

# **RAPPORT SCIENTIFIQUE**

**IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PROTEIQUES DE LA PERTURBATION  
ENDOCRINIENNE, AUX DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DU  
POISSON MEDAKA**

*MISE AU POINT D'UN TEST DE CRIBLAGE CORRELE AUX ESSAIS REGLEMENTAIRES*

## **PROGRAMME PNRPE**

**NOM DU RESPONSABLE SCIENTIFIQUE DU PROJET :**

**CHARLES PINEAU**

**PLATE-FORME PROTEOMIQUE BIOGENOUEST (EX UPRES JE2459)**

**NOMS DES AUTRES PARTENAIRES SCIENTIFIQUES BENEFICIAIRES :**

**UNITE D'ECOTOXICOLOGIE - L'OREAL RECHERCHE AVANCEE**

**LABORATOIRE D'ECOTOXICOLOGIE EA2069 UNIVERSITE DE REIMS**

**PROCTER & GAMBLE**

## 1 INTRODUCTION

La protection de l'Homme et de l'Environnement vis-à-vis des perturbateurs endocriniens, passe par le développement de méthodes d'essais spécifiques, destinées à l'évaluation des substances chimiques et des effluents ainsi qu'à la surveillance des milieux naturels. Ces méthodes d'essai sont en cours de développement et de validation dans le cadre de l'OCDE<sup>1</sup>.

La perturbation de la régulation endocrinienne n'étant qu'un des nombreux mécanismes d'action des xénobiotiques, il fut envisagé d'évaluer quels essais réglementaires existants pouvaient contribuer à l'identification des perturbateurs endocriniens. Un premier inventaire des méthodes disponibles et adaptables à ce nouvel objectif fut présenté en mai 2001 (OECD, 2001). Il distinguait les essais sur mammifères, destinés à la protection de l'homme, des essais sur espèces non mammifères destinés à la protection des espèces sauvages.

Le manque de lignes directrices existantes pouvant être facilement adaptables à l'identification des perturbateurs endocriniens conduisit au développement de nouveaux essais. En raison des grandes différences de régulation endocrinienne entre les différentes espèces animales (Damstra et al., 2002 ; OECD 2001 ; Campbel et al., 1998), les essais sélectionnés pour identifier les perturbateurs endocriniens chez les espèces sauvages, portent désormais sur quatre grands groupes animaux : les poissons, les amphibiens, les invertébrés et les oiseaux.

Les espèces aquatiques, notamment les poissons, sont privilégiés en raison de la fréquence des rejets (industriels et urbains) dans les eaux de surface et la contribution de ces dernières à la production d'eau potable. En dépit de l'augmentation globale de la qualité écologique des cours d'eau européens, des effets oestrogéno-mimétiques ont été observés chez des poissons en aval de stations d'épuration (Folmar et al., 1996). Ces effets furent principalement attribués aux oestrogènes naturels contenus dans les effluents des stations d'épuration urbaines (Purdom et al., 1996 ; Matthiesen et al., 1996).

Les essais développés sur poissons sont parmi les plus avancés des 4 groupes animaux privilégiés par l'OCDE. La stratégie d'évaluation chez ces organismes repose sur une démarche par étape :

En première intention, un essai de screening / criblage d'activité doit permettre de déterminer si une substance chimique a une activité endocrinienne potentielle.

En seconde intention, un essai sur cycle de vie (complet) ou un essai sur 2 générations doit permettre d'évaluer les effets sur le développement et la reproduction de la descendance.

Le projet REACH (Registration Evaluation and Authorisation of CHemicals) (COM 2003) de future réglementation européenne pour l'évaluation du risque des substances chimiques pour l'Homme et l'Environnement, envisage de soumettre à autorisation (et à restriction) les substances chimiques identifiées comme perturbateurs endocriniens.

Parallèlement, le projet REACH recommande fortement de limiter le recours aux essais sur animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques. Or les essais développés dans le cadre de l'OCDE nécessitent l'utilisation de poissons juvéniles ou adultes, qui répondent à la définition européenne de l'animal de laboratoire (CEE 1986).

Il apparaît donc souhaitable, en accord avec les principes développés dans le projet REACH, de développer des méthodes d'évaluation rapides, peu coûteuses et si possible alternatives à l'expérimentation animale, pour l'identification des perturbateurs endocriniens chez les poissons.

---

<sup>1</sup> OCDE : Organisation pour la Coopération et le Développement Economique

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

A cet effet, le présent projet de recherche a été mené :

Ce projet se propose d'identifier par une approche de protéomique différentielle, les protéines qui, chez le Médaka, sont associées aux altérations du développement de l'appareil reproducteur tel qu'elles apparaissent à l'issue de l'essai « extended OECD n° 210 » (soit 60 jours après éclosion pour le Médaka).

Ces protéines ou leurs précurseurs seront également recherchés à des stades précoces de développement :

- Stade embryonnaire : prélèvement à 6 jours après éclosion.
- Stade larvaire : prélèvement à 30 jours après éclosion.

La toxicogénomique et la toxicoprotéomique sont des champs disciplinaires en pleine expansion dans le contexte de l'identification de biomarqueurs (pour revues, voir Merrick & Bruno, 2004; Barrier & Mirkes, 2005) avec des retombées déjà significatives en écotoxicogénomique sur des modèles poisson (Miracle & Ankley, 2005).

Afin d'optimiser la probabilité d'identifier les potentiels biomarqueurs protéiques d'intérêt, nous envisageons de les rechercher sur des Médaka de sexe mâle exposés à des agonistes oestrogéniques dont les effets sont déjà connus sur les poissons (voir références au chapitre ci-dessus). Un premier essai sera envisagé avec l'agoniste fort ethynyl oestradiol (EE2). Les biomarqueurs protéiques identifiés lors de ce premier essai seront recherchés et validés au cours d'un second essai avec un agoniste faible, le 4-t-pentylphenol (4tPP).

L'objectif général de ce projet de recherche est de développer une méthode alternative aux essais réglementaires, de longue durée, pour l'identification des perturbateurs endocriniens chez les poissons.

La stratégie expérimentale retenue initialement dans le cadre de ce projet de recherche repose sur les étapes successives suivantes :

1. Mise en évidence des protéines différentiellement exprimées chez le Médaka à trois stades de développement (embryonnaire, larvaire et juvénile) en réponse à une exposition à EE2.
2. Evaluation des effets de la perturbation endocrinienne (EE2 et 4tPP à 3 concentrations) chez le Médaka juvénile (60 jours post-éclosion; jpe) par analyse morphologique et histologique des gonades ainsi que par le dosage de la vitellogénine. Cette étape contribuera à la validation du test réglementaire en développement « extended OECD N° 210 ».
3. Evaluation de l'analyse protéomique différentielle quant à la prédiction d'effets de type "perturbateur endocrinien" (4tPP à 3 concentrations) sur un stade précoce de développement de Médaka (embryonnaire ou juvénile).
4. Sélection parmi les protéines d'intérêt (étapes n°1 et 3), de celles susceptibles d'être utilisées en tant que biomarqueurs d'une perturbation endocrinienne qui s'exprimerait à plus long terme par une perturbation du développement de l'appareil reproducteur.

### **Résultats attendus :**

Les résultats attendus sont de plusieurs ordres :

- Détection et identification de biomarqueurs protéiques précoces liés à la perturbation endocrinienne par des technologies de protéomique différentielle.
- Contribution à la validation du test réglementaire en développement « extended OECD N° 210 »
- Développement d'un essai robuste et de courte durée permettant de cribler un grand nombre de substances chimiques.

### **Aspects innovants :**

Le présent projet de recherche présente un caractère fortement innovant sur plusieurs aspects:

- Utilisation de souches de Médaka particulièrement appropriées.
- Utilisation de technologies de pointe en protéomique différentielle associant les approches 2D DIGE d'une part, et puces à protéines (ProteinChip®) d'autre part.
- Possible détection précoce (stade embryonnaire) des effets causés par une exposition à des perturbateurs endocriniens durant la différenciation sexuelle uniquement.

## **2 MATERIEL ET METHODES**

Depuis février 2006, date de démarrage du projet, les partenaires ont accumulés un retard notable du fait du problème d'élevage des Médaka utilisés comme modèle biologique (voir rapport intermédiaire). Les premiers échantillons valides ont été livrés début 2008 et nous avons donc centrés les efforts d'analyse sur un plan d'expérimentation redéfini comme suit après validation par le conseil scientifique du PNRPE:

- Exposition des alevins à l'EE2 pendant 2 ou 60 jpe à une dose de 100mg/ml
- Sexage des alevins par génomique pour sélectionner les mâles
- Mise en évidence par protéomique de marqueurs de l'action de l'EE2 à 3 et 60 jpe
- Validation de l'approche par utilisation des tests réglementaires :
  - Histologie à 60 jpe ;
  - Dosage de vitellogénine à 60 jpe.

### **2.1 CONDITIONS D'ÉLEVAGE ET DE DOSAGE DES PERTURBATEURS DANS LES MILIEUX D'ÉLEVAGE.**

Le protocole d'exposition des poissons Médaka a été sous-traité par notre partenaire industriel L'Oréal, auprès de la société *Watchfrog*. Au départ, une culture d'œufs fertilisés de Médakas est répartie dans des boîtes de Pétri en verre de diamètre 150mm. Certains œufs sont exposés uniquement à un milieu d'élevage, d'autres au même milieu d'élevage contenant de l'EE2. Les boîtes de Pétri sont stockées dans une enceinte climatique à 26°C avec une photopériode 14 heures de jour / 10 heures de nuit.

Au bout d'une dizaine de jours, les œufs commencent à éclore : les Médakas sont alors transférés dans des aquariums en verre de 3L également stockés dans l'enceinte climatique. Les Médakas sont alors nourris 2 fois par jour avec de la tétramine pour alevins. Lorsqu'a lieu le renouvellement du milieu, cette alimentation est faite environ 1h avant le renouvellement afin d'éviter l'adsorption de l'EE2 sur la matière organique. Le renouvellement des milieux

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

d'exposition est effectué toutes les 48 ou 72 heures. Il est effectué à 80% sauf une fois par semaine à 100% pour changer d'aquarium.

Le dosage du milieu EE2 d'exposition a été réalisé dans le laboratoire d'HPLC, éléments traces de L'Oréal. Il sera fait sur le milieu frais préparé par la société Watchfrog et sur ce même milieu après exposition des poissons Médakas.

Ci-après sont décrits le milieu d'élevage utilisé et le protocole de préparation de l'EE2 à 100 ng/L (100 ppt).

### Milieu d'élevage 1X

Composition du milieu d'élevage 10X :

Chlorure de sodium (NaCl) :	10	g
Chlorure de potassium (KCl) :	0,30	g
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) :	0,40	g
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O) :	0,40	g
Quantité suffisante pour :	1 L	d'eau osmosée

→ Dilution au 1/10ème de la solution 10X avec de l'eau osmosée pour obtenir le milieu d'élevage 1X.

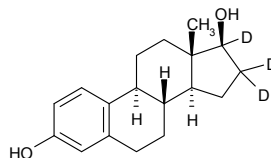
Paramètres physico-chimiques :           pH = 7,5           osmolarité = 33 mosm

### 2.1.1 METHODE DE DOSAGE DE L'EE2

La détection et quantification de l'EE2 dans l'eau sont principalement basées sur la méthode d'extraction en phase solide (SPE, Solide Phase Extraction), qui permet de concentrer l'EE2, suivie par une technique séparative, la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée au détecteur spectromètre de masse. La technique ELISA<sup>2</sup> qui est une technique biochimique, a aussi été utilisée dans le cadre du dosage de l'EE2 dans l'eau. Mais cette technique n'est pas sélective comparée à un spectromètre de masse.

Pour notre étude, nous avons développé une méthode analytique comprenant une phase d'extraction en phase solide pour l'étape d'enrichissement suivie d'un dosage<sup>3</sup> par LC/MS-MS. Nous avons également fait le choix d'utiliser un étalon interne. L'espèce choisie possède des propriétés semblables à celles de l'analyte vis-à-vis de la méthode d'analyse. L'emploi d'un étalon interne est très utile dans notre cas car il nous permet de compenser les éventuelles pertes lors de l'enrichissement par SPE. L'étalon interne choisi est le **17β-estradiol-16,16,17-D3 (E2-d3)**.

17β-estradiol-16,16,17-D3 (E2-d3)



### 2.1.2 MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'ENRICHISSEMENT

Le protocole développé afin de concentrer l'échantillon à doser comporte 4 étapes avant le dosage par LC/MS-MS.

<sup>2</sup> C. Schneider et al. *Analytica Chimica Acta*. **551** : 92-97, 2005.

<sup>3</sup> S. Zuehlke et al. *J. Sep. Sci.* **28** : 52-58, 2005.

① **Filtration** : étape permettant d'éliminer les débris (provenant des aliments, excréments...) qui pourraient être présents dans l'ancien milieu d'exposition

→ Rendement de cette étape : 100%

② **Ajout de l'étalon interne** de façon à obtenir une concentration en E2-d3 de 80ppb à la fin du protocole

③ **Enrichissement par SPE** : se décompose en 4 phases

- conditionnement / équilibration
- dépôt de l'échantillon
- lavage
- élution

La cartouche de SPE employée est une cartouche Sep-Pak® C18 plus (réf. Waters WAT036810). Le débit de percolation est d'environ 2ml/min. L'étape d'enrichissement a été optimisée de telle sorte à minimiser les pertes.

Ces différentes phases ont été effectuées à l'aide d'un module d'extraction sous vide Visiprep® (Supelco). Le point délicat de cet appareil est le réglage du débit de percolation. Il doit absolument rester stable tout au long de la percolation pour garantir la reproductibilité.

④ **Concentration** : se décompose en 2 phases

- évaporation du solvant organique d'élution
- reprise du résidu par un faible volume de solvant

→ Rendement de cette étape : 100%

Cette étape est effectuée à l'aide d'un module d'évaporation chauffant Reacti-therm® (Pierce).

L'ensemble de ces résultats montrent la fiabilité, la reproductibilité et la robustesse de cette méthode de dosage. Cette étude a aussi montré la stabilité de l'EE2 dans les conditions d'exposition des poissons Médakas au bout de 72h.

### 2.1.3 PROTOCOLE D'EXPOSITION DES POISSONS MEDAKAS A L'ETHYNYL ESTRADIOL

#### MATERIEL ET CONDITIONS

##### **Matériel nécessaire :**

1 enceinte climatique LMS  
2 x 9 cristallisoirs en verre de 2L  
2 x 9 aquariums en verre de 6L  
9 bulleurs  
Bouteilles de prélèvement en verre teinté de contenance minimum 500mL  
Milieu Médaka sans bleu de méthylène (10X et 1X)  
Ethinylestradiol  
Isopropanol

##### **Conditions de stabulation :**

Enceinte climatique (LMS)  
Taux d'oxygène dissous >60% (assuré par un bullage)  
Température :  $26 \pm 1^\circ\text{C}$   
Photopériode : 14 heures de jour / 10 heures de nuit

##### **Milieu d'élevage :**

Milieu Médaka sans bleu de Méthylène

Composition du milieu Médaka (10X) conseillé par Kirchen et West<sup>4</sup> :

Chlorure de sodium (NaCl) :	10	g
Chlorure de potassium (KCl) :	0,30	g
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) :	0,40	g
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O) :	0,40	g

Quantité suffisante pour : 1 L d'eau osmosée  
Dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution 10X avec de l'eau osmosée pour obtenir le milieu Médaka 1X.

##### **Paramètres physico-chimiques :**

pH = 7,5  
osmolarité = 33 mosm

<sup>4</sup> RV KIRSCHEN, ER WEST « The Japanese Medaka : Its care and development » Carolina Biological Supply Co, Burlington, North Carolina (1976)

**Milieu témoin tiers solvant :**  
 Isopropanol à 0,005% dans le milieu Médaka :  
 1mL de Isopropanol dans 20mL de milieu médaka 1X  
 Puis 2mL dans 2L  
 ou 7ml dans 7L si les Médakas sont dans les cristallisoirs  
 13mL dans 13L  
 ou 17ml dans 17L si les Médakas sont en aquariums

**Solution d'EE2 :**  
 Solution mère d'EE2 à 100mg/L dans du méthanol conservé à -20°C dans un flacon brun :  
 10mg d'EE2 dans 100mL de Isopropanol  
 Solution de stockage d'EE2 à 2mg/L dans du méthanol conservé à 4°C dans un flacon brun :  
 2mL dans 100mL de Isopropanol

**A chaque renouvellement :**  
 Dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la solution de stockage dans du milieu Médaka 1X  
 (100µg/L ou 100ppm)  
 1mL dans 20mL  
 Dilution au 1/1000<sup>ème</sup> de la solution intermédiaire dans du milieu médaka 1X  
 (100ng/L ou 100ppt)  
 2mL dans 2L ou 8ml dans 8L si les Médakas sont dans les cristallisoirs

13mL dans 13L ou 17ml dans 17L si les Médakas sont en aquariums

**Conditionnement des Médakas :**  
 J0 à JPE23 : 400mL dans cristallisoir  
 JPE23 à JPE33 : 1,7L dans cristallisoir  
 JPE33 à JPE42 : 3L dans aquarium  
 JPE42 à JPE61 : 4L dans aquarium

**Renouvellement des milieux :**  
 Tous les lundis et mercredis à 80% et les vendredis à 95%.  
 A chaque renouvellement, des échantillons de 300mL (jusqu'à JPE23) puis de 500mL des milieux suivants seront envoyés par coursier des bouteilles de prélèvement en verre teinté :  
 - du nouveau milieu d'EE2 à 100ng/L  
 - de l'ancien milieu d'EE2 à 100ng/L

**Alimentation :**  
 A partir du JPE2, alimentation des Médakas 3 fois par jour avec de la Tétramine pour alevins.  
 Au fur et à mesure, de la Tétramine pour adultes sera ajoutée en proportion de plus en plus importante au cours du développement des Médakas.  
 L'alimentation se fera environ 1h avant le renouvellement du milieu pour éviter l'adsorption de l'EE2 sur la matière organique.  
 Une diète de 48h sera observée avant les prélèvements de JPE60

#### 2.1.4 EXPOSITION

9 groupes :

- 1 groupe pour Témoin N = 1x 165
- 4 groupes pour Témoin tiers solvant Isopropanol (0,005%) N = 4x 165
- 4 groupes pour Médakas exposés à 100ng/L d'EE2 + Isopropanol N = 4x 165

JPE 60	Témoins	15	1	15	2,5	38	38	1,3	49	569
	1/3 solvant (protéomique)	5	4	20	4	20	80	1,3	104	
	1/3 solvant (histologie)	5	2	10	4	20	40	1,3	52	
	1/3 solvant (vitellogenine)	5	4	20	4	20	80	1,3	104	
	EE2 (protéomique)	5	4	20	4	20	80	1,3	104	
	EE2 (histologie)	5	2	10	4	20	40	1,3	52	
	EE2 (vitellogenine)	5	4	20	4	20	80	1,3	104	

#### 2.1.5 PRELEVEMENTS

JPE2 :

PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

- Les Médakas seront observés quotidiennement. Au fur et à mesure, les alevins sont mis à part pour constituer le prélèvement JPE2. Ainsi, on aura la garantie que les alevins auront 48h au moment du flash dans l'azote liquide.

