



HAL
open science

Effets biologiques et mécanismes d'action de ligands environnementaux du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre

Clémentine Garoche

► **To cite this version:**

Clémentine Garoche. Effets biologiques et mécanismes d'action de ligands environnementaux du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre. Ecotoxicologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B023 . tel-01745554

HAL Id: tel-01745554

<https://theses.hal.science/tel-01745554>

Submitted on 28 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Biologie-Santé

présentée par

Clémentine Garoche

Préparée à l'unité de recherche ECOT
Unité d'Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*
INERIS

et

à l'unité de recherche IRSET Inserm U1085
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Intitulé de la thèse :
Effets biologiques et
mécanismes d'action
de ligands
environnementaux du
récepteur nucléaire
de la progestérone
chez le poisson zèbre**

**Thèse soutenue à INERIS, Verneuil-en-Halatte
le 4 octobre 2017**

devant le jury composé de :

Thierry CHARLIER

Professeur de l'Université de Rennes 1 / *Président du jury*

Xavier COUMOUL

Professeur de l'Université Paris 5 Descartes / *rapporteur*

Patrice GONZALEZ

Chargé de Recherche de l'Université de Bordeaux / *rapporteur*

Jean-Stéphane JOLY

Directeur de Recherche de l'Université Paris Sud / *examineur*

Helmut SEGNER

Professeur de l'Université de Bern / *examineur*

Marie PICOT

Maître de Conférence de l'Université de Rouen Normandie /
examineur

Olivier KAH

Professeur de l'Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

François BRION

Chargé de Recherche à l'INERIS / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci donc à monsieur Thierry Charlier, Professeur à l'Université de Rennes 1 et président du jury ; à monsieur Xavier Coumoul, Professeur de l'université Paris 5, et monsieur Patrice Gonzalez, Docteur à l'Université de Bordeaux en tant que rapporteurs de cette thèse ; merci à madame Marie Picot, Maître de Conférence à l'Université de Rouen Normandie ; à monsieur Jean-Stéphane JOLY, Directeur de Recherche à l'Université Paris Sud ; et à monsieur Helmut SEGNER, Professeur à l'Université de Bern.

Le travail réalisé pendant cette thèse a été financé par le projet de recherche PROOFs (ANR PROOFs 13-CESA-0006) et par le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (MEEM) (P190 Écotoxicologie). Je souhaite également remercier le GDR Reprosciences qui m'a octroyé une bourse en 2016 afin de réaliser des expériences dans un laboratoire à l'étranger.

Merci à monsieur Eric Thybaud, responsable du pôle VIVA à l'INERIS, et à monsieur Jean-Marc Porcher, responsable de l'équipe d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, pour m'avoir accueillie au sein de l'INERIS.

Je remercie vivement mon directeur de thèse François Brion, grâce à qui j'ai pu commencer ce travail dès le stage de Master 2. Merci à lui de m'avoir fait confiance et de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant et sur lequel il y a encore tant de choses à faire. Merci pour les conseils et les conversations que nous avons pu avoir et pour son soutien tout au long de la thèse. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble à l'avenir. Merci à mon directeur de thèse Olivier Kah, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements durant ces trois années de thèse. Merci à Selim, mon co-directeur de thèse, pour son écoute et ses nombreux conseils.

Je souhaite également remercier Marie Trabalon de l'École Doctorale VAS.

Je remercie toute l'équipe, Edith, Nathalie, Manu, Sandrine, Anne, Cyril, Benjamin, Olivier, Patrick, Vanessa, pour leur accueil et la bonne ambiance dans laquelle ils m'ont permis de travailler. Je remercie en particulier Edith et Nathalie (mes mamans du laboratoire :) pour leurs nombreux conseils, pour avoir soigné mes petits bobos (et les plus gros, eh oui ça coupe). Merci pour ces heures passées à faire des petits moules en alu et à

essayer de faire marcher le microscope (restons Zen). Merci surtout pour votre soutien indéfectible et pour votre écoute même quand ça n'allait pas, et d'être venues me voir à l'hôpital ! Merci Manu pour ta bonne humeur et pour ta compagnie pendant les longues heures de culture cell. Merci aussi de m'avoir laissée bidouiller le robot ! Merci Olivier pour la chantilly et pour m'avoir écouté raconter mes cours de plongée. Merci pour tous tes conseils chaque fois que je me posais des questions sur des protocoles (c'est-à-dire souvent). Merci à Anne, Nicolas Pucheux, Cyril et Sandrine pour les sessions jeux de société, les BD (je vous ai pas tout rendu encore, tiens), les comics, le chocolat ! Merci à Benjamin pour avoir fait pondre tous ces poissons et m'avoir aidée de nombreuses fois. Je remercie de nouveau Marie Picot qui m'a aidée, suivie et conseillée au cours de mon stage de Master 2. Merci à Nicolas Creusot qui m'a beaucoup aidée pour le *in vitro*. Merci à mes compagnons doctorants : Hélène (avec qui j'ai partagé le bureau, et grâce à qui il était toujours plein de plantes et de jolies fleurs), Audrey (et ses ratous), Younes (شكرا), Adrien, Vincent et Manoj. Merci à Betty qui m'a accompagnée une partie de ma thèse pendant son stage de M2. Merci à tous pour votre gentillesse et votre humour. Vous allez me manquer !

Merci à Xavier Cousin et Thomas Dickmeis, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, et pour avoir apporté leurs conseils et leurs suggestions qui ont contribué à orienter la thèse vers ce qu'elle est aujourd'hui. Merci à Thomas de m'avoir accueillie pendant trois semaines au sein du KIT, grâce à lui j'ai pu réaliser un séjour dans un laboratoire à l'étranger, ce qui fut très enrichissant. Merci pour la visite de la Schwarzwald sous la neige. Danke à Melanie pour avoir fait toutes ces manip avec moi et pour le Weihnachtsmarkt. Merci à Xavier et Marie-Laure pour m'avoir accueillie chez eux et dans leur laboratoire. Merci à Louisa pour les parties de Mario Kart ! Merci à Lucette pour les ISH et la carte de l'Île de la Recherche qu'elle m'a offerte (et que j'ai redessinée plus loin :)), et merci à Sébastien pour m'avoir montré comment fonctionnent les PMR.

Je souhaite remercier ma famille (attention on est beaucoup). Mes parents d'abord, Emmanuelle et Hervé, pour m'avoir permis de choisir les études que je voulais. Grâce à vous, j'ai pu faire de longues études sans me soucier du reste. Vous m'avez donné la curiosité des lettres, des sciences, j'ai d'ailleurs eu du mal à choisir une voie. Merci pour nous avoir fait autant voyager, mes frère et sœurs et moi, je pense que c'est un des plus beaux cadeaux que l'on puisse recevoir. Je suis fière de vous avoir pour parents. Merci à Camille, Charlotte et Louis qui sont les meilleurs frère et sœurs que l'on puisse souhaiter. Merci pour votre humour et tous ces moments passés en famille. Je me souviens avoir été triste que vous quittiez la

maison (je mettais encore la table pour six par habitude) mais je suis tellement contente que l'on puisse se voir si souvent maintenant. Merci à Carlotta, Didier et Guillaume ! Merci à mes petites nièces d'amour, Éléonore, Rose et Aurore. Merci à mes grands-parents Papé et Mamé (coucou de la pékinoise) et Mamy, qui nous manquent ; merci à mon Papy pour toutes ces vacances avec les cousins – d'ailleurs merci aux cousins ! Clément, Lucile et Justine avec qui je partage de super souvenirs d'enfance. Merci à ma tata Coco et à tonton Patrice (même si je suis un mauvais sujet). Merci à Emmanuel, Laureline, Jonathan, Anne-Sophie et Baptiste, merci à Didier et à Muriel. Merci à Janick, à Talmi et Agnès, à Chloé et Nicolas. Merci à Tonton Barbu et aux grands cousins barbus Benjamin et Boubou !

Merci à Totie et Jean-Louis qui m'ont beaucoup aidée dans mes débuts sur la voie de la recherche. Merci à mes vrais parents, Dominique et Bernard, et leurs enfants Marion, Agathe et Thomas. Merci aux Leuleu, aux Crolle, aux Coulon, à Agnès, Joël, Sophie et Pauline (Archimède). Merci à tous les autres que je n'ai pas cités.

Merci à mon fiancé François (puche) qui me soutient en tout depuis presque dix ans, qui a beaucoup plus confiance en moi que moi-même et qui est toujours là pour moi. Merci pour tout. Je suis fière de tout ce qu'il a accompli de son côté. Merci à mes amis Margaux, Julie, Caroline, Laurie, Margot, Sacha, Laurine, Nicolas, Pablo, Thomas, Erwan, Guillaume, et à tous les amis du collège et du lycée. Merci aux nez Audrey, Pegah, Hélène, Julie et Néma.

Merci à Alexandra Elbakyan et tout ce qu'elle fait pour la diffusion des connaissances.

Je tiens à remercier mon appendice qui a jugé intelligent de s'inflammer deux semaines avant le rendu du manuscrit.

Merci à mon chat Luminou grâce à qui j'ai pu introduire des poils jusque dans mes expériences, ce qui donne des résultats pour le moins intéressants.

Merci enfin aux poissons zèbres sans qui rien de tout cela n'aurait été possible !

Sommaire

Remerciements	3
Table des Illustrations	10
Table des Tableaux.....	11
Liste des abréviations	12
Publications et Communications	13
I. Introduction générale.....	15
II. Synthèse bibliographique	21
1. La progestérone et les progestatifs endogènes	23
2. La progestérone et les progestatifs de synthèse.....	34
3. Les progestatifs naturels et de synthèse dans l'environnement.....	38
4. Effets biologiques des progestatifs naturels et de synthèse sur les organismes aquatiques	48
5. Bilan de la synthèse	54
III. Objectifs et Démarche expérimentale.....	55
1. Sélection des ligands du nPR à étudier.....	58
2. Activités (anti-)progestatives des ligands du nPR <i>in vitro</i> chez le poisson zèbre et l'humain	58
3. Effet des progestatifs sur ER et sur la voie de signalisation des œstrogènes	59
4. Effets des progestatifs sur GR et sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes ..	60
5. Résumé de la démarche expérimentale	62
IV. Résultats.....	65
Chapitre 1 : Activité (anti-)progestative des ligands du nPR vis-à-vis des récepteurs nucléaires de la progestérone humain et poisson zèbre	67
Chapitre 2 : Évaluation des effets des progestatifs sur la voie de signalisation des œstrogènes.....	107
Chapitre 3 : Effets des ligands du nPR sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes.....	155
Synthèse des résultats	237
V. Discussion générale	243
1. Intérêts et limites de la démarche expérimentale.....	248
2. Mise en perspective des données obtenues <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> : Conséquences fonctionnelles pour les organismes	253
3. Bioanalyse <i>in vitro</i> des activités PR et identification des substances chimiques par EDA : apport des données obtenues au laboratoire sur les ligands purs.....	262
VI. Conclusion générale	265
Références bibliographiques.....	269
Résumé.....	296

Table des Illustrations

Figure 1 : Hypothèse de la stéroïdogénèse chez les poissons téléostéens.....	23
Figure 2 : Structure du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre.....	24
Figure 3 : Arbre phylogénétique des nPRs de vertébrés	26
Figure 4 : Liaison des ligands au récepteur nucléaire stéroïdien.	27
Figure 5 : Structure des récepteurs à sept hélices transmembranaires.	28
Figure 6 : Combinaison des données de consommation des progestatifs.	37
Figure 7 : Concentrations des progestatifs dans l'environnement	40
Figure 8 : Structure de la progestérone et points-clés de changements d'activité	44
Figure 9 : Devenir des progestatifs dans l'environnement aquatique.	47
Figure 10 : Construction des lignées cellulaires HELN-PRB et U2OS-zfPR.....	59
Figure 11 : Construction du modèle <i>cyp19a1b</i> -GFP.....	60
Figure 12 : Schéma de la démarche expérimentale	62
Figure 13 : Transactivation des différents sous-types du zfER.....	147
Figure 14 : Réponse photomotrice de larves WT-AB exposées à des concentrations croissantes de P4, E2 ou NET	152
Figure 15 : Réponse photomotrice de larves exposées à P4 1nM, E2 0.1nM ou NET	153
Figure 16 : Transactivation du récepteur poisson zèbre des glucocorticoïdes (zfGR) dans la lignée cellulaire HG5LN-zfGR exprimant le gène rapporteur luciférase	233
Figure 17 : Construction de la lignée GRE :Luc	234
Figure 18 : Activité luciférase relative dans des larves GRE:Luc	236
Figure 19 : EC ₅₀ et IC ₅₀ calculées sur les différents bioessais (nM).	241
Figure 20 : Organisation du cadre de travail pour évaluer les récepteurs nucléaires stéroïdiens en tant qu'initiateurs moléculaires de la perturbation des voies de signalisation	252
Figure 21 : AOP potentiel des progestatifs antagonistes du zfPR sur la voie de signalisation des progestatifs.....	255
Figure 22 : Hypothèse de l'action des métabolites des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur les cellules gliales radiaires dans le télencéphale.....	256
Figure 23 : AOP potentiel des métabolites des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur la voie de signalisation des œstrogènes.....	258
Figure 24 : Axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI).....	259
Figure 25 : AOP potentiel du progestatif norethistérone (NET) sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes.	261

Table des Tableaux

Tableau 1 : Pourcentages d'identités dans les séquences d'acides aminés entre le nPR (PGR) poisson zèbre et les nPR de différentes espèces ainsi qu'avec les autres récepteurs nucléaires stéroïdiens poissons zèbres.....	25
Tableau 2 : Classification de ligands du nPR naturels et de synthèse.....	35
Tableau 3 : Pourcentages de contraceptifs oraux utilisés par cinq pays de l'Union Européenne en fonction de la génération	36
Tableau 4 : Consommation et occurrence environnementale de progestatifs	43
Tableau 5 : Relations entre structure et activité des progestatifs	45
Tableau 6 : Métabolites de quelques progestatifs et leurs activités pharmacologiques	46
Tableau 7 : Résumé des effets des progestatifs sur différentes espèces poissons.....	52
Tableau 8 : Résumé de la démarche expérimentale et des modèles utilisés dans la thèse.....	63
Tableau 9 : ECs et ICs en nM calculées sur les lignées cellulaires.....	105
Tableau 10 : Comparaison des EC ₅₀ (nM) calculées sur les bioessais.....	148
Tableau 11 : Concentrations induisant 50% d'inhibition de l'effet maximum dans la lignée cellulaire HG5LN-zfGR exprimant le gène rapporteur luciférase	232
Tableau 12 : Liste des progestatifs testés sur les larves GRE:Luc.....	235
Tableau 13 : Résumé des effets des progestatifs sur les différents bioessais.....	240

Liste des abréviations

AOP	Adverse Outcome Pathway	LH	Hormone lutéinisante
AR	Récepteur des androgènes	LNG	Levonorgestrel ou (D-)-Norgestrel
CMA	Acétate de chlormadinone	LYN	Lynestrénol
CPA	Acétate de cyprotérone	MEP	Medroxyprogestérone
DBD	Domaine de liaison à l'ADN	MGA	Acétate de megestrol
DEX	Dexaméthasone	MPA	Medroxyprogestérone 17-acétate
DRO	Drospirénone	mPR	Récepteur membranaire de la progestérone
DSG	Désogestrel	MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
DYD	Dydrogestérone	NEA	Acétate de norethindrone
E2	17 β -œstradiol	NES	Nestorone
EE2	17 α -éthinyloestradiol	NET	Norethistérone ou norethindrone
EC₅₀	Concentration efficace médiane	NGA	Acétate de nomegestrol
EDA	Diacétate d'ethynodiol	NGL	Norgestrel
ENG	Etonogestrel	NTE	Norgestimate
ER	Récepteur des œstrogènes	nPR	Récepteur nucléaire de la progestérone
ERE	Éléments de réponse des œstrogènes	OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
ETH	Ethistérone	P4	Progestérone
GES	Gestodène	P5	Pregnénolone
GFP	Green Fluorescent Protein	PBS	Tampon phosphate salin
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaire	PE	Perturbateur(s) endocrinien(s)
GR	Récepteur des glucocorticoïdes	PFA	Paraformaldéhyde
GRE	Éléments de réponse des glucocorticoïdes	PR	Récepteur de la progestérone
GRN	Gestonorone	R5020	Promegestone
GSI	Indice gonado-somatique	RU486	Mifepristone
HPI	Axe hypothalamus-hypophyse-interrénal	STEP	Station d'épuration des eaux usées
HPG	Axe hypothalamus-hypophyse-gonadique	T	Testostérone
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane	TIB	Tibolone
Jpf	Jours post-fécondation		
LBD	Domaine de liaison du ligand		

Publications et Communications

Articles publiés

J. Cano-Nicolau*, **C. Garoche***, N. Hinfray, E. Pellegrini, N. Boujrad, F. Pakdel, O. Kah, F. Brion (2016) Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebrafish, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305, 12-21. (Article 2, p. 109)

* Premiers auteurs.

N. Hinfray, C. Tebby, **C. Garoche**, B. Piccini, G. Bourguine, S. Aït-Aïssa, O. Kah, F. Pakdel, F. Brion (2016) Additive effects of levonorgestrel and ethynilestradiol on brain aromatase (cyp19a1b) in zebrafish specific in vitro and in vivo bioassays, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 307, 108-114. (Article 3, p. 133)

Articles en préparation

C. Garoche, S. Aït-Aïssa, N. Creusot, A. Boulahtouf, W. Bourguet, P. Balaguer, F. Brion. Human and zebrafish nuclear progesterone receptors are differently activated by natural and synthetic progestins, in prep. (Article 1, p. 69)

C. Garoche, M. Picot, N. Hinfray, B. Piccini, O. Kah, F. Brion. Generation and characterization of cyp11c1-GFP transgenic zebrafish, in prep. (Article 4, p. 157)

C. Garoche, N. Creusot, M. Macherey, N. Hinfray, S. Aït-Aïssa, P. Balaguer, X. Cousin, O. Kah, T. Dickmeis, F. Brion. The progestin norethindrone (NET) disrupts the glucocorticoid signalling pathway in zebrafish, in prep. (Article 5, p. 193)

Communications orales

F. Brion, M. Picot, M. Caulier, **C. Garoche**, C. Torchy, M. Bédu, S. Aït-Aïssa, Y. Guiguen, O. Kah, J.-M. Porcher, N. Hinfray, Strengths and limits of transgenic zebra fish models to study the expression and the perturbation of steroidogenic genes by endocrine disrupting chemicals, CECE 2014.

C. Garoche, S. Aït-Aïssa, N. Creusot, A. Boulathouf, P. Balaguer, F. Brion, Human and zebrafish nuclear progestin receptors are differently activated by natural and synthetic progestins, 8ISFE Göteborg, juin 2016.

F. Brion, S. Aït-Aïssa, P. Balaguer, O. Kah, **C. Garoche**, H. Budinski, Integrated approaches to investigate the effect of progestins in fish and their occurrence in the aquatic environment, Norman Workshop Amsterdam, avril 2017.

Garoche et al., Use of several zebrafish-based bioassays to study the mechanisms of action and tissue-specific effects of ligands of the progesterone receptor, European Zebrafish Meeting EZM10 Budapest, juillet 2017.

Posters

C. Garoche, M. Picot, N. Hinfrey, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Characterization of a new transgenic zebrafish *cyp11c1*-GFP line: a potentially relevant model to assess the effects of Endocrine Active Substances on corticosteroidogenesis at early developmental stages, GDR Reprosiences Rennes, avril 2015 [Poster]

C. Garoche, M. Picot, N. Hinfrey, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Characterization of a new transgenic zebrafish *cyp11c1*-GFP line: a potentially relevant model to assess the effects of Endocrine Active Substances on corticosteroidogenesis at early developmental stages, SETAC Europe, Barcelone, mai 2015 [Poster].

C. Garoche, M. Picot, N. Hinfrey, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Use of transgenic zebrafish models to study the endocrine effects of natural and synthetic progestins, Leipzig EDA-Emerge, juin 2015 [Poster]

C. Garoche, J. Cano-Nicolau, N. Hinfrey, B. Piccini, C. Turiès, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Use of transgenic zebrafish models to study the endocrine effects of natural and synthetic progestins, PNRPE Paris, janvier 2016 [Poster]

C. Garoche, J. Cano-Nicolau, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in the developing brain of fish, SETAC Europe Nantes, mai 2016 [Poster spotlight]

C. Garoche, J. Cano-Nicolau, N. Hinfrey, B. Piccini, C. Turiès, J.-M. Porcher, O. Kah, F. Brion, Use of transgenic zebrafish models to study the endocrine effects of natural and synthetic progestins, 8ISFE Göteborg, juin 2016 [Poster]

C. Garoche, S. Aït-Aïssa, N. Creusot, A. Boulathouf, P. Balaguer, F. Brion, Synthetic progestins activate human and zebrafish nuclear progesterone receptor in vitro, ICRAPHE Paris, septembre 2016 [Poster]

S. Aït-Aïssa, F. Brion, N. Creusot, **C. Garoche**, N. Hinfrey, P. Balaguer, H. Budzinski, C. Chollet, J. Cano-Nicolau, O. Kah, Environmental occurrence and effects in fish of ligands of the progesterone receptor: current progress of the French national project PROOFS, ICRAPHE Paris, septembre 2016 [Poster]

C. Garoche, N. Creusot, M. Macherey, N. Hinfrey, S. Aït-Aïssa, P. Balaguer, X. Cousin, O. Kah, T. Dickmeis, F. Brion, The progestin norethindrone affects the glucocorticoid signalling pathway in zebrafish, GDR Reprosiences Tours, avril 2017 [Poster spotlight]

I. Introduction générale

Les perturbateurs endocriniens (PEs) sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-) populations (OMS, 2012). Parmi ces PEs, les œstrogènes naturels et synthétiques ont fait l'objet de nombreux travaux durant ces vingt dernières années (Arukwe & Goksoyr, 1998; Belfroid et al., 1999; Brion et al., 2004; Colborn, vom Saal, & Soto, 1993; Fernandez, Ikonou, & Buchanan, 2007; Hotchkiss et al., 2008; Kramer, Miles-Richardson, Pierens, & Giesy, 1998; Kuch & Ballschmiter, 2001; Menuet et al., 2005; J P Sumpter, 1998; John P Sumpter & Jobling, 2013; John P Sumpter & Johnson, 2008; Tyler, Jobling, & Sumpter, 1998; Viglino, Aboufadel, Prévost, & Sauvé, 2008; Zoeller et al., 2012). De nombreux composés appelés xeno-œstrogènes miment l'action de l'estradiol (E2), comme par exemple l'ethinylestradiol (EE2). Leur occurrence environnementale est bien renseignée. Ils sont actifs à de faibles concentrations et peuvent notamment induire la vitellogénine (VTG) et le développement d'organes intersexes, et sont aussi capables de compromettre la survie des populations. Les travaux réalisés sur ces composés ont conduit à la mise en place de normes de qualité environnementale concernant l'estrone (E1), E2 et EE2 dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau européenne (Directive 2008/105/EC modifiée par la Décision 2015/495/EU).

