et Grimalt, J.O. (**2006**) Early exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene, breastfeeding and asthma at age six. *Clin. Exp. Allergy* 36, 1236-1241.
Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N. et Ohta, S. (**2005**) Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 9-17.
Sverrisdottir, E., Lund, T.M., Olesen, A.E., Drewes, A.M., Christrup, L.L. et Kreilgaard, M. (**2015**) A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *Eur. J. Pharm. Sci.* 74, 45-62.
Swedenborg, E., Ruegg, J., Makela, S. et Pongratz, I. (**2009**) Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J. Mol. Endocrinol.* 43, 1-10.
Szaefer, H., Licznerska, B., Krajka-Kuzniak, V., Bartoszek, A. et Baer-Dubowska, W. (**2012**) Modulation of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 expression by cabbage juices and indoles in human breast cell lines. *Nutr. Cancer* 64, 879-888.
Szego, C.M. et Davis, J.S. (**1967**) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 1711-1718.
Tabata, A. (**2004**) The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (Oryzias latipes). *Water Sci Technol* 50, 125-132.
Tchoudakova, A. et Callard, G.V. (**1998**) Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139, 2179-2189.
Tchoudakova, A., Pathak, S. et Callard, G.V. (**1999**) Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, Carassius auratus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 388-400.
Teng, Q., Ekman, D.R., Huang, W. et Collette, T.W. (**2013**) Impacts of 17alpha-ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (Danio rerio) liver cells. *Aquat Toxicol* 130-131, 184-191.

Thibaut, R. et Porte, C. (**2004**) Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 485-494.
Thibaut, R., Schnell, S. et Porte, C. (**2009**) Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines. *Cell Biol Toxicol* 25, 611-622.
Thomas, P. (**2012**) Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 367-383.
Thomas, P., Alyea, R., Pang, Y., Peyton, C., Dong, J. et Berg, A.H. (**2010**) Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids* 75, 595-602.
Tollefsen, K.E. (**2002**) Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquat Toxicol* 56, 215-225.
Tollefsen, K.E., Meys, J.F., Frydenlund, J. et Stenersen, J. (**2002**) Environmental estrogens interact with and modulate the properties of plasma sex steroid-binding proteins in juvenile Atlantic salmon (Salmo salar). *Mar Environ Res* 54, 697-701.
Tollefsen, K.E., Ovrevik, J. et Stenersen, J. (**2004**) Binding of xenoestrogens to the sex steroid-binding protein in plasma from Arctic charr (Salvelinus alpinus L.). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 139, 127-133.
Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O. et Chung, B.C. (**2009**) A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67-73.
Toran-Allerand, C.D., Guan, X., MacLusky, N.J., Horvath, T.L., Diano, S., Singh, M., Connolly, E.S., Jr., Nethrapalli, I.S. et Tinnikov, A.A. (**2002**) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 22, 8391-8401.
Tseng, H.P., Hseu, T.H., Buhler, D.R., Wang, W.D. et Hu, C.H. (**2005**) Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicol Appl Pharmacol* 205, 247-258.
Turyk, M., Anderson, H., Knobeloch, L., Imm, P. et Persky, V. (**2009**) Organochlorine exposure and incidence of diabetes in a cohort of Great Lakes sport fish consumers. *Environ Health Perspect* 117, 1076-1082.
UE. (**1996**) Impact des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine et l'environnement.
UE. (**2010**) Directive 2010/63/EU of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
Van den Belt, K., Verheyen, R. et Witters, H. (**2003**) Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 271-281.
Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. et Myers, J.P. (**2012**) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378-455.
Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. et Soto, A.M. (**2009**) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* 30, 75-95.
Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Wadia, P.R., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. et Soto, A.M. (**2007**) Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148, 116-127.
Vaudry, H., Do Rego, J.C., Le Mevel, J.C., Chatenet, D., Tostivint, H., Fournier, A., Tonon, M.C., Pelletier, G., Conlon, J.M. et Leprince, J. (**2010**) Urotensin II, from fish to human. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1200, 53-66.
Viberg, H., Fredriksson, A., Buratovic, S. et Eriksson, P. (**2011**) Dose-dependent behavioral disturbances after a single neonatal Bisphenol A dose. *Toxicology* 290, 187-194.
Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N. et Hernandez-Cordoba, M. (**2010**) Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass

spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal Bioanal Chem* 397, 115-125.