-> Formation des lots de Médakas exposés pendant 2 jours après éclosion à l'EE2

- Rinçage à l'eau MilliQ

- Prélèvement d'une nageoire sur chaque alevin pour sexage par PCR

- Flash dans de l'azote liquide

- Identification par PCR (gène Dmy placé sur le chromosome Y) des Médakas mâles

- Envoi de 4 lots de 25 Médakas mâles PAR GROUPE dans de la carboglace pour travaux de protéomique

JPE60 :

- Formation des lots exposés à 30 jpe selon le même protocole

## 2.2 DOSAGE DE LA VITELLOGENINE

### 2.3

#### 2.3.1 PROTOCOLE D'EXTRACTION PROTEIQUE:

- 50µl de PBS pH7,4 / alevin
- Broyage au potter à froid
- Sonication à froid (2sec X5, amplitude 30%, off 10sec)
- Centrifugation 15000g, 30min, 4°C
- Dosage Bradford

#### 2.3.2 DOSAGE ELISA

La vitellogenine a été dosée grâce au kit « MEDAKA VITELLOGENIN ELISA KIT PROD. NO.: V01013403 – Biosense »

Le Dosage ELISA a été réalisé selon les indications du fournisseur.

140, 20, 5 et 2µg de protéines totales ont été déposées pour dosage de la vitellogenine en parallèle d'une gamme de vitellogenine de 0 à 50ng/ml.

## 2.4 HISTOLOGIE

Les poissons fixés et déshydratés ont été transférés au laboratoire d'Eco-toxicologie de Reims dans le butanol-1. Ils sont alors individuellement inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm sont réalisées par microtomie. Les coupes obtenues sont colorées par une coloration histochemique et topographique quadrichromatique au rouge nucléaire solide-picro-indigocarmin. Les photos des coupes sont réalisées grâce à un microscope Leica DMR couplé à une caméra numérique raccordée à un ordinateur de type PC équipé du système logiciel Histolab (Microsystem). Tous les poissons ont été observés et une étude complète des gonades a été réalisée. Les premières observations du foie et de l'intestin que nous avons réalisées ont révélé des perturbations histologiques.

## 2.5 ANALYSES PROTEOMIQUES

### 2.5.1 PROFILING PAR PROTEINCHIP/SELDI TOF

La technologie ProteinChip® associe deux principes d'analyse des protéines, la chromatographie d'affinité par rétention et la spectrométrie de masse. La séparation des protéines par chromatographie d'affinité est réalisée sur des barrettes réactives qui comportent 8 plages actives ou "spots". Ces spots sont constitués de surfaces chimiques (ioniques, hydrophobes, hydrophiles...) permettant la rétention sélective des peptides et protéines de l'échantillon biologique. Les peptides et protéines ainsi retenus sur ces surfaces sont ensuite directement analysés par insertion des barrettes dans un spectromètre de masse SELDI conduisant à la détermination de leur masse moléculaire. La technologie permet de comparer les profils obtenus dans des conditions identiques (quantité de protéines chargée, type de surface, conditions chromatographiques...) entre deux ou plusieurs échantillons. Il est ainsi possible de mettre en évidence des peptides et protéines



## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

différentiellement exprimés entre échantillons. Cette approche est totalement complémentaire de l'approche 2D-DIGE car elle permet notamment l'étude des protéines membranaires ainsi que des protéines et peptides de petite taille qui sont difficilement séparables par électrophorèse bidimensionnelle.

### 2.5.1.1 REFERENCE

Une référence composée d'un mélange égal de chaque échantillon à comparer a été réalisée pour chaque âge (ref2jpe et ref60jpe)

### 2.5.1.2 CALIBRANTS

Des calibrant (protéines et peptides) ont été déposés en parallèle afin de réaliser une calibration des spectres obtenus.

Les analyses ont été effectuées dans un tampon Tris HCL 100 mM et deux pH d'éluion ont été retenus pour chaque barrette :

- Tris HCl 100mM pH6
- Tris HCl 100mM pH8

### 2.5.1.3 MATRICE

Acide sinapinique (spa AEM Biorad)

Ref spa0708061 exp date : 06-08-2010

N° lot : 10007827revA

Reprise : 75µl ACN 50%, TFA 0,05%

### 2.5.1.4 DEPOT SUR BIOPROCESSEUR ET PROTOCOLE DE BINDING SUR PROTEINCHIP

Les échantillons ont été déposés de façon aléatoire. La disposition des échantillons sur les barrettes a été déterminée par le logiciel Cypherger Express. Chaque échantillon a été déposé en duplicata selon le protocole suivant :

- Lavage des barrettes par le tampon de dépôt 5 min à 21°C et à 250 rpm.
- Ajout des 10µg d'échantillons dans 200µl de tampon d'éluion soit 50 µg/ml
- Incubation à 21°C, 30min, 250 rpm
- 3 lavages par 200µl de tampon d'éluion à 21°C, 250 rpm
- Lavage rapide à l'HEPES 20mM, pH 7.4
- Séchage des barrettes à l'aire
- Dépôt de 2x 0.8µl de matrice (acide sinapinique (SPA))
- Séchage
- Lecture sur le spectromètre SELDI-TOF

Le tableau suivant récapitule la position de chaque échantillon dans le bioprocasseur

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Barcode	1230216800	1230216801	1230216802	1230216803	1230216804	1230216805	1170318488	1170318489	1170318490	1170318491	1170318492	1170318493
Array Type	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	CM10	CM10	CM10	CM10	CM10	CM10
A	60S2	2E3	2S2		2S4	2E4	ref	60E3	2E1	2S4	2E5	pep
B	ref	2E5	2E4	2E2	60E1	prot	2E3	2S5	2E4	60S4	60S2	60S1
C	2S5	60S3	2S1	2S4	60S1	60S4	2S1	2S5	60E4	60E4	ref	2S4
D	2S2	prot	60S4	pep	60E1	2E2	60E1	2S2	2S3	2E2	2S2	60E2
E	60S2	60E3	ref	2S3	60E4	60S1	60S5	60E3	60S5	2E2	2E3	
F	60E2	60S5	2E1	60E3	2E3	2E1	pep	2E4	60S4	2S1	60S3	60S3
G	60E4	2S5	60S3	60E5	ref	2E5	60E5	2E1	prot	60S1	60E1	60E5
H	2S1	pep	2S3	60E2	60S5	60E5	60S2	2E5	ref	60E2	prot	2S3

### 2.5.1.5 PROTOCOLE DE LECTURE SUR SELDI-TOF

Pour chaque spot, 2 lectures ont été réalisées de façon automatique en basses masses et hautes masses selon les protocoles suivants:

Lecture dans les basses masses:

- Sensibilité : 7
- Intensité : 180
- Lecture optimisée de 3000 à 20 000 Da
- Déflecteur : 2000 Da
- Focus : 11500 Da
- Collecte de 20 spectres /position sur 60 positions/spot soit : 1200 spectres collectés /spot

Lecture dans les hautes masses

- Sensibilité : 8
- Intensité : 200
- Lecture optimisée de 15 000 à 150 000 Da
- Déflecteur : 5000 Da
- Focus : 50 000 Da
- Collecte de 20 spectres /position sur 60 positions/spot soit : 1200 spectres collectés /spot

#### 2.5.1.6 ANALYSE STATISTIQUE UNIVARIEE

Deux types d'analyses statistiques univariées ont été utilisés pour analyser les pics présentant une différence significative d'intensité entre les deux groupes d'échantillons :

**P value :**

Dans cette expérience, le test de Mann-Whitney (comparaison de deux groupes) a été utilisé pour comparer les deux groupes (exposé versus non exposé). Une p-value <0.05 est considérée comme significative.

**Courbe de ROC :**

La courbe de ROC (Receiver-Operator Characteristic) permet d'obtenir des informations sur la sensibilité et la spécificité des clusters détectés.

#### 2.5.1.7 ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE

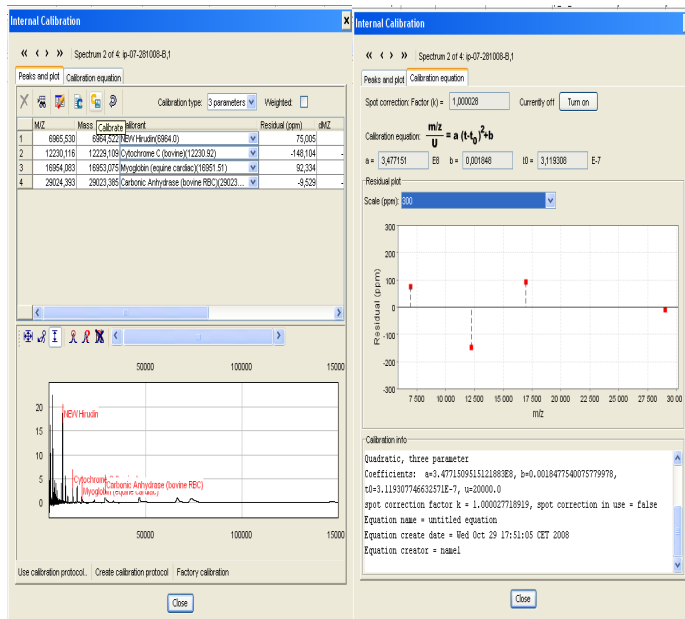
L'analyse multivariée permet de détecter des différences entre les groupes sur un critère de profil général et non pas sur un cluster donné.

Dans cette étude, l'analyse multivariée a été réalisée, sans détermination des groupes d'appartenance des échantillons, par la méthode d'analyse en composante principale.

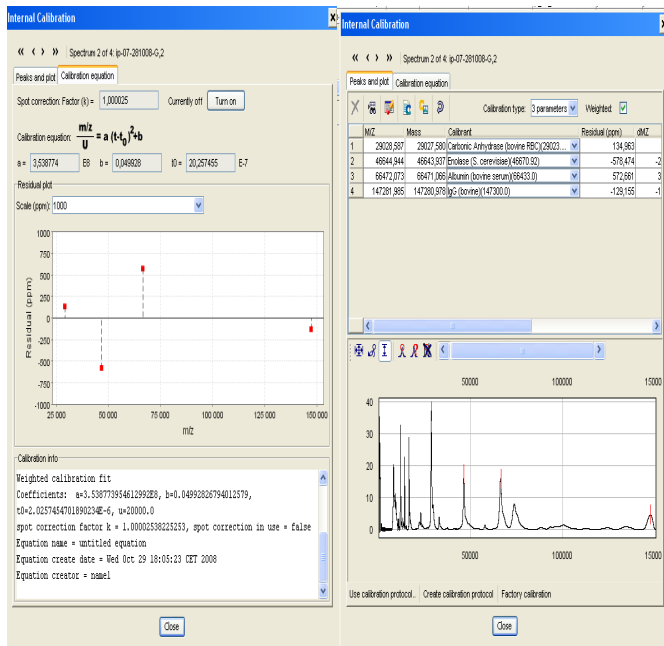
#### 2.5.1.8 – CALIBRATION

La calibration interne a été effectuée à partir du spectre de calibrant donnant le meilleur profil (faible erreur ppm, voir les tableaux ci-dessous)

## Équation de calibration en Basses Masses



## Équation de calibration en Hautes Masses



### 2.5.2 ANALYSE PAR 2D-DIGE

La technologie 2D-DIGE est basée sur le marquage des protéines totales d'échantillons à comparer sur leurs résidus lysine, par des cyanines fluorescentes spécifiques (CyDyes -2, -3 et -5) préalablement à leur fractionnement. Les échantillons à comparer sont ensuite mélangés en quantités égales et co-séparés sur un seul et unique gel d'électrophorèse bidimensionnelle. L'analyse des images digitalisées (3 images pour chaque gel 2D) est effectuée grâce au logiciel DeCyder™ dans le but d'identifier et de quantifier l'expression des protéines différemment exprimées entre les échantillons d'intérêt. Les protéines peuvent être directement identifiées par spectrométrie de masse à partir du gel fluorescent ou à partir d'un gel similaire coloré par une technique conventionnelle (e.g. bleu de Coomassie colloïdal, Sypro).

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

### 2.5.2.1 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

Solutions d'extraction protéique :

- Inhibiteurs de protéases cocktail (concentration finale):
- AEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) : 1mM
- E64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane) : 1 mM
- EDTA : 1 mM
- Aprotinin : 0.002 mg/ml
- Pepstatin A : 1  $\mu$ M

Tampon de lyse (pour 100 $\mu$ l) :

- Tampon Urée/Thiourée/Chaps 7M/2M/4%
- Tampon Tris 1,5 M pH8,8
- Mix inhibiteur : 1X $\rightarrow$

Préparation des échantillons :

- 50 $\mu$ l de tampon de lyse par lot de poisson (n~20)
- broyage au potter - traitement aux Ultrasons (30%, 5 x 2''/ 10'')
- incubation dans le tampon de lyse (30 minutes à RT)
- centrifugation 15 000g, 15 min - centrifugation 105 000g, 60 min
- Dosage

### 2.5.2.2 CONTROLE QUALITE PAR ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE

Gebalgel 12% (Interchim); dépôt de 7 $\mu$ g de protéines totales, Coloration EzBlue (Sigma), Nitrate d'argent (99,9% ; Sigma)

### 2.5.2.3 ÉLECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE A HAUTE RESOLUTION ET DIGITALISATION

- 1ère dimension : M2 (70  $\mu$ g), S2 (70  $\mu$ g) et E2 (70  $\mu$ g) repris dans le tampon DeStreak™ et 2% (v/v) IPG buffer pH3-10 NL, 10 mM DTT ; strip IEF pH 3-10 NL 24 cm (respectivement n°23799, 23800 et 23801 ; lot n°100013452 ; GE)
- Isoélectrofocalisation sur système IPGphor™ (réhydratation active 10h00, migration 18h27, 60303 Vhrs total ; voir Figure ci dessous)

Récapitulatif expérience DIGE - 2JPE					
	Marquage Cy-3	Marquage Cy-5	Marquage Cy-2	Strip IEF n° (lot n°100021589)	Gel DALY n° (lot n° 10019493)
<b>Gel 1</b>	S1	E1	Standard	37492	11105
<b>Gel 2</b>	E2	S2	Standard	37493	11135
<b>Gel 3</b>	S3	E3	Standard	37495	11097
<b>Gel 4</b>	E4	S4	Standard	37496	11099
<b>Gel 5</b>	S5	E5	Standard	37497	11104

Récapitulatif expérience DIGE - 60JPE					
	Marquage Cy-3	Marquage Cy-5	Marquage Cy-2	Strip IEF n° (lot n°100021589)	Gel DALY n° (lot n° 10019493)
<b>Gel 1</b>	S1-60	E1-60	Standard	37508	11174
<b>Gel 2</b>	E2-60	S2-60	Standard	37509	11138
<b>Gel 3</b>	S5-60	E3-60	Standard	37510	11175
<b>Gel 4</b>	E4-60	S6-60	Standard	37511	11172
<b>Gel 5</b>	S7-60	E5-60	Standard	37512	11171

## 2.5.2.4 ANALYSE DECYDER™ MODULE DIA ET BVA

### 2.5.2.5 Etape 1 : DIA pour Differential In Gel Analysis

	Gel n°	Nombre spots détectés	Nombre spots retenus dans l'analyse	Nombre spots exclus	Nombre de spots avec Ratio ≤ -2	Nombre de spots avec -2 ≤ Ratio ≤ +2	Nombre de spots avec Ratio ≥ +2
<b>2JPE</b>	<b>11105</b>	674	471	203	28 (5,9%)	441 (93,6%)	2 (0,4%)
	<b>11135</b>	599	430	169	17 (4,0%)	413 (96,0%)	0 (0%)
	<b>11097</b>	647	458	189	47 (10,3%)	404 (88,2%)	7 (1,5%)
	<b>11099</b>	692	404	288	26 (6,4%)	371 (91,8%)	7 (1,7%)
<b>60JPE</b>	<b>11138</b>	622	464	158	43 (9,3%)	420 (90,5%)	1 (0,2%)
	<b>11175</b>	693	545	148	107 ((19,6%)	334 (61,3%)	104 (19,1%)
	<b>11171</b>	694	416	278	112 (26,9%)	258 (62,0%)	46 (11,1%)

### 2.6.1.1 Etape 2 : BVA pour Biological Variation Analysis.

L'analyse BVA repose sur les analyses individuelles DIA qu'elle regroupe afin de définir les spots 2D statistiquement différentiels.

Dans un premier temps, les différents gels d'une expérience (n=4 pour 2JPE ; n=3 pour 60 JPE) vont être alignés afin de faire correspondre au mieux l'ensemble de leurs spots protéiques. Un gel « maître » sera également défini à ce stade comme le gel le plus représentatif de la série. Les résultats de ces alignements sont disponibles dans les tableaux ci-dessous.