Néanmoins, d'autres stéroïdes que les œstrogènes naturels et synthétiques ont été détectés et quantifiés dans l'environnement aquatique, notamment des progestatifs et des glucocorticoïdes (Chang, Wan, & Hu, 2009; Creusot et al., 2014; Labadie & Budzinski, 2005; Van der Linden et al., 2008; K. Zhang, Zhao, & Fent, 2017). Notamment, des poissons (goujons) femelles au niveau de stations d'épuration des eaux usées (STEPs) ont montré des perturbations de la VTG et de la différenciation sexuelle (Sanchez et al., 2011) alors même que l'analyse de leur eau a révélé la présence de composés stéroïdiens qui n'étaient non pas des (xeno-)œstrogènes mais des corticoïdes et des progestatifs (Creusot et al., 2014).

Les progestatifs sont des ligands naturels ou de synthèse du récepteur nucléaire de la progestérone (nPR). Comparativement aux (xeno-)œstrogènes, peu de recherches ont été faites sur l'occurrence environnementale et les effets biologiques de ces composés. Chez les vertébrés, la progestérone (P4) est un progestatif endogène agissant via les récepteurs nucléaires et membranaires de la progestérone (nPR et mPR) pour médier des processus clés du développement et de la reproduction. Les progestatifs de synthèse ont été conçus pour mimer l'action de la P4. La progestérone et les progestatifs de synthèse sont largement utilisés

en tant que produits pharmaceutiques à usage humain notamment dans la contraception et souvent en association avec des œstrogènes comme EE2. Ils sont également très utilisés dans l'élevage. Certains progestatifs ont été détectés et quantifiés dans l'environnement aquatique dont les eaux de surface et les effluents de STEP à des concentrations de l'ordre du ng/L (Besse & Garric, 2008, 2009; Chang, Wan, Wu, Fan, & Hu, 2011; Creusot et al., 2014; Runnalls, Margiotta-Casaluci, Kugathas, & Sumpter, 2010; Vulliet, Baugros, Flament-Waton, & Grenier-Loustalot, 2007). Certains ont été testés en laboratoire à des concentrations environnementales et ont induit des effets PE sur différentes espèces aquatiques poissons et amphibiens (Bluthgen, Castiglioni, Sumpter, & Fent, 2013; Brion et al., 2012; Chishti, Feswick, & Martyniuk, 2014; Hoffmann & Kloas, 2012; Huang, Ying, Liang, Liu, & Liu, 2013; Jayaraman & Pike, 2014; Linderoth, Ledesma, Zebühr, & Balk, 2006; Matthew D. Overturf, Overturf, Carty, Hala, & Huggett, 2014; Paulos et al., 2010; Runnalls, Beresford, Losty, Scott, & Sumpter, 2013; Svensson, Fick, Brandt, & Brunström, 2013; Tokumoto, Yamaguchi, Ii, & Tokumoto, 2011; Zeilinger et al., 2009; Zucchi, Castiglioni, & Fent, 2012; Zucchi, Mirbahai, Castiglioni, & Fent, 2014). Des travaux ont mis en évidence les effets androgéniques et anti-androgéniques de certains progestatifs sur différentes espèces de poissons (épineche, vairon, poisson zèbre, medaka, gardon et gambusie). Les effets progestatifs, œstrogéniques ou encore corticoïdes ont été comparativement très peu étudiés, bien que de telles activités aient été rapportées *in vitro* sur des cellules exprimant différents récepteurs nucléaires stéroïdiens humains et autres mammifères. Néanmoins, cette multiplicité d'action *in vitro* est très peu documentée chez les poissons. De plus, les études investiguant les effets sur les poissons utilisent principalement des individus matures et s'intéressent aux effets sur des organes périphériques comme le foie et les gonades. Il faut également constater que le nombre de substances testées est très limité. Les études relatives aux effets précoces de la progestérone et des progestatifs de synthèse chez les poissons sont peu nombreuses. Elles mettent en évidence des perturbations de l'expression de gènes cibles impliqués dans le système endocrinien mais ne renseignent pas de l'activité tissu-spécifique des progestatifs en raison des techniques employées (analyses PCR sur homogénats de larves entières). Il en résulte un manque de données pour évaluer les risques potentiels posés par ces composés sur l'environnement.

Dans ce contexte, le projet de recherche PROOFs (ANR PROOFS 13-CESA-0006 - Occurrence and Effect of environmental progesterone receptor ligands on fish reproduction and neurodevelopment) a été mis en place. Les objectifs du projet sont d'une part d'évaluer

l'occurrence des activités (anti-)progestagéniques de matrices environnementales et d'identifier les ligands environnementaux du nPR responsables de ces activités, et d'autre part d'évaluer leurs capacités à perturber le système endocrinien des poissons.

C'est ce dernier point que ce travail de thèse vise à investiguer en étudiant les mécanismes d'action et des effets biologiques de ligands environnementaux du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Pour ce faire, la démarche expérimentale a été de sélectionner 26 progestatifs parmi les nombreux composés existant aujourd'hui en fonction de leur consommation, leur présence dans l'environnement et leurs structures chimiques. Ces composés ont été étudiés grâce à une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de cibles endocriniennes multiples ; à savoir des lignées cellulaires de type gène-rapporteur exprimant des récepteurs stéroïdiens humains et poissons zèbres ainsi que des modèles poissons zèbres transgéniques embryo-larvaires de type gène-rapporteur exprimant des gènes de la stéroïdogénèse hormono-régulés.

II. Synthèse bibliographique

1. La progestérone et les progestatifs endogènes

La progestérone (ou P4 pour pregn-4-ene-3,20-dione) est une hormone stéroïdienne endogène chez les vertébrés et fait partie de la classe des progestatifs. Elle régule des processus clés du développement et de la reproduction et est aussi un intermédiaire dans la biosynthèse d'autres stéroïdes, dont des androgènes (testostérone), des glucocorticoïdes (cortisol) et des œstrogènes (17 β -œstradiol). Au niveau moléculaire, les progestatifs peuvent agir via le récepteur nucléaire de la progestérone (nPR) et le récepteur membranaire de la progestérone (mPR). Ils peuvent également activer le PGRMC1 (pour *Progesterone receptor membrane component 1*), une protéine exprimée dans le foie et les ovaires.

Chez les poissons téléostéens, les progestatifs endogènes sont la progestérone (P4), la 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S) et la 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP). La stéroïdogénèse aboutissant à la formation de ces molécules est détaillée figure 1.

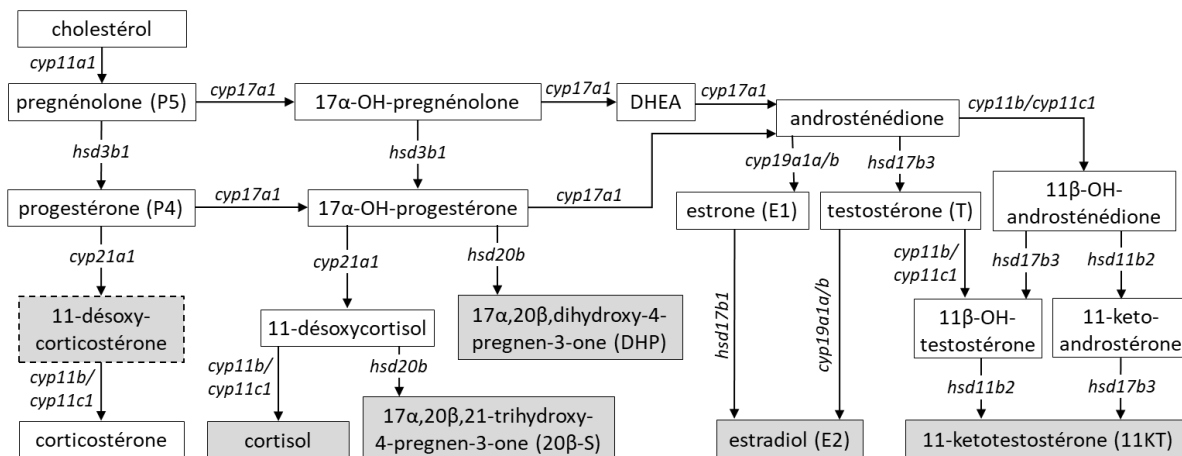


Figure 1 : Hypothèse de la stéroïdogénèse chez les poissons téléostéens. Sur chaque flèche, le nom du gène codant pour l'enzyme impliquée dans la conversion. En gris : stéroïdes considérés comme étant les ligands principaux des récepteurs stéroïdiens. En gris, pointillé : stéroïde considéré comme étant le ligand du récepteur des minéralocorticoïdes. Cyp : cytochrome P450 ; DHEA : déshydroépiandrostérone ; hsd : hydroxystéroïde déshydrogénase ; OH- : hydroxy-. D'après Tokarz et al. 2015.

La stéroïdogénèse débute avec la conversion du cholestérol en pregnénolone, catalysée par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol ou P450_{scc} (pour *side chain cleaving*) codée par le gène *cyp11a1*. Différentes voies biochimiques aboutissent ensuite à la synthèse des hormones stéroïdes, *i.e.* les stéroïdes sexuels (progestatifs, œstrogènes et androgènes) et les corticostéroïdes (gluco- et minéralocorticoïdes). Les principales enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse sont des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD). Chez les poissons, la stéroïdogénèse se fait principalement dans les gonades, dans le cerveau et dans les cellules interrénales.

1.1. Le récepteur nucléaire de la progestérone

1.1.1. Structure et phylogénie du nPR

Le récepteur nPR est intracellulaire et fait partie de la super-famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens (Tsai & O'Malley, 1994), tout comme les récepteurs nucléaires des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), des minéralocorticoïdes (MR) et des glucocorticoïdes (GR).

Chez l'humain et les autres mammifères, deux isoformes PRA et PRB du récepteur nucléaire de la progestérone ont été identifiées et sont issues de l'épissage alternatif du transcrit d'un unique locus dont la longueur varie selon l'espèce. C'est également le cas chez la plupart des poissons téléostéens (truite de mer, medaka, takifugu, tétraodon, épineche, etc.) (Pinter & Thomas, 1995, 1997). Chez le poisson zèbre en revanche, une seule isoforme a été identifiée, provenant de la transcription d'un locus comprenant un unique site de liaison spécifique pour les progestatifs endogènes téléostéens DHP et 20 β -S (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010).

Le cadre de lecture ouvert du *pgr* poisson zèbre est constitué de 1854 paires de bases codant pour une protéine de 617 acides aminés (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010). Cette protéine présente une forte homologie avec les nPR d'autres vertébrés et contient les cinq domaines caractéristiques des récepteurs nucléaires stéroïdiens (Germain & Bourguet, 2013) (figure 2).

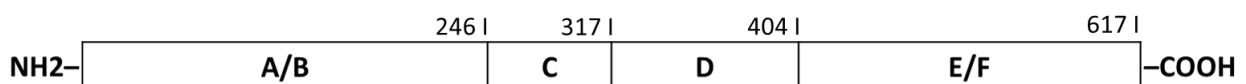


Figure 2 : Structure du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre. A/B : domaine de transactivation (AF1) ; C : domaine de fixation à l'ADN (DBD) ; D : région charnière ; E/F : domaine de fixation du ligand (LBD) et AF2. Les nombres au-dessus de chaque domaine correspondent aux positions des acides aminés à partir du site de traduction. D'après Hanna et al., 2010.

Le domaine de transactivation (A/B) se situe dans la région N-terminale et contient le domaine d'activation AF1 (indépendant de la fixation du ligand) qui intervient dans le recrutement des co-activateurs et des co-répresseurs transcriptionnels. Le domaine de fixation à l'ADN (DBD) (C), en doigt de zinc, permet l'association du récepteur avec les éléments de réponse des gènes cibles (séquence d'ADN spécifique localisée dans le promoteur). Cette région joue également un rôle dans la dimérisation. Le DBD est une région hautement conservée dans l'évolution. La région charnière (D) contient la séquence de localisation

nucléaire responsable de la translocation dans le noyau et permet le changement de conformation du récepteur et sa dimérisation. Au niveau de la région C-terminale, le domaine (E/F) contient le domaine de fixation du ligand (LBD) qui est très conservé et est essentiel pour la reconnaissance spécifique des ligands et l'induction du changement de conformation associé à la formation du dimère. Cette région contient également le domaine de transactivation AF-2 (dépendant de la fixation du ligand) permettant le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels.

Le tableau 1 présente les pourcentages d'identités dans les séquences d'acides aminés entre le nPR poisson zèbre et les nPR de différentes espèces ainsi qu'avec les autres récepteurs nucléaires stéroïdiens poissons zèbres.

Tableau 1 : Pourcentages d'identités dans les séquences d'acides aminés entre le nPR (PGR) poisson zèbre et les nPR de différentes espèces ainsi qu'avec les autres récepteurs nucléaires stéroïdiens poissons zèbres. D'après Hanna *et al.* 2010 et Chen *et al.* 2010.

Récepteur	Longueur totale	A/B	DBD	Charnière	LBD
Humain PGR	44	14	90	36	67
Anguille PGR1	57	24	97	57	83
Anguille PGR2	56	21	92	64	81
Xenope PGR1		18	87	47	69
Xenope PGR2		20	87	47	70
Chien PGR	44	12	90	37	67
Poulet PGR	47	12	90	45	66
Grenouille PGR	48	15	89	45	69
Souris PGR	44	14	90	38	65
Rat PGR	44	12	90	38	66
Lapin PGR	44	13	90	37	67
Mouton PGR	63	7	90	37	67
Bovin PGR	58	14	90	38	67
Tortue d'eau douce PGR	46	14	90	47	67
Poisson zèbre GR		20	83	33	52
Poisson zèbre AR		16	73	41	51
Poisson zèbre MR		13	85	39	49
Poisson zèbre ER α		11	54	21	27
Poisson zèbre ER β 1		13	58	25	27
Poisson zèbre ER β 2		13	58	29	29

L'alignement des LBD de différents vertébrés confirme que les résidus importants pour la liaison de P4 sont très conservés (Chen *et al.*, 2010; R. N. Hanna *et al.*, 2010). Le nPR poisson zèbre s'apparente à l'isoforme B du récepteur humain. Les séquences de liaison du ligand (LBD) des nPR poisson zèbre et humain présentent une similarité dans leurs identités relativement importante (67%) et plus élevée que celle entre le nPR poisson zèbre et les autres récepteurs stéroïdiens de cette même espèce (27%-52%).

Deux espèces aquatiques possèdent deux gènes *pgr* codant pour le nPR, l'anguille japonaise (Ikeuchi, Todo, Kobayashi, & Nagahama, 2001, 2002; Todo et al., 2000) et le xénope (Bayaa, Booth, Sheng, & Liu, 2000; X. S. Liu, Ma, Hamam, & Liu, 2005; Tian, Kim, Heilig, & Ruderman, 2000). Ces gènes se situent sur deux loci séparés qui diffèrent considérablement dans leurs séquences d'acides aminés. Le génome ancestral des actinoptérygiens contenait probablement deux loci *pgr* qui ont été conservés chez certaines espèces comme l'anguille japonaise, tandis que chez d'autres espèces comme le poisson zèbre un locus *pgr* a été perdu au cours de l'évolution. Dans le cas du xénope, l'hypothèse est que les deux loci *pgr* sont issus d'un événement de duplication du génome (figure 3).

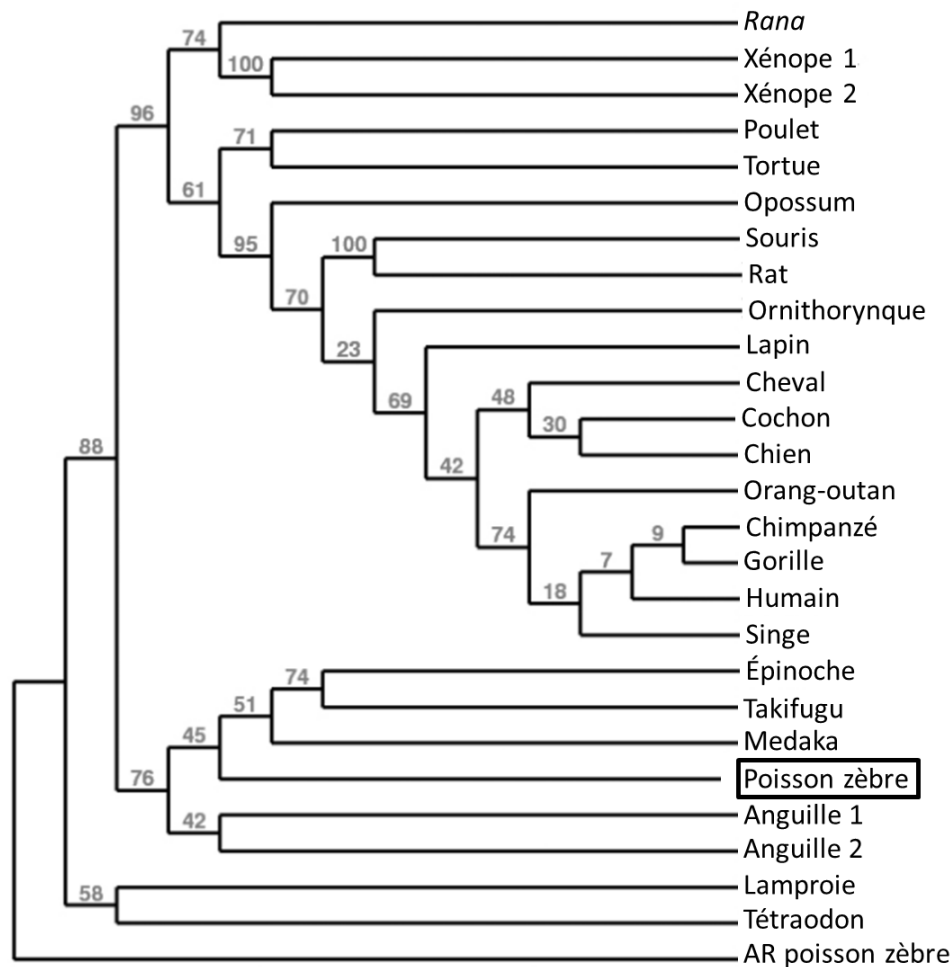


Figure 3 : Arbre phylogénétique des nPRs de vertébrés d'après Hanna *et al.* 2010. L'arbre phylogénétique a été construit en fonction de la conservation des domaines de liaison du ligand (LBD). Les nombres indiqués sur les branches indiquent les valeurs de *bootstrap* en pourcentages.

1.1.2. Mécanisme d'action du nPR

Les progestatifs endogènes comme DHP et P4 se lient au nPR qui agit comme un facteur de transcription pour induire des réponses génomiques (Zhu et al., 2015). Les

progestatifs tout comme les autres stéroïdes sont de petites molécules liposolubles qui diffusent à travers la membrane cellulaire vers le cytoplasme où ils peuvent se lier aux récepteurs nucléaires (figure 4). L'interaction entre les récepteurs et l'ADN est bloquée par la protéine de choc thermique Hsp90 (*heat shock protein 90*), une protéine chaperonne entraînant une conformation du domaine de liaison du ligand (LBD) lui permettant d'accepter le ligand mais pas d'entrer dans le noyau. La liaison du ligand au récepteur dissocie la protéine Hsp90 et libère le domaine de liaison du récepteur à l'ADN (DBD). Le récepteur peut ainsi se dimériser et l'ensemble migre du cytoplasme vers le noyau dans lequel il se lie aux éléments de réponse et active la transcription en association avec des cofacteurs. Les actions médiées par ces récepteurs sont génomiques et plus lentes que les actions médiées par les récepteurs membranaires.

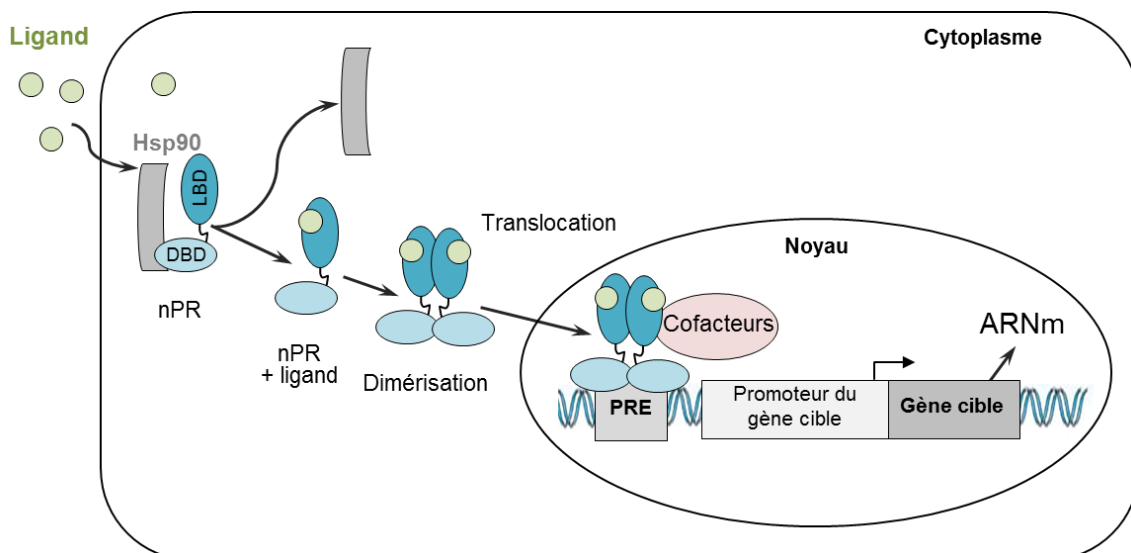


Figure 4 : Liaison des ligands au récepteur nucléaire stéroïdien, dimérisation et translocation dans le noyau où le complexe dimérisé se fixe aux éléments de réponse pour agir en tant que facteur de transcription. nPR : récepteur nucléaire de la progestérone ; LBD : domaine de liaison du ligand ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; Hsp90 : protéine de choc thermique 90 (*heat shock protein*) ; PRE : éléments de réponse aux progestatifs ; ARNm : ARN messenger.

1.1.3. Localisation du nPR

Chez les poissons zèbres, l'ARNm du nPR est exprimé tôt dans le développement puisqu'il est détecté dès 8 heures post-fécondation (hpf) (Chen et al., 2010). Chez l'adulte, l'ARNm de nPR et la protéine sont exprimés majoritairement dans les ovaires et les testicules mais ils sont également présents dans le cerveau (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010; Pandian, 2013; Tokarz, Moller, Hrabe De Angelis, & Adamski, 2013). Dans l'ovaire, le nPR et le transcrit s'expriment dans les cellules folliculaires entourant les ovocytes (similaire chez les autres vertébrés) et dans les noyaux d'ovocytes de stades I et II. En revanche, il ne

s'exprime pas dans les noyaux des ovocytes de stades III et IV mais dans les cellules folliculaires qui leur sont associées. Dans le testicule, le nPR est exprimé de façon importante dans les spermatogonies et les spermatocytes dans les cellules de Leydig et de Sertoli. Dans le cerveau, le récepteur est exprimé dans des régions neuroendocrines (hypophyse et aire préoptique de l'hypothalamus) et au niveau des neurones, le long des ventricules et dans les cellules gliales radiaires, des régions du cerveau non associées à la reproduction.