Vine, M.F., Stein, L., Weigle, K., Schroeder, J., Degnan, D., Tse, C.K., Hanchette, C. et Backer, L. (**2000**) Effects on the immune system associated with living near a pesticide dump site. *Environ Health Perspect* 108, 1113-1124.

vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S. et Welshons, W.V. (**1998**) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health* 14, 239-260.

Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B.C., Combarnous, Y., Porcher, J.M., Kah, O. et Brion, F. (**2010**) 17alpha-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat Toxicol* 99, 479-491.

Wang-Buhler, J.L., Lee, S.J., Chung, W.G., Stevens, J.F., Tseng, H.P., Hseu, T.H., Hu, C.H., Westerfield, M., Yang, Y.H., Miranda, C.L. et Buhler, D.R. (**2005**) CYP2K6 from zebrafish (Danio rerio): cloning, mapping, developmental/tissue expression, and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140, 207-219.

Wang, H., Tan, J.T., Emelyanov, A., Korzh, V. et Gong, Z. (**2005**) Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, Danio rerio. *Gene* 356, 91-100.

Wang, Y., Huang, H. et Wu, Q. (**2014**) Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. *Mol. Pharmacol.* 86, 62-75.

Waring, R.H., Ayers, S., Gescher, A.J., Glatt, H.R., Meinl, W., Jarratt, P., Kirk, C.J., Pettitt, T., Rea, D. et Harris, R.M. (**2008**) Phytoestrogens and xenoestrogens: the contribution of diet and environment to endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108, 213-220.

Weisbrod, C.J., Kunz, P.Y., Zenker, A.K. et Fent, K. (**2007**) Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225, 255-266.

Westerink, W.M. et Schoonen, W.G. (**2007**) Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 1592-1602.

Westphal, U. (**1986**) Steroid-protein interactions II. *Monogr. Endocrinol.* 27, 1-603.

Wilson, V.S., Bobseine, K. et Gray, L.E., Jr. (**2004**) Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol. Sci.* 81, 69-77.

Wilson, V.S., Cardon, M.C., Gray, L.E., Jr. et Hartig, P.C. (**2007**) Competitive binding comparison of endocrine-disrupting compounds to recombinant androgen receptor from fathead minnow, rainbow trout, and human. *Environ Toxicol Chem* 26, 1793-1802.

Xie, Y., Yang, Q., Nelson, B.D. et DePierre, J.W. (**2003**) The relationship between liver peroxisome proliferation and adipose tissue atrophy induced by peroxisome proliferator exposure and withdrawal in mice. *Biochem Pharmacol* 66, 749-756.

Yamada, H., Furuta, I., Kato, E.H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F., Kishi, R. et Fujimoto, S. (**2002**) Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 16, 735-739.

Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Sawaki, M., Imatanaka, N., Shinoda, K. et Takatsuki, M. (**2003**) Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 93-115.

Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, N. et Takatsuki, M. (**2002**) Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* 170, 21-30.

Yang, Y.H., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Wang-Buhler, J.L. et Buhler, D.R. (**2000**) Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BV-CYP2K1) as lauric acid (omega-1)-hydroxylase and aflatoxin B1 exo-epoxidase. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1279-1283.

Yano, J.K., Wester, M.R., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D. et Johnson, E.F. (**2004**) The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. *J. Biol. Chem.* 279, 38091-38094.

Yasuda, S., Burgess, M., Yasuda, T., Liu, M.Y., Bhuiyan, S., Williams, F.E., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M. et Liu, M.C. (**2009**) A novel hydroxysteroid-sulfating cytosolic sulfotransferase,

SULT3 ST3, from zebrafish: identification, characterization, and ontogenic study. *Drug Metabolism Letters* 3, 217-227.

Yasuda, S., Kumar, A.P., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Chen, L. et Liu, M.C. (**2005a**) Identification of a novel thyroid hormone-sulfating cytosolic sulfotransferase, SULT1 ST5, from zebrafish. *FEBS J* 272, 3828-3837.