<b>BVA 2JPE</b>							
Gel n°	Gel ref n°	Echantillon	Groupe	Nombre de spots	Matched	% Matched	Fonction
1	11105	Standard-Cy2	Standard	465	307	66	
1	11105	S1-Cy3	2JPE Solvant	465	307	66	
1	11105	E1-Cy5	2JPE EE2	465	307	66	
2	11135	Standard-Cy2	Standard	426	298	70	
2	11135	E2-Cy3	2JPE EE2	426	298	70	
2	11135	S2-Cy5	2JPE Solvant	426	298	70	
3	11097	Standard-Cy2	Standard	454	454	100	Maitre
3	11097	S3-Cy3	2JPE Solvant	454	454	100	
3	11097	E3-Cy5	2JPE EE2	454	454	100	
4	11099	Standard-Cy2	Standard	400	316	79	
4	11099	E4-Cy3	2JPE EE2	400	316	79	
4	11099	S4-Cy5	2JPE Solvant	400	316	79	

<b>BVA 60 JPE</b>							
Gel n°	Gel ref n°	Echantillon	Groupe	Nombre de spots	Matched	% Matched	Fonction
2	11138	Standard-Cy2	Standard	457	373	82	
2	11138	S2-60-Cy5	60JPE Solvant	457	373	82	
2	11138	E2-60-Cy3	60JPE EE2	457	373	82	
3	11175	Standard-Cy2	Standard	540	540	100	Maitre
3	11175	E3-60-Cy5	60JPE EE2	540	540	100	
3	11175	S5-60-Cy3	60JPE Solvant	540	540	100	
5	11171	Standard-Cy2	Standard	411	334	81	
5	11171	E5-60-Cy5	60JPE EE2	411	334	81	
5	11171	S7-60-Cy3	60JPE Solvant	411	334	81	

### 2.6.1.2 Analyse des spots d'intérêt par spectrométrie de masse

- Traitement des gels DIGE
- Prélèvement des spots d'intérêt
- Trypsine à 8,8ng/μL

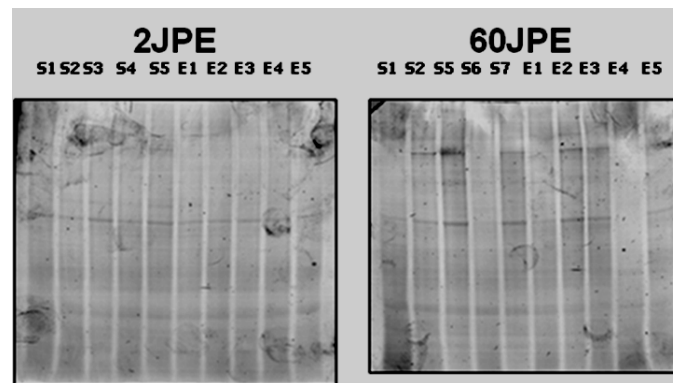
- Procédure de dessalage/recristallisation sur cibles MTP AnchorChip 600/384 S/N 01307 en présence de matrice HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)
- Analyse par spectrométrie de masse sur MALDI-TOF/TOF (Ultraflex ; Bruker Daltonics).
- Acquisition et exploitation d'empreintes peptidiques via la suite logicielle FlexControl™, FlexAnalysis™ et Proteinscape™ (Bruker Daltonics).
- Interrogation des bases de données NCBI « all entries » (version 155, Mise à jour du 21/09/2008) et EST\_fishes\_tigr (banque reconstruite en interne).

## 3 RESULTATS

### 3.1 IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PAR ANALYSE 2D-DIGE

#### 3.1.1 CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS PAR ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE

Avant analyse par 2D-DIGE, la qualité des échantillons a été vérifiée par électrophorèse monodimensionnelle (Figure ci-dessous).



Les échantillons 2JPE présentent un profil électrophorétique satisfaisant.

Les échantillons 60JPE présentent des profils électrophorétiques non-homogènes. Les échantillons S1, S6, E1 et E4 semblent perfectibles. Ces derniers échantillons seront analysés ensemble au cours de l'expérimentation DIGE.

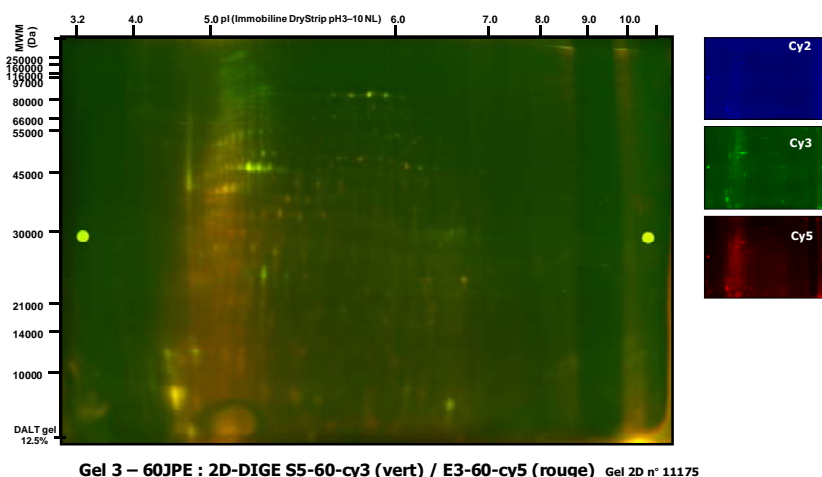
#### 3.1.2 COMPARAISON DES ECHANTILLONS PAR 2D-DIGE

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus à partir des échantillons 2JPE sont homogènes. Nous avons choisi d'exclure le gel n°11104 préalablement à l'analyse logicielle DeCyder™. Le marquage de l'échantillon E5 avec la cyanine 5 était médiocre. Quatre gels ont donc été retenus pour l'analyse différentielle proprement dite.

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus à partir des échantillons 60JPE sont particulièrement reproductibles (i.e., gels 11138, 11175 et 11172). Ces 3 gels ont été retenus pour l'analyse différentielle. Les gels exclus (i.e., 11174, 11172) ne remplissent pas les exigences imposées par une analyse différentielle de qualité.

Un exemple des résultats obtenus sur les lots 60jpe est présenté ci-dessous :

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne



### 3.1.3 ANALYSE DECYDER™ MODULE DIA ET BVA

#### 3.1.3.1 ÉTAPE 1 : DIA POUR DIFFERENTIAL IN GEL ANALYSIS

De nombreux spots ont été exclus lors de l'analyse. Ce sont des artéfacts dus notamment au marquage des ampholytes principalement au niveau basique ainsi que les bords du gel. Ce retrait de spots n'a aucune incidence sur le reste de l'analyse.

	Gel n°	Nombre spots détectés	Nombre spots retenus dans l'analyse	Nombre spots exclus	Nombre de spots avec Ratio $\leq -2$	Nombre de spots avec $-2 \leq \text{Ratio} \leq +2$	Nombre de spots avec Ratio $\geq +2$
<b>2JPE</b>	<b>11105</b>	674	471	203	28 (5,9%)	441 (93,6%)	2 (0,4%)
	<b>11135</b>	599	430	169	17 (4,0%)	413 (96,0%)	0 (0%)
	<b>11097</b>	647	458	189	47 (10,3%)	404 (88,2%)	7 (1,5%)
	<b>11099</b>	692	404	288	26 (6,4%)	371 (91,8%)	7 (1,7%)
<b>60JPE</b>	<b>11138</b>	622	464	158	43 (9,3%)	420 (90,5%)	1 (0,2%)
	<b>11175</b>	693	545	148	107 ((19,6%)	334 (61,3%)	104 (19,1%)
	<b>11171</b>	694	416	278	112 (26,9%)	258 (62,0%)	46 (11,1%)

Le classement des résultats a été effectué avec un ratio arbitraire de 2. Ce ratio n'a pas, à ce stade, de validité biologique, mais peut tout simplement permettre d'apprécier dans les grandes lignes le différentiel présenté par les échantillons. Il apparaît donc à ce stade que les spots d'une intensité relativement similaire entre échantillons Témoin (1/3 Solvant) et Traité (EE2) représente une grande majorité des spots 2D retenus dans l'analyse, particulièrement dans l'expérience 2JPE (*i.e.*, 88,2 à 96%).

#### 3.1.3.2 ÉTAPE 2 : BVA POUR BIOLOGICAL VARIATION ANALYSIS.

L'analyse BVA repose sur les analyses individuelles DIA qu'elle regroupe afin de définir les spots 2D statistiquement différentiels.

BVA 2JPE							
Gel n°	Gel ref n°	Echantillon	Groupe	Nombre de spots	Matched	% Matched	Fonction
1	11105	Standard-Cy2	Standard	465	307	66	
1	11105	S1-Cy3	2JPE Solvant	465	307	66	
1	11105	E1-Cy5	2JPE EE2	465	307	66	
2	11135	Standard-Cy2	Standard	426	298	70	
2	11135	E2-Cy3	2JPE EE2	426	298	70	
2	11135	S2-Cy5	2JPE Solvant	426	298	70	
3	11097	Standard-Cy2	Standard	454	454	100	Maitre
3	11097	S3-Cy3	2JPE Solvant	454	454	100	
3	11097	E3-Cy5	2JPE EE2	454	454	100	
4	11099	Standard-Cy2	Standard	400	316	79	
4	11099	E4-Cy3	2JPE EE2	400	316	79	
4	11099	S4-Cy5	2JPE Solvant	400	316	79	

BVA 60 JPE							
Gel n°	Gel ref n°	Echantillon	Groupe	Nombre de spots	Matched	% Matched	Fonction
2	11138	Standard-Cy2	Standard	457	373	82	
2	11138	S2-60-Cy5	60JPE Solvant	457	373	82	
2	11138	E2-60-Cy3	60JPE EE2	457	373	82	
3	11175	Standard-Cy2	Standard	540	540	100	Maitre
3	11175	E3-60-Cy5	60JPE EE2	540	540	100	
3	11175	S5-60-Cy3	60JPE Solvant	540	540	100	
5	11171	Standard-Cy2	Standard	411	334	81	
5	11171	E5-60-Cy5	60JPE EE2	411	334	81	
5	11171	S7-60-Cy3	60JPE Solvant	411	334	81	

Dans un premier temps, les différents gels d'une expérience (n=4 pour 2JPE ; n=3 pour 60 JPE) vont être alignés afin de faire correspondre au mieux l'ensemble de leurs spots protéiques. Un gel « maître » sera également défini à ce stade comme le gel le plus représentatif de la série.

### 3.1.4 RECAPITULATIF DES SPOTS CANDIDATS 2JPE ET 60JPE

**2JPE** : 15 spots candidats ont été sélectionnés après analyse BVA dans une gamme de ratio s'échelonnant de -1,60 à +1.76. Ces ratio sont très faibles et nécessiteraient, le cas échéant, et si l'identification est réalisable, d'être confirmés sur un plus grand nombre de points de mesure (potentiellement à l'aide d'une autre technique d'investigation).

Protein Table T-test and Av.Ratio: 2JPE EE2 / 2JPE				
Pos.	Master Nb.	Appearance	T-test	Av. Ratio
1	342	12 (12) A, M	0,18	-1,60
2	65	12 (12) A, M	0,17	-1,45
3	319	9 (12) A, M	0,18	-1,42
4	48	12 (12) A, M	0,18	-1,34
5	56	12 (12) A, M	0,22	-1,28
6	53	12 (12) A, M	0,29	-1,27
7	57	12 (12) A, M	0,051	-1,27
8	336	12 (12) A, M	0,1	1,25
9	389	12 (12) A, M	0,3	1,27
10	308	9 (12) A, M	0,049	1,28
11	175	12 (12) A, M	0,19	1,29
12	222	12 (12) A, M	0,003	1,32
13	338	12 (12) A, M	0,034	1,42
14	332	12 (12) A, M	0,032	1,46
15	270	9 (12) A, M	0,12	1,76



PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

**60 JPE** : 22 spots candidats ont été sélectionnés après analyse BVA dans une gamme de ratio s'échelonnant de -4,98 à +2,29. Deux groupes de spots sous-exprimés dans les conditions d'exposition à l'EE2 semblent particulièrement intéressants :

- 1<sup>er</sup> groupe : 190, 191, 171 et 170
- 2<sup>ème</sup> groupe : 43, 38, 46 et 41.

L'ensemble de ces spots candidats seront analysés par spectrométrie de masse en vue de leur identification.

<b>Protein Table T-test and Av.Ratio: 60JPE EE2 / 60JPE</b>				
<b>Pos.</b>	<b>Master No.</b>	<b>Appearance</b>	<b>T-test</b>	<b>Av. Ratio</b>
1	116	6 (9) A, M	0,17	-4,98
2	77	6 (9) A, M	0,15	-3,90
3	78	6 (9) A, M	0,0079	-3,54
4	109	6 (9) A, M	0,072	-3,22
5	96	6 (9) A, M	0,0029	-2,37
6	191	9 (9) A, M	0,024	-2,32
7	190	9 (9) A, M	0,12	-2,17
8	43	9 (9) A, M	0,17	-2,15
9	38	9 (9) A, M	0,079	-1,80
10	46	9 (9) A, M	0,083	-1,76
11	360	6 (9) A, M	0,2	-1,72
12	197	9 (9) A, M	0,18	-1,71
13	365	9 (9) A, M	0,055	-1,69
14	41	9 (9) A, M	0,16	-1,65
15	325	9 (9) A, M	0,057	-1,62
16	171	9 (9) A, M	0,18	-1,61
17	370	9 (9) A, M	0,094	-1,57
18	170	9 (9) A, M	0,19	-1,50
19	337	9 (9) A, M	0,041	1,58
20	460	9 (9) A, M	0,042	1,67
21	450	6 (9) A, M	0,023	1,98
22	459	6 (9) A, M	0,038	2,29

PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

3.1.5 ANALYSE DES SPOTS D'INTERET PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Résultats d'identification – Medaka 60 JPE (score significatif si > 81 (all entries) > 77 (EST Fishes), p < 0.05)

Sample name	Ratio	Protein name	Species	Accession number	Accession gi	Th. Mass	Th. pI	Exp. Mass	Exp. pI	Matched peptides	Error (ppm)	Seq. Coverage	Score	Threshold (p<0.05)
109	-3.22	similar to UniRef100_09PU85 Cluster: Type II cytokeratin; n=1; Danio rerio Rep: Type II cytokeratin - Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio), partial (77%) similar to UniRef100_06P3K5 Cluster: Kt15 protein; n=2; Danio rerio Rep: Kt15 protein - Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio), partial (49%)	Danio rerio	///	TC64075 (98354)	86317	8.63	52000	5.2	27/84	11.28	30%	155	77
			Danio rerio	///	TC68903 (103182)	43220	5.71				16/84	14.83	34%	121
96	-2.37	transferrin	Oryzias latipes	NP_001116384	qil171544935	76453	6.14	60000	5.5	17/65	26.05	32%	120	81
41	-1.65	transferrin	Oryzias latipes	NP_001116384	qil171544935	76453	6.14	78000	5.6	28/76	16.79	46%	210	81
46	-1.76	transferrin	Oryzias latipes	NP_001116384	qil171544935	76453	6.14	78000	5.7	33/83	13.16	50%	282	81
38	-1.80	transferrin	Oryzias latipes	NP_001116384	qil171544935	76453	6.14	78000	5.8	34/64	26.42	49%	310	81
171	-1.61	* variant Enolase 1 * cf 170-1, 170-2, 170-3						48000	5.85					
191	-2.32	* variant Enolase 1 * cf 170-1, 170-2, 170-3						47000	6.2					
190	-2.17	* variant Enolase 1 * cf 170-1, 170-2, 170-3						47000	6.3					
325	-1.62	chimera1	synthetic construct	AA19136Z	qil22040813	67853	5.59	30000	6.3	9/37	33.79	21%	84	81
360	-1.72							26500	7					
365	-1.69	weakly similar to UniRef100_05DV68 Cluster: Apolipoprotein AI; n=1; Platichthys flesus Rep: Apolipoprotein AI - Platichthys flesus (European flounder), partial (93%) weakly similar to UniRef100_05DV68 Cluster: Apolipoprotein AI; n=1; Platichthys flesus Rep: Apolipoprotein AI - Platichthys flesus (European flounder), partial (97%)	Platichthys flesus		TC88283 (122562)	42454	8.17	23500	5.15	15/34	30	49%	162	77
			Platichthys flesus		TC2159	29545	5.35				13/34	31	57%	137
370	-1.57	weakly similar to UniRef100_05DV68 Cluster: Apolipoprotein AI; n=1; Platichthys flesus Rep: Apolipoprotein AI - Platichthys flesus (European flounder), partial (93%) weakly similar to UniRef100_05DV68 Cluster: Apolipoprotein AI; n=1; Platichthys flesus Rep: Apolipoprotein AI - Platichthys flesus (European flounder), partial (97%)	Platichthys flesus	///	TC88283 (122562)	42454	8.17	23500	5.25	26/72	13.67	51%	191	77
			Platichthys flesus	///	TC2159	29545	5.35				24/72	13.96	67%	183
337	1.58							25000	4.8					
450	1.98							13000	5.4					
43	-2.15	transferrin	Oryzias latipes	NP_001116384	qil171544935	76453	6.14	78000	5.9	35/81	16.13	52%	284	81
170-2	-1.50	* variant Enolase 1 * cf 170-1, 170-2, 170-3						48000	5.5					
170-3		Enolase 1, (alpha)	Danio rerio	AAH59511	qil37590349	47386	6.16	48000	5.6	15/74	13.89	39%	119	81
170-4		Enolase 1, (alpha)	Danio rerio	AAH59511	qil37590349	47386	6.16	48000	5.65	12/72	23.18	40%	88	81
		Enolase 1, (alpha)	Danio rerio	AAH59511	qil37590349	47386	6.16	48000	5.75	19/91	9.87	51%	169	81
		Enolase 1, (alpha)	Danio rerio	AAH59511	qil37590349	47386	6.16	48000	5.75	13/78	15.48	43%	101	81
197	-1.71	skeletal alpha-actin type-2b	Coryphaenoides yaquinae	BAC7597Z	qil3026860Z	42205	5.23	45000	5.5	13/78	22.43	47%	98	81
459	2.29							12500	5.15					
460	1.67	homologue to UniRef100_005K05 Cluster: Fast skeletal myosin heavy chain isoform mMWH-11; n=1; Oryzias latipes Rep: Fast skeletal myosin heavy chain isoform mMWH-11 - Oryzias latipes (Medaka fish) (Japanese ricefish), partial (11%)	Oryzias latipes	///	B1731476	25520	5.34	12500	4.8	12/67	35.58	58%	93	77
			Danio rerio		TC64075 (98354)	86317	8.63						17%	95
116	-4.98	similar to UniRef100_09PU85 Cluster: Type II cytokeratin; n=1; Danio rerio Rep: Type II cytokeratin - Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio), partial (77%)	Danio rerio		TC64075 (98354)	86317	8.63	52000	5.2	12/32	8	17%	95	77



### 3.1.6 CONCLUSIONS DE L'ANALYSE PAR 2D-DIGE

**2JPE** : 15 spots candidats ont été sélectionnés après analyse BVA dans une gamme de ratio s'échelonnant de -1,60 à +1.76. Ces ratio sont très faibles et nécessiteraient, le cas échéant, et si l'identification est réalisable, d'être confirmés sur un plus grand nombre de points de mesure (potentiellement à l'aide d'une autre technique d'investigation).