1.2. Les récepteurs membranaires de la progestérone

Contrairement aux récepteurs nucléaires qui médient des actions génomiques et lentes (de quelques heures à plusieurs jours), les récepteurs membranaires médient des actions non-génomiques et rapides (de quelques secondes à quelques minutes). Les récepteurs mPR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires (hélices α) qui font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (figure 5). Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques constituées des sous-unités α , β et γ . À l'état basal, la sous-unité $G\alpha$ lie une molécule de guanosine diphosphate (GDP) au niveau de son domaine GTPase. Lorsqu'un ligand se lie au récepteur membranaire, celui-ci se couple à une protéine G et catalyse l'échange du nucléotide lié à cette protéine G en substituant le guanosine triphosphate (GTP) au GDP. Cette substitution entraîne la dissociation du complexe hétérotrimérique en sous-unités qui vont stimuler des protéines effectrices cibles.

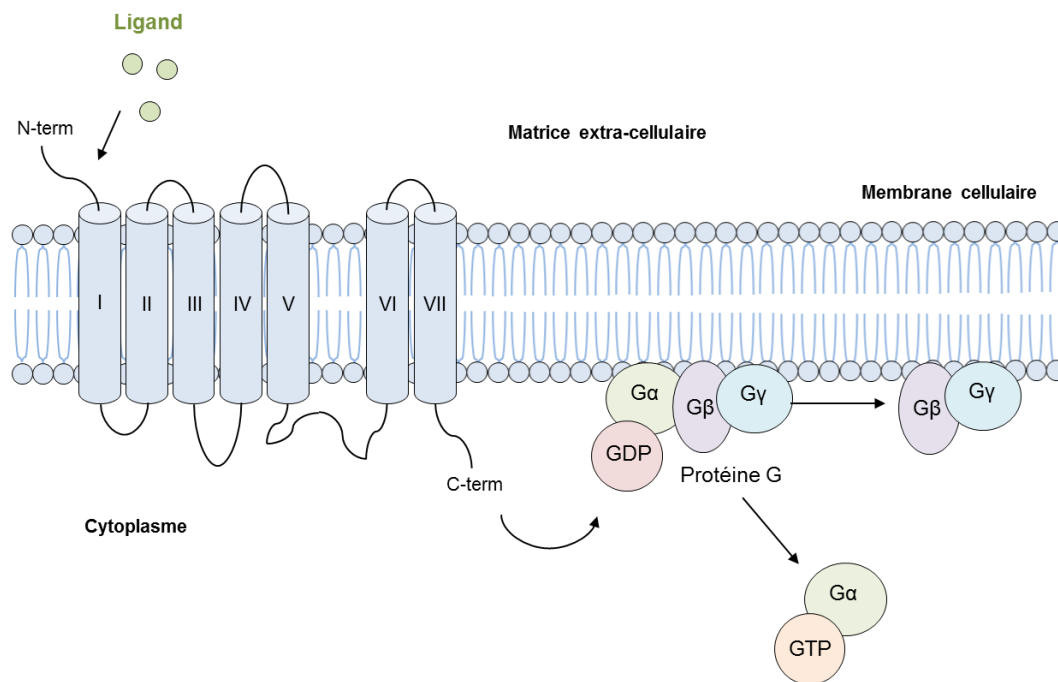


Figure 5 : Structure des récepteurs à sept hélices transmembranaires (de I à VII). N-term : domaine N-terminal ; C-term : domaine C-terminal ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; α , β et γ : sous-unités de la protéine G.

Tout comme l'humain, le poisson zèbre exprime trois isoformes de récepteurs membranaires de la progestérone (mPR α , mPR β et mPR γ) (Thomas, Pang, Zhu, Detweiler, & Doughty, 2004). Chez le poisson zèbre et de nombreux autres poissons téléostéens, ces récepteurs s'expriment dans les ovaires, les testicules et les ovocytes et également au niveau de l'hypophyse (sauf mPR γ) (R. N. Hanna & Zhu, 2009; R. Hanna, Pang, Thomas, & Zhu, 2006; Ikeuchi et al., 2001; Pandian, 2013; Tan, Zagrodny, Bernaud, & Peng, 2009; Thomas et al., 2006, 2004; Tokarz, Moller, et al., 2013; Tokumoto et al., 2012; Zhu, Bond, & Thomas, 2003; Zhu, Rice, Pang, Pace, & Thomas, 2003). Les mPR étant localisés majoritairement dans les mêmes tissus que les nPR et étant activés par le même ligand DHP (R. N. Hanna & Zhu, 2009), il est possible qu'il y ait des interactions entre les deux voies de signalisation (*cross-talks*), comme montré chez l'humain (Karteris et al., 2006). Chez les poissons, le mPR joue un rôle dans la maturation ovocytaire (Yoshitaka Nagahama & Yamashita, 2008; Thomas, Zhu, & Pace, 2002) et dans la motilité des spermatozoïdes et exerce des effets anti-apoptotiques dans les follicules ovariens (Thomas, 2008, 2012; C Tubbs & Thomas, 2008; Christopher Tubbs & Thomas, 2009). Pendant la maturation ovocytaire, l'expression du mPR est stimulée par l'hormone lutéinisante (LH) (Thomas et al., 2004).

1.3. Rôles des progestatifs endogènes

Chez les mammifères, la progestérone est synthétisée principalement par le corps jaune des ovaires, mais aussi par les testicules, les glandes surrénales, le placenta et le cerveau. Cette hormone régule de multiples processus de la reproduction des femelles comme la croissance folliculaire, la maturation ovocytaire, l'ovulation, l'implantation de l'embryon, le maintien de la grossesse, le cycle menstruel et l'embryogenèse (Clarke & Sutherland, 1990). Chez les mâles, la progestérone joue notamment un rôle dans la fonction spermatique au niveau de l'hyperactivation des gamètes et de la réaction acrosomale (Calogero et al., 2000).

Chez les poissons téléostéens, les progestatifs endogènes sont la P4, la DHP et la 20 β -S. Tout comme chez les mammifères, ils ont des fonctions essentielles dans le développement et la reproduction (gamétogenèse, ovulation, spermiation, rôle de phéromones sexuelles) et également des rôles potentiels dans le cerveau.

1.3.1. Rôle des progestatifs endogènes chez les poissons téléostéens mâles

Il a été montré que les niveaux de DHP plasmatique augmentent deux fois pendant le cycle de reproduction (Amer, Miura, Miura, & Yamauchi, 2001; Scott & Sumpter, 1989),

avec un pic quand les cellules germinales entrent en méiose puis un autre pic aux stades plus tardifs de maturité et de fraie. Le premier pic suggère que la DHP joue un rôle dans l'initiation de la méiose dans les stades précoces de la spermatogenèse. Ceci a été montré chez l'anguille du Japon dans des cultures d'explants testiculaires (*Anguilla japonica*) (Takeshi Miura, Higuchi, Ozaki, Ohta, & Miura, 2006). Le premier pic de DHP survient également chez d'autres espèces comme le huchon japonais (*Parahucho perryi*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), le hareng du Pacifique (*Clupea pallasii*), la tanche (*Tinca tinca*) et le pagre commun (*Pagrus pagrus*) suggérant également un rôle initiateur de la méiose chez ces espèces (Scott, Sumpter, & Stacey, 2010). Le rôle de la DHP dans la spermatogenèse est également montré chez plusieurs salmonidés (Yoshitaka Nagahama, 2011). Chez les poissons zèbres, l'ARNm de nPR et la protéine sont exprimés dans les testicules au niveau des spermatogonies et des spermatocytes dans les cellules de Leydig et de Sertoli. (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010). L'expression importante du récepteur dans les spermatogonies et les spermatocytes suggère un rôle potentiel des progestatifs dans le développement des cellules germinales. En effet, la DHP stimule les stades précoces de la spermatogenèse chez le poisson zèbre dans des cultures d'explants de testicules (Chen et al., 2013). Chez l'anguille japonaise, il a été montré que la DHP pouvait induire la prolifération des cellules germinales dans les testicules de façon aussi importante que l'androgène endogène 11-ketotestostérone (11-KT) (Takeshi Miura et al., 2006; T Miura, Yamauchi, Takahashi, & Nagahama, 1991; Todo et al., 2000). Le nPR semble toutefois être peu impliqué dans la maturation finale des spermatozoïdes.

La DHP induit la spermiation chez plusieurs espèces, comme cela a été montré pour la truite biwa (*Oncorhynchus rhodurus*) et le cyprin doré (*Carassius auratus*) (Ueda, Kambegawa, & Nagahama, 1985). C'est également le cas chez la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), l'anguille du Japon (*Anguilla japonica*) (Scott et al., 2010) et plusieurs salmonidés (Yoshitaka Nagahama, 2011). Chez le huchon japonais (*Parahucho perryi*), la DHP est essentielle pour la maturation finale de la spermatogenèse (Amer et al., 2001). Chez le cyprin doré (*Carassius auratus*), la progestérone induit également la spermiation (Billard, le Gac, & Loir, 1990). Il a été noté un lien important entre la concentration de DHP plasmatique et la production de laitance, en particulier chez les salmonidés. Chez plusieurs espèces, la DHP augmente le volume de laitance (Scott et al., 2010). De façon intéressante, chez plusieurs espèces, on observe une baisse de la production

de l'androgène 11-ketotestostérone au profit d'une hausse de la production de DHP sous contrôle de la LH au moment de la spermiation (Scott et al., 2010).

Chez plusieurs espèces de téléostéens, la production de DHP dans les testicules est responsable de l'acquisition de la motilité spermatique comme montré pour le saumon du Japon (*Oncorhynchus masou*) (T Miura, Yamauchi, Takahashi, & Nagahama, 1992) et d'autres salmonidés (Yoshitaka Nagahama, 2011). Chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*), c'est la 20β -S qui induit l'hypermotilité spermatique via le mPR (Christopher Tubbs & Thomas, 2009). Cette acquisition de la motilité se fait par altération du pH et de la fluidité du liquide séminal.

1.3.2. Rôle des progestatifs endogènes chez les poissons téléostéens femelles

Chez le poisson zèbre adulte, l'ARNm de nPR et la protéine sont très exprimés dans les ovaires (cellules folliculaires et ovocytes aux stades précoces) (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010). Dans l'ovaire, l'expression de nPR et du transcrit dans les cellules folliculaires entourant les ovocytes suggère un rôle important des progestatifs dans la régulation du développement ovocytaire et l'ovulation. Le rôle du nPR dans l'ovulation a notamment été mis en évidence grâce à des poissons zèbres mutants Knock-Out (KO) pour le nPR (Tang et al., 2016). Le récepteur s'exprime dans les noyaux d'ovocytes de stades I et II, suggérant un rôle dans la croissance et le développement des ovocytes précoces. Sur des cultures d'ovocytes de huchon japonais (*Parahucho perryi*) et de carpe commune (*Cyprinus carpio*), la DHP régule les stades précoces de l'ovogenèse en initiant la première division de méiose (C. Miura, Higashino, & Miura, 2007). En revanche, le récepteur nPR ne s'exprime pas dans les noyaux des ovocytes de stades III et IV mais dans les cellules folliculaires qui leur sont associées, suggérant un rôle dans le développement folliculaire des stades tardifs mais pas dans la maturation finale de l'ovocyte en lui-même.

Très tôt il a été montré que la DHP induit la maturation finale de l'ovocyte chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Fostier, Jalabert, & Terqui, 1973). Chez le salmonidé *Cynoscion nebulosus*, 20β -S induit la maturation finale de l'ovocyte via le mPR (Pinter & Thomas, 1995, 1997; Thomas & Das, 1997). Chez le poisson zèbre, c'est la DHP qui est considérée comme étant l'hormone de maturation ovocytaire en agissant via les mPR (Thomas et al., 2004). Elle est également considérée comme étant l'hormone de maturation

ovocytaire chez plusieurs autres téléostéens (DeQuattro et al., 2012; C. Miura et al., 2007; Y Nagahama, 1994, 1997; Yoshitaka Nagahama, 2011; Pandian, 2013; Tokumoto et al., 2011)

Chez le salmonidé *Cynoscion nebulosus*, DHP et 20 β -S induisent l'ovulation dans des cultures d'ovocytes. La P4 n'induit pas l'ovulation et antagonise au contraire l'effet de 20 β -S (Pinter & Thomas, 1999). L'ovulation induite par 20 β -S est bloquée par l'actinomycine D et l'inhibiteur de la synthèse protéique cycloheximide, ce qui suggère que ce mécanisme est génomique et implique probablement le nPR.

1.3.3. Rôles de phéromones sexuelles

La DHP et la 20 β -S peuvent être détectées par l'organe olfactif de plusieurs espèces de poissons (Stacey & Sorensen, 2009). Pendant la maturation finale de l'ovocyte, les femelles *C. auratus* excrètent la DHP qui agit sur les mâles en tant que phéromone et induit des effets libérateurs (*releaser effects*) comme le comportement de cour (Poling, Fraser, & Sorensen, 2001), et des effets d'amorce (*primer effects*) comme l'augmentation du taux de LH, des niveaux de stéroïdes et de la production de laitance (Dulka, Stacey, Sorensen, & Kraak, 1987; Hong, Chen, Zhang, & Zheng, 2006), ce qui a également été montré chez d'autres espèces de poissons (Scott et al., 2010). Chez certaines espèces, ce sont des métabolites de ces progestatifs qui jouent le rôle de phéromones (Scott et al., 2010). Les phéromones peuvent également induire des changements de comportement chez les femelles *Bostrychus sinensis* (Hong et al., 2006). En revanche, les rôles des progestatifs endogènes en tant que phéromones chez les poissons zèbres ne sont pas établis.

1.3.4. Rôle des progestatifs endogènes dans le cerveau

Chez les mammifères, la P4 est présente naturellement dans le cerveau des mâles et des femelles à des niveaux comparables (Stein, 2008). Elle a une fonction dans la reproduction des femelles en alternant des rétrocontrôles positifs et négatifs sur l'axe hypothalamus-hypophyse, influençant les taux d'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) et d'hormone lutéinisante (LH) et d'hormone folliculo-stimulante (FSH). La P4 exerce également des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques importants (Brinton et al., 2008; Jayaraman & Pike, 2014), en réduisant notamment les dommages neuronaux liés à l'accumulation de glutamate dans les neurones (Nilsen & Brinton, 2002) ou en stimulant la myélinisation axonale pendant le développement et la régénération de la myéline après une lésion, comme montré chez le modèle murin (Schumacher, Sitruk-Ware, & De Nicola, 2008;

Stein, 2008). Des effets paracrines des neurones et des cellules gliales ont été suggérés en raison de la présence d'enzymes de la stéroïdogénèse actives et de fortes concentrations de progestatifs (Brinton et al., 2008; Charalampopoulos, Remboutsika, Margioris, & Gravanis, 2008; J. M. Wang, Irwin, Liu, Chen, & Brinton, 2007). On sait que certains de ces effets sont médiés par des progestatifs synthétisés *de novo* dans le cerveau par les neurones et les cellules gliales, en particulier par les astrocytes (Baulieu, 1998; Micevych & Sinchak, 2008).

Chez les poissons, les rôles des progestatifs au niveau du système nerveux central sont moins connus. L'ARNm de nPR et la protéine sont présents dans le cerveau des poissons zèbres dans des régions neuroendocrines au niveau de l'hypophyse et de l'aire préoptique de l'hypothalamus (Chen et al., 2010; R. N. Hanna et al., 2010). Les récepteurs mPR α et mPR β sont exprimés dans l'hypophyse. Ces localisations suggèrent un rôle des progestatifs endogènes dans la régulation de la reproduction. Chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*), 20 β -S exerce des actions rapides et non génomiques au niveau du système neuroendocrinien dans la région préoptique de l'hypothalamus antérieur et diminue la sécrétion de GnRH (Thomas et al., 2004). Une étude récente a montré que la DHP augmente l'expression des hormones gonadotropes FSH β et LH β au niveau de l'hypophyse des poissons zèbres mâles, ce qui n'est pas le cas chez les poissons Knock-Out pour le *pgr*, montrant le rôle du récepteur et de la DHP dans la régulation neuroendocrine de la reproduction (C. Wang et al., 2016).

Le récepteur nPR est également exprimé au niveau des neurones et des cellules gliales radiaires et le long des ventricules. Du fait de la persistance des cellules gliales radiaires à l'âge adulte, le cerveau des poissons zèbres a une forte activité neurogénique (Pellegrini et al., 2007, 2015). De façon intéressante, l'expression du nPR poisson zèbre dans le cerveau peut être régulée par l'estradiol (synthétisé par les cellules gliales radiaires) (Diotel et al., 2010; Diotel, Servili, et al., 2011; R. N. Hanna et al., 2010; Hao et al., 2013; Menuet et al., 2005). La présence dans le cerveau de l'ensemble des enzymes de la stéroïdogénèse suggère une synthèse *de novo* de neurostéroïdes comme la progestérone (Diotel, Do Rego, Anglade, Vaillant, Pellegrini, Gueguen, et al., 2011; Diotel, Do Rego, Anglade, Vaillant, Pellegrini, Vaudry, et al., 2011), faisant du cerveau une cible potentielle de la P4. Les progestatifs endogènes pourraient donc avoir un rôle dans des processus physiologiques autres que la reproduction, par exemple la survie neuronale, la croissance des neurites et la neurogenèse comme cela a été suggéré chez les mammifères. Quelques études ont montré les effets de P4 et de quelques autres progestatifs sur l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes de la

stéroïdogénèse pendant le développement du poisson zèbre (Karl Fent, 2015; Kumar et al., 2015; Y.-Q. Liang, Huang, Ying, et al., 2015b; Zhao, Castiglioni, & Fent, 2015a; Zucchi et al., 2012; Zucchi, Castiglioni, & Fent, 2013), suggérant que ces composés peuvent perturber des processus régulés par des neuro-stéroïdes dans le cerveau, comme la neurogénèse.

2. La progestérone et les progestatifs de synthèse

Les progestatifs synthétiques sont conçus pour mimer l'action de la progestérone chez l'humain. Il en existe aujourd'hui plus de 200 (Lefebvre, 2010) et de nouvelles molécules progestatives sont régulièrement développées par l'industrie chimique. Une vingtaine d'entre eux sont utilisés régulièrement en tant que substances pharmaceutiques dans la médecine humaine et vétérinaire (Sitruk-Ware, 2004; Sitruk-Ware & Nath, 2010).

2.1. Classification des progestatifs

Les progestatifs peuvent être classés selon leur structure chimique : ils peuvent par exemple être structurellement apparentés à la testostérone (estranes et gonanes) ou à la progestérone (pregnanes et 19-norpregnanes) (Sitruk-Ware & Nath, 2010). Le tableau 2 page suivante présente la classification de certains ligands du nPR naturels et de synthèse.

Tableau 2 : Classification de ligands du nPR naturels et de synthèse.

Classe	Composé	Abréviation	CAS	Masse molaire (g/mol)	
Progestatif endogène	Progestérone	P4	57-83-0	314,46	
Rétroprogestérone	Dydrogestérone	DYD	152-62-5	312,45	
Progestatif endogène téléoestéen	17 α ,20 β -dihydroxyprogestérone	DHP	1662-06-2	332,48	
Structurellement apparentés à la progestérone	Medroxyprogestérone	MEP	520-85-4	344,49	
	Dérivés de la 17 α -hydroxyprogestérone	Acétate de medroxyprogestérone	MPA	71-58-9	386,52
		Acétate de mégestrol	MGA	595-33-5	384,51
		Acétate de chlormadinone	CMA	302-22-7	406,94
		Acétate de cyproterone	CPA	427-51-0	416,94
	Dérivés de la 19-norprogestérone	Promégestone	R5020	34184-77-5	326,47
		Nestorone	NES	7759-35-5	370,48
		Acétate de nomégestrol	NGA	58652-20-3	370,48
	Dérivé de la 17 α -hydroxy-19-norprogestérone	Gestonorone	GRN	2137-18-0	316,43
	Structurellement apparentés à la testostérone : dérivés de la 19-nortestostérone	Éthistérone	ETH	434-03-7	312,45
Diacétate d'éthinodiol		EDA	297-76-7	384,51	
Estranes		Lynestrénol	LYN	52-76-6	284,44
		Acétate de noréthindrone	NEA	51-98-9	340,46
		Noréthindrone	NET	68-22-4	298,42
		Tibolone	TIB	5630-53-5	312,40
		Désogestrel	DSG	54024-22-5	310,47
Gonanes		Étonogestrel	ENG	54048-10-1	324,45
		Gestodène	GES	60282-87-3	310,43
		Levonorgestrel	LNG	797-63-7	312,45
		Norgestimate	NTE	35189-28-7	369,50
		Norgestrel	NGL	6533-00-2	312,45
Dérivé de la spironolactone		Drospirénone	DRO	67392-87-4	366,49
Antagoniste du PR	Mifepristone	RU486	84371-65-3	429,60	

2.2. Usages de la progestérone et des progestatifs de synthèse

La progestérone et les progestatifs de synthèse sont utilisés dans la contraception (contraception orale, dispositifs intra-utérins, implants et patches), souvent en association avec des œstrogènes (majoritairement EE2). Les contraceptifs contiennent des doses plus importantes de progestatifs que d'œstrogènes. P4 et les progestatifs de synthèse sont également prescrits dans le cadre du traitement hormonal substitutif de la ménopause (THS), dans le traitement de l'endométriose et de certains cancers, et dans le cadre du don d'ovocytes (prescription de P4 à la patiente receveuse afin de préparer l'endomètre).

Les progestatifs utilisés dans la contraception sont divisés par convention en quatre générations (Rozenbaum, 2001; Sitruk-Ware, 2004). La première génération comporte entre autres la norethistérone (NET) et la seconde génération inclut entre autres le norgestrel (NGL)

et le levonorgestrel (LNG). La troisième génération comprend par exemple le desogestrel (DSG), le gestodène (GES) et le norgestimate (NTE). La plupart des progestatifs de ces trois générations sont structurellement apparentés à la testostérone. Ils ont d'ailleurs des effets (anti-)androgéniques (LNG et NET), mais également des effets (anti-) œstrogéniques (NET) et (anti-) glucocorticoïdes (MPA et GES) (Besse & Garric, 2009; Paulos et al., 2010; Svensson et al., 2013). La 4^{ème} génération quant à elle contient notamment la drospirénone (DRO), la nestorone (NES), la chlormadinone, le dienogest et le nomegestrol. Ces dérivés ont été développés pour limiter les effets secondaires androgéniques, œstrogéniques ou glucocorticoïdes.

D'après l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), dans le document « Contraceptifs oraux commercialisés en France au 1^{er} janvier 2013 », les françaises sont 4 millions à consommer des contraceptifs oraux. La France consomme 49% de contraceptifs oraux de 2^{ème} génération et 38% de 3^{ème} génération contre 12% de contraceptifs oraux de 4^{ème} génération et 1% de 1^{ère} génération. Le tableau 3 résume les pourcentages de contraceptifs oraux utilisés par cinq pays de l'Union Européenne en fonction de la génération (ANSM, IMS MIDAS).