Yasuda, S., Liu, C.C., Takahashi, S., Suiko, M., Chen, L., Snow, R. et Liu, M.C. (**2005b**) Identification of a novel estrogen-sulfating cytosolic SULT from zebrafish: molecular cloning, expression, characterization, and ontogeny study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 219-225.

Yasuda, S., Liu, M.Y., Yang, Y.S., Snow, R., Takahashi, S. et Liu, M.C. (**2006**) Identification of novel hydroxysteroid-sulfating cytosolic SULTs, SULT2 ST2 and SULT2 ST3, from zebrafish: cloning, expression, characterization, and developmental expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 455, 1-9.

Yasuda, T., Yasuda, S., Williams, F.E., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Bhuiyan, S., Snow, R., Carter, G. et Liu, M.C. (**2008**) Characterization and ontogenic study of novel steroid-sulfating SULT3 sulfotransferases from zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 294, 29-36.

Yeung, B.H., Law, A.Y. et Wong, C.K. (**2012**) Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 272-280.

Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G. et Tulliez, J. (**1997**) Evidence for a new and major metabolic pathway clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxyarylamine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 197-204.

Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R. et Cravedi, J.P. (**2003**) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health. Perspect.* 111, 309-319.

Zenker, A., Schmutz, H. et Fent, K. (**2008**) Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1202, 64-74

In vivo/ *in vitro* metabolic fate of endocrine disruptors in zebrafish (*Danio rerio*) models

Abstract

Endocrine disruptors (ED) are potentially harmful for Human beings and for wildlife species. Species-specific mechanism-based screening tests nowadays allow characterizing the ED potency of chemicals in the context of their toxicological assessment. However, the biotransformation capabilities of the biological models used are seldom taken into consideration, despite they ultimately condition the fate of the tested xenobiotics (detoxification *vs.* bioactivation), and, consequently, the biological response. In this work, we examined the fate of two emerging ED (benzophenone-2, bisphenol S) using novel *in vitro* and *in vivo* zebrafish models (ZELH-zfERs cells and *cyp19a1b*-GFP transgenic larvae) as well as human cell lines. Our results demonstrate that the zebrafish models are metabolically competent, and underline their relevance, accuracy and usefulness in an integrated *in vivo*/*in vitro* screening approach designed to assess ED's biological activity.

Keywords: zebrafish, metabolism of xenobiotics, endocrine disruptors, estrogenic activity, benzophenones, bisphenols

Vincent LE FOL

Approche *in vivo* / *in vitro* du métabolisme de perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)

Directeur de thèse : Dr. Daniel ZALKO
Co-directeur de thèse : Dr. François BRION

Présentée et soutenue le 17 décembre 2015 à Toulouse

Résumé

Les perturbateurs endocriniens (PE) posent des risques pour la santé Humaine et pour la faune. L'utilisation de tests biologiques basés sur des mécanismes d'action spécifiques permet de caractériser le potentiel PE des substances chimiques dans le cadre de l'évaluation toxicologique, mais les capacités de biotransformation de ces modèles sont rarement prises en compte. Or, le métabolisme conditionne le devenir des xénobiotiques (détoxication *vs.* bioactivation) et donc *in fine* l'activité biologique mesurée. Dans ce travail, le devenir de deux contaminants œstrogéniques émergents (benzophénone-2, bisphénol S) a été comparé dans de nouveaux modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre (cellules ZELH-zfERs, larve transgénique *cyp19a1b*-GFP) et des lignées humaines. Nos résultats démontrent que les modèles de poissons zèbres sont métaboliquement compétents et soulignent leur pertinence dans une approche intégrée *in vivo*/*in vitro* pour le criblage de l'activité PE des substances chimiques.

Mots-clefs : poisson zèbre, métabolisme des xénobiotiques, perturbateurs endocriniens, activité œstrogénique, benzophénones, bisphénols

Ecole doctorale SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INRA ToxAlim UMR 1331
Equipe Métabolisme des Xénobiotiques
180 chemin de Tournefeuille – BP 93173
31027 Toulouse cedex 3, France

INERIS
Unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*
BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte,
France