Sur les 15 spots candidats, 9 ont été identifiés sans ambiguïté. Il s'agit des spots 53, 56, 57, 175, 222, 332, 336, 338 et 319, qui correspondent à 8 protéines non redondantes :

- cytokeratin type II (ratio -1.27)
- tubulin b2c (ratio -1.27)
- tubulin b1c (ratio +1.29)
- myosin heavy chain isoform mMYH-2 (ratio -1.27)
- vitellogenin fragment (ratio -1.42)
- muscle actin OIMA1 (ratio ~ +1.39)
- alpha-actin (ratio ~ +1.27)
- myosin heavy chain (ratio ~ +1.33)

**60 JPE** : 22 spots protéiques candidats ont été sélectionnés après analyse BVA dans une gamme de ratio s'échelonnant de -4,98 à +2,29. Sur les 22 spots candidats, 15 ont été identifiés sans ambiguïté. Il s'agit des spots 38, 41, 43, 46, 96, 109, 116, 197, 365, 370 et 460. Les spots 170, 171, 190 et 191 ont été identifiés indirectement via l'analyse des spots 170-2, 170-3 et 170-4. L'identification du spot 325 est tout juste significative et doit être considérée avec précaution. Ces identifications correspondent à 5 protéines non redondantes:

- - cytokeratin type II (ratio ~ -4.10)
- - transferrin (ratio ~ -1.95)
- - enolase 1 (ratio ~ -1.86)
- - apolipoprotein A1 (ratio ~ -1.63)
- - myosin heavy chain (ratio +1.67)

Il apparaît à ce stade de notre étude, que 3 protéines clairement identifiées peuvent être intéressantes en tant que traceurs de l'effet de l'EE2 : la Transferrine, l'Enolase I et l'Apolipoprotéine A1. Il est indispensable de confirmer ces résultats à l'aide d'un dosage grâce à des anticorps spécifiques disponibles commercialement (*e.g.*, ELISA). Ceci afin de tester les niveaux d'expression de ces protéines indicatrices sur une large cohorte d'individus à 60 jpe, mais également à des âges plus avancés.

## 3.2 IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PAR ANALYSE PROTEINECHIP SELDI-TOF

### 3.2.1 COMPARAISON DES ECHANTILLONS A 60JPE SUR BARRETTE Q10 A PH6

#### 3.2.1.1 ANALYSE EN BASSES MASSES

L'analyse des spectres acquis après dépôt des échantillons jpe60 témoins et traités sur puces de type q10/ pH6 a permis la détection de 56 clusters en basses masses.

Seuls les 9 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
1	0,0253	0,00	3 105,14	3 105,01	3 105,15	0,89	0,03	1,23	1,04	0,49
2	0,0253	0,00	3 252,72	3 252,11	3 252,71	1,14	0,04	1,77	1,74	0,51
4	0,0253	0,00	3 365,19	3 364,74	3 364,68	1,50	0,04	1,12	1,04	0,39
10	0,0253	0,00	4 290,27	4 289,39	4 289,45	1,69	0,04	0,78	0,74	0,44
20	0,0253	1,00	5 849,83	5 849,91	5 850,33	2,16	0,04	0,95	0,91	0,46
37	0,0253	0,00	10 403,46	10 405,22	10 405,50	3,20	0,03	0,69	0,66	0,15
38	0,0253	0,00	11 086,07	11 086,60	11 086,76	2,98	0,03	1,10	1,12	0,27
43	0,0253	1,00	11 643,60	11 645,47	11 643,60	3,98	0,03	1,85	1,73	0,83
44	0,0253	1,00	11 688,68	11 690,57	11 693,59	10,26	0,09	1,90	1,77	0,59
7	0,0526	0,07	4 022,04	4 022,35	4 022,86	1,05	0,03	12,67	10,57	4,53
9	0,0526	0,07	4 223,76	4 223,60	4 223,31	2,34	0,06	1,22	1,10	0,41
14	0,0526	0,93	4 999,63	5 000,17	4 999,99	1,06	0,02	1,80	1,76	0,92
45	0,0526	0,07	11 871,41	11 872,42	11 873,26	3,19	0,03	1,35	1,29	0,34
54	0,0526	0,07	18 337,33	18 336,54	18 337,33	5,08	0,03	0,60	0,60	0,20
11	0,1011	0,13	4 345,95	4 347,28	4 347,70	2,99	0,07	1,27	1,16	0,44
21	0,1011	0,87	6 499,01	6 499,36	6 499,56	1,78	0,03	1,64	1,54	0,48
24	0,1011	0,13	7 268,74	7 268,88	7 269,43	1,82	0,03	1,34	1,20	0,54
40	0,1011	0,87	11 405,44	11 405,42	11 406,11	7,53	0,07	1,54	1,71	0,67
46	0,1011	0,87	13 485,42	13 486,46	13 485,42	2,23	0,02	0,42	0,30	0,32
52	0,1011	0,13	17 906,03	17 903,28	17 905,00	4,77	0,03	0,46	0,43	0,19
53	0,1011	0,13	18 213,25	18 211,28	18 211,68	5,66	0,03	0,70	0,62	0,23
8	0,1797	0,20	4 124,08	4 124,09	4 124,15	1,16	0,03	1,18	1,24	0,31
23	0,1797	0,23	6 719,99	6 720,39	6 721,29	1,71	0,03	4,36	4,07	1,61
33	0,1797	0,20	9 199,68	9 193,29	9 194,03	7,00	0,08	1,29	1,21	0,35
34	0,1797	0,80	9 437,74	9 438,83	9 439,34	1,02	0,01	1,37	1,28	0,55
48	0,1797	0,17	15 525,08	15 524,28	15 525,84	5,55	0,04	0,30	0,30	0,07
55	0,1797	0,80	18 879,54	18 880,17	18 881,74	6,04	0,03	1,17	1,19	0,41
13	0,2967	0,30	4 746,00	4 746,55	4 747,02	1,25	0,03	4,08	3,85	1,12
22	0,2967	0,30	6 637,81	6 637,55	6 637,80	1,60	0,02	1,56	1,67	0,40
26	0,2967	0,23	7 491,08	7 491,59	7 492,13	1,94	0,03	5,60	5,32	1,98
47	0,2967	0,70	13 668,00	13 662,45	13 663,06	6,76	0,05	0,30	0,27	0,11
51	0,2967	0,73	16 959,04	16 959,90	16 960,15	3,79	0,02	0,60	0,62	0,09
6	0,4561	0,37	3 891,56	3 891,89	3 892,36	1,47	0,04	1,49	1,40	0,50
17	0,4561	0,67	5 643,37	5 643,93	5 644,25	1,38	0,02	13,17	14,11	3,18
19	0,4561	0,37	5 776,67	5 777,43	5 777,42	1,25	0,02	2,16	2,20	0,44
35	0,4561	0,70	9 488,72	9 493,41	9 491,69	10,67	0,11	1,46	1,39	0,41
36	0,4561	0,33	9 765,71	9 765,34	9 765,93	2,81	0,03	1,29	1,23	0,41
39	0,4561	0,67	11 284,65	11 285,76	11 286,66	3,03	0,03	22,40	22,76	4,98
41	0,4561	0,67	11 489,57	11 489,71	11 490,42	2,53	0,02	4,88	5,07	1,24
50	0,4561	0,67	16 763,80	16 765,21	16 766,62	4,90	0,03	2,68	2,61	0,57
56	0,4561	0,63	19 068,33	19 071,03	19 070,23	8,15	0,04	0,72	0,71	0,18
15	0,6547	0,60	5 323,93	5 326,88	5 325,13	5,01	0,09	1,15	1,08	0,44
16	0,6547	0,57	5 396,07	5 395,62	5 396,04	1,42	0,03	1,33	1,37	0,30
25	0,6547	0,43	7 465,56	7 466,07	7 466,76	1,86	0,02	4,93	4,80	1,36
28	0,6547	0,60	8 030,58	8 030,77	8 031,10	2,14	0,03	2,01	1,69	1,03
29	0,6547	0,43	8 167,85	8 168,79	8 169,01	5,35	0,07	1,57	1,35	0,66

#### 3.2.1.2 ANALYSE EN HAUTES MASSES

L'analyse des spectres acquis après dépôt des échantillons jpe60 témoins et traités sur puces de type q10/ pH6 a permis la détection de 31 clusters en hautes masses.

Seuls les 11 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels.

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
25	0,0143	-	22 578,49	22 601,80	22 605,21	32,35	0,14	0,78	0,74	0,26
3	0,0275	0,95	15 500,41	15 504,47	15 495,25	21,35	0,14	0,71	0,62	0,33
19	0,0275	0,05	18 630,10	18 632,16	18 631,11	6,15	0,03	1,96	2,21	0,82
26	0,0275	0,05	22 737,45	22 740,19	22 741,73	10,35	0,05	1,31	1,08	0,72
30	0,0275	0,95	32 800,63	32 808,89	32 807,35	28,86	0,09	1,68	1,38	0,71
31	0,0275	0,95	32 994,06	32 982,86	32 977,41	14,94	0,05	1,77	1,43	0,73
17	0,0500	0,10	18 310,50	18 312,29	18 312,29	4,54	0,02	6,46	6,58	2,68
18	0,0500	0,10	18 436,16	18 435,24	18 438,35	6,66	0,04	5,19	5,45	2,22
23	0,0500	0,90	20 746,40	20 763,56	20 756,24	24,00	0,12	0,65	0,59	0,25
33	0,0500	0,90	42 066,69	42 005,94	41 982,92	78,95	0,19	0,66	0,66	0,23
40	0,0500	0,90	68 424,25	68 487,17	68 716,83	476,39	0,70	0,08	0,05	0,05
15	0,0864	0,15	18 005,98	18 008,94	18 010,23	4,51	0,03	4,86	4,98	2,54
6	0,1416	0,22	15 960,71	15 959,10	15 957,75	3,77	0,02	0,74	0,43	0,61
29	0,1416	0,20	32 202,40	32 218,99	32 233,75	55,56	0,17	0,72	0,68	0,13
39	0,1416	0,78	65 473,11	65 285,61	65 288,68	286,79	0,44	0,15	0,12	0,06
4	0,2207	0,22	15 667,74	15 670,27	15 671,13	4,01	0,03	2,93	2,92	0,92
14	0,2207	0,27	17 816,74	17 811,90	17 817,07	15,28	0,09	1,16	1,12	0,38
16	0,2207	0,27	18 168,26	18 176,07	18 177,17	14,59	0,08	3,35	3,22	1,49
21	0,2207	0,75	19 084,26	19 087,48	19 086,76	9,41	0,05	6,06	5,53	2,05
24	0,2207	0,78	21 338,48	21 427,54	21 428,87	92,93	0,43	0,65	0,46	0,30
28	0,3272	0,70	28 294,39	28 373,65	28 350,13	376,42	1,33	0,43	0,41	0,17
37	0,3272	0,70	55 113,18	55 057,14	55 032,78	234,92	0,43	0,16	0,16	0,05
7	0,4624	0,35	16 102,39	16 081,14	16 072,05	20,90	0,13	0,39	0,42	0,13
32	0,4624	0,37	35 960,31	36 000,23	35 967,09	452,16	1,26	0,45	0,46	0,15
35	0,4624	0,65	48 611,49	48 597,49	48 645,56	125,98	0,26	0,17	0,16	0,08
36	0,4624	0,35	52 077,52	52 053,45	52 049,94	83,01	0,16	0,25	0,27	0,06
2	0,6242	0,60	15 365,36	15 374,65	15 388,12	25,48	0,17	0,74	0,74	0,23
8	0,6242	0,63	16 381,75	16 358,42	16 347,63	18,75	0,11	0,55	0,51	0,30
10	0,6242	0,63	16 890,91	16 891,17	16 889,56	3,98	0,02	20,45	20,29	2,90
11	0,6242	0,63	17 072,76	17 076,50	17 078,12	6,69	0,04	4,47	4,62	0,77
20	0,6242	0,63	18 970,50	18 972,10	18 972,59	6,73	0,04	12,04	10,40	3,33
34	0,6242	0,43	46 126,50	45 957,49	45 876,93	270,79	0,59	0,18	0,15	0,08
41	0,6242	0,58	72 821,04	73 122,25	73 045,83	599,42	0,82	0,07	0,05	0,05
42	0,6242	0,37	80 401,06	80 658,52	80 889,94	628,53	0,78	0,05	0,04	0,04
5	0,8065	0,55	15 867,83	15 874,25	15 871,31	8,62	0,05	0,86	0,83	0,20
9	0,8065	0,55	16 664,09	16 668,24	16 668,52	2,97	0,02	27,51	28,25	3,14
12	0,8065	0,48	17 302,15	17 303,62	17 304,52	5,68	0,03	0,98	0,98	0,07
22	0,8065	0,58	19 169,64	19 166,95	19 167,45	5,54	0,03	6,26	5,65	1,26
27	0,8065	0,48	26 083,97	26 123,15	26 115,78	42,21	0,16	0,38	0,34	0,13
38	0,8065	0,48	61 718,64	61 791,05	61 675,47	282,86	0,46	0,09	0,07	0,04
1	1,0000	0,48	15 099,99	15 110,44	15 113,45	11,43	0,08	1,22	1,15	0,44
13	1,0000	0,48	17 506,52	17 491,46	17 491,31	11,99	0,07	0,47	0,44	0,15

### 3.2.2 COMPARAISON DES ECHANTILLONS A 60JPE SUR BARRETTE CM10 A PH6

#### 3.2.2.1 ANALYSE EN BASSES MASSES

L'analyse des spectres acquis après dépôt des échantillons jpe60 témoins et traités sur puces de type cm10/ pH6 a permis la détection de 44 clusters en hautes masses.

Seuls les 17 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels.

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
2	0,0090	-	3 312,25	3 314,17	3 314,52	2,03	0,06	2,66	2,87	1,48
4	0,0090	-	4 021,57	4 022,52	4 022,89	1,68	0,04	0,86	0,76	0,49
18	0,0090	-	7 783,31	7 782,80	7 783,15	1,04	0,01	1,22	1,31	0,58
20	0,0090	-	8 162,73	8 162,25	8 162,37	1,16	0,01	1,16	1,07	0,53
1	0,0163	0,04	3 000,69	3 000,08	3 000,12	0,85	0,03	0,50	0,46	0,33
5	0,0163	0,04	4 354,61	4 357,96	4 361,40	5,89	0,14	1,20	1,14	0,61
32	0,0163	0,96	12 822,91	12 827,65	12 830,30	7,29	0,06	0,28	0,28	0,06
13	0,0283	0,08	6 642,70	6 641,36	6 640,86	2,50	0,04	1,02	1,02	0,12
17	0,0283	0,08	7 495,91	7 494,79	7 495,67	3,76	0,05	1,18	0,95	0,59
28	0,0283	0,92	11 647,73	11 649,25	11 649,81	2,76	0,02	1,41	1,40	0,39
33	0,0283	0,92	13 489,73	13 491,74	13 493,02	3,55	0,03	0,62	0,51	0,36
34	0,0283	0,92	13 673,86	13 670,45	13 672,65	10,02	0,07	0,39	0,34	0,21
15	0,0472	0,88	6 874,12	6 871,48	6 872,65	4,37	0,06	1,68	1,56	0,61
30	0,0472	0,12	11 898,63	11 901,45	11 903,59	7,23	0,06	0,41	0,41	0,08
3	0,0758	0,16	3 774,78	3 780,11	3 783,51	8,26	0,22	0,71	0,65	0,35
8	0,0758	0,16	4 942,47	4 942,81	4 943,18	1,60	0,03	1,29	1,19	0,44
19	0,0758	0,18	8 034,70	8 034,54	8 034,58	1,67	0,02	1,03	0,77	0,56
23	0,0758	0,82	8 778,59	8 778,59	8 778,79	1,30	0,01	3,08	2,60	1,87
31	0,0758	0,16	12 166,14	12 167,47	12 167,03	4,57	0,04	0,26	0,24	0,12
41	0,0758	0,84	17 492,06	17 486,97	17 488,71	8,47	0,05	0,16	0,16	0,05
42	0,0758	0,82	18 902,16	18 904,44	18 901,16	22,15	0,12	0,19	0,19	0,06
7	0,1172	0,78	4 901,64	4 902,93	4 903,14	1,07	0,02	0,77	0,70	0,28
14	0,1172	0,20	6 729,64	6 726,87	6 721,69	13,04	0,19	1,18	1,16	0,39
24	0,1172	0,18	9 548,11	9 547,42	9 546,65	5,97	0,06	0,52	0,47	0,17
16	0,1745	0,78	7 266,83	7 288,55	7 292,67	9,76	0,13	1,29	1,29	0,19
21	0,1745	0,74	8 284,71	8 285,05	8 285,24	3,19	0,04	0,83	0,80	0,17
36	0,1745	0,76	15 694,29	15 695,65	15 696,17	9,54	0,06	0,12	0,12	0,04
38	0,1745	0,78	16 551,00	16 553,78	16 554,10	2,74	0,02	0,78	0,79	0,17
39	0,1745	0,74	16 770,60	16 774,35	16 772,39	7,05	0,04	0,42	0,42	0,08
6	0,2506	0,72	4 392,63	4 390,42	4 390,55	2,26	0,05	0,75	0,76	0,40
9	0,2506	0,28	5 001,39	5 002,34	5 002,29	0,84	0,02	1,33	1,44	0,37
11	0,2506	0,70	5 646,89	5 646,94	5 647,19	1,25	0,02	4,19	4,19	0,61
26	0,2506	0,70	11 289,82	11 290,08	11 289,96	1,80	0,02	9,70	9,59	1,32
27	0,2506	0,72	11 491,17	11 490,27	11 489,99	3,36	0,03	2,45	2,46	0,29
40	0,2506	0,72	16 996,98	17 005,63	17 007,14	15,72	0,09	0,16	0,16	0,02
10	0,4647	0,36	5 421,65	5 422,17	5 422,41	1,52	0,03	5,11	5,19	1,01
12	0,6015	0,58	6 508,55	6 507,18	6 506,75	2,71	0,04	1,14	1,14	0,26
22	0,6015	0,58	8 672,66	8 673,97	8 674,43	1,57	0,02	1,38	1,37	0,42
35	0,6015	0,40	15 529,03	15 531,11	15 532,30	5,32	0,03	0,32	0,35	0,08
25	0,9168	0,48	9 879,72	9 880,71	9 880,01	2,51	0,03	1,09	1,19	0,39
29	0,9168	0,52	11 704,49	11 704,51	11 704,14	1,54	0,01	1,67	1,71	0,20
37	0,9168	0,52	15 744,50	15 749,88	15 749,86	12,36	0,08	0,12	0,12	0,04

### 3.2.2.2 ANALYSE EN HAUTES MASSES

L'analyse des spectres acquis après dépôt des échantillons jpe60 témoins et traités sur puces de type cm10/ pH6 a permis la détection de 18 clusters en hautes masses.