Tableau 3 : Pourcentages de contraceptifs oraux utilisés par cinq pays de l'Union Européenne en fonction de la génération (ANSM, IMS MIDAS).

	France	Allemagne	Royaume-Uni	Italie	Espagne
1^{ère} génération	1	0,6	11	0	0
2^{ème} génération	49	29	38	7	11
3^{ème} génération	38	21	39	48	25
4^{ème} génération	12	44	10	43	52

Des études épidémiologiques ont mis en évidence un risque accru d'accidents thromboemboliques veineux parmi les utilisatrices de pilules contraceptives de 3^{ème} et 4^{ème} génération pouvant entraîner la mort (Emmerich, Thomassin, & Zureik, 2014; Lemaitre, Lastennet, Syr, Emmerich, & Zureik, 2015; A. Tricotel, Collin, & Zureik, 2015; Aurore Tricotel, Raguideau, Collin, & Zureik, 2014). Depuis 2013, l'ANSM recommande une réorientation des prescriptions vers des pilules de 1^{ère} et 2^{ème} génération, bien que cette décision soit controversée (Debarre, 2013). Dans le document de l'ANSM « Evolution récente de l'utilisation des contraceptifs en France : contraceptifs oraux combinés (COC) et autres contraceptifs - Bilan à un an », on peut constater que l'utilisation des COC de 3^{ème} et 4^{ème} génération diminue au profit des COC de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

Les progestatifs de synthèse sont consommés dans des quantités plus importantes que les œstrogènes et les androgènes de synthèse. La figure 6 montre la consommation annuelle de progestatifs en France et au Royaume-Uni en 2004 et 2006 respectivement. La consommation la plus importante concerne la progestérone (P4). C'est également le cas en Suisse en 2010 avec 485 kg de P4 contre 213 kg de progestatifs synthétiques, ainsi que dans d'autres pays (Karl Fent, 2015).

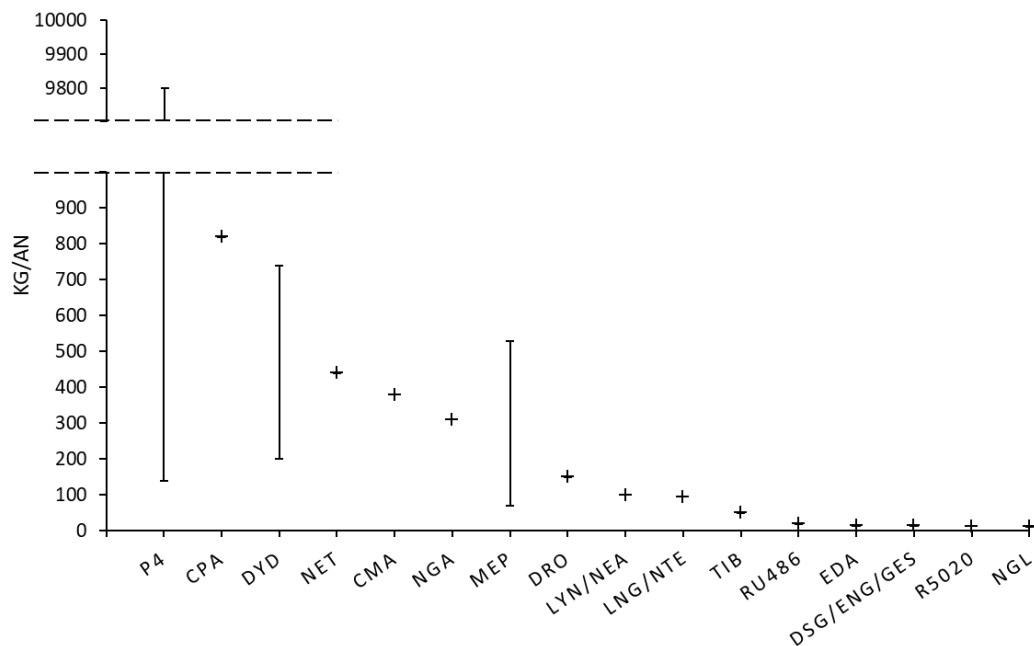


Figure 6 : Combinaison des données de consommation des progestatifs en France en 2004 et au Royaume-Uni en 2006 (kg) d'après (Besse & Garric, 2009; Runnalls et al., 2010).

Les progestatifs sont également utilisés dans l'élevage. Les animaux d'élevages secrètent la P4 endogène et ses métabolites, mais sont également traités avec de la progestérone et des progestatifs de synthèse dans un but de régulation de leur procréation (McPhee, Doyle, Davis, & Chamley, 1983; Perry, Smith, & Geary, 2004). Les progestatifs sont aussi utilisés comme contraceptifs pour les animaux de compagnie, bien qu'il ne s'agisse pas d'une source de contamination des milieux aquatiques. Dans plusieurs pays, comme les États-Unis et la Chine, des progestatifs ayant une activité androgénique sont utilisés dans l'élevage en tant que facteurs de croissance comme par exemple la medroxyprogestérone (MEP), l'acétate de medroxyprogestérone (MPA), l'acétate de mélengestrol, le norgestrel (NGL) et la dydrogestérone (DYD) (U.S. Food & Drug Administration (FDA) : <https://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/productsafetyinformation/ucm055436.htm>, liste consultable dans le *Code of Federal Regulations (CFR), Title 21, Parts 522 and 556*) (Lange et al., 2002). Des progestatifs sont en effet excrétés par les animaux d'élevage (Lange et al., 2002) et certains sont retrouvés dans les eaux de ruissellement des fermes d'élevage (S.-S. Liu

et al., 2014, 2015; S. Liu, Ying, Zhang, et al., 2012; S. Liu, Ying, Zhou, et al., 2012). Cette utilisation est interdite dans l'Union Européenne selon la Directive 96/22/CE du Conseil du 29 avril 1996 concernant l'interdiction d'utilisation de certaines substances à effet hormonal ou thyroïdienne et des substances β -agonistes dans les spéculations animales, parmi lesquelles on compte les substances à effet œstrogène (autres que l'œstradiol et ses dérivés estérifiés), androgène ou gestagène.

3. Les progestatifs naturels et de synthèse dans l'environnement

3.1. Source des progestatifs naturels et de synthèse dans l'environnement

Les sources principales des progestatifs naturels et de synthèse ainsi que leurs métabolites dans l'environnement aquatique sont les eaux de ruissellement des fermes d'élevage et les effluents de stations d'épuration (STEPs) urbains, hospitaliers ou industriels du fait de l'importante consommation des progestatifs en tant que substances pharmaceutiques et de l'absence de traitement adapté pour gérer ces molécules. Par exemple, Une activité progestative due à P4 et au LNG a été mise en évidence dans un effluent d'industrie pharmaceutique en France (Creusot et al., 2014). Les effluents de STEP s au niveau des papeteries sont une source importante de progestérone dans l'environnement. En effet, lors du processus de fabrication de pâte à papier, des phyto-stéroïdes comme le β -sitosterol, le campesterol et le stigmasterol sont relargués dans les effluents et transformés par des bactéries en différents métabolites, dont la progestérone (Jenkins, Wilson, Angus, Howell, & Kirk, 2003). La Chine, de par sa population très élevée et l'importance de ses élevages est une source majeure de stéroïdes dans l'environnement aquatique à raison de près de 3000 tonnes par an (Q. Q. Zhang, Zhao, Ying, Liu, & Pan, 2014). Des progestatifs ont également été détectés dans des fermes d'aquaculture chinoises, *i.e.* la progestérone (P4), le norgestrel (NGL) et l'acétate de medroxyprogestérone (MPA) (S. Liu et al., 2015).

3.2. Occurrence environnementale des progestatifs

L'occurrence environnementale des progestatifs est mal renseignée. Pour certains d'entre eux, des concentrations environnementales prédites dans les influents de STEP s français ont été calculées à partir de leur consommation en France en 2004 et des facteurs de bioconcentration (Besse & Garric, 2009) (tableau 4 p. 42). Afin de détecter et quantifier la présence des progestatifs dans l'environnement aquatique, des méthodes d'analyses de traces utilisant par exemple la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

tandem LC-MS/MS (Al-Odaini, Zakaria, Yaziz, & Surif, 2010; Chang et al., 2009, 2011; Chang, Wu, Hu, Asami, & Kunikane, 2008; Fayad, Prévost, & Sauvé, 2013; Fick et al., 2010; Kuster et al., 2008; Labadie & Budzinski, 2005; S. Liu et al., 2011; Ze-hua Liu, Ogejo, Pruden, & Knowlton, 2011; Vulliet & Cren-olivé, 2011) sont combinées à des approches de type Effect Directed Analysis (EDA) utilisant des bioessais *in vitro* basés sur des cellules humaines ou des levures (P. A. Bain, Williams, & Kumar, 2014; Bluthgen, Sumpster, Odermatt, & Fent, 2013; Chatterjee, Kumar, Majumder, & Roy, 2008; Creusot et al., 2014; K Fent, 2001; W. G. Schoonen et al., 2000; W. G. E. J. Schoonen, de Ries, Joosten, Mathijssen-Mommers, & Kloosterboer, 1998; Van der Linden et al., 2008) mais aussi des bioessais *in vivo* comme des larves poissons zèbres (König et al., 2017; K. Zhang et al., 2017).

Certains progestatifs ont été recherchés dans plusieurs pays au niveau des influents et des effluents de STEPs, des eaux de surface, des eaux souterraines, des eaux de ruissellement des fermes d'élevages et des lagunes ainsi que dans les sédiments. Le tableau 4 page 42 présente les différentes concentrations mesurées de progestatifs.

3.2.1. *Influents et effluents de STEPs, eaux de surface et eaux souterraines*

Dans les influents et effluents de STEPs, les eaux de surface et les eaux souterraines, les concentrations de progestérone (P4) et des progestatifs de synthèse recherchés sont de l'ordre du ng/L et peuvent atteindre plus de 200 ng/L (hors élevages). Une étude rapporte la présence de P4 dans des effluents de STEPs hospitaliers et urbains à des concentrations allant jusqu'à 33 ng/L (Pauwels, Noppe, De Brabander, & Verstraete, 2008). Dans les rivières chinoises, la P4 a été détectée entre moins d'1 ng/L (Chang et al., 2008) et 38 ng/L (Chang et al., 2009) selon le site de prélèvement. Les fourchettes de concentrations de progestatifs mesurées dans ces compartiments sont présentées dans la figure 7 page suivante.

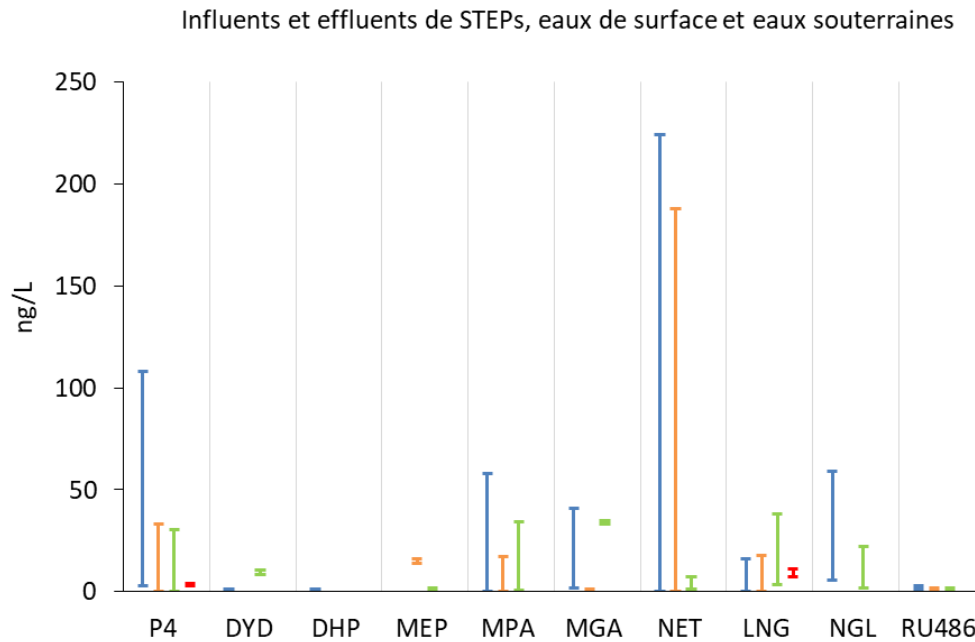


Figure 7 : Concentrations des progestatifs dans l'environnement dans les différents compartiments. Bleu : influents de STEP ; orange : effluents de STEP ; vert : eaux de surface ; rouge : eaux souterraines (Besse & Garric, 2009; Karl Fent, 2015; Kumar et al., 2015; Runnalls et al., 2010).

P4, le levonorgestrel (LNG) et la norethistérone (NET) ont été mesurés dans les eaux de surface et les eaux souterraines à des concentrations de l'ordre du ng/L (Vulliet & Crenolivé, 2011; Vulliet, Wiest, Baudot, & Grenier-Loustalot, 2008) et détectés dans les effluents de STEP et les sédiments de rivière (López de Alda, Gil, Paz, & Barceló, 2002; Petrovic, Solé, López De Alda, & Barceló, 2002). NET et LNG ont été mesurés dans les effluents de STEP à des concentrations allant jusqu'à 50 ng/L (Fernandez et al., 2007; Kuch & Ballschmiter, 2001; Vulliet et al., 2007, 2008). P4, la médroxyprogestérone (MEP) et la mifépristone (RU486) ont été détectés dans des effluents de STEP hospitaliers, (Ammann, Macikova, Groh, Schirmer, & Suter, 2014). En Malaisie, NET a été quantifiée à 188 ng/L dans les effluents et LNG a été quantifié à 38 ng/L dans les eaux de rivière (Al-Odaini et al., 2010). D'importantes concentrations de P4 (199 ng/L) et NET (872 ng/L) ont été rapportées dans des rivières aux États-Unis, mais les résultats ne semblent pas représentatifs de la contamination effective de ces milieux (Kolpin et al., 2002). MEP a été détectée dans des effluents de STEP et des eaux de surface à 15 ng/L et 1 ng/L respectivement et l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) a été détecté dans les effluents à des concentrations allant de 1 à 15 ng/L et dans les milieux humides entre 0,4 et 0,7 ng/L (Kolodziej, Harter, & Sedlak, 2004). Dans des influents de STEP en Chine, P4, l'acétate de mélangestrol, MPA, la dydrogestérone (DYD) et le norgestrel (NGL) ont été détectés entre 2,4 et 35 ng/L avec des concentrations

plus faibles au niveau des effluents (0,9 à 2,9 ng/L) (S.-S. Liu et al., 2014). En aval de ces sites, les progestatifs étaient toujours présents avec 2,5 ng/L de P4 et 9,6 ng/L de DYD (S.-S. Liu et al., 2014).

Dans les effluents et les eaux de surface en Chine, les progestatifs P4, ses métabolites 17 α -hydroxyprogestérone, 21 α -hydroxyprogestérone et methyl-hydroxyprogestérone, la DHP, l'acétate de megestrol (MGA) et le MPA ont été quantifiés à des concentrations de l'ordre du ng/L et allant jusqu'à 50 ng/L (Chang et al., 2008). Le MPA, MGA, la NET et le NGL ont également été détectés dans les rivières chinoises au niveau d'autres sites de prélèvements entre 5,4 et 9,5 ng/L (Chang et al., 2009). Une étude plus récente sur des échantillons d'influent et d'effluent de STEPs à Pékin en Chine met en évidence la présence de P4 (66 ng/L dans les influents) et de trois progestatifs synthétiques MGA, NET et MPA entre 6 et 41 ng/L dans les influents (Chang et al., 2011).

D'une manière générale, les concentrations mesurées sont assez proches entre les influents et les effluents de STEPs et les eaux de surface, malgré la dégradation des progestatifs à laquelle on s'attend au niveau des STEPs.

À l'exception de P4 pour laquelle les concentrations mesurées dans les influents de STEPs sont relativement basses par rapport à ce qui a été prédit (entre 2 et 108 ng/L selon le site) les concentrations mesurées sont assez proches des concentrations prédites par (Besse & Garric, 2009), montrant la pertinence de prédire les concentrations de ces molécules dans l'environnement afin d'évaluer le risque.

3.2.2. Occurrence au niveau des fermes d'élevage

Du fait de l'utilisation importante de certains progestatifs dans l'élevage, une grande quantité se retrouvent dans les eaux de ruissellement et les lagunes des fermes d'élevage. Les concentrations mesurées dans ces compartiment est largement supérieure à celle mesurée au niveau des STEPs et dans les eaux de surface et tout particulièrement en Chine (Q. Q. Zhang et al., 2014). Ainsi, on trouve des niveaux de P4 pouvant atteindre près de 20 000 ng/L dans les élevages de vaches laitières et de porcs dans lesquels on trouve également la médroxyprogestérone (MEP), l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) et le norgestrel (NGL) (S.-S. Liu et al., 2014, 2015; S. Liu, Ying, Zhang, et al., 2012; S. Liu, Ying, Zhou, et al., 2012). D'autres progestatifs ont été détectés dans des élevages de porcs, comme l'acétate de cyprotérone (CPA) à 127 ng/L, la dydrogestérone (DYD) à 2188 ng/L, le megestrol à 397

ng/L, la norethistérone (NET) à 143 ng/L et l'acétate de norethistérone (NEA) à 2134 ng/L (S.-S. Liu et al., 2014). De façon intéressante, des métabolites de la P4 ont été quantifiés comme 17 α -hydroxyprogestérone (217 ng/L), l'acétate de 17 α -hydroxyprogestérone (137 ng/L) et le caproate d'hydroxyprogestérone (51 ng/L) (S.-S. Liu et al., 2014). Les progestatifs se retrouvent également au niveau des compartiments aquatiques proches des fermes d'élevage et contaminent les sols (S.-S. Liu et al., 2015; S. Liu, Ying, Zhang, et al., 2012). En Chine, la progestérone, le norgestrel (NGL) et l'acétate de medroxyprogestérone (MPA) ont également été détectés dans des fermes d'aquaculture, *i.e.* le (S. Liu et al., 2015). Aux États-Unis, P4 et l'acétate de mélangestrol à 115 ng/L ont été détectés dans les eaux de ruissellement de fermes d'élevage de bœufs (Bartelt-Hunt et al., 2012) et les niveaux de P4 sont également élevés dans les eaux de ruissellement et les lagunes d'élevages de porcs (Yost et al., 2014).

Le tableau 4 page suivante résume la consommation des progestatifs en France en 2004 et au Royaume-Uni en 2006, les concentrations prédites dans les influents de STEPs, et les concentrations mesurées dans différents compartiments, *i.e.* les influents et effluents de STEPs, les eaux de surface, les eaux souterraines, les eaux de ruissellement des fermes d'élevage et les lagunes et enfin les concentrations de progestatifs au niveau des sédiments.

Tableau 4 : Consommation, concentrations prédites et occurrence environnementale de progestatifs dans différents compartiments. nd : non détecté. D'après (Besse & Garric, 2009; Karl Fent, 2015; Kumar et al., 2015).

Composé	Consommation en 2004 en France et en 2006 au Royaume-Uni (kg)	Concentration prédite dans les influents de STEPs (ng/L)	Influents de STEPs (ng/L)	Effluents de STEPs (ng/L)	Eaux de surface (ng/L)	Eaux souterraines (ng/L)	Fermes d'élevages, lagunes (ng/L)	Sédiments (ng/g)
P4	140-9800	2252	2-108	0,3-33	0,06-30,5	1,6-4,1	<7-19	462
DYD	200-740	170	35	nd	9,6		2188	
DHP			4,9					
MEP	70-530	16	nd	15	1		11-91	
MPA			0,2-58	0,03-17	0,9-34		14-452	
MGA			1,9-41	0,7-1	34			
CMA	380	88	nd	nd	nd			
CPA	820	187	nd	nd	nd		127	
R5020	13	3						
NGA	310	71						
EDA	14							
LYN	NET+NEA+LYN: 100	NET+NEA+LYN : 32						
NEA	NET+NEA+LYN: 100	NET+NEA+LYN : 32					2134	
NET	NET+NEA+LYN: 100/ NET: 440	NET+NEA+LYN : 32	<0,2-224	<0,2-188	1-7,5	1,9	<1,1-143	nd-1,08
TIB	50	12						
DSG	DSG+ENG : 30/ DSG : 14	DSG+ENG : 7						
ENG	DSG+ENG : 30/ NGL+ENG+GES+autres : 13	DSG+ENG : 7						
GES	GES : 20/ NGL+ENG+GES+autres : 13	5	nd	nd	nd			
LNG	LNG+NTE : 95/ LNG: 20	LNG+NTE : 22	<0,2-16	<0,2-17,9	3,6-38	7,4-11		nd-6,82
NTE	LNG+NTE : 95/ NTE: 24	LNG+NTE : 22						
NGL	NGL :12/ NGL+ENG+GES+autres : 13	3	5,5-59		1,6-22,2		19,6-10	800
DRO	150	34	nd	nd	nd			
RU486	19		nd	nd	nd			

3.3. Devenir des progestatifs naturels et de synthèse dans l'environnement

Les données concernant la métabolisation des progestatifs sont peu nombreuses. La métabolisation se fait principalement dans le foie des mammifères et des poissons où ils sont soumis à des processus de réduction et d'hydroxylation. On considère que la majorité des progestatifs naturels et de synthèse subissent d'abord une réduction, en général au niveau de la double liaison au niveau de C(4) puis sur la fonction cétone de C(3). Ces modifications produisent des métabolites qui peuvent être biologiquement actifs avec des effets différents des molécules parents (tableau 5 page suivante).

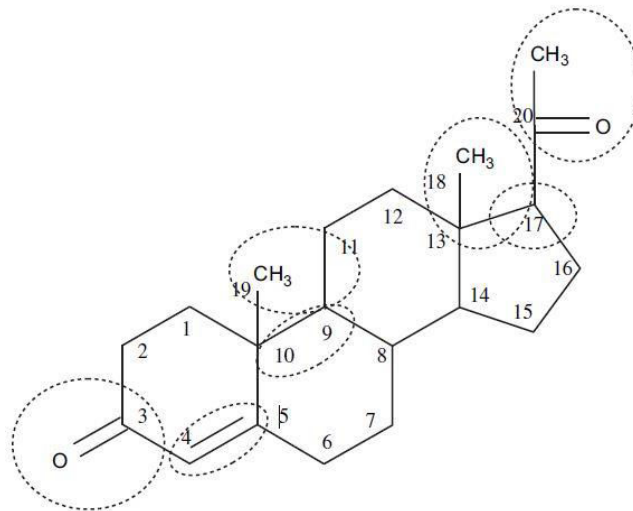


Figure 8 : Structure de la progestérone et points-clés de changements d'activité (Besse & Garric, 2009).

Les progestatifs parents et leurs métabolites peuvent ensuite être gluco-conjugués ou sulfo-conjugués avant d'être excrétés. La figure 8 présente la structure de la progestérone et les points-clés au niveau desquels un changement de structure induira un changement d'activité (Besse & Garric, 2009). Ces données s'appuient sur des données observées chez les mammifères.