Seuls les 5 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
13	0,0163	0,04	22 797,27	22 842,20	22 850,21	58,70	0,26	0,51	0,48	0,12
16	0,0283	0,92	42 224,07	42 119,47	42 149,27	178,74	0,42	0,21	0,17	0,10
9	0,0472	0,88	17 594,74	17 596,38	17 596,21	3,32	0,02	1,31	1,41	0,37
15	0,0472	0,88	32 595,82	32 799,11	32 895,60	248,75	0,76	0,52	0,41	0,30
17	0,0472	0,88	55 571,82	55 562,30	55 578,14	213,17	0,38	0,08	0,07	0,03
6	0,0758	0,82	16 899,02	16 900,84	16 901,07	5,11	0,03	2,78	2,96	0,79
8	0,0758	0,84	17 334,26	17 331,55	17 332,54	7,98	0,05	0,39	0,38	0,14
1	0,1172	0,80	15 168,64	15 166,11	15 168,64	22,98	0,15	0,26	0,22	0,16
5	0,1172	0,82	16 680,91	16 682,30	16 682,05	3,51	0,02	6,29	6,19	1,99
12	0,1172	0,82	18 987,54	18 989,18	18 988,21	7,33	0,04	1,86	1,90	0,80
18	0,1172	0,80	72 812,57	72 767,67	72 701,42	359,75	0,49	0,05	0,05	0,02
7	0,1745	0,76	17 133,75	17 136,08	17 141,39	15,98	0,09	0,93	0,98	0,38
3	0,2506	0,72	15 868,99	15 875,87	15 872,36	20,13	0,13	0,98	1,12	0,33
11	0,2506	0,30	18 386,57	18 363,24	18 327,09	65,24	0,36	0,86	0,71	0,32
4	0,4647	0,64	16 429,65	16 431,58	16 432,29	6,21	0,04	0,62	0,57	0,35
10	0,4647	0,34	18 026,01	18 017,06	18 017,05	5,43	0,03	0,39	0,31	0,22
14	0,6015	0,38	26 552,53	26 549,31	26 561,90	39,05	0,15	0,33	0,32	0,06
2	0,7540	0,56	15 675,33	15 674,83	15 674,71	3,25	0,02	2,52	2,76	0,82

### 3.2.3 COMPARAISON DES ECHANTILLONS A 2JPE SUR BARRETTE Q10 A PH6

#### 3.2.3.1 ANALYSE EN BASSE MASSE

L'analyse des spectres acquis sur puces de type q10/ pH6 a permis la détection de 77 clusters en basses masses.

Seuls les 5 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme de marqueurs potentiels.

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
43	0,0283	0,92	9 500,54	9 491,52	9 489,58	5,19	0,05	0,92	0,94	0,13
44	0,0283	0,08	9 684,62	9 687,95	9 693,02	10,35	0,11	0,77	0,78	0,20
74	0,0283	0,08	18 499,73	18 512,31	18 513,19	6,85	0,04	0,25	0,23	0,09
67	0,0472	0,12	15 822,26	15 814,02	15 813,92	9,13	0,06	0,18	0,19	0,03
73	0,0472	0,12	18 314,89	18 316,78	18 318,01	3,73	0,02	0,67	0,59	0,30
18	0,0758	0,84	5 340,27	5 340,59	5 340,92	1,52	0,03	1,76	1,62	0,52
72	0,0758	0,16	18 196,32	18 190,24	18 188,50	8,10	0,04	0,45	0,40	0,20
31	0,1172	0,80	7 264,91	7 264,47	7 264,92	1,51	0,02	0,76	0,70	0,26
39	0,1172	0,20	8 565,43	8 565,61	8 565,32	2,31	0,03	0,68	0,74	0,19
42	0,1172	0,22	9 325,27	9 324,24	9 324,20	2,15	0,02	0,63	0,65	0,20
48	0,1172	0,22	11 032,55	11 033,01	11 033,82	4,60	0,04	0,47	0,45	0,07
50	0,1172	0,82	11 280,57	11 280,27	11 280,26	2,05	0,02	10,62	10,32	1,72
55	0,1172	0,80	11 684,11	11 689,70	11 693,82	9,48	0,08	0,66	0,68	0,11
56	0,1172	0,18	11 862,82	11 862,44	11 862,12	1,53	0,01	1,82	1,85	0,33
61	0,1172	0,20	12 967,65	12 963,97	12 964,11	2,87	0,02	0,39	0,35	0,10
66	0,1172	0,20	15 234,51	15 238,08	15 237,96	5,27	0,03	0,14	0,14	0,04
75	0,1172	0,80	18 986,44	18 986,21	18 986,31	3,87	0,02	0,63	0,63	0,17
1	0,1745	0,24	3 170,51	3 169,38	3 169,64	0,63	0,02	1,03	0,80	0,59
16	0,1745	0,76	4 995,96	4 996,56	4 996,91	1,48	0,03	0,88	0,71	0,52
22	0,1745	0,78	5 639,96	5 641,34	5 641,37	0,88	0,02	5,38	5,19	1,05
37	0,1745	0,76	8 263,91	8 263,72	8 263,79	1,32	0,02	1,85	1,74	0,32
51	0,1745	0,74	11 481,48	11 481,31	11 482,73	3,22	0,03	2,14	2,11	0,41
58	0,1745	0,22	12 380,39	12 374,97	12 374,94	6,33	0,05	0,45	0,46	0,08
71	0,1745	0,26	18 005,80	18 010,36	18 009,82	6,38	0,04	0,38	0,31	0,24
25	0,2506	0,28	6 372,77	6 370,90	6 369,88	3,40	0,05	1,15	1,12	0,19
26	0,2506	0,30	6 491,71	6 491,46	6 491,45	2,24	0,03	1,41	1,33	0,22
30	0,2506	0,28	7 130,68	7 135,73	7 136,36	2,72	0,04	0,61	0,61	0,11
36	0,2506	0,72	8 172,89	8 171,14	8 171,68	3,02	0,04	0,54	0,52	0,16
40	0,2506	0,26	8 870,56	8 870,70	8 870,57	2,31	0,03	1,33	1,22	0,22
76	0,2506	0,70	19 120,38	19 125,47	19 127,73	12,27	0,06	0,39	0,39	0,05
3	0,3472	0,66	3 312,95	3 313,30	3 312,98	0,58	0,02	4,06	3,63	2,74
11	0,3472	0,66	4 528,34	4 528,29	4 528,46	1,28	0,03	0,83	0,66	0,70
13	0,3472	0,66	4 594,97	4 594,80	4 594,85	1,04	0,02	1,88	1,80	0,52
15	0,3472	0,32	4 818,92	4 816,91	4 815,94	3,16	0,07	1,10	0,99	0,29
62	0,3472	0,32	13 055,64	13 046,53	13 044,05	8,53	0,07	0,26	0,23	0,10
65	0,3472	0,34	14 934,46	14 939,14	14 938,58	6,81	0,05	0,22	0,23	0,06
70	0,3472	0,34	16 953,07	16 954,40	16 956,84	7,40	0,04	0,57	0,57	0,12
8	0,4647	0,38	4 047,00	4 044,59	4 042,51	3,97	0,10	1,11	0,78	0,86
21	0,4647	0,38	5 552,20	5 554,96	5 555,81	2,12	0,04	1,75	1,75	0,45
32	0,4647	0,38	7 462,19	7 462,67	7 462,94	1,50	0,02	2,63	2,32	0,96
47	0,4647	0,34	10 752,13	10 752,68	10 752,36	2,30	0,02	0,57	0,58	0,12
52	0,4647	0,64	11 546,30	11 546,10	11 546,87	2,89	0,03	1,09	0,98	0,43
7	0,6015	0,40	4 019,74	4 019,72	4 019,77	0,62	0,02	13,88	13,70	2,97
12	0,6015	0,40	4 551,28	4 548,06	4 546,51	4,47	0,10	1,04	0,93	0,63
24	0,6015	0,62	6 019,53	6 015,37	6 015,11	2,43	0,04	0,77	0,73	0,43
28	0,6015	0,42	6 710,15	6 706,81	6 705,40	4,13	0,06	1,71	1,63	0,53



## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

### 3.2.3.2 ANALYSE EN HAUTES MASSES

L'analyse des spectres acquis sur puces de type q10/ pH6 a permis la détection de 72 clusters en hautes masses.

Seuls les 2 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels.

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
28	0,0472	0,12	18 290,51	18 290,10	18 290,12	2,58	0,01	3,90	3,45	1,45
31	0,0472	0,88	19 074,32	19 074,64	19 075,16	2,84	0,01	6,65	6,24	1,69
37	0,0758	0,84	25 724,85	25 724,59	25 724,85	11,10	0,04	0,22	0,22	0,06
63	0,0758	0,84	57 840,42	57 873,74	57 863,47	110,55	0,19	0,05	0,05	0,01
8	0,1172	0,20	13 154,54	13 155,64	13 155,60	3,48	0,03	2,95	2,76	0,74
27	0,1172	0,22	18 111,82	18 112,43	18 111,71	2,81	0,02	3,84	3,15	2,04
40	0,1172	0,80	28 785,07	28 824,14	28 804,09	75,52	0,26	0,21	0,22	0,05
44	0,1172	0,80	32 958,87	32 934,48	32 930,43	14,32	0,04	0,90	0,76	0,44
51	0,1172	0,80	41 908,06	42 015,98	42 036,11	93,42	0,22	0,33	0,31	0,10
68	0,1745	0,76	61 906,55	61 909,95	61 906,55	44,99	0,07	0,03	0,02	0,02
6	0,2506	0,72	12 933,39	12 933,75	12 933,54	2,74	0,02	2,23	2,02	0,77
10	0,2506	0,30	13 351,95	13 355,28	13 353,38	6,41	0,05	0,91	0,90	0,26
14	0,2506	0,28	14 064,86	14 050,59	14 043,00	25,63	0,18	0,49	0,42	0,39
18	0,2506	0,28	15 386,90	15 387,06	15 387,64	3,88	0,03	1,21	1,22	0,34
24	0,2506	0,30	17 072,63	17 075,39	17 075,50	5,10	0,03	4,69	4,57	0,43
32	0,2506	0,70	19 203,08	19 203,93	19 203,42	2,60	0,01	3,43	3,51	0,38
39	0,2506	0,30	28 192,85	28 199,33	28 208,93	58,39	0,21	0,31	0,31	0,05
45	0,2506	0,28	35 851,47	35 558,45	35 566,52	63,60	0,18	0,36	0,36	0,11
48	0,2506	0,72	39 144,25	39 143,78	39 144,25	26,11	0,07	0,17	0,16	0,07
55	0,2506	0,74	48 720,62	48 705,91	48 720,62	33,92	0,07	0,05	0,06	0,02
62	0,2506	0,72	55 958,06	55 951,95	55 958,06	148,81	0,27	0,04	0,03	0,02
69	0,2506	0,72	64 327,23	64 366,37	64 327,23	146,96	0,23	0,06	0,06	0,02
11	0,3472	0,66	13 536,51	13 537,95	13 538,05	2,90	0,02	2,01	2,11	0,35
17	0,3472	0,34	15 096,07	15 099,09	15 100,97	5,33	0,04	1,83	1,77	0,51
20	0,3472	0,32	15 951,35	15 952,54	15 951,02	3,45	0,02	1,85	1,87	0,47
23	0,3472	0,30	16 891,07	16 891,88	16 890,84	3,53	0,02	19,93	20,21	1,38
30	0,3472	0,34	18 620,52	18 620,88	18 621,23	4,75	0,03	2,09	1,93	0,74
46	0,3472	0,32	37 246,12	37 251,20	37 246,12	28,67	0,08	0,10	0,09	0,09
50	0,3472	0,66	40 972,84	40 976,01	40 972,84	10,02	0,02	0,17	0,16	0,08
52	0,3472	0,68	44 279,86	44 270,75	44 289,69	93,68	0,21	0,11	0,11	0,04
54	0,3472	0,30	46 826,40	46 737,54	46 717,41	118,72	0,25	0,14	0,12	0,07
57	0,3472	0,68	52 044,46	51 951,87	51 955,55	124,03	0,24	0,14	0,14	0,03
64	0,3472	0,34	58 667,51	58 674,24	58 667,51	126,50	0,22	0,03	0,03	0,02
65	0,3472	0,34	59 576,57	59 572,68	59 576,57	12,51	0,02	0,02	0,02	0,02
12	0,4647	0,62	13 661,72	13 661,99	13 661,82	2,40	0,02	8,06	8,41	1,61
16	0,4647	0,62	14 806,20	14 793,97	14 803,40	27,80	0,19	0,71	0,72	0,21
19	0,4647	0,66	15 597,62	15 604,72	15 597,62	32,52	0,21	0,60	0,57	0,24
22	0,4647	0,62	16 658,59	16 659,61	16 659,61	3,14	0,02	15,85	15,39	2,37
58	0,4647	0,36	53 451,99	53 457,99	53 451,99	56,20	0,11	0,03	0,03	0,01
60	0,4647	0,62	54 897,46	54 886,76	54 897,46	18,64	0,03	0,05	0,05	0,02
61	0,4647	0,64	55 256,75	55 267,70	55 256,75	15,42	0,03	0,05	0,05	0,02
66	0,4647	0,66	60 189,19	60 191,26	60 189,19	47,12	0,08	0,02	0,02	0,01
3	0,6015	0,62	12 366,10	12 364,30	12 364,91	3,76	0,03	0,92	0,89	0,41
9	0,6015	0,38	13 236,32	13 238,34	13 238,43	1,95	0,01	1,88	1,75	0,67
15	0,6015	0,42	14 308,11	14 293,30	14 275,10	29,46	0,21	1,11	1,05	0,20
25	0,6015	0,42	17 286,26	17 285,51	17 286,26	3,48	0,02	0,64	0,66	0,10

### 3.2.4 COMPARAISON DES ECHANTILLONS A 2JPE SUR BARRETTE CM10 A PH6

#### 3.2.4.1 ANALYSE EN BASSES MASSES

L'analyse des spectres acquis sur puces de type cm10/ pH6 a permis la détection de 45 clusters en basses masses.

Seuls les 2 pics protéiques, définis par leur rapport masse/charge (m/z), qui présentent les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.05 peuvent être considérés comme marqueurs potentiels.

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
1	0,0282801	0,08	3 152,67	3 151,79	3 151,07	2,91	0,09	0,72	0,72	0,23
19	0,0472018	0,12	6 347,71	6 347,23	6 347,37	2,02	0,03	0,45	0,39	0,27
3	0,0758002	0,16	3 439,22	3 437,63	3 437,08	2,61	0,08	0,66	0,62	0,19
13	0,0758002	0,18	5 093,77	5 093,21	5 092,89	2,83	0,06	0,88	0,79	0,51
15	0,0758002	0,82	5 418,60	5 419,39	5 419,70	1,04	0,02	8,81	8,53	1,02
25	0,0758002	0,84	7 288,03	7 288,98	7 289,26	1,26	0,02	0,50	0,51	0,16
41	0,0758002	0,82	13 481,56	13 483,81	13 484,64	4,01	0,03	1,01	1,04	0,15
5	0,1171851	0,20	4 022,78	4 022,24	4 022,01	2,03	0,05	0,67	0,70	0,19
9	0,1171851	0,20	4 702,07	4 701,85	4 701,99	1,62	0,03	1,03	0,97	0,49
16	0,1171851	0,80	5 643,41	5 643,83	5 643,94	1,04	0,02	2,32	2,27	0,27
18	0,1171851	0,22	6 015,83	6 016,49	6 015,83	1,52	0,03	1,30	1,13	0,75
24	0,1171851	0,80	7 230,23	7 230,06	7 229,75	1,66	0,02	0,61	0,57	0,13
45	0,1171851	0,80	17 491,91	17 483,94	17 482,20	16,56	0,09	0,08	0,08	0,02
39	0,2505921	0,26	12 067,66	12 065,55	12 064,12	6,11	0,05	0,43	0,38	0,14
4	0,3472077	0,34	3 785,18	3 785,32	3 784,66	2,34	0,06	1,62	1,55	0,53
7	0,3472077	0,30	4 314,88	4 319,34	4 321,17	3,05	0,07	1,27	1,29	0,51
17	0,3472077	0,32	5 735,59	5 735,48	5 735,23	2,98	0,05	0,59	0,53	0,26
27	0,3472077	0,32	7 776,55	7 778,50	7 779,29	2,27	0,03	0,90	0,83	0,30
38	0,3472077	0,70	11 698,89	11 700,27	11 700,12	4,49	0,04	0,43	0,43	0,08
8	0,4647021	0,66	4 360,31	4 359,96	4 359,94	1,73	0,04	1,88	1,84	0,41
10	0,4647021	0,66	4 900,40	4 901,49	4 901,30	1,28	0,03	2,28	2,20	0,82
29	0,4647021	0,62	8 346,47	8 344,51	8 344,46	2,96	0,04	0,46	0,46	0,12
30	0,4647021	0,62	8 652,79	8 647,83	8 647,10	4,29	0,05	1,43	1,42	0,25
31	0,4647021	0,64	8 772,25	8 772,90	8 773,17	1,62	0,02	5,27	5,35	1,82
34	0,4647021	0,64	9 875,99	9 875,82	9 875,03	3,43	0,03	0,43	0,42	0,10
36	0,4647021	0,66	11 283,91	11 285,26	11 285,73	3,07	0,03	5,71	5,95	1,08
37	0,4647021	0,66	11 484,16	11 486,98	11 487,37	3,76	0,03	1,28	1,32	0,25
42	0,4647021	0,64	13 672,06	13 671,21	13 669,16	4,51	0,03	0,48	0,50	0,10
11	0,6015081	0,40	4 940,19	4 940,79	4 940,92	1,25	0,03	4,07	4,34	0,96
12	0,6015081	0,40	5 049,70	5 050,78	5 051,01	1,38	0,03	1,03	0,93	0,37
14	0,6015081	0,58	5 290,21	5 291,72	5 291,96	1,30	0,02	1,06	0,94	0,49
21	0,6015081	0,60	6 743,15	6 742,95	6 743,00	1,17	0,02	1,38	1,29	0,32
26	0,6015081	0,38	7 513,21	7 518,20	7 519,00	3,03	0,04	0,45	0,43	0,13
32	0,6015081	0,60	8 969,10	8 972,37	8 974,47	6,32	0,07	0,53	0,57	0,21
33	0,6015081	0,40	9 181,84	9 182,04	9 182,17	3,22	0,04	0,75	0,77	0,09
40	0,6015081	0,60	13 354,81	13 357,08	13 358,11	7,37	0,06	0,22	0,23	0,06
2	0,7540226	0,44	3 308,47	3 313,16	3 313,07	2,53	0,08	1,02	1,02	0,31
6	0,9168149	0,50	4 176,62	4 174,81	4 175,83	2,66	0,06	0,97	0,91	0,28
20	0,9168149	0,50	6 632,61	6 635,47	6 636,23	4,91	0,07	0,84	0,82	0,23
22	0,9168149	0,54	6 870,98	6 871,55	6 871,84	1,43	0,02	2,57	2,69	0,55
23	0,9168149	0,52	6 930,42	6 929,98	6 930,04	2,37	0,03	0,78	0,77	0,09
28	0,9168149	0,52	8 287,35	8 289,45	8 290,13	3,05	0,04	0,95	1,05	0,22
35	0,9168149	0,50	10 615,51	10 613,75	10 614,07	3,65	0,03	0,56	0,59	0,12
43	0,9168149	0,46	16 549,29	16 544,34	16 542,28	6,89	0,04	0,27	0,28	0,09
44	0,9168149	0,50	16 776,87	16 778,09	16 778,65	5,75	0,03	0,32	0,30	0,07

### 3.2.4.2 ANALYSES EN HAUTES MASSES

index	p-VALUE	ROC area	M/Z	M/Z average	M/Z median	M/Z STD	M/Z CV	intensity average	intensity median	intensity STD
8	0,047	0,120	18 424,4	18 426,2	18 426,9	4,3	0,0	0,88	0,9	0,2
2	0,117	0,780	15 676,1	15 678,2	15 678,1	11,6	0,1	0,45	0,4	0,1
7	0,117	0,800	17 591,0	17 595,2	17 594,8	11,2	0,1	0,58	0,6	0,2
9	0,117	0,800	19 084,5	19 086,9	19 088,2	3,6	0,0	1,07	1,2	0,3
3	0,251	0,280	15 976,1	15 966,3	15 970,9	13,9	0,1	0,33	0,3	0,1
13	0,251	0,740	32 828,1	32 817,2	32 843,6	147,7	0,5	0,18	0,2	0,1
1	0,347	0,700	15 491,2	15 527,9	15 535,4	37,9	0,2	0,63	0,6	0,1
4	0,347	0,680	16 673,0	16 674,7	16 675,1	3,6	0,0	2,32	2,6	0,6
10	0,347	0,700	19 332,7	19 304,9	19 302,8	48,5	0,3	0,76	0,7	0,2
11	0,465	0,360	22 526,7	22 789,7	22 817,0	75,5	0,3	0,55	0,5	0,1
15	0,465	0,620	79 083,3	79 095,4	79 114,0	521,0	0,7	0,03	0,0	0,0
12	0,602	0,580	26 617,2	26 534,9	26 510,9	77,7	0,3	0,22	0,2	0,1
14	0,602	0,400	42 032,5	41 981,3	41 999,8	184,2	0,4	0,09	0,1	0,0
16	0,602	0,400	81 617,7	81 522,7	81 513,3	530,0	0,7	0,03	0,0	0,0
17	0,602	0,600	88 745,2	88 610,6	88 736,7	980,9	1,1	0,02	0,0	0,0
18	0,602	0,400	96 747,3	96 988,4	96 986,1	880,0	0,9	0,02	0,0	0,0
6	0,754	0,460	17 081,5	17 079,1	17 080,0	7,2	0,0	0,69	0,7	0,1
5	0,917	0,520	16 901,0	16 902,3	16 902,2	3,2	0,0	2,67	2,7	0,3

L'analyse des spectres acquis sur puces de type CM10/ pH6 a permis la détection de 18 clusters en hautes masses.

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

Parmi ces 18 clusters, seuls le pic protéique, défini par son rapport masse/charge (m/z), qui présente les critères de significativité suivant : Mann-Whitney p-value < 0.01 et ROC >0.9 ou <0.1, peut être considéré comme un marqueur potentiel.

### 3.2.4.3 CONCLUSION DE L'ANALYSE PAR PROTEINCHIP

Le *profiling* des échantillons traités en comparaison aux témoins, a permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines différentiellement exprimés entre les deux échantillons.

A 2jpe, 9 protéines ont été mises en évidence. Seule une protéine (6350 Da) présente un ratio supérieur à 2 (potéines réprimée dans les échantillons traités). 3 protéines présentent des ratio de 1,5 à 2, et enfin 5 protéines présentent des ratio compris entre 1,2 et 1,5.

Le tableau ci-dessous présente les protéines différentielles mise en évidence entre les lots traités à l'EE2 et les échantillons témoins :

	MW	ratio	p-value	traités/témoins
jpe2-CM10-BM	6350	2,14	0,028	-
jpe2-CM10-BM	3150	1,58	0,028	-
jpe2-Q10-hM	18300*	1,53	0,047	-
jpe2-Q10-BM	18500	1,5	0,028	-
jpe2-Q10-BM	18300*	1,5	0,047	-
jpe2-Q10-BM	9700	1,47	0,028	-
jpe2-Q10-hM	19070	1,41	0,028	+
jpe2-CM10-HM	18400	1,32	0,047	-
jpe2-Q10-BM	15800	1,22	0,047	-
jpe2-Q10-BM	9500	1,21	0,28	+

\* ces deux détections en basse et hautes masses correspondent à priori à la même protéine de 18300Da détectée dans les deux modes de lecture.

A 60 jpe, 39 protéines sont détectées comme différentielles entre les traités et les témoins. 13 de ces protéines présentent un ratio supérieur à 2. Il est à noter que certaines protéines (notées par un code couleur) ont été retrouvées comme différentielles dans diverses conditions de lecture.

	MW	ratio	p-value	traités/témoins
60 JPE-CM10-BM	3000	3,1	0,016	-
60 JPE-CM10-BM	3313	2,7	0,009	-
60 JPE-CM10-BM	4000	2,5	0,009	-
60 JPE-CM10-HM	32500	2,4	0,047	+
60 JPE-CM10-BM	13500	2,4	0,028	+
60 JPE-CM10-BM	13650	2,2	0,028	+
60 JPE-CM10-BM	8160	2,2	0,009	-
60 JPE-Q10-BM	4290	2,11	0,02	-
60 JPE-CM10-HM	42000	2,1	0,028	+
60 JPE-CM10-BM	7780	2,1	0,009	-
60 JPE-CM10-BM	4360	2,1	0,016	-
60 JPE-Q10-BM	11600	2,02	0,02	+
60 JPE-Q10-HM	22750	2	0,02	-

PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

60 JPE-Q10-BM	5850	1,99	0,02	+
60 JPE-Q10-BM	3100	1,83	0,02	-
60 JPE-Q10-HM	33000	1,8	0,02	+
60 JPE-Q10-HM	32800	1,8	0,02	-
60 JPE-Q10-BM	3360	1,8	0,02	-
60 JPE-CM10-HM	55500	1,7	0,047	+
60 JPE-Q10-HM	22600	1,7	0,01	-
60 JPE-Q10-HM	20750	1,7	0,05	+
60 JPE-Q10-HM	18600	1,7	0,02	-
60 JPE-Q10-HM	18400	1,7	0,05	-
60 JPE-CM10-BM	7500	1,7	0,028	-
60 JPE-Q10-BM	11700	1,68	0,02	+
60 JPE-Q10-BM	3250	1,64	0,02	-
60 JPE-CM10-BM	6873	1,6	0,047	+
60 JPE-Q10-BM	11080	1,52	0,02	+
60 JPE-Q10-HM	42000	1,5	0,05	+
60 JPE-Q10-HM	18300	1,5	0,05	-
60 JPE-CM10-HM	17600	1,5	0,047	-
60 JPE-CM10-BM	11650	1,5	0,028	+
60 JPE-CM10-HM	22800	1,4	0,016	-
60 JPE-Q10-HM	15500	1,4	0,02	+
60 JPE-CM10-BM	12820	1,4	0,016	+
60 JPE-Q10-BM	10404	1,36	0,02	-
60 JPE-Q10-HM	68800	1,3	0,05	+
60 JPE-CM10-BM	11900	1,3	0,047	-
60 JPE-CM10-BM	6640	1,2	0,016	-

Enfin, certaines protéines sont retrouvées aux deux âges :

	MW	ratio	p-value	traités/témoins
<b>60 JPE-Q10-HM</b>	<b>18600</b>	1,7	0,02	-
<b>jpe2-Q10-BM</b>	<b>18550</b>	1,5	0,028	-
<b>jpe2-CM10-HM</b>	<b>18400</b>	1,32	0,047	-
<b>60 JPE-Q10-HM</b>	<b>18400</b>	1,7	0,05	-
<b>jpe2-Q10-BM</b>	<b>18300</b>	1,5	0,047	-
<b>60 JPE-Q10-HM</b>	<b>18300</b>	1,5	0,05	-
jpe2-CM10-BM	3150	1,58	0,028	-
60 JPE-Q10-BM	3100	1,83	0,02	-

Ces dernières protéines méritent d'être étudiées plus avant afin de déterminer s'il s'agit réellement de marqueurs d'action d'un perturbateur endocrinien, utilisables pour la détection d'anomalies à des âges précoces.

### **3.3 VALIDATION DE L'EFFET DE L'EE2 PAR HISTOLOGIE**

#### **3.3.1 HISTOLOGIE DES MEDAKAS "TEMOINS "**

Les médakas témoins présentent une histologie classique d'animaux en bon état sanitaire. Aucune pathologie n'a été détectée aux niveaux gonadique, intestinal ou hépatique ainsi qu'aucun parasite. La majorité des femelles (80 %) sont en fin de pré-vitellogenèse, quelques unes sont en début de vitellogenèse (Fig. 1) tandis que les mâles sont en fin de spermatogenèse et présentent parfois des spermatozoïdes mûrs en cours de transition dans le calice et dans le spermiducte (Fig.5).

Le foie exempt de pathologie, présente des variations morphologiques en fonction du sexe et de la phase du cycle reproducteur (Figs. 2,4), correspondant aux données bibliographiques (Paris-Palacios, 1999). Les mâles et les femelles montrent des hépatocytes assez grands avec des vacuoles claires visibles et un cytoplasme faiblement coloré tandis que les femelles en vitellogenèse ont un foie composé de petits hépatocytes aux vacuoles nombreuses, petites et réfringentes et au cytoplasme dense prenant plus fortement la coloration. Ces modifications structurales normales sont en relation avec l'effort métabolique produit par le foie lors de la synthèse des réserves transférées vers les gonades lors de la vitellogenèse exogène.

L'intestin contenant un bol alimentaire important et continu, on peut en déduire que la prise alimentaire durant l'élevage a été très régulière et probablement suffisante. La dégradation des particules alimentaires tout au long du tube et le bon état des villosités indiquent une bonne tolérance et une digestion normale des apports alimentaires (Fig. 3). Les poissons présentent une structure anatomo-morphologique et des stades de développement gonadique chronologiquement proches les uns des autres ce qui montrent une bonne homogénéité du lot d'animal utilisé.

#### **3.3.2 HISTOLOGIE DES MEDAKAS "TEMOINS SOLVANT" (ELEVES DANS LE MILIEU ADDITIONNE D'ISOPROPANOL)**

Les "témoins solvant" femelles (Médakas exposés à l'isopropanol 0,001%) présentent un état globalement proche de celui des témoins sans solvant, en particulier au niveau gonadique. Le solvant, à la dose utilisée ne perturbe pas le développement gonadique ni le cycle reproducteur de ces Médakas femelles. Par contre, un retard de développement apparaît entre les Médakas mâles témoins milieux et les "témoins solvant" (Table 1). En effet, la majorité des mâles exposés à l'isopropanol sont en début de spermatogenèse et ne présentent pas de spermatozoïdes mûrs (Fig.6). Plus précisément 67% des Médakas mâles témoins sont à un stade avancé de la spermatogenèse contre seulement 16 % des poissons ayant été exposés au solvant. Par ailleurs, 50% des poissons "témoins solvant" présentent des testicules aux stades primaires de la spermatogenèse. La concentration d'isopropanol utilisée induit donc un ralentissement ou un blocage de la spermatogenèse. L'isopropanol n'est pas référencé comme un perturbateur endocrinien, considéré comme sans danger pour les mammifères très peu de donnée toxicologique existe à son sujet pour les poissons. Ce point mériterait donc d'être approfondi par des études complémentaires.

De plus quelques atteintes pathologiques ont pu être mises en évidence chez les Médakas exposés au solvant. Il s'agit de dépôts de fibres intra-testiculaires (autour des tubules) et péri-vasculaires dans les testicules mais aussi dans le foie de tous les individus (flèche - Fig.6). Ces dépôts fibreux étant colorés en bleu par le micro-indigo-carmin sont très probablement constitués de collagène. Ils s'accompagnent dans les vaisseaux sanguins hépatiques et testiculaires de précipités protéiques, d'amas d'éléments figurés et d'une dilatation de la lumière des vaisseaux concernés signant une thrombose. Ces éléments sont

PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

convergeants pour conclure que les Médakas ont développé une fibrose réactionnelle à l'isopropanol. En outre, le foie de certains individus (7 sur 15) présente des perturbations nucléaires hépatocytaires (cercle - Fig 6) : présence de mottes chromatiniennes, fragmentation du nucléole, irrégularité du contour nucléaire. Ces perturbations s'accompagnent souvent d'altérations de la forme des hépatocytes et d'une condensation du cytoplasme évoquant un processus nécrotique. Les atteintes nucléaires visibles à notre échelle d'observation sont toujours indicatrices de graves dysfonctionnements cellulaires. Cependant les zones concernées par cette pathologie sont peu étendues et n'excèdent jamais 25 % du parenchyme hépatique et l'ensemble du foie apparaît fonctionnel.

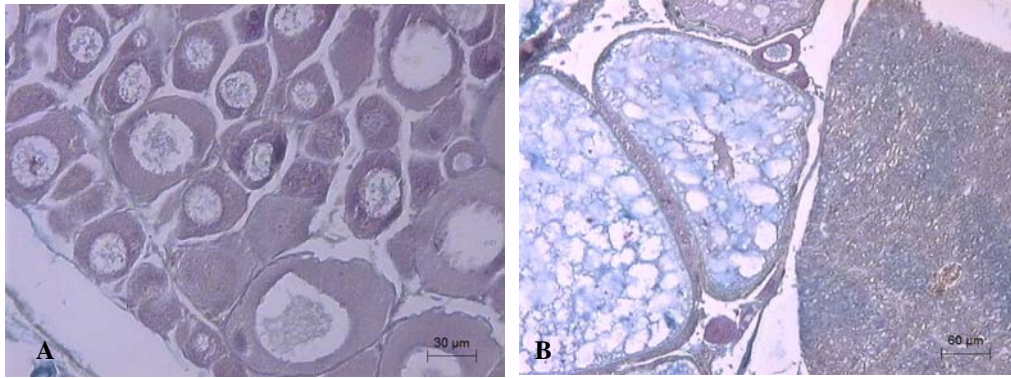
A notre connaissance aucune donnée n'existe sur l'hépatotoxicité de l'isopropanol. Il est connu que cette molécule est rapidement métabolisée en acétone. L'acétone n'est pas considéré comme toxique et est souvent utilisé expérimentalement comme solvant de molécules dont la toxicité est à évaluer (INRIS, 2008). L'acétone est rapidement éliminé de l'organisme par le système respiratoire (40 à 70 % chez le rat) ou urinaire (30 % chez le rat) le reste étant, soit métabolisé en méthyl-glyoxal puis en glucose, soit transformé en 1,2-propanediol avant d'être pris en charge dans le cycle de métabolisme du glucose (Clayton et Clayton, 1982 ; Roche, 1983). Il est à noter que ces voies de métabolisation s'accompagnent d'une induction du système des oxydases et est potentiellement générateur d'un stress oxydatif. Biagianti-Risbourg *et al.* (1997) ont montrés que l'acétone pouvait être hépatotoxique pour les poissons. Il semble donc important que des investigations spécifiques soient entreprises pour élucider l'impact éco-toxicologique de l'isopropanol et de son métabolite, l'acétone; qui sont tous deux des solvants très fortement utilisés industriellement.