Tableau 5 : Relations entre structure et activité des progestatifs sur des modèles mammifères (Besse & Garric, 2009).

Changements dans la structure	Changements d'activité
Cétone C3 et double liaison $\Delta 4$	Essentiel pour la liaison au récepteur de la P4
Réduction cétone C(3) puis C(20)	Réduction puis abolition de l'activité progestative
Réduction de la double liaison $\Delta 4$	Réduction ou abolition de l'activité progestative
Réduction cétone C(3)	Pas de modification de l'activité progestative
Suppression du groupe méthyle sur C(10) β	Reporte la métabolisation
Conversion du groupe méthyle sur C(10) β en C(10) α	Reporte la métabolisation
Hydroxylation 17 α	Augmente la métabolisation
Esterification 17 α -OH	Reporte la métabolisation
Remplacement du groupe méthyle sur C(13) par un groupe éthyle	Reporte la métabolisation
Addition d'un radical ethinyl sur C(17)	Réduit l'androgénicité et augmente l'effet progestatif
Suppression du groupe méthyle en C(10)	Réduit l'androgénicité et augmente l'effet progestatif
Insaturation de $\Delta 4$, $\Delta 9$ et $\Delta 11$ dans un 19-norstéroïde	Augmente l'affinité pour le récepteur des androgènes
Cétone C3 et double liaison $\Delta 4$ dans un dérivé de la 19-nortestostérone	Activité anti-aromatase de P4 (activité anti-androgénique)
Réduction cétone C(3) dans un dérivé de la 19-nortestostérone	Apparence d'activité œstrogénique
Réduction cétone C(3) et double liaison $\Delta 4$ dans un dérivé de la 19-nortestostérone	Changement d'activité progestative par une activité œstrogénique
Hydroxylation 17 β d'un dérivé de la 19-nortestostérone	Nécessaire pour exercer une activité œstrogénique

Le tableau 6 page suivante présente les métabolites de quelques progestatifs et leurs activités pharmacologiques rapportées sur des modèles mammifères d'après (Besse & Garric, 2009; Chang et al., 2008; Garcia-Becerra et al., 2002; Larrea et al., 2001; S.-S. Liu et al., 2014; Rozenbaum, 2001; Schindler et al., 2003; Sitruk-Ware, 2005; Stanczyk & Roy, 1990).

Tableau 6 : Métabolites de quelques progestatifs et leurs activités pharmacologiques rapportées sur des modèles mammifères, d'après (Besse & Garric, 2009). Les métabolites majeurs sont en gras et les métabolites actifs sur les mammifères sont soulignés.

Progestatif parent	Métabolite(s)	Activité
Progesterone	5b-Pregnane-3a,20adiol-3-glucuronide 17 α -hydroxyprogestérone 21 α -hydroxyprogestérone Methyl-hydroxyprogestérone Acétate de 17 α -hydroxyprogestérone Caproate d'hydroxyprogestérone	Pas d'activité rapportée
Dydrogesterone	<u>Dihydrodydrogesterone (DHD)</u> <u>C21-OH-dydrogesterone</u> <u>C13α-OH-dydrogesterone</u>	Progestative Potentiellement progestative Potentiellement progestative
Chlormadinone acetate	<u>3β-Hydroxy-chlormadinone acetate</u>	Anti-androgénique
Cyproterone acetate	<u>15β-Hydroxycyproterone acetate</u>	Anti-androgénique
Norethisterone	3α,5β-Tetrahydronorethisterone sulfate et glucuronide <u>5α-Dihydronorethisterone</u> <u>3α,5β-Tetrahydronorethisterone</u> <u>3α,5α-Tetrahydronorethisterone</u> <u>3β,5α-Tetrahydronorethisterone</u>	Œstrogénique/progestative Potentiellement œstrogénique Œstrogénique Œstrogénique
Tibolone	<u>Δ4-Tibolone</u> <u>3α-Hydroxytibolone</u> <u>3β-Hydroxytibolone</u>	Progestative Œstrogénique Œstrogénique
Levonorgestrel	3α,5β-Tetrahydrolevonorgestrel glucuronide <u>3α,5β-Tetrahydrolevonorgestrel</u> <u>3β,5α-Tetrahydrolevonorgestrel</u> <u>5α-Dihydrolevonorgestrel</u>	Potentiellement œstrogénique Œstrogénique Œstrogénique/progestative
Desogestrel/Etonogestrel	C13-hydroxyetonogestrel glucuronide C15α-hydroxyetonogestrel glucuronide 3α,5α-Tetrahydroetonogestrel sulfate 3β,5α-Tetrahydroetonogestrel (libre et glucuronide)	
Gestodene	<u>5α-Dihydrogestodene</u> <u>3α,5α-Tetrahydrogestodene</u> <u>3β,5α-Tetrahydrogestodene</u>	Œstrogénique/progestative Œstrogénique Œstrogénique
Drospirenone	Métabolite acide de drospirénone 4,5-Dihydrodrospirenone sulfate	

Le devenir des progestatifs dans l'environnement est mal renseigné. Les métabolites peuvent être de nouveau transformés en leurs composés parents au niveau des STEP's et les métabolites gluco-conjugués peuvent être déconjugués au niveau des STEP's (figure 9).

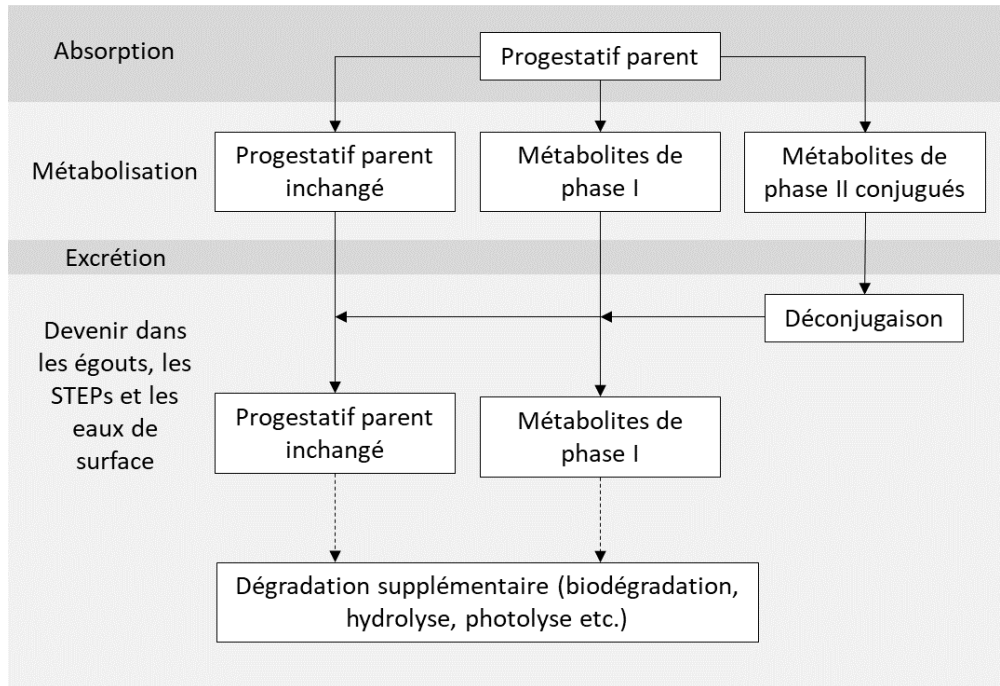


Figure 9 : Devenir des progestatifs absorbés, métabolisés puis excrétés dans l'environnement aquatique, d'après (Besse & Garric, 2009).

Les études du devenir des progestatifs dans l'environnement portent surtout sur la progestérone. Il a été montré que la P4 se dégrade assez rapidement au niveau des STEP's et dans les eaux de surface (Chang et al., 2011; Esperanza et al., 2007; Labadie & Budzinski, 2005). Les progestatifs de synthèse étant conçus pour être plus résistants que P4 avec une demi-vie plus grande, il est possible que leur dégradation soit plus lente. Les progestatifs sont des contaminants dits pseudo-persistants (Daughton, 2003) car ils sont introduits dans l'environnement de façon continue via les STEP's, ce qui pourrait contrebalancer une dégradation rapide. Les progestatifs sont considérés comme étant dissous dans les eaux de surface, et non pas adsorbés sur des particules (Karl Fent, 2015; S.-S. Liu et al., 2015). En revanche dans les eaux de ruissellement, P4 est plus souvent associée à des particules que dissoute (S. Liu, Ying, Zhang, et al., 2012; Yang et al., 2012). Pour P4, les concentrations trouvées dans les sédiments sont plus importantes que dans l'eau (Jenkins et al., 2003; López de Alda et al., 2002; Q. Q. Zhang et al., 2014). Combiné aux constantes de dissociation (K_d) des progestatifs, ceci suggère que les progestatifs en général tendent à s'accumuler dans les sédiments. Une faible proportion de progestatifs se retrouve dans les sols (S. Liu, Ying, Zhang, et al., 2012; Q. Q. Zhang et al., 2014), où la dégradation est lente et où il a été montré

que les bactéries présentes pouvaient transformer la P4 en androstenedione, un androgène (Jenkins et al., 2004).

L'œstrogène de synthèse EE2 est connu pour avoir une résistance bactérienne importante et cette résistance est possiblement due à la présence d'un groupe éthynylé au niveau de C(17). Les progestatifs norethistérone (NET), levonorgestrel (LNG), tibolone (TIB) et norgestimate (NTE) possédant également cette fonction sur C(17), il est possible qu'elles soient plus résistantes que P4 (Besse & Garric, 2009).

3.4. Bioconcentration

Les progestatifs sont hydrophobes et leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{ows}) sont compris entre 3 et 5,4 (Kumar et al., 2015) ce qui fait que ces composés tendent à se bioconcentrer dans les organismes aquatiques. La bioconcentration a été montrée chez la truite arc-en-ciel et le gardon exposés au levonorgestrel (LNG) avec des facteurs de bioconcentration (BCFs) allant de 17 jusqu'à 46 selon l'organe ou le compartiment considéré (Fick et al., 2010; Kroupova et al., 2014). Cela a également été montré chez la carpe exposée à la norethistérone (NET) ou à l'acétate de medroxyprogestérone (MPA) avec des BCFs entre 4,3 et 38 (Gomez, Constantine, & Huggett, 2010; Nallani et al., 2012; Steele et al., 2013). Les BCFs tissus-spécifiques de la NET dans le vairon à tête de boule et la barbue de rivière sont compris entre 2,6 et 41 (Nallani et al., 2012). Dans l'ensemble, les BCFs sont plus élevés dans les reins et le foie. Les BCFs chez les poissons sont relativement bas, probablement en raison de la métabolisation des progestatifs parents. Ils sont en revanche plus élevés chez les bivalves avec notamment le levonorgestrel (LNG) ayant des BCFs entre 30 et 208 dans la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Contardo-Jara et al., 2011) ce qui pourrait suggérer une bioaccumulation chez ses prédateurs.

4. Effets biologiques des progestatifs naturels et de synthèse sur les organismes aquatiques

Plusieurs études *in vitro* sur des cellules exprimant différents récepteurs nucléaires stéroïdiens humains et autres mammifères ou sur des levures rapportent des activités progestatives, œstrogéniques, androgéniques et glucocorticoïdes de certains progestatifs (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Runnalls et al., 2013). Au-delà des effets sur les PR, les progestatifs naturels et de synthèse et leurs métabolites peuvent donc agir sur d'autres récepteurs stéroïdiens et exercer des effets biologiques variables. Les effets multiples de ces

composés sur les récepteurs stéroïdiens attestent de la complexité de leurs modes d'action. Un exemple représentatif de cette complexité d'action est la tibolone qui, chez l'humain, peut subir des transformations métaboliques tissu-dépendantes et avoir des effets œstrogéniques dans le cerveau, les os et les tissus vaginaux, des effets progestatifs dans l'utérus et des effets androgéniques dans le cerveau et le foie (Formoso et al., 2012). Un autre exemple est la mifepristone qui a un mécanisme d'action mal connu et a un rôle antagoniste mixte (ou agoniste-antagoniste) du PR selon le type cellulaire considéré (Zheng Liu et al., 2002). Cette multiplicité d'action retrouvée chez les mammifères est très peu documentée chez les poissons.

Quelques progestatifs ont été testés *in vitro* sur des modèles cellulaires humains exprimant des récepteurs poissons, par exemple des cellules COS-7 transfectées avec le nPR du vairon (Ellestad et al., 2014) et les cellules U2OS exprimant le nPR de *Melanotaenia fluviatilis* (P. a. Bain, Kumar, Ogino, & Iguchi, 2015). Sur ces modèles, le criblage de la progestérone (P4), de l'étonogestrel (ENG), du gestodène (GES), du levonorgestrel (LNG), de la norethistérone (NET), de la drospirénone (DRO), de la DHP et de 20 β -S a révélé que la majorité des progestatifs ne sont pas actifs sur les récepteurs poissons alors qu'ils activent le récepteur nPR humain.

Certains progestatifs ont été testés en laboratoire sur différentes espèces aquatiques à des concentrations environnementales et ont induit des effets PE. Chez les amphibiens, notamment le xénope (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*), le LNG a des effets androgéniques en cela qu'il peut altérer le développement des testicules et des ovaires et perturber le comportement sexuel des mâles et a également des effets perturbateurs du système thyroïdien impliqué dans la métamorphose (Hoffmann & Kloas, 2012; Lorenz et al., 2011; Safholm, Ribbenstedt, Fick, & Berg, 2014; Ziková et al., 2017).

Chez les poissons, les effets des progestatifs ont été étudiés sur différentes espèces qui sont le poisson zèbre (*Danio rerio*), le vairon (*Pimephales promelas*), le gambusie (*Gambusia holbrooki* et *Gambusia affinis*), l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), le gardon (*Rutilus rutilus*), et le medaka (*Oryzias latipes*). Ces effets sont résumés dans le tableau 7 (p.52-53). Les travaux ont principalement porté sur les effets des progestatifs sur la reproduction et certaines études rapportent les effets sur les embryons au niveau transcriptomique. Parmi les effets induits par les progestatifs testés, on observe une masculinisation des poissons, une réduction de la fécondité et une altération de l'histologie des gonades et des niveaux

d'hormones stéroïdiennes comme l'estradiol (E2), la testostérone ou la 11-ketotestostérone (11-KT). Les transcrits dont l'expression est modifiée par les progestatifs sont des transcrits de gènes de la stéroïdogénèse (des cytochromes et des hydroxystéroïdes déshydrogénases), le gène codant pour la vitellogénine dans le foie, des gènes codants pour différents récepteurs nucléaires stéroïdiens et des gènes impliqués dans la régulation du rythme circadien.

La progestérone (P4) peut altérer l'expression de nombreux transcrits du poisson zèbre embryo-larvaire mais les effets dépendent beaucoup du stade de développement, des fenêtres d'expositions et des concentrations utilisées (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Y.-Q. Liang et al., 2014; Y.-Q. Liang, Huang, Ying, et al., 2015b; Zucchi et al., 2012). L'expression de plusieurs transcrit est également altérée chez le poisson zèbre adulte (Zucchi et al., 2013). Chez cette espèce, la progestérone induit une puberté précoce des mâles et augmente les transcrits de *fshb* dans l'hypophyse (Svensson, 2016). L'exposition de poissons zèbres à la progestérone donne des populations avec une proportion de femelles plus importante et une augmentation de plusieurs transcrits de gènes de la stéroïdogénèse (Y.-Q. Liang, Huang, Liu, et al., 2015). La P4 diminue également les transcrits de *vtg* dans le foie des poissons zèbres femelles, l'expression du nPR dans l'ovaire et l'indice gonado-somatique (GSI) mais augmente la production d'œufs (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Bluthgen, Sumpter, et al., 2013). Chez le vairon femelle (*Pimephales promelas*), la P4 réduit le nombre d'œufs pondus, augmente le GSI et altère l'expression de la vitellogénine dans le foie (DeQuattro et al., 2012). Chez les mâles, la motilité des spermatozoïdes est diminuée (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Bluthgen, Sumpter, et al., 2013). La P4 a également été testée sur les mâles *Gambusia affinis* chez qui elle diminue la transcription de ER α , ER β et AR β dans le testicule (Huang et al., 2013).

Certains travaux ont mis en évidence des effets androgéniques du levonorgestrel (LNG) sur l'épinoche femelle à des concentrations supérieures à 40 ng/L avec une augmentation de la spigine et une baisse de vitellogénine, tandis qu'il interrompt le cycle de reproduction saisonnier chez le mâle (Svensson et al., 2013; Svensson, Fick, Brandt, & Brunström, 2014). Chez le vairon, LNG a également un impact négatif sur la reproduction avec une baisse de la production des œufs (Runnalls et al., 2013; Zeilinger et al., 2009) et chez les larves il altère l'expression de plusieurs transcrits de gènes de la stéroïdogénèse et affecte la croissance et la survie (Matthew D. Overturf et al., 2014). Des effets androgéniques du LNG ont également été mis en évidence sur le gambusie (Brockmeier, Scott, Denslow, & Leusch, 2016; Frankel, Meyer, & Orlando, 2016) et le gardon (Kroupova et al., 2014).

D'autres travaux menés sur le vairon ont montré que la norethistérone (NET) peut avoir des effets androgéniques à faibles concentrations (1-10 ng/L) et anti-androgéniques à des concentrations plus fortes (100 ng/L) (Paulos et al., 2010). La fécondité des femelles vairons a également été affectée par la drospirénone (DRO) (Runnalls et al., 2013; Zeilinger et al., 2009), le desogestrel (DSG) et le gestodène (GES) (Frankel, Meyer, Kolpin, et al., 2016; Paulos et al., 2010; Runnalls et al., 2013). Les poissons zèbres femelles exposées à DRO, à l'acétate de mégestrol (MGA) et à la dydrogestérone (DYD) ont également présenté des altération de la fonction de reproduction (Han et al., 2014).

Les effets de l'antagoniste du PR mifepristone (RU486) ont été peu étudiés. La mifepristone induit la production des œufs chez des femelles poissons zèbres avec une courbe en U, augmente le nombre d'ovocytes matures dans les ovaires et altère l'histologie des ovaires (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013). Ces effets sont accompagnés d'une baisse des transcrits des récepteurs des androgènes, de la progestérone et des glucocorticoïdes ainsi que certains cytochromes et hydroxystéroïdes déshydrogénases (Bluthgen, Sumpter, et al., 2013). Ces altérations transcriptionnelles s'observent également chez les embryons de poissons zèbres (Bluthgen, Sumpter, et al., 2013; Zucchi et al., 2012).

Certaines études ont investigué les effets de mélanges chez le poisson zèbre, notamment P4 et DRO chez l'adulte (Zucchi et al., 2014) et DYD et l'acétate de medroxyprogestérone (MPA) chez l'éléuthéro-embryon et l'adulte (Zhao, Castiglioni, & Fent, 2015b) et ces mélanges ont des effets additifs pour certains paramètres. Chez les éléuthéro-embryons de poissons zèbres, l'acétate de cyprotérone (CPA), l'acétate de chlormadinone (CMA) et leurs mélanges ont été testés et ont altéré plusieurs transcrits (Siegenthaler, Bain, Riva, & Fent, 2017).

Les études portant sur les poissons en développement ne concernent que les effets des progestatifs sur la transcription de gènes (Y.-Q. Liang et al., 2014; Matthew D. Overturf et al., 2014; Siegenthaler et al., 2017; Svensson, 2016; Zucchi et al., 2012) à l'exception de (Brion et al., 2012) qui mettent en évidence de façon tissu-spécifique des effets œstrogéniques du LNG et de la NET dans le cerveau.

Tableau 7 : Résumé des effets des progestatifs sur différentes espèces poissons. D'après Kumar *et al.* 2015 et Fent 2015. LOEC : concentration la plus faible à laquelle l'effet est observé ; pgr : récepteur de la P4 ; ar : récepteur des androgènes ; gr : récepteur des glucocorticoïdes ; mr : récepteur des minéralocorticoïdes ; esr : récepteur des œstrogènes ; vtg : vitellogénine ; nis : symport Na/I ; nr1d1 : récepteur nucléaire 1, groupe D, membre 1 (impliqué dans le cycle circadien) ; lhb : hormone lutéinisante (sous-unité B) ; fshb : hormone folliculo-stimulante (sous-unité B) ; gnrh : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires ; star : *Steroidogenic Acute Regulatory protein* ; cyp : cytochrome ; hsd : hydroxystéroïde déshydrogénase ; pomc : pro-opiomélanocortine ; crh : corticolibérine ; figa : protéine phosphatase ; amh : hormone anti-müllérienne ; ccnb1 : cycline B1 ; zp3 : glyco-protéine de la zone pellucide 3 ; arnt2 : translocateur nucléaire du récepteur d'aryl-hydrocarbone ; GSI : indice gonado-somatique ; CF : *condition factor* ; aqp8 : aquaporine 8 ; p38mapk : MAP kinase p38 ; KEH : *Kidney Epithelium Height* ; NSI : indice néphrosomatique.