	Effectif (N)	Nombre de Médakas mâles présentant les types cellulaires suivants :			
		Ovocytes	Cellules de la lignée mâle		
			spermatocytes	spermatides	spermatozoïdes
Témoins	12	0	12	12	10
Témoins solvant (isopropanol 0,001%)	12	0	12	10	2
EE2 : 10 ng/l	10	10	0	0	0

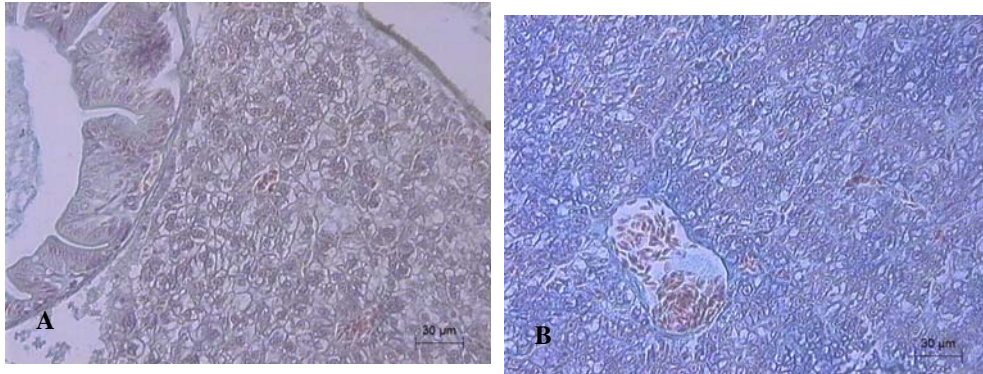
**Tableau 1:** Analyse histologique des gonades mâles du poisson Médaka (*Oryzias latipes*) suite à une exposition à un agoniste oestrogénique puissant (17 $\alpha$ -Éthinyl oestradiol, EE2).



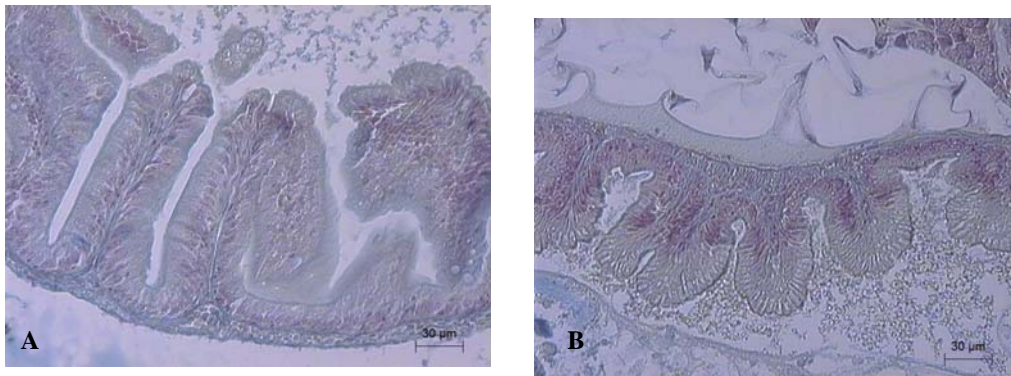
PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne



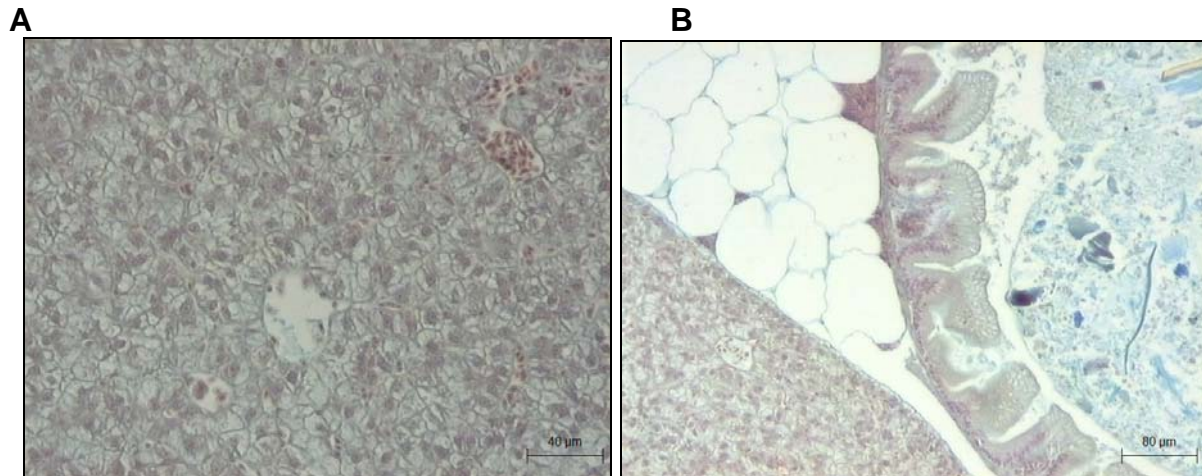
**Fig. 1** : Ovaire de femelle en prévitellogenèse [A] et en vitellogenèse [B]



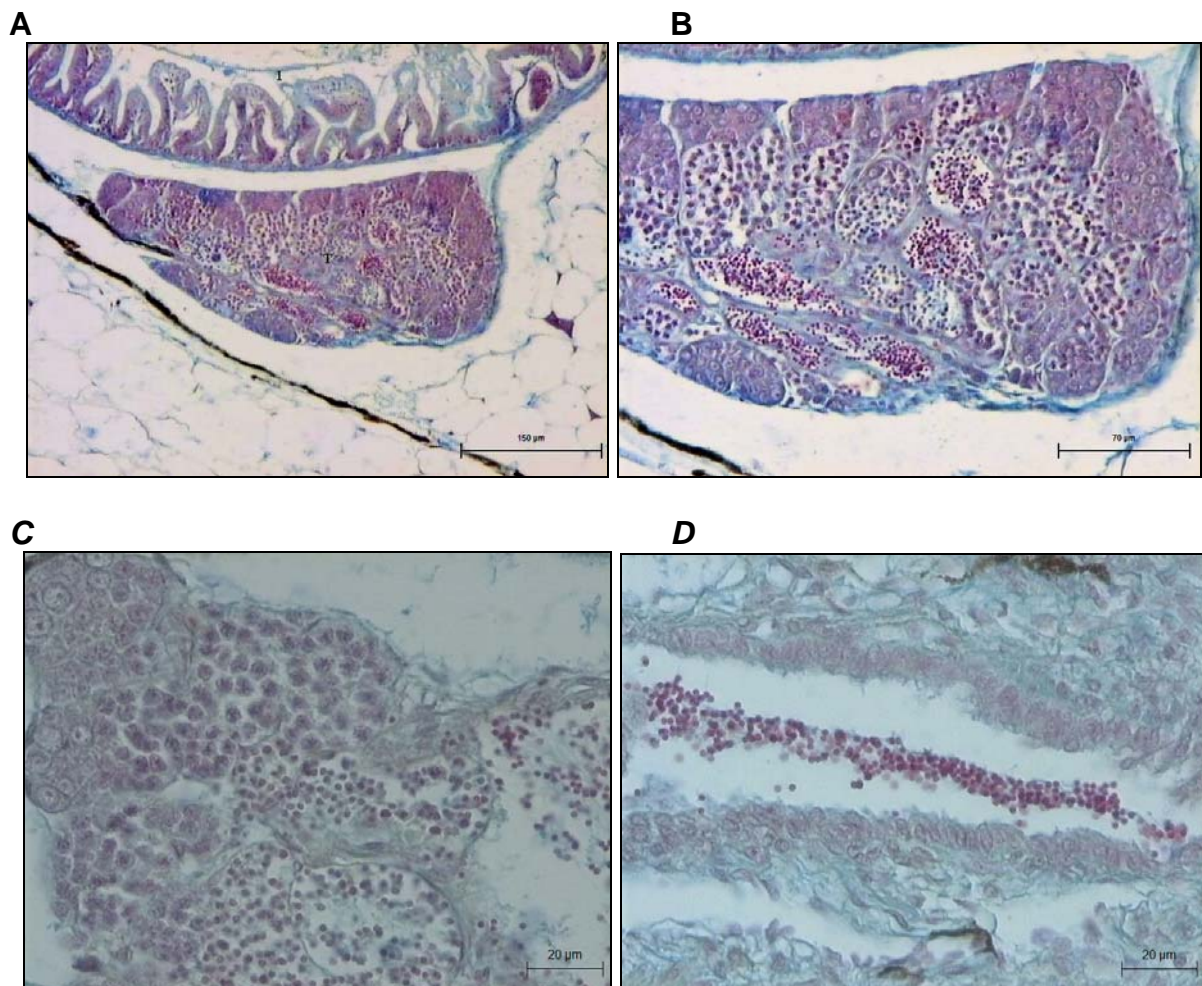
**Fig. 2** : Foie de femelle témoin en prévitellogenèse [A] et en vitellogenèse [B].



**Fig. 3** : Portion d'intestin antérieur [A] et moyen [B] de femelle médaka témoin.

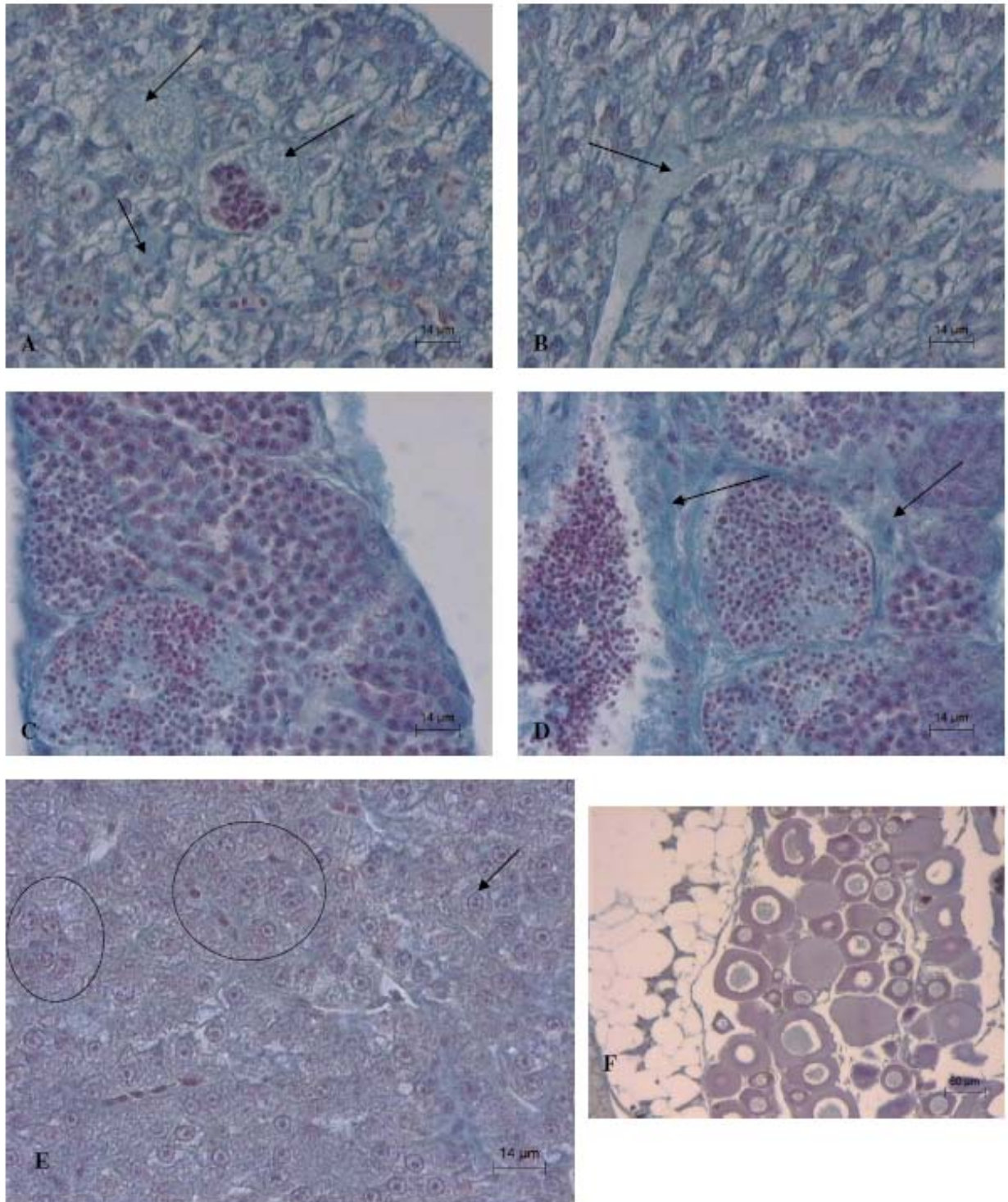


*Fig. 4 : Structure hépatique [A,B] et intestinale [B] d'un Médaka mâle témoin.*



*Fig. 5 : Testicule [A,B], calice [C] et spermiducte [D] de Médaka mâle témoin en spermatogenèse. A noter : la présence de spermatozoïdes dans le calice et le spermiducte (flèche).*

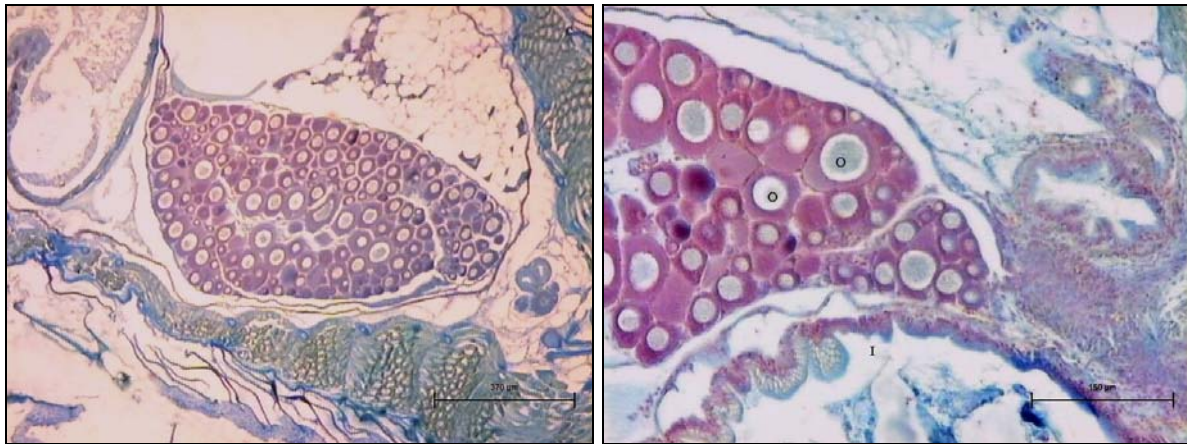




**Fig. 6** : Structure des Médakas mâles [A,B,C,D] et femelles [E,F] élevés dans le milieu d'élevage additionné d'isopropanol montrant le foie [A,B,F] et les gonades [CDF]. Flèches et cercles: pathologies décrites dans le texte.

### 3.3.3 HISTOLOGIE DES MEDAKAS EXPOSES A L' EE2 (17A-ÉTHINYL OESTRADIOL)

Dans le cas de la présente étude la totalité des poissons mâles (10 Médakas) est totalement féminisée suite à l'exposition à l'EE2 (10 ng/l). Les gonades présentes des ovocytes pré-vitellogénétique ou en début de vitellogénèse (de type III et IV) et aucune cellule de la lignée mâle n'a été observée sur l'ensemble des coupes (Fig. 7).



**Figure 7:** Coupe histologique de la gonade du Médaka (*Oryzias latipes*) mâle traité à l'EE2. I : Intestin ; O : Ovocytes.

La Table I résume les perturbations gonadiques observées pour l'ensemble des mâles de cette étude. Les "ovaires" des mâles ne présentent aucune pathologie histologique particulière et sont semblables à ceux observés chez les femelles témoins (témoins milieu et solvant). Les pathologies hépatiques et vasculaires observées chez les témoins solvant se retrouvent de façon identique, en intensité et en fréquence, chez les animaux exposés à l'EE2. Nos résultats sont cohérents avec la littérature existante. EE2 est l'œstrogène de synthèse le plus largement utilisé (pilule contraceptive) et pour lequel le plus grand nombre de données écotoxicologiques existent (Fent *et al.*, 2006). Ce composé peut induire des effets œstrogénomimétiques chez le poisson, à des niveaux de concentrations très faibles et pour des concentrations environnementales pertinentes. Une étude de Länge *et al.* (2001) a montré que des poissons mâles de *Pimephales promelas* exposés à des concentrations d'EE2 de 4 ng/l ne développaient plus de caractéristiques morphologiques sexuelles secondaires. Metcalfe *et al.* (2001) rapportent également une LOEC 100 jours de 10 ng/l pour l'apparition d'ovo-testis chez 100% des poissons mâles de Médakas, soit pour des concentrations 10 fois plus faibles que pour l'estradiol. Une autre étude de Parott et Blunt (2005) a montré un effet de l'EE2 sur la fertilisation des œufs et le *sex ratio* chez le poisson à une concentration de 0.32 ng/l.