Espèce	Progestatif	Sexe et stade	Effets	LOEC (ng/L)	Références
Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	P4	Embryons	↑ <i>pgr</i> , ↑ <i>ar</i> , ↑ <i>gr</i> , ↑ <i>mr</i> , ↑ <i>vtg</i> , ↑ <i>nis</i> , ↑ <i>lhb</i> , ↑ <i>cyp11a1</i> , ↑ <i>cyp19a1a</i> , ↑ <i>cyp19a1b</i> , ↑ <i>cyp11b</i> , ↑ <i>hsd3b</i> , ↑↓ <i>gnrh2</i> , ↑↓ <i>gnrh3</i> , ↑↓ <i>fshb</i> , ↑↓ <i>pomc</i> , ↑↓ <i>hsd17b3</i> , ↓ <i>crh</i> , ↓ <i>hsd11b2</i>	2-254	(Zucchi <i>et al.</i> , 2012) (Y.-Q. Liang, Huang, Ying, <i>et al.</i> , 2015b) (Bluthgen, Castiglioni, <i>et al.</i> , 2013) (Y.-Q. Liang <i>et al.</i> , 2014)
		Juveniles	Puberté précoce des mâles, ↑ <i>fshb</i> dans l'hypophyse ↑ proportion de femelles, ↑ <i>figa</i> , ↓ <i>cyp17</i> , ↓ <i>cyp19a1a</i> , ↓ <i>hsd3b</i> , ↓ <i>amh</i>	77 63	(Svensson, 2016) (Y.-Q. Liang, Huang, Liu, <i>et al.</i> , 2015)
		Femelles	↓ <i>ccnb1</i> , ↓ <i>zp3</i> ↑ <i>arnt2</i> , ↑ <i>gr</i> et ↓ <i>ar</i> dans le cerveau, ↓ <i>nr1d1</i> et ↓ <i>pgr</i> dans l'ovaire, ↓ <i>cyp11b</i> , ↓ <i>hsd17b3</i> ↓ <i>vtg</i> dans le foie, ↑ production œufs, ↓ GSI	3,5-306	(Bluthgen, Castiglioni, <i>et al.</i> , 2013; Bluthgen, Sumpter, <i>et al.</i> , 2013) (Zucchi <i>et al.</i> , 2013)
	RU486	Embryons	↓ <i>ar</i> , ↓ <i>pgr</i> , ↓ <i>gr</i> , ↓ <i>cyp</i> , ↓ <i>hsd</i>	2-3	(Bluthgen, Castiglioni, <i>et al.</i> , 2013; Bluthgen, Sumpter, <i>et al.</i> , 2013) (Zucchi <i>et al.</i> , 2012)
		Mâles et femelles	↑ production œufs (courbe en U), ↑ ovocytes matures dans les ovaires, altération de l'histologie des ovaires, ↓ <i>ar</i> , ↓ <i>pgr</i> , ↓ <i>gr</i> , ↓ <i>cyp</i> , ↓ <i>hsd</i>	5-39	(Bluthgen, Castiglioni, <i>et al.</i> , 2013; Bluthgen, Sumpter, <i>et al.</i> , 2013) (Zucchi <i>et al.</i> , 2012)
	LNG	Embryons	↓ <i>ar</i> , ↑ <i>pgr</i> ↑ aromatasase B dans le cerveau	2 100	(Zucchi <i>et al.</i> , 2012) (Brion <i>et al.</i> , 2012)
		Juveniles	Puberté précoce des mâles, ↑ proportion de mâles, ↑ <i>fshb</i> et ↑ <i>lhb</i> dans l'hypophyse	5,5	(Svensson, 2016)
	NET	Embryons	↑ <i>esr1</i> et ↑ <i>mr</i> ↑ aromatasase B dans le cerveau	2 100	(Zucchi <i>et al.</i> , 2012) (Brion <i>et al.</i> , 2012)
			Transcrits	2	(Zucchi <i>et al.</i> , 2012)
	DRO	Femelles	↓ proportion d'ovocytes tardifs-VTG, ↓ <i>vtg</i> dans le foie, ↓ <i>nr1d1</i> dans le cerveau	55	(Zucchi <i>et al.</i> , 2014)
	MGA	Mâles et femelles	Baisse de la fécondité, niveaux de stéroïdes	33-666	(Han <i>et al.</i> , 2014)
	NGL	Embryons	↑ <i>nis</i> , ↑ <i>vtg1</i> , ↑ <i>ar</i> , ↑ <i>pomc</i> , ↑ <i>mr</i> , ↑ <i>gr</i> , ↑ <i>lhb</i> , ↑ <i>cyp17</i> , ↑ <i>star</i> , ↑ <i>gnrh2</i> , ↑ <i>gnrh3</i> , ↑↓ de plusieurs <i>cyp</i> et <i>hsd</i> , ↑↓ <i>fshb</i> , ↓ <i>pgr</i> , ↓ <i>esr1</i> , ↓ <i>crh</i>	5-34	(Y. Q. Liang <i>et al.</i> , 2015) (Y.-Q. Liang <i>et al.</i> , 2014) (Y. Liang <i>et al.</i> , 2017)
			Juveniles	↑ proportion de mâles, ↑ <i>figa</i> , ↑ <i>cyp17</i> , ↑ <i>cyp19a1a</i> , ↑ <i>cyp11a1</i> , ↑ <i>dmrt1</i>	34
	DYD	Embryons	Transcrits	4,8	(Zhao <i>et al.</i> , 2015b)
			Mâles, femelles	Baisse de la fécondité, histologie	89-1263
MPA	Embryons	Transcrits	4,6	(Zhao <i>et al.</i> , 2015b)	
		Mâles et femelles	Baisse de la fécondité, histologie	342	(Zhao <i>et al.</i> , 2015b)
CPA	Embryons	Transcrits	1	(Siegenthaler <i>et al.</i> , 2017)	
CMA	Embryons	Transcrits	0.6	(Siegenthaler <i>et al.</i> , 2017)	

Vairon (<i>Pimephales promelas</i>)	P4	Femelles	↓ <i>vtg</i> dans le foie, ↓ production œufs, ↓ fécondation, ↓ <i>aqp8</i> , ↑ <i>hsd20b</i> , ↑ <i>follistatine</i> , ↑ <i>p38mapk</i> et ↑ <i>zp3</i> dans l'ovaire.	10-500	(Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Bluthgen, Sumpster, et al., 2013) (DeQuattro et al., 2012)
		Mâles	↓ motilité des spermatozoïdes	300	(Murack, Parrish, & Barry, 2011)
	LNG	Femelles	↓ production des œufs, ↓ pregnénone, ↓ DHP, ↓ testostérone, ↓ 11-KT dans les ovaires	0,8-100	(Zeilinger et al., 2009) (Runnalls et al., 2013)
		Embryons	↓ <i>hsd3b</i> , ↓ <i>hsd20b</i> , ↓ <i>cyp17</i> , ↓ <i>ar</i> , ↓ <i>esra</i> , ↓ <i>fshb</i> , ↓ <i>cyp19a</i> ↓ croissance, ↓ survie, ↓ 11-KT	2-462	(Matthew D. Overturf et al., 2014)
	NET	Femelles	↓ production œufs, ↓ E2 plasmatique	1-10	(Paulos et al., 2010)
		Embryons	↓ croissance	740	(M. D. Overturf et al., 2012)
	DRO	Femelles	↓ production œufs	6500	(Zeilinger et al., 2009) (Runnalls et al., 2013)
	GES	Femelles	Développement masculinisé, ↓ production des œufs ↓ E2, ↑ 11-KT, ↑ testostérone	1-100	(Runnalls et al., 2013) (Frankel, Meyer, Kolpin, et al., 2016)
	DSG	Femelles	↓ production œufs, ↓ E2 plasmatique, ↓ testostérone et ↓ VTG, caractères sexuels secondaires	1000	(Paulos et al., 2010)
	Gambusie (<i>Gambusia affinis</i>)	P4	Mâles	↓ <i>esra</i> , ↓ <i>esrb</i> , ↓ <i>arb</i> et ↓ <i>metallothioneine</i> dans le testicule, ↓ <i>arb</i> dans le foie	1000
Gambusie (<i>Gambusia holbrooki</i>)	LNG	Mâles et femelles	Masculinisation des femelles et ↓ du comportement reproducteur	8,6-100	(Frankel, Meyer, & Orlando, 2016) (Brockmeier et al., 2016)
Épinoche (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	LNG	Femelles	↑ <i>spiggine</i> , ↓ <i>cyp1a</i> dans le rein, ↓ <i>vtg</i> dans le foie, hypertrophie rénale	40	(Svensson et al., 2013)
		Mâles	↑ KEH, ↑ NSI, inhibition de l'initiation de spermatogenèse, ↑ <i>spiggine</i> , ↓ <i>cyp1a</i> dans le rein, ↑ <i>lhb</i> dans l'hypophyse	65-750	(Svensson et al., 2014)
Gardon (<i>Rutilus rutilus</i>)	LNG	Mâles	↓ 11-KT plasmatique des mâles et ↑ spermatogonies B dans les testicules, ↓ <i>fshb</i> , ↑ <i>lhb</i> , ↑ <i>vtg</i> et ↑ <i>esr1</i>	312	(Kroupova et al., 2014)
		Femelles	↓ E2 plasmatique, ↓ 11-KT, ↑ testostérone, ↓ <i>fshb</i> , ↑ <i>lhb</i> , ↑ <i>vtg</i> et ↑ <i>esr1</i>	312	(Kroupova et al., 2014)
	NET	Femelles	↓ production œufs	25	(Paulos et al., 2010)
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	CPA	Embryons à adultes	↓ ovogenèse et ↓ spermatogenèse, ↓ poids moyen et CF chez les mâles	1000	(Kiparissis, Metcalfe, Balch, & Metcalfe, 2003)

5. Bilan de la synthèse

La progestérone et certains progestatifs de synthèse et leurs métabolites ont été détectés dans l'environnement aquatique au niveau des STEP's et des eaux de surface à des concentrations de l'ordre du ng/L. Au niveau des eaux de ruissellement des fermes d'élevage, ces concentrations sont de l'ordre du µg/L. De plus, une activité progestative d'échantillons environnementaux a été montrée sur plusieurs bioessais. Cependant, assez peu de composés progestatifs ont été recherchés et leur devenir dans l'environnement est très mal connu. Au niveau moléculaire, l'activité des progestatifs vis-à-vis des différents récepteurs nucléaires stéroïdiens est bien documentée *in vitro* pour les mammifères mais très peu pour les poissons. De plus, l'expression spatio-temporelle de ces récepteurs est peu connue chez les poissons en développement.

Les études portant sur les effets des progestatifs sur les poissons *in vivo* mettent en évidence des effets sur le développement et la reproduction même à de faibles concentrations, mais ces études concernent principalement des poissons adultes et les effets sur les organes périphériques (foie, gonades). Elles se sont principalement intéressées aux effets (anti-) androgéniques et la perturbation de gènes régulés par d'autres voies de signalisation a été peu étudiée. En particulier, l'activité tissu-spécifique est mal renseignée. Il y a un manque d'informations concernant les effets au niveau du système nerveux central (SNC), et également concernant les effets sur les poissons en développement. Le nombre d'études concernant les effets faibles doses et les effets de mélanges est clairement insuffisant. Il faut également constater que le nombre de substances testées est très limité.

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à combler certains de ces manques en étudiant les mécanismes d'action et les effets biologiques de ligands environnementaux du récepteur nucléaire de la progestérone chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Pour ce faire, nous avons établi une stratégie combinant des approches *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de cibles endocriniennes multiples en utilisant des modèles de type gène-rapporteur basés sur les mécanismes d'action des PEs (III. p.55).

III. Objectifs et Démarche expérimentale

Parmi les perturbateurs endocriniens, les œstrogènes naturels et de synthèse ont fait l'objet de nombreux travaux. Ils sont détectés et quantifiés dans l'environnement aquatique à des concentrations induisant des effets néfastes sur la reproduction de plusieurs espèces d'amphibiens et de poissons. Néanmoins, d'autres composés stéroïdiens d'origine naturelle ou synthétique utilisés en tant que substances pharmaceutiques sont présents dans l'environnement aquatique et peuvent potentiellement exercer des effets PEs sur les organismes exposés comme c'est le cas des progestatifs. Comparativement aux œstrogènes, les progestatifs ont été très peu étudiés malgré leur forte consommation en tant que produits pharmaceutiques. Récemment, certains de ces composés ont été quantifiés dans l'environnement aquatique à des concentrations pouvant altérer la reproduction. Jusqu'à maintenant, la plupart des études sur les poissons se sont focalisées sur les effets délétères des progestatifs au niveau de la reproduction et se sont notamment limitées à des organes périphériques comme le foie et les gonades. De plus, le nombre de composés étudiés est relativement faible. Cela résulte en un manque d'informations pour évaluer correctement les dangers et les risques que posent ces composés pour l'environnement.

Les objectifs de cette thèse sont d'étudier les mécanismes d'action et les effets biologiques de ligands environnementaux du nPR sur le poisson zèbre. Pour cela, la stratégie consiste à utiliser une combinaison d'outils *in vitro* et *in vivo* de type gène-rapporteur basés sur les mécanismes d'action des PEs. Les capacités de criblage de ces modèles permettront d'obtenir des informations sur les effets et les modes d'action de progestatifs vis-à-vis de cibles endocriniennes multiples (voies de signalisation médiées par différents récepteurs nucléaires et expression tissu-spécifique de gènes hormono-régulés). La combinaison de modèles *in vitro* et *in vivo* nous permettra d'appréhender les mécanismes d'action et les effets biologiques des progestatifs à l'échelle moléculaire et à l'échelle cellulaire et tissulaire sur les différentes voies de signalisation.

L'utilisation des modèles cellulaires de type gène-rapporteur nous permettra de générer une quantité importante de données à de façon sensible et spécifique d'un mode d'action donné à l'échelle moléculaire (*i.e.* transactivation de récepteurs nucléaires stéroïdiens). Afin d'acquérir des données à une échelle plus intégrative, nous utiliserons des modèles poissons zèbres transgéniques exprimant un gène rapporteur de façon tissu-spécifique sous contrôle de gènes hormono-régulés. Nous avons choisi de cibler l'espèce poisson zèbre (*Danio rerio*), une espèce aujourd'hui reconnue comme modèle biologique en toxicologie et en écotoxicologie pour les nombreux avantages qu'elle offre. Au-delà de sa simplicité d'élevage, ce modèle a

l'avantage d'avoir un génome séquencé ce qui facilite la transgénèse. De plus, les embryons et les larves présentent l'avantage d'être transparents. Il s'agit d'un modèle vertébré adapté pour des études développementales, génétiques, pathologiques et physiologiques (Briggs, 2002; Maack & Segner, 2003; McGonnell & Fowkes, 2006; Santos et al., 2007; Van den Belt, Wester, van der Ven, Verheyen, & Witters, 2002).

1. Sélection des ligands du nPR à étudier

Il existe plus de 200 progestatifs présentant des structures chimiques variées et pour lesquels les quantités consommées et retrouvées dans l'environnement et les effets montrés en laboratoire sont divers (Voir Synthèse bibliographique). Le choix des ligands du nPR à étudier a été fait de manière à prendre en compte les quantités produites et prescrites, malgré des données manquantes concernant la consommation de ces dernières années et concernant l'usage vétérinaire. Le choix a également pris en compte leur présence dans l'environnement et les activités de perturbation endocrinienne rapportées dans la littérature. Ces composés pouvant être classés selon leur structure chimique, la sélection a été faite de manière à ce que chacune des classes soit représentée. L'antagoniste du nPR mifepristone (RU486) et le progestatif endogène poisson zèbre DHP font également partie des composés choisis et seront compris dans le terme « progestatif » dans ce manuscrit de thèse. Le tableau 2 (*cf.* Synthèse bibliographique, page 36) présente les 26 ligands du nPR naturel et de synthèse sélectionnés et leur classification.

2. Activités (anti-)progestatives des ligands du nPR *in vitro* chez le poisson zèbre et l'humain

Afin de déterminer si les ligands du nPR humain ont un effet (anti-) progestatif chez le poisson zèbre, nous utiliserons des lignées stables exprimant soit l'isoforme B du récepteur de la progestérone humain soit le récepteur de la progestérone poisson zèbre dans un contexte cellulaire humain (Inserm, P. Balaguer). Afin d'éviter des interférences transcriptionnelles avec le récepteur des glucocorticoïdes GR qui s'exprime dans l'ensemble des cellules, les récepteurs PR sont modifiés au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN de façon à ce qu'ils soient les seuls à pouvoir activer le gène de la luciférase. Les cellules sont également transfectées avec le gène-rapporteur luciférase qui s'exprime sous le contrôle des éléments de réponse des œstrogènes (EREs) (figure 10, page suivante).

La lignée HELN-PRB a été construite à partir de cellules HeLa transfectées pour exprimer le récepteur hPR dans lequel le domaine de liaison à l'ADN a été remplacé par celui du récepteur des œstrogènes hER α et le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur œstrogénique (cellules HELN-PRB hER α -DBD). Cette même méthodologie a été appliquée pour établir une lignée cellulaire humaine exprimant le récepteur de la progestérone de poisson zèbre (zfPR) dans des cellules U2OS (U2OS-zfPR ER α -DBD).

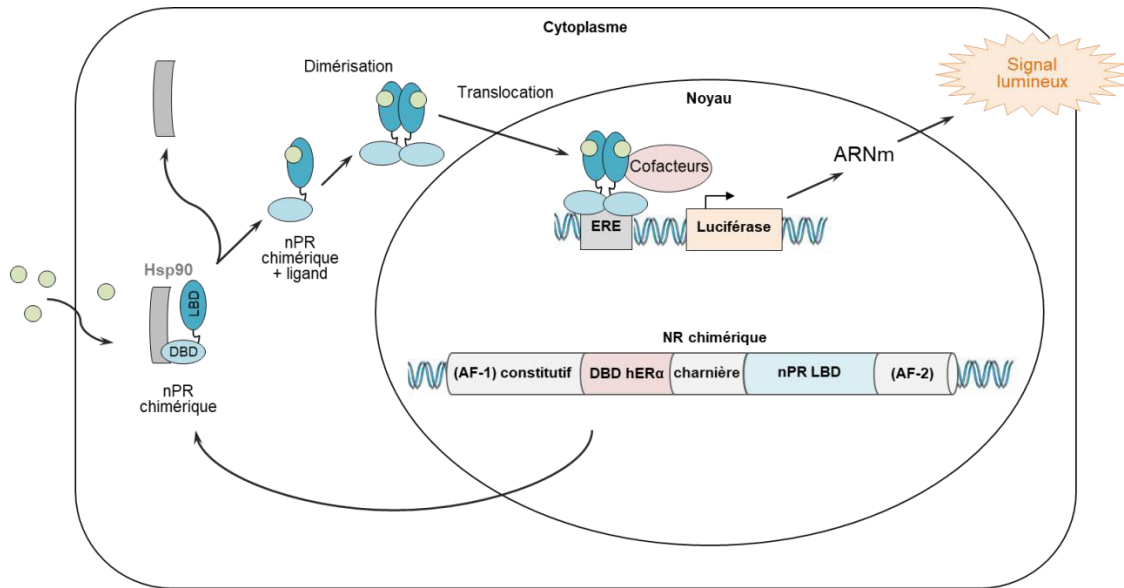


Figure 10 : Construction des lignées cellulaires HELN-PRB et U2OS-zfPR.

L'ensemble des 26 ligands choisis seront testés seuls en dose-réponse et en co-exposition avec des ligands de référence du nPR afin d'évaluer le potentiel agoniste ou antagoniste des molécules. La combinaison de modèles humain et poisson zèbre nous permettra de mettre en évidence d'éventuelles différences inter espèces (*cf.* partie Résultats, Chapitre 1, Article 1).

3. Effet des progestatifs sur ER et sur la voie de signalisation des œstrogènes

L'activité œstrogénique des progestatifs est mal renseignée chez les poissons. Au niveau physiologique, les études des progestatifs ont plutôt porté sur leurs effets androgéniques au niveau des organes périphériques de poissons adultes (foie, gonades). Les effets sur des poissons en développement et sur le système nerveux central (SNC) sont mal connus. Dans ce contexte, l'objectif est ici de renseigner des actions potentielles d'un ensemble de ligands progestatifs de synthèse sur la signalisation œstrogénique dans le système nerveux central.

Pour étudier les effets des progestatifs sur le cerveau du poisson zèbre en développement, nous utiliserons le modèle poisson zèbre éléuthéro-embryon *cyp19a1b*-GFP exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène ER-régulé *cyp19a1b* codant pour l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires (Brion et al., 2012; Menuet et al., 2005) (figure 11). Ce modèle permettra de révéler des activités œstrogéno-mimétiques des progestatifs dans le cerveau (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 2, Article 1) et également d'évaluer les effets d'un progestatif en mélange avec le xéno-œstrogène EE2 (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 2, Article 2).

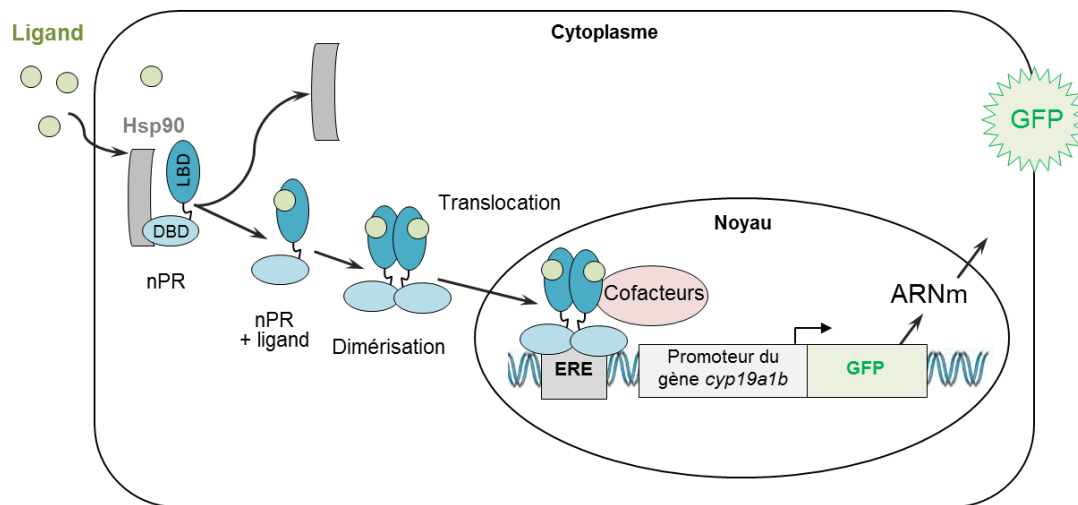


Figure 11 : Construction du modèle *cyp19a1b*-GFP.

Des lignées cellulaires exprimant les différents récepteurs ER du poisson zèbre permettront d'investiguer l'activité œstrogénique des progestatifs *in vitro* (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 2). Pour aller plus loin, les effets d'un progestatif actif sur ces modèles seront étudiés sur le comportement de réponses des larves à un stress lumineux (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 2).

4. Effets des progestatifs sur GR et sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes

Dans la littérature, certains ligands du nPR ont une activité glucocorticoïde *in vitro* et *in vivo* chez les humains et les autres mammifères. Chez les poissons, des effets glucocorticoïdes ont été montrés pour quelques progestatifs mais il existe un manque important d'informations.

Pour étudier les effets des ligands du nPR sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes, différents outils seront utilisés. Une lignée cellulaire exprimant le LBD du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes (GR) poisson zèbre et le gène rapporteur luciférase permettra d'obtenir des informations quant aux activités (anti-)glucocorticoïdes des

progestatifs *in vitro* (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 3). Les progestatifs seront également testés sur le bioessai GRIZLY basé sur le modèle poisson zèbre GRE:Luc exprimant la luciférase suite à la fixation de ligands sur les éléments de réponse des glucocorticoïdes (GREs) (Weger, Weger, Nusser, Brenner-Weiss, & Dickmeis, 2012) afin d'étudier leur interaction directe ou indirecte avec les GREs (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 3).

Un progestatif actif *in vitro* sera ensuite testé sur le modèle poisson zèbre *cyp11c1*-GFP nouvellement développé dans le cadre du projet NEMO (TEFOR, AMAGEN) et dont la caractérisation est présentée dans les résultats de la thèse (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 3, Article 4). Ce modèle exprime la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp11c1* codant pour l'enzyme 11 β -hydroxylase responsable de la biosynthèse du cortisol dans les cellules interrénales. Les effets du progestatif seront également évalués sur la production de cortisol et sur l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC) dans l'hypophyse, qui régule l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI) (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 3, Article 5). Pour aller plus loin, les effets du progestatif seront également évalués dans des comportements de réponse aux stress (*cf.* Partie Résultats, Chapitre 3, Article 5).

5. Résumé de la démarche expérimentale

La combinaison des modèles *in vitro* et *in vivo* nous permettra d'appréhender les mécanismes d'action et les effets biologiques des progestatifs à l'échelle moléculaire avec les bioessais *in vitro* exprimant le gène-rapporteur luciférase et à l'échelle cellulaire et tissulaire sur différentes voies de signalisation grâce à des modèles poissons zèbres exprimant la GFP sous le contrôle de promoteurs de gènes de la stéroïdogénèse. La démarche expérimentale est résumée dans la figure 12 et le tableau 8 page suivante.

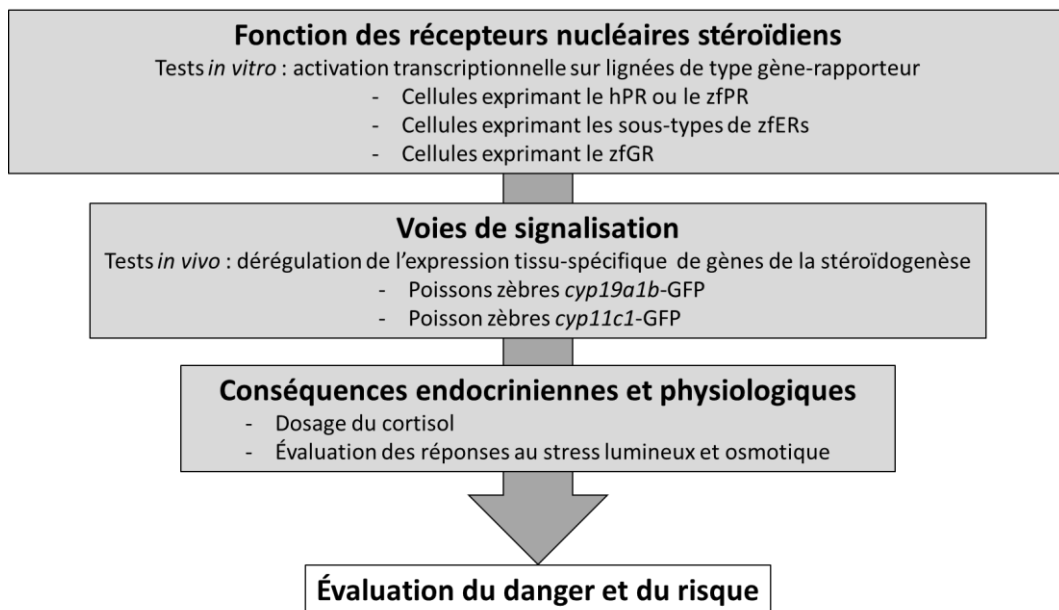


Figure 12 : Schéma de la démarche expérimentale.

Tableau 8 : Résumé de la démarche expérimentale et des modèles utilisés dans la thèse.

Signalisation	Échelle	Outils biologiques	Principe	Objectifs
PR	<i>In vitro</i> , niveau moléculaire	Cellules U2OS-zfPR	Cellules humaines transfectées avec hER α (DBD)-zfPR(DBD) et le rapporteur ERE-luciférase	Identifier l'activité des progestatifs vis-à-vis des récepteurs nPR humain et poisson zèbre et identifier de potentielles différences inter-espèces.
		Cellules HELN-PRB	Cellules humaines transfectées avec hER α (DBD)-hPR(LBD) et le rapporteur ERE-luciférase	
ER	<i>In vitro</i> , niveau moléculaire	Cellules U251-MG	Cellules humaines gliales radiaires ER-négatives transfectées avec zfER α , zfER β 1 ou zfER β 2) et le gène rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur du gène <i>cyp19a1b</i>	Identifier l'activité œstrogénique potentielle des progestatifs <i>in vitro</i> via les différents sous-types du récepteurs ER.
		zfERs cytosoliques	Compétition radioactive de liaison de récepteurs aux ligands zfERs	Déterminer si les progestatifs peuvent se lier aux récepteurs Ers et avec quelle affinité.
	<i>In vivo</i> , niveau cellulaire et tissulaire	Larves <i>cyp19a1b</i> -GFP	Larves transgéniques exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène <i>cyp19a1b</i> codant pour l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires	Identifier l'activité œstrogénique <i>in vivo</i> des progestatifs dans le cerveau des larves en développement.
GR	<i>In vitro</i> , niveau moléculaire	Cellules HG5LN-zfGR	Cellules humaines transfectées avec Gal4(DBD)-zfGR(LBD) et le rapporteur GalRE-luciférase	Identifier l'activité des progestatifs vis-à-vis des récepteurs nGR humain et poisson zèbre et identifier de potentielles différences inter-espèces.
		Larves <i>cyp11c1</i> -GFP	Larves transgéniques exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène <i>cyp11c1</i> codant pour la 11 β -H dans les cellules interrénales	Identifier l'activité (anti-)glucocorticoïde <i>in vivo</i> des progestatifs au niveau des cellules interrénales des larves en développement.
	<i>In vivo</i> , niveau cellulaire et tissulaire	Larves WT-AB	Dosage du cortisol par ELISA sur des homogénats de larves	Identifier la capacité des progestatifs à déréguler les concentrations de cortisol chez les larves.
			Expression de <i>pomc</i> (hybridation <i>in toto in situ</i>) dans la région de l'hypophyse antérieure	Identifier la capacité des progestatifs à déréguler l'expression d'un gène hypophysaire GR-régulé chez les larves.
	Larves GRE:Luc	Larves transgéniques exprimant le rapporteur luciférase sous contrôle des éléments de réponses aux glucocorticoïdes (GRES)	Évaluer la capacité des progestatifs à interagir de façon directe ou indirecte avec les GRES <i>in vivo</i> .	
<i>In vivo</i> , niveau physiologique	Larves WT-AB	Stress osmotique (250 mM NaCl) puis stimuli pour évaluer la réponse de fuite	Identifier la capacité des progestatifs à perturber la réponse des larves à un stress osmotique.	
Réponse photomotrice (PMR) dans l'obscurité pour évaluer une hyperactivité ou une réponse ralentie		Déterminer si les progestatifs peuvent induire des effets anxiogènes ou anxiolytiques.		

IV. Résultats

**Chapitre 1 : Activité (anti-)progestative des ligands du nPR
vis-à-vis des récepteurs nucléaires de la progestérone humain
et poisson zèbre**

Synthèse de l'article 1 : hPR et zfPR sont activés différemment par les progestatifs naturels et de synthèse***Contexte***

Les progestatifs de synthèse sont conçus pour mimer l'action de la progestérone (P4). Ils sont actifs chez l'humain via leur interaction avec l'isoforme B du récepteur nucléaire humain de la progestérone (hPRB). En revanche, leurs activités vis-à-vis du récepteur nucléaire de la progestérone chez les espèces aquatiques sont peu connues même si l'activité de la P4 et d'un nombre limité de progestatifs de synthèse sur le nPR de différentes espèces de téléostéens a été récemment rapportée (P. a. Bain et al., 2015; Chen et al., 2010; Ellestad et al., 2014). Il n'en reste pas moins un manque d'information pour évaluer les modes d'actions potentiels des progestatifs de synthèse sur le nPR chez les poissons.

Objectifs

L'objectif de cette partie de la thèse visait donc à évaluer l'activité (anti-)progestative d'un ensemble de 26 progestatifs choisis *a priori* (cf. tableau 2 p.32) vis-à-vis du hPR et du zfPR. Il s'agissait également de mettre en évidence d'éventuelles différences inter-espèces, qui ne sont à ce jour pas renseignées. De telles différences sont à considérer dans une démarche d'évaluation des dangers PE des substances pour les espèces et les milieux aquatiques, comme démontré pour les récepteurs ERs (Anne Cosnefroy et al., 2012; Sonavane et al., 2016).

Pour ce faire, il s'agissait d'établir des lignées exprimant soit l'isoforme B du récepteur de la progestérone humain soit le récepteur de la progestérone poisson zèbre dans un contexte cellulaire humain. Une difficulté relative à l'établissement de ces modèles réside dans le fait qu'il est nécessaire d'exprimer des récepteurs PR modifiés afin d'éviter des interférences transcriptionnelles avec le récepteur des glucocorticoïdes GR qui s'exprime dans l'ensemble des cellules. Ces récepteurs sont modifiés au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN de façon à ce qu'ils soient les seuls à pouvoir activer le gène de la luciférase. À l'initiation de ce projet, une lignée cellulaire exprimant une protéine de fusion constituée du domaine de liaison à l'ADN (DBD) de la protéine Gal4 de levure et du domaine de liaison du ligand (LBD) de hPR (V633-L933) était disponible. Comme la région A/B du récepteur de la progestérone contient un domaine d'activation constitutif, il a été décidé d'établir dans le cadre de ce projet des lignées cellulaires exprimant un récepteur hPR contenant les deux domaines de transactivation (AF1 et AF2). Pour cela, des cellules HeLa ont été transfectées pour exprimer

le récepteur hPR dans lequel le domaine de liaison à l'ADN a été remplacé par celui du récepteur des œstrogènes hER α et le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur œstrogénique (cellules HELN-PRB hER α -DBD). Cette même méthodologie a été appliquée pour établir une lignée cellulaire humaine exprimant le récepteur de la progestérone de poisson zèbre (zfPR). Initialement, le même contexte cellulaire avait été retenu, *i.e.* des cellules HeLa, afin de s'affranchir des différences potentielles dans la transactivation des récepteurs humain et poisson zèbre en fonction du contexte cellulaire considéré. Cependant, nous n'avons pu établir la lignée HELN-zfPR (ER α -DBD). En revanche, une lignée exprimant de façon stable le récepteur zfPR dans les cellules U2OS (U2OS-zfPR ER α -DBD) a pu être établie.

La méthodologie repose donc sur l'utilisation de deux lignées cellulaires humaines exprimant de façon stable le gène de la luciférase sous le contrôle soit du récepteur chimérique hPR-LBD-hER α -DBD, soit du récepteur chimérique zfPR-LBD- ER α -DBD.

Résultats et discussion

Pour caractériser la réponse des lignées cellulaires, des ligands endogènes ou synthétiques de référence du hPR ont été testés dans un premier temps. Il s'agissait de la progestérone (P4), de la promegestone (R5020) (ligands agonistes) et de la mifepristone (RU486) (ligand antagoniste du hPR). La DHP a également été testée car il s'agit d'un progestatif endogène spécifique de certains téléostéens dont le poisson zèbre. Nos données montrent que la R5020 et la P4 induisent l'activité luciférase dans les deux modèles de façon concentration-dépendante. Au contraire, la DHP n'active que le zfPR. Nous avons déterminé la R5020 comme étant l'agoniste de référence de la lignée HELN-PRB et la DHP comme étant l'agoniste de référence de la lignée U2OS-zfPR. Les effets agonistes induits par la R5020 sur hPR et DHP sur zfPR sont bloqués par la RU486. Ces résultats indiquent que les activités luciférase mesurées dans les deux lignées sont PR-dépendantes. En outre, aucun autre stéroïde naturel testé (17 β -estradiol, testostérone et 11-ketotestostérone) ne présentait d'activité, démontrant que les activités luciférase sont spécifiques du hPRB ou du zfPR.

Après cette étape de caractérisation des lignées cellulaires, l'ensemble des progestatifs a été évalué dans ces deux modèles. À l'exception de la DHP et de la RU486, l'ensemble des progestatifs testés induisent l'activité luciférase de façon concentration-dépendante dans la lignée HELN-PRB. En revanche, dans la lignée U2OS-zfPR, seuls cinq composés induisent l'activité luciférase (la DHP, la P4, la R5020, la nestorone (NES) et la drospirénone (DRO)).

Pour aller plus loin, tous les composés ont été testés en co-exposition avec les ligands agonistes de référence, *i.e.* la R5020 dans la lignée HELN-hPR et la DHP dans la lignée U2OS-zfPR, utilisés à une concentration fixe induisant 80% de l'activité luciférase. Les résultats montrent que les progestatifs agonistes se comportent soit comme des agonistes entiers (induisant de 80% à 100% du maximum d'activité luciférase) soit comme des agonistes partiels (induisant moins de 80% de l'activité luciférase). Parmi les progestatifs de synthèse qui ne présentaient pas d'activité luciférase seuls dans la lignée U2OS-zfPR, tous se sont avérés capables d'antagoniser la réponse de la DHP, révélant ainsi leurs propriétés antagonistes vis-à-vis du zfPR.

Afin d'évaluer l'influence potentielle du contexte cellulaire dans les réponses obtenues *in vitro*, des transfections transitoires de zfPR dans la lignée HELN et de hPR dans la lignée U2OS ont été réalisées (voir les données complémentaires, p.95). Ces expérimentations ont permis de confirmer les résultats précédemment obtenus, suggérant que le contexte cellulaire n'influe pas sur les réponses obtenues dans les deux modèles. Aussi, sur la base de ces travaux, nous concluons qu'il existe des différences inter-espèces marquées s'agissant de l'activité biologique des progestatifs testés vis-à-vis de hPR et du zfPR.

Dans l'ensemble, les deux lignées utilisées apparaissent comme des outils pertinents pour évaluer l'activité des perturbateurs endocriniens sur hPR et zfPR. Certains xénobiotiques ont été testés (BPA, BPF, BPAF, 4-octylphénol, BP1, BP2, BP3...) et aucun n'a d'activité agoniste de hPR ou zfPR. En revanche, des expériences préliminaires semblent indiquer qu'ils ont une activité antagoniste.

L'utilisation de ces modèles permet d'apporter des informations nouvelles sur les profils toxicologiques de nombreux progestatifs sur hPR et zfPR en mettant en évidence pour la première fois des différences inter-espèces majeures entre l'humain et le poisson zèbre.

L'effet antagoniste de la majorité des progestatifs vis-à-vis du zfPR pose la question des conséquences au niveau des processus physiologiques régulés par ce récepteur. L'ARNm du nPR est exprimé tôt au cours du développement du poisson zèbre (dès 8 hpf) et s'exprime dans de nombreux tissus chez l'adulte. Les progestatifs environnementaux sont susceptibles de perturber des processus clés du développement et de la reproduction régulés par les progestatifs endogènes P4 et DHP, notamment la maturation de l'ovocyte.

Human and zebrafish nuclear progesterone receptors are differently activated by natural and synthetic progestins

Clémentine Garoche ^a, Sélim Aït-Aïssa ^{a,*}, Nicolas Creusot ^b, Abdelhay Boulahtouf ^b, Patrick Balaguer ^b, François Brion ^{a,*}

^a *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité*

Écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATA, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^b *Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Inserm U1194, Université Montpellier 1, 34290 Montpellier, France*

* Corresponding authors:

E-mail: francois.brion@ineris.fr, phone +33(0)3 44 55 65 12

E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, phone +33(0)3 44 55 65 11

Keywords: synthetic progestins; 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; human and zebrafish nuclear progesterone receptor; luciferase reporter cell lines.

Abstract

As compared to (xeno-)estrogens, natural and synthetic ligands of the progesterone receptor (PR) have been scarcely studied on aquatic organisms while the potential risk posed by these compounds has been recently pointed out. However, there is still a lack of data to accurately characterize the hazards posed by these compounds and the capacity of synthetic progestins to interact with fish nuclear PR was poorly investigated. Herein, we assessed the biological activity of a broad range of natural and synthetic progestins towards zebrafish (zf) PR and human (h) PR to identify possible interspecies differences. Two human cell lines co-expressing either hPR or zfPR and luciferase gene, namely HELN-hPRB and U2OS-zfPR cells, were characterized using respectively promegestone (R5020) and the natural zebrafish progestin $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) as reference agonistic ligands. R5020 and progesterone (P4) induced luciferase activity in both cell lines in a concentration-dependent manner. DHP activated zfPR, but not hPR in a concentration-dependent manner. The agonistic effects induced by the reference progestins on hPR and zfPR were blocked by co-exposing the cells with mifepristone (RU486), a potent PR antagonist. A large set of natural and synthetic progestins (26) was screened in the two cell lines. All of the compounds except RU486 and DHP activated hPR. Conversely, in U2OS-zfPR cells, only five compounds induced luciferase activity. The coexposure of progestins with R5020 or DHP allowed us to further characterize progestins as partial or full agonists of hPR or zfPR. Overall, we showed that two newly developed luciferase reporter cell lines were relevant screening tools to assess the activation of h and zfPR by synthetic compounds. The use of these cell lines provided novel information regarding the activity of a large set of progestins on human and zebrafish PR. We highlighted major interspecies differences, but there is still a need to further determine the effects of zfPR agonist progestins on PR-dependent physiological processes in order to characterize the hazards posed by progestins in fish.

1. Introduction

Progesterone (P4) and fish progestins play crucial roles in the development and reproduction of fish, acting through nuclear or membrane progesterone receptors (nPR or mPR). These compounds regulate multiple reproductive processes in female and male fish and can affect the central nervous system (Chen et al. 2010; Zhu et al. 2015; Scott et al. 2010; Wang et al. 2016; Diotel et al. 2010; Chen et al. 2013). Natural and synthetic progestins are numerous and can be classified based on their chemical structures depending whether they are structurally related to progesterone, 19-nortestosterone or spironolactone (see Table 1). Progesterone and synthetic progestins are widely used pharmaceuticals, notably in the formulation of contraceptive pills, but also in various other medical applications such as hormone replacement therapy, treatment for secondary amenorrhea, dysfunctional uterine bleeding, endometriosis, and several cancers. In contraceptive pills, progestins can be used either alone or in combination with estrogens, mostly 17 α -ethinylestradiol (EE2). The presence of progestins in the aquatic environment is much less documented as compared to that of (xeno)-estrogens since there is data for only a few of them (Kumar et al. 2015; Fent 2015). Various studies reported that some progestins can be detected in industrial and urban wastewater treatment plants (WWTPs) influents and effluents or surface waters, at concentration ranging from low ng/L to 50 ng/L, and in animal farm waste and runoffs at concentrations up to the μ g/L range (Chang et al. 2011; Labadie & Budzinski 2005; Creusot et al. 2014; Kumar et al. 2015; Fent 2015). Recent studies on different aquatic vertebrates have documented that some synthetic progestins could disrupt the expression of hormone-regulated genes and could alter reproduction at environmentally relevant concentrations (Runnalls et al. 2010; Fent 2015; Sumpter 2005; Labadie & Budzinski 2005; Bluthgen et al. 2013; Han et al. 2014; Liang et al. 2015; Overturf et al. 2014; Safholm et al. 2014; Zucchi et al. 2012). In mammals, some progestins bind to a variety of nuclear steroid receptors (*i.e.* androgen, glucocorticoid, mineralocorticoid and

estrogen receptors), depending on their structural derivation (Kumar et al. 2015). Although it has not been investigated in detail in fishes, some progestins are known to display androgenic (Svensson et al. 2014; Paulos et al. 2010) or estrogenic effects (Brion et al. 2012; Cano-Nicolau et al. 2016), and *in vitro* studies on human and fathead minnow (Ellestad et al. 2014) or rainbow fish (Bain et al. 2015) androgens or progesterone nuclear receptors explored the mechanisms of action of these compounds. There is still a lack of data to characterize the capacity of synthetic progestins to interact with the zebrafish nuclear progesterone receptor (zfPR). Therefore, the aims of this study was (1) to develop and characterize two cell lines expressing zfPR or human PR (hPR); (2) to profile the effects of a broad range of natural and synthetic progestins on zfPR; and (3) to identify possible interspecies differences.

2. Material and Methods

2.1. *Chemicals and materials*

Materials for cell culture came from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Luciferin (sodium salt) was purchased from Promega (Charbonnières, France). 17 β -estradiol (E2), testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT), pregnenolone (P5), progesterone (P4), dydrogesterone (DYD), medroxyprogesterone (MEP), medroxyprogesterone acetate (MPA), megestrol acetate (MGA), chlormadinone acetate (CMA), cyproterone acetate (CPA), promegestone (R5020), nesterone (NES), nomegestrol acetate (NGA), ethisterone (ETH), ethynodiol diacetate (EDA), lynestrenol (LYN), norethindrone acetate (NEA), norethindrone (NET), tibolone (TIB), desogestrel (DSG), etonogestrel (ENG), gestodene (GES), levonorgestrel (LNG), norgestimate (NTE), norgestrel (NGL), drospirenone (DRO), mifepristone (RU486), 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), spironolactone (SPIRO) and canrenone (CAN) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Louis, MO). Gestonorone (GRN) was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Progestins can be sorted in different classes depending on their chemical structures (Table 1). At least one representative progestin of each class was selected for the screening. Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C . Fresh dilutions of test chemicals in medium were prepared before each experiment.

2.2. *Reporter gene cell lines*

To assess the ability of progestins to transactivate the human nPR (PRB) or the zebrafish nPR (zfPR), two human luciferase-reporter-gene cell lines were established through stable transfections. The HELN-hPR cell line was already described (Bellet et al. 2012). The cells were obtained after two sequential transfections. HeLa cells were first transfected with the ERE- β Globin-Luc-SVNeo plasmid (Balaguer et al. 1999) then with the PRB (ER α DNA Binding

Domain)-puromycin construct. The U2OS-zfPR cell line was obtained after a simultaneous transfection with plasmids ERE-LUC and PSG5-ER α (DBD)-Puro in which a part of the receptor zfPR was inserted. A chimeric PR receptor was designed so that it can bind the estrogen responsive element (ERE). It is composed of the ligand binding domain of PR (PR-LBD), the two transactivation domains of PR (AF1 and AF2) and the DNA binding domain of hER α (ER α -DBD). Luminescent and inducible clones were identified using a photon counting camera (Argus 100 from Hamamatsu, Japan or NightOWL LB 981 from Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and the most responsive clones were isolated.

2.3. Cell culture conditions

Cell lines were grown in phenol red containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 1 g/l glucose, supplemented with 2.5% of fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotic (penicillin/streptomycin) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Exposures were made in phenol red-free medium supplemented with 6% dextran-coated charcoal (DCC)-treated FCS and 1% antibiotic (penicillin/streptomycin). Selection of HELN-PRB cells was made with 0.5 μ g/ml puromycin and 1mg/L G418 and selection of USO2-zfPR cells was made with 0.5 μ g/ml puromycin.

2.4. In vitro transcriptional activation bioassays

Cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar; Dutscher, Brumath, France) at a density of 7×10^4 cells per well in 100 μ l culture medium. After 24 h, cells were exposed by adding in each well 50 μ l of serial dilutions of compounds or solvent control (DMSO; 0.1% v/v) in triplicates and left to incubate for 16 h. For antagonist activity assessment, cells were exposed to different concentrations of the tested compounds and to the concentration of the reference compound that yield 80% of the maximal response (10^{-9} M R5020 for HELN-PRB and 3×10^{-9} M DHP for U2OS-zfPR). At the end of the incubation, the medium

was removed and replaced with 50 μ L per well of medium containing 0.3mM luciferin. Luminescence signal was monitored in living cells for 2s per well with the BioTek Synergy H4 Hybrid Microplate Reader and Gen5 software. Results were expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 3x10⁻⁸M R5020 for HELN-PRB cells and 3x10⁻⁸M DHP for U2OS-zfPR cells. Those reference compounds were selected amongst typical PR ligands for inducing a maximum luciferase activity with a minimum EC₅₀. Each chemical was tested in at least three independent experiments. Concentration–response curves were modeled using the Regtox 7.0.6 Microsoft Excel TM macro (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html), which uses the Hill equation model. Effective concentrations (EC) and inhibitory concentrations (IC) were derived. For a given chemical, EC₅₀ is defined as the concentration inducing 50% of its maximal effect and IC₅₀ represents the concentration required for 50% inhibition. Relative Effect Potencies (REP) were calculated by dividing the EC₅₀ of the reference by the EC₅₀ of the tested compound.