### 3.3.4 HISTOLOGIE DES MEDAKAS EXPOSES AU 4tPP (4-T-PENTYLPHENOL)

Les Médakas mâles exposés au 4tPP présentent une féminisation du testicule plus ou moins poussée allant de la présence d'ovocytes dans le testicule à une féminisation complète de la gonade (Fig. 8, Table 2). Avec les doses croissantes, la féminisation s'accroît mais le faible effectif et sa variation d'un répliquât à l'autre interdit une exploitation chiffrée plus poussée des résultats (Table 2). Nos résultats montrent que, quelque soit la dose de 4tPP utilisée, tous les individus mâles présentent des ovocytes à tous les stades de développement jusqu'au stade IV (Table 2 ; Fig. 8).

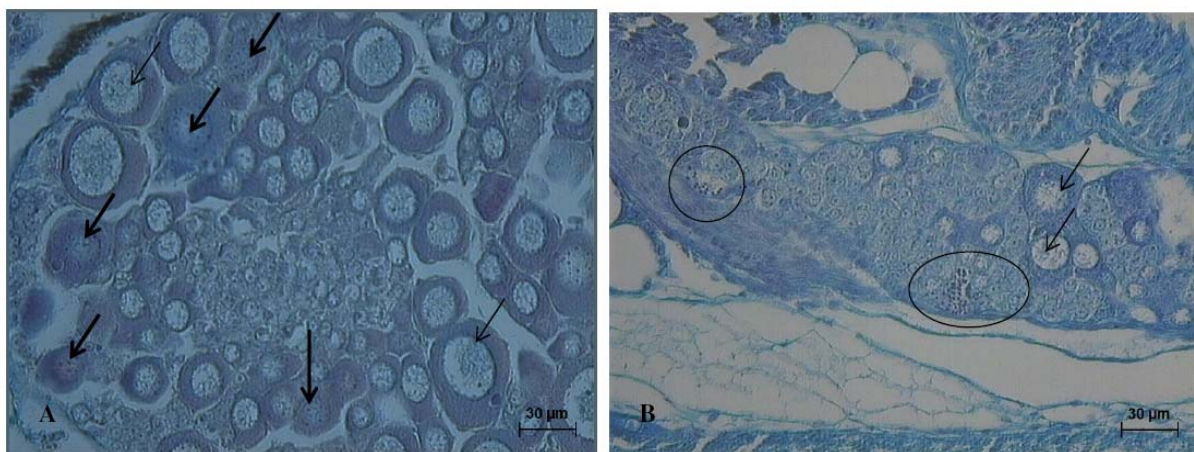


4-t-pentylphenol	Effectif (N)	Nombre de médakas mâles présentant les types cellulaires suivants :			
		Ovocytes	Cellules de la lignée mâle		
			Spermatocytes	Spermatides	Spermatozoïdes
Témoins	11	0	11	11	9
E1	3	3	3	2	0
E2	2	2	1	1	0
E3	1	1	0	0	0
E4	5	5	1	1	0

**Table 2 :** Analyse histologique des gonades mâles du poisson Médaka (*Oryzias latipes*) suite à une exposition à un agoniste oestrogénique faible (4-t-pentylphenol).

Le niveau d'intersexualité est dans chacun des cas très sévère avec un pourcentage important de la masse testiculaire composée de cellule féminine (de 30% à 60% du testicule pour la plus faible dose). Les testicules présentent des stades de spermatogenèse comparables à ceux observés avec le témoin solvant. Le retard de développement testiculaire ne peut donc pas être imputé au perturbateur endocrinien. La fréquence d'apparition d'ovocytes est plus forte chez les Médakas mâles traités avec de très faibles concentrations d'éthinylestradiol (entièrement féminisés) que ceux traités avec de plus fortes concentrations de 4tPP. Il peut donc être considéré comme un agoniste oestrogénique faible.

Nos résultats sont en corrélation avec les travaux de Metcalfe *et al.* (2001), Nash *et al.*, 2004 et de Balch *et al.* (2004). D'autre part les Médakas mâles exposés au 4tPP présentent une grande déstructuration des parties gonadiques restant mâles. La structure tubulaire a disparu et l'organisation de la lignée mâle de la périphérie du tubule vers son centre n'est plus observable (Fig. 8). Cela peut être dû à l'infiltration importante de cellules féminines dans toute la masse gonadique mais aussi traduire une toxicité testiculaire du perturbateur endocrinien ce qui a déjà été évoqué par Weber *et al.*, (2004).



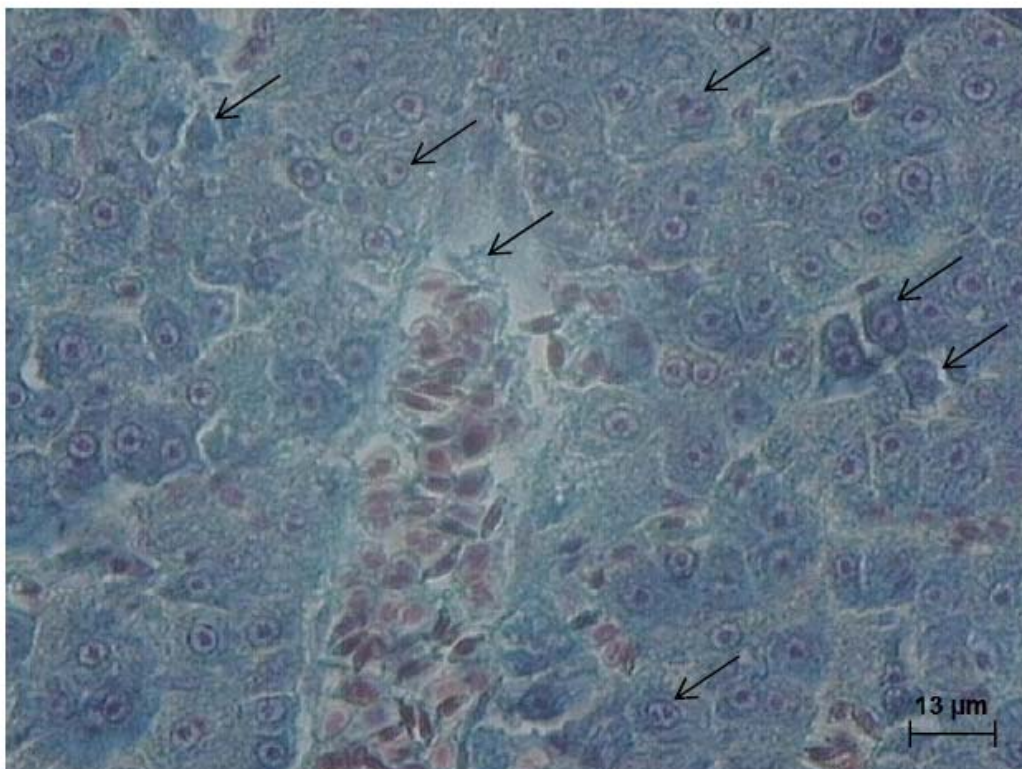
**Figure 8.** Gonade de Médakas mâles exposés au 4Tpp montrant une féminisation totale [A] ou partielle [B] de la masse gonadique et des altérations nucléaires modérées (petites flèches) ou sévères (flèches épaisses). Dans les cercles : zones toujours mâles, fortement perturbées.

## PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

La gonade femelle présente une histologie très proche de celle des témoins. Toutefois chez les femelles comme chez les mâles, le noyau de très nombreux ovocytes de stade I et II (prévitellogénétiques), montrent un nucléole diffus et granulaire. Peu d'ovocytes vitellogénétiques ont pu être observés, il nous est donc impossible d'évaluer le devenir de ces cellules. De plus le faible effectif de poissons et sont hétérogénéité interdit de conclure quant à une éventuelle perturbation de la poursuite du développement ovocytaire.

De plus, chez les mâles comme chez les femelles exposés au 4tPP les atteintes observées sont de nature semblable mais d'intensité plus forte que celles décrites chez les "témoins solvants". En effet, la masse hépatique comporte un grand nombre d'hépatocytes aux noyaux altérés, des fibroses périvasculaires et des thromboses : la lumière des vaisseaux sanguins dilatée est emplie d'erythrocytes et contient du matériel fibreux (précipitation de protéines plasmatiques?) (Fig. 9).

Il semble donc que le 4-t-pentylphenol puisse accroître l'effet toxique de l'isopropanol. Des études précédentes ont montrées la capacité de ce perturbateur endocrinien à induire des altérations hépatiques et rénales chez les deux sexes ainsi que des perturbations au niveau testiculaire (Weber *et al.*, 2004). Il serait nécessaire de reproduire nos expériences avec un autre solvant ou, mieux, sans solvant pour discriminer l'effet du perturbateur endocrinien de celui du solvant.

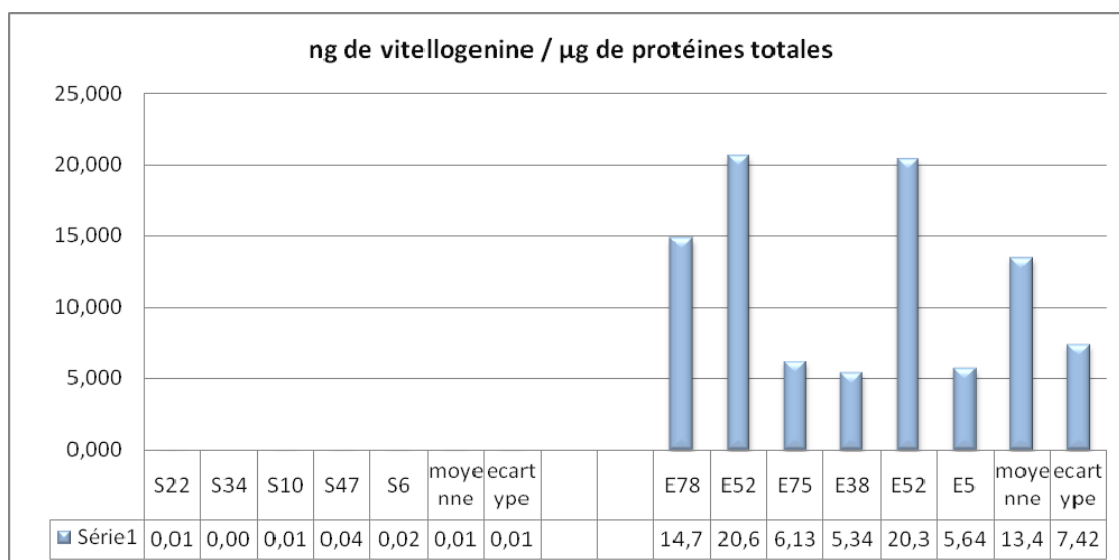


**Fig. 9 :** Foie d'une femelle Médaka exposée au 4tPP et montrant une fibrose périvasculaire, une thrombose ainsi que des altérations hépatocytaires nettes (flèches).

### 3.4 VALIDATION DE L'EFFET DE L'EE2 PAR DOSAGE DE LA VITELLOGENINE (INNOVA PROTEOMICS – ANNEXE 4)

Le Dosage ELISA de la vitellogénine a été réalisé selon les indications du fournisseur (Biosens). 140, 20, 5 et 2µg de protéines totales ont été déposées pour dosage de la vitellogénine en parallèle d'une gamme de vitellogénine de 0 à 50ng/ml. La vitellogénine a été dosée chez 5 lot de poissons (60 jpe) témoins et 5 lots de poissons 60jpe traités à l'EE2. Les résultats sont présentés Figure 6.

La vitellogénine n'est pas détectée chez les témoins. Tous les poissons exposés à l'EE2 expriment la vitellogénine de façon significative. Un test statistique de Student sur les données issues des 2 populations confirme une différence significative entre les deux cohortes (p value 0,015). Les résultats du dosage de vitellogénine sont cohérents avec les observations histologiques. Tous les poissons mâles exposés à l'EE2 sont féminisés et produisent en conséquence de la vitellogénine.



**Figure 6:** Dosage de la vitellogénine chez les médaka à 60jpe en présence de EE2 (lot E78, E52, E75, E38, E5) ou chez les lots témoins (S22, S34, S10, S47, S6)

### CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES:

Suite à la mise en place du projet REACH, il apparaît nécessaire de développer des méthodes d'évaluation rapides, peu coûteuses et si possible alternatives à l'expérimentation animale, pour l'identification des perturbateurs endocriniens chez les poissons. Notre projet se proposait d'identifier par une approche de protéomique différentielle, les protéines qui, chez le Médaka, sont associées aux altérations du développement de l'appareil reproducteur tel qu'elles apparaissent à l'issue de l'essai "Extended OECD n° 210", soit 60 jours après éclosion pour le Médaka. Ces protéines ou leurs précurseurs ont été également recherchés à des stades précoces de développement.

L'étude que nous avons entreprise doit être considérée comme une étude Pilote.

#### **Deux contraintes importantes devaient être prises en compte :**

- **La nécessité de travailler sur le poisson entier** et non sur des organes après dissection. Celle-ci, envisageable sur les poissons adultes, étant de toute façon impossible à réaliser techniquement sur les jeunes alevins.
- **La nécessité de développer un test rapide à mettre en place, de faible complexité technique et surtout peu coûteux.**

Nous avons donc fait le pari de pouvoir mettre en évidence des biomarqueurs protéiques de l'exposition aux perturbateurs endocriniens à partir d'extraits de poissons entiers. Les protéines attendues devaient donc être des protéines très abondantes et être par conséquent impliquées dans le métabolisme cellulaire ou l'organogenèse.

Les difficultés rencontrées avec l'élevage de deux souches particulières de Médaka ont eu pour conséquence un retard considérable dans le déroulement de ce projet. Toutefois une solution, techniquement plus délicate et plus coûteuse, a pu être trouvée (voir rapport intermédiaire) et nous a permis de réaliser une grande partie du projet et d'atteindre les objectifs que nous nous étions fixés.

Les modifications observées chez le Médaka mâles 60j traités à l'EE2 sont corrélés à une modification de l'expression de certaines protéines :

- 22 Protéines différentielles ont été détectées par 2D-DIGE et identifiées par spectrométrie de masse. Ces protéines sont toutes des protéines majoritaires impliquées dans l'organogenèse et composantes de l'architecture cellulaire (myosine, tubuline, actine, cytokératine...) ou dans le métabolisme cellulaire (transferrine, apolipoprotéine A1, enolase 1).
- 39 protéines et peptides différentiels ont été mis en évidence sur ProteinChip®

Les modifications anatomiques induites par l'exposition à l'EE2 ont été validés par des analyses morphologiques et par dosage de la vitellogénine. Nos résultats montrent que les mâles 60 jpe traités à l'EE2 présentent une féminisation des gonades en ovotestis et produisent des niveaux importants de vitellogénine.

Nos travaux montrent que des différences d'expression de protéines sont observables dès 2 jours post éclosion :

PNRPE : Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne

- 15 spots protéiques différentiels ont été détectés par 2D-DIGE et identifiées par spectrométrie de masse. Ils correspondent à 8 protéines non redondantes.
- 9 protéines et peptides différentiels ont été détectés par l'approche ProteinChip®

La caractérisation des marqueurs identifiés lors d'études de *Profiling* sur ProteinChip® reste à ce jour un enjeu très difficile techniquement. Les avancées technologiques réalisées dans ce domaine par la plate-forme protéomique Biogenouest, devraient nous permettre d'identifier certains des marqueurs, en particulier peptidiques, mis en évidence. Une priorité sera donnée dans les prochains mois à la caractérisation des marqueurs retrouvés à la fois à 60jpe et 2 jpe. En effet, un test diagnostic précoce des effets des perturbateurs endocriniens sur le modèle Médaka, en remplacement des approches actuelles, n'est acceptable que s'il est réalisé sur de jeunes individus et si possible avant 6jpe.

L'association de ratios différentiels très modestes et de l'identification de protéines composantes principales du muscle des poissons démontrent que l'analyse protéomique différentielle sur extraits protéiques entiers de Médaka est difficile. La découverte de biomarqueurs protéiques de l'effet de la perturbation endocrinienne devrait passer obligatoirement par une analyse sur échantillon protéique fractionné afin d'étudier des protéines plus discrètes. Ceci est toutefois difficilement compatible avec la quantité de matériel biologique nécessaire à ce type d'analyse et surtout avec les contraintes, évoquées ci-dessus, préalables au développement d'un test alternatif aux méthodes existantes d'évaluation de l'action de perturbateurs endocriniens.

Les marqueurs protéiques identifiés par spectrométrie de masse sont des candidats sérieux pour une étude de validation sur des cohortes plus importantes de Médaka traités versus témoins. **Ce projet connaît donc actuellement des prolongements entre l'équipe de Rennes et l'unité d'écotoxicologie de L'Oréal.**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Balch GC, Mackenzie CA, Metcalfe CD., 2004. Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 alpha-ethinylestradiol. *Environ Toxicol Chem*, 23:782–791.
- Biagianti-Risbourg S, Vernet G., and Boulekbache H., 1998. Ultrastructural response of the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sac-fry exposed to acetone. *Chemosphere*, 36,9,1911-1922.
- Clayton CD, Clayton FE, 1982. Patty's industrial hygiene and toxicology, 3 , II, New York : Wiley Intersciences, 4720-4727.
- INRS, 2008 : fiches toxicologiques en ligne.
- Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6):1216–1227.
- Fent K, Weston AA et Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76 (2): 122-159.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughues RJ., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plants as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:297-308.
- Nash JP, Kime DE, Van den Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P et Tyler CP., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of pharmaceutical éthinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health. Perspect*, 112: 1725-1733.
- Parrott JL, Blunt BR., 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology*, 20(2):131–141.
- Roche M, 1983. Etude toxicologique des cétones en milieu industriel. Thèse de médecine, Marseille.
- Weber LP, Balch GC, Metcalfe CD and Janz DM., 2004. Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem*, 23: 792-797.