3. Results

3.1. *hPRB and zfPR transactivation by natural progestins and promegestone*

Typical PR ligands were screened on the established HELN-PRB line and the newly developed U2OS-zfPR line in order to characterize the cell lines responses. The ligands used were progesterone (P4), promegestone (R5020), the antagonist mifepristone (RU486), and the fish progestin 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP). For each compound, the results were expressed as a percentage of the maximum luminescence induced by R5020, the reference compound. P4 and R5020 induced luciferase activity in HELN-PRB cells in a concentration-dependent manner with calculated EC₅₀ of 14.6nM and 0.33nM, respectively (Figure 1A,B; Table 2). Interestingly, DHP did not activate hPR (Figure 1A,B; Table 2). Moreover, DHP antagonised the effect of R5020 with an IC₅₀ of 576nM (Figure 1). RU486 did not induce luciferase activity at the concentrations tested (up to 10⁻⁵M). The luciferase activity induced by

R5020 was completely inhibited by RU486 in a concentration-dependent manner with a calculated IC_{50} of 1.04nM (Figure 1C,D).

In U2OS-zfPR cells, R5020 induced luciferase activity in a concentration-dependent manner with a calculated EC_{50} of 1.98nM. However, DHP was found to be more potent than R5020 with a calculated EC_{50} of 1.56nM and a maximum luminescence induction 1.5 times higher than with R5020 (data not shown). DHP was therefore used as the reference agonistic ligand for the U2OS-zfPR line. The EC_{50} of DHP was thus recalculated to 1.87nM (Figure 1A,B; Table 2). With DHP as a reference, R5020 induced luciferase activity with a calculated EC_{50} of 1.93nM (Figure 1A,B; Table 2) and a maximum luminescence induction of 64% of the maximum induced by DHP. P4 activated zfPR in a concentration-dependent manner with a calculated EC_{50} of 1.97nM. The maximum induction of luciferase activity in U2OS-zfPR cells by P4 was lower than in HELN-PRB cells (40% versus 70%, respectively) (Figure 1A,B; Table 2). RU486 did not induce luciferase activity at the concentrations tested (up to $10^{-5}M$). The luciferase activity induced by DHP was inhibited by RU486 in a concentration-dependent manner (Figure 1C,D). However, RU486 IC_{50} in U2OS-zfPR cells was more than 2200nM, while it was 1.04nM in HELN-PRB cells.

Other reproductive steroids (17 β -estradiol (E2), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-kt)) were unable to transactivate hPR or zfPR (Figure 2).

To confirm that the luciferase induction was due specifically to the transactivation of receptors and not the cellular context, reference compounds and some synthetic progestins were tested on the constitutive HELN cell line. None of the tested compounds showed an effect (data not shown). These compounds were also tested on the transient cell lines HELN-zfPR and U2OS-PRB. R5020 induced luciferase in both transient cell lines and DHP induced luciferase in HELN-zfPR cells. However, DHP also induced luciferase in U2OS-PRB cells (data not shown), although with a high EC_{50} (2404nM), while it was not active in HELN-PRB cells.

3.2. *Effect of synthetic progestins on HELN-hPRB*

To assess the ability of different progestins to transactivate hPR, a large set of 22 synthetic progestins representative of the different chemical classes was screened on HELN-PRB cells. All of the compounds tested activated hPR in a concentration-dependent manner (Figure 3). EC_{50} were calculated and ranged from 0.14nM for GES to 249nM for MEP (Table 2). Twelve of the tested progestins induced a maximum effect comprised between 80 and 100% when compared to R5020, while the others only partially induced luciferase activity (Table 2). Progestins were tested in coexposure with 10^{-9} M R5020, the concentration inducing 80% of the maximum luciferase activity. The progestins partially inducing luciferase activity antagonised R5020 to reach the level of activity obtained with the compound alone, which is the typical behavior of a partial agonistic ligand (Figures 3 and 5). IC_{50} ranged from 4.70 nM for MGA to 156nM for EDA (Table 2). The progestins inducing 80 to 100% maximum activity did not antagonise R5020 and were therefore considered as full agonists (Figures 3 and 5).

3.3. *Effect of synthetic progestins on U2OS-zfPR*

In contrast to the results obtained on hPR, most of the progestins tested did not show any agonistic activity on zfPR (Figure 5). Only three of the synthetic progestins tested (R5020, NES and DRO) transactivated zfPR, in addition to the natural progestins P4 and DHP (Figure 4). Calculated EC_{50} ranged from 1.41nM for NES to 14.1nM for DRO (Table 2). Compounds can be sorted according to their EC_{50} in ascending order: NES > DHP > R5020 > P4 > DRO.

Progestins were tested in coexposure with 3×10^{-9} M DHP, the concentration inducing 80% of the maximum luciferase activity. All the active progestins on zfPR except R5020 antagonised DHP to reach the level of activity obtained with the compound alone, and were therefore considered partial zfPR agonists (Figure 5). Interestingly, the coexposure of R5020 with 3×10^{-9} M DHP showed no change in luciferase activity (Figure 5). RU486 and the 20 progestins

that showed no agonistic activity on zfPR were screened on U2OS-zfPR in coexposure with 3×10^{-9} M DHP, the concentration inducing 80% of the maximum luciferase activity, and all of them antagonised the activity induced by DHP in a concentration-dependent manner (Figure 4). IC_{50} ranged from 6.39 nM for NES to 503 nM for LYN. It is important to note that RU486 was by far the weakest zfPR antagonist amongst the compounds tested, with an IC_{50} of 2253 nM.

3.4. *Effect of drospirenone, spironolactone and canrenone on HELN-PRB and U2OS-zfPR*

The selection of progestins for screening was extended to spironolactone (SPIRO) and canrenone (CAN) since these compounds are structurally related to the progestin drospirenone (DRO). SPIRO is the parent compound of DRO and CAN. Moreover, SPIRO and CAN have been detected and quantified in the environment in the mg/g of sorbent range (POCIS extracts) (Creusot et al. 2014). In our study, the progestin DRO transactivated both hPR and zfPR. SPIRO and CAN were also able to transactivate both receptors in a concentration-dependent manner with EC_{50} in the 10-1000 nM range. DRO, SPIRO and CAN were all partial agonists of hPR and zfPR and were able to antagonise the reference compounds with IC_{50} in the 10-100 nM range.

4. Discussion

4.1. *hPRB and zfPR are differently transactivated by natural progestins and promegestone*

The typical PR ligands tested showed effects on hPR and zfPR, but there were major differences regarding the effects of DHP and RU486. The PR ligands P4 and R5020 were able to transactivate hPR and zfPR with EC_{50} in the low nM range. P4 and R5020 induced luciferase activity in HELN-PRB cells with calculated EC_{50} of 14.6 nM and 0.33 nM respectively, both similar to the results previously published on this cell line by (Creusot et al. 2014), suggesting

that the established stable cell line HELN-PRB still responds as expected. EC₅₀ for P4 was similar to that calculated by Bain et al., 2015 in U2OS-hPR cells (PRE-CALUX assay from BioDetectionSystems). EC₅₀ for R5020 was found to be in the same range in HG5LN-GalPR cells (Escande et al. 2009). DHP was not an agonist of hPR in our model, suggesting a species-specificity of the PR. Bain et al., 2015 also showed that DHP did not antagonise hPR in U2OS-hPR cells. Interestingly, DHP was able to antagonise the effect of the reference compound R5020 in HELN-PRB cells with an IC₅₀ of 576nM, suggesting that this fish progestin is able to bind to the hPR.

DHP was a potent agonist of zfPR. In fish, P4 plays important roles in steroidogenesis but is not considered to be a major progestogenic compound, as opposed to DHP and 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S). In teleost fishes such as zebrafish, DHP is thought to be the Maturation Inducing Steroid (MIS) (Nagahama 1997), which concurs with its strong potency towards the zfPR in our model. The agonistic effect of P4, DHP and R5020 on the zfPR was also shown by (Chen et al. 2010) (HEK293T cells cotransfected with the pGL3-MMTV-Luc vector and a zfPR expression vector construct) with a similar EC₅₀ for DHP but higher EC₅₀ for P4 and R5020. The agonistic effect of typical PR ligands was shown as well on other teleost fishes nPR such as the nPR of rainbowfish (U2OS cells) (Bain et al. 2015), fathead minnow (COS-7 cells) (Ellestad et al. 2014), Atlantic cod (Chen et al. 2012) and Atlantic salmon (Chen et al. 2011).

RU486, a potent hPR antagonist, did not induce luciferase activity on neither cell lines at the concentrations tested (up to 10⁻⁵M). RU486 antagonised the reference compounds in both models in a concentration-dependent manner, showing that the response is PR-dependent and PR-specific. IC₅₀ was 1.04nM in HELN-PRB cells, similar to what had been calculated by (Bellet et al. 2012) in the same cell line, confirming the robustness of the line response over time. However, it is interesting to note that a much higher concentration of RU486 was needed

to completely antagonise the reference compound on zfPR. Indeed, IC₅₀ of RU486 in U2OS-zfPR cells was around 2000 times the IC₅₀ in HELN-PRB cells, showing that mifepristone is not a potent antagonist of zfPR.

Other reproductive steroids, 17 β -estradiol (E2), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-kt) were unable to transactivate hPR or zfPR, suggesting a specificity of the receptors. This concurs with the results from (Chen et al. 2010) in HEK293T cells. None of the tested compounds showed an effect in HELN cell line, showing the specificity of the transactivation of hPR in HELN-PRB cells. The screening of the compounds on the transient cell lines HELN-zfPR and U2OS-PRB suggest that the differences in luminescence observed are not due to intermodel differences but rather to interspecies specificity.

Overall, our data showed that HELN-PRB and U2OS-zfPR are valid models to study the human or zebrafish progesterone receptor and are therefore relevant screening tools to assess the activation of those receptors by synthetic compounds.

4.2. All synthetic progestins tested transactivated hPRB

All of the synthetic progestins tested activated hPR in a concentration-dependent manner. Creusot et al., 2014 calculated a similar EC₅₀ for LNG in HELN-PRB cells. Some studies showed this effect on cell models expressing a human PR for a few progestins. Six of the synthetic progestins we screened were tested by Bain et al, 2015 in U2OS-hPR cells and calculated EC₅₀ were in the same nM range than what we found. Escande et al. 2009 showed that tibolone and its Δ^4 derivative were full agonists of hPR in in HG5LN-GalPR cells. However, EC₅₀ for tibolone was ten times higher than what we calculated. SPIRO and CAN were detected in the environment by (Creusot et al. 2014) and EC₅₀ were in the μ M range (26600 and 95200 nM) in HELN-PRB cells, while we calculated 1000 and 600 nM. Our study provides information on a large set of synthetic progestins, not only regarding their agonistic

activity towards the hPR, but also their ability to antagonise the reference compound. The screening allowed us to sort the progestins between full or partial agonistic ligands. The testing of the environmental compounds SPIRO and CAN concurred with what was found by Creusot et al., 2014 and furthermore supports the need to consider these compounds as hPR ligands.

4.3. *Only five of the 25 tested progestins were zfPR agonists and most progestins were zfPR antagonists*

The screening of progestins on U2OS-zfPR showed that the majority of them did not show any agonistic activity of zfPR, in contrast to the results obtained in HELN-PRB cells. Only three of the synthetic progestins tested (R5020, NES and DRO) transactivated zfPR, in addition to the natural progestins P4 and DHP. Interestingly, the agonistic effect of DRO was shown on the rainbowfish PR (Bain et al. 2015) and the fathead minnow PR (Ellestad et al. 2014). However, the agonistic activity of NES, SPIRO and CAN we showed on zfPR had not been previously described. DRO, SPIRO and CAN were able to transactivate zfPR in a concentration-dependent manner as partial agonists and can thus be considered as progestins towards fishes. The presence of SPIRO and CAN in the aquatic environment (Creusot et al. 2014) and their ability to transactivate zfPR make them concerning compounds for the zebrafish and for other teleost species.

Our study provides novel information on the absence of agonistic activity of a large set of progestins on zfPR. The absence of agonistic activity of a few synthetic progestins was previously reported on the rainbowfish PR (Bain et al. 2015) and the fathead minnow PR (Ellestad et al. 2014) and suggests that progestins may display the same transactivation patterns in all teleost fish species.

As compared to previous studies, progestins were also screened for their antagonistic activity. A major finding was that the 20 progestins that showed no agonistic activity

antagonised DHP in a concentration-dependent manner. IC₅₀ ranged from 15.2nM for GES to 1002nM for DSG. It is important to note that RU486 was the weakest zfPR antagonist amongst the compounds tested with an IC₅₀ of 2253 nM. To our knowledge, it is the first time we show antagonisation of progestins towards a fish nPR. It is likely that progestins can also antagonise other fish species nPR, but it needs to be investigated.

4.4. *Species-specificity of the nuclear progesterone receptor transactivation by progestins*

Major differences were highlighted between the transactivation patterns of hPR and zfPR by PR ligands. The differences observed seem to be due to interspecies differences as suggested by the results on transient cell lines. In human, there are two PR isoforms A and B obtained from alternative splicing of a single gene, while there is only one in zebrafish. There seem to be no link between structural classification of progestins and their effect on zfPR. It would be of interest to study the interspecies differences by structural analysis of hPR and zfPR selectivity. In mammals, binding studies showed that progestins containing hydroxyl groups at the 17 or 20 position displayed lower binding than P4 (Pinter & Thomas 1997). The interspecies differences are surprising, given the relatively high homology in LBD sequences of hPR and zfPR (67% amino acid identity) and the close functions in development and reproduction (Hanna et al. 2010; Chen et al. 2010).

Regarding estrogen receptors, only two ER subtypes have been characterized in mammals and the presence of three ER subtypes has been reported in teleosts including the zebrafish. Despite these differences, the hER ligands controlled the transcriptional activity of zFERs in a similar manner, although significant differences in selectivity were observed among subtypes (Pinto et al. 2014).

The species-specificity of progesterone receptors raises the importance of acquiring further information on the mechanisms of action of compounds such as progestins on fish species. It points out that human-based bioassays and toxicological information cannot be used to predict the effects of progestins on fish and fish populations. In an effect-directed analysis approach, the use of human-based bioassays can be combined with zebrafish-based bioassays to more accurately assess the presence of progestins in the aquatic environment.

4.5. *Ecotoxicological relevance of these findings*

Nuclear PR belongs to the nuclear receptor superfamily and act as ligand-activated transcription factor to mediate genomic effects. In adult zebrafish, the mRNA of nPR is expressed mainly in testis (in germ cells, proliferating spermatogonia and early spermatocytes in Leydig and Sertoli cells), but also at lower levels in other tissues such as ovaries (follicular cells and early stage oocytes) and brain (preoptic region of the hypothalamus, pituitary) (Hanna et al. 2010; Chen et al. 2010). In zebrafish embryos, nPR mRNA is expressed early in development (Chen et al. 2010). Based on their localization, nPRs take part in the regulation of reproductive and developmental processes. They may be involved in germ cell proliferation, differentiation (meiosis, steroidogenesis) and maturation. The presence of nPR in the brain suggests a role in neuroendocrine regulation of reproduction, but also possibly in nonreproductive processes such as neuronal survival, neurite outgrowth and neurogenesis (Hanna et al. 2010). Endogenous fish progestins such as DHP and P4 bind to the nPR to induce genomic actions. It has been shown that DHP could induce the resumption of meiosis during final oocyte maturation (Nagahama 1997; Miura et al. 2007). DHP is also important in male fishes since it is known to regulate spermiation, notably early stages of spermatogenesis (Chen et al. 2013), regulate sperm motility and act as a pheromone (Scott et al. 2010). Given the antagonistic activity of a number of synthetic progestins on zfPR, the effects mediated by endogenous progestins in fish through the nPR might be inhibited if fish are exposed to these

compounds. The presence of progestins in the aquatic environment is much less documented as compared to that of (xeno)-estrogens since there is data for only a few of them (Kumar et al. 2015; Fent 2015). Still, various studies reported that some progestins can be detected in industrial and urban wastewater treatment plants (WWTPs) influents and effluents or surface waters, at concentration ranging from low ng/L to 50 ng/L, and in animal farm waste and runoffs at concentrations up to the µg/L range (Chang et al. 2011; Labadie & Budzinski 2005; Creusot et al. 2014; Kumar et al. 2015; Fent 2015). Recent studies on different aquatic vertebrates have documented that some synthetic progestins could disrupt the expression of hormone-regulated genes and could alter reproduction at environmentally relevant concentrations (Runnalls et al. 2010; Fent 2015; Sumpter 2005; Labadie & Budzinski 2005; Bluthgen et al. 2013; Han et al. 2014; Liang et al. 2015; Overturf et al. 2014; Safholm et al. 2014; Zucchi et al. 2012). These major reproduction disruptions might be explained by the antagonistic activities of synthetic progestins. In literature, there was anovulation in nPR-KO fishes (Zhu et al. 2015) and ovulation problems when DHP was inhibited. When studying the morphology of female gudgeons from the river Dore, it was found that they had hypertrophied gonads and were unable to lay eggs (Sanchez et al. 2011). These disruptions could be explained by the antagonisation of endogenous progestins by synthetic progestins, preventing the oocytes from entering final maturation and be laid. The localization of nPR in the brain suggests that the antagonising effects of progestins could have consequences at other levels than spermiation and ovulation, but the effects of progestins at the central nervous system level and notably on nonreproductive processes have been scarcely studied. The agonistic effect shown for the progestins R5020, NES and DRO and for the compounds SPIRO and CAN might also disrupt developmental and reproduction processes. P4 is an endogenous fish progestin, but its presence in the environment due to anthropic activity might also disrupt the normal processes of aquatic species.

5. Conclusion

In this study, we assessed the transcriptional activity of a broad range of natural and synthetic progestins on human and zebrafish progesterone receptor. This screening highlighted major interspecies differences. For the first time, we showed that the majority of progestins were zfPR antagonists. Our results show that fish exposure to progestins may disrupt physiological processes regulated by endogenous progestins through nPR. This study emphasize the need to monitor the environmental occurrence of P4 and synthetic progestins and assess their effects on different physiological processes regulated by fish nPRs to better apprehend the risk posed by these compounds on the aquatic environment.

Acknowledgements

This research was supported by the ANR PROOFS “Occurrences and effects of environmental ligands of progesterone receptor on fish reproduction and neurodevelopment” (ANR-13-CESA-0006-03). Clémentine Garoche was supported by a doctoral fellowship from the ANR PROOFS and the French Ministry of Ecology (P190 “Axe de Recherche Ecotoxicologie”).

References

- Bain, P. a. et al., 2015. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray–Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquatic Toxicology*, 163, pp.97–101.
- Balaguer, P. et al., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *The Science of the total environment*, 233(1–3), pp.47–56.
- Bellet, V. et al., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research*, 46(6), pp.1912–1922.
- Bluthgen, N. et al., 2013. Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 2. Gene expression analysis and in vitro activity. *Aquatic Toxicology*, 144–145, pp.96–104.
- Brion, F. et al., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 7(5), p.e36069.
- Cano-Nicolau, J. et al., 2016. Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305, pp.12–21.
- Chang, H. et al., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*, 45(2), pp.732–740.
- Chen, S.X. et al., 2013. A progestin (17a,20b-dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 185, pp.1–9.
- Chen, S.X. et al., 2011. Cloning, pharmacological characterization, and expression analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) nuclear progesterone receptor. *Reproduction*, 141(4), pp.491–500.
- Chen, S.X. et al., 2012. Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) nuclear progesterone receptor. *General and Comparative Endocrinology*, 179(1), pp.71–77.
- Chen, S.X. et al., 2010. Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear

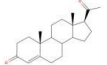
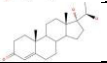
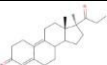
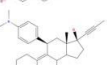
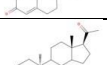


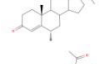
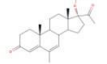



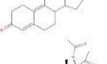
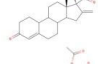
- progesterone receptor. *Biology of reproduction*, 82(1), pp.171–81.
- Creusot, N. et al., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental science & technology*, 48(7), pp.3649–3657.
- Diotel, N. et al., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), pp.172–192.
- Ellestad, L.E. et al., 2014. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environmental Science and Technology*, 48, pp.8179–8187.
- Escande, A. et al., 2009. Regulation of activities of steroid hormone receptors by tibolone and its primary metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 116(1–2), pp.8–14.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environment International*, 84, pp.115–130.
- Han, J. et al., 2014. The synthetic progestin megestrol acetate adversely affects zebrafish reproduction. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 150, pp.66–72.
- Hanna, R.N. et al., 2010. Characterization and expression of the nuclear progestin receptor in zebrafish gonads and brain. *Biology of reproduction*, 82(1), pp.112–22.
- Kumar, V. et al., 2015. Ecotoxicological Research : A Critical Review The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research : A Critical Review.
- Labadie, P. & Budzinski, H., 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(6), pp.1199–1205.
- Liang, Y.-Q. et al., 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 160, pp.172–179.
- Miura, C., Higashino, T. & Miura, T., 2007. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biology of reproduction*, 77(5), pp.822–8.
- Nagahama, Y., 1997. 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62(1), pp.190–6.

- Overturf, M.D. et al., 2014. Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquatic Toxicology*, 148, pp.152–161.
- Paulos, P. et al., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, 99(2), pp.256–262.
- Pinter, J. & Thomas, P., 1997. The ovarian progestogen receptor in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, demonstrates steroid specificity different from progesterone receptors in other vertebrates. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 60(1–2), pp.113–9.
- Pinto, C. et al., 2014. Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), pp.60–69.
- Runnalls, T.J. et al., 2010. Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 16(6), pp.1318–1338.
- Safholm, M. et al., 2014. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), pp.20130577–20130577.
- Sanchez, W. et al., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International*, 37(8), pp.1342–1348.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P. & Stacey, N., 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of fish biology*, 76(1), pp.183–224.
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 33(1), pp.9–16.
- Svensson, J. et al., 2014. Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology*, 147, pp.84–91.
- Wang, C. et al., 2016. Progestin increases the expression of gonadotropins in pituitaries of male Zebrafish. *Journal of Endocrinology*, (April), p.JOE-16-0073.

Zhu, Y. et al., 2015. Nuclear progestin receptor (Pgr) knockouts in zebrafish demonstrate role for Pgr in ovulation but not in rapid non-genomic steroid mediated meiosis resumption. *Frontiers in Endocrinology*, 6(MAR), pp.1–10.

Zucchi, S., Castiglioni, S. & Fent, K., 2012. Progestins and Antiprogestins Affect Gene Expression in Early Development in Zebra fish (*Danio rerio*) at Environmental Concentrations. *Environmental science & technology*, 46(46), pp.5183–5192.

Table 1: Classification of natural hormones and natural and synthetic nPR ligands tested on HELN-PRB and U2OS-zfPR cells.

Classification		Compound	Abbreviation	Uses	Molecular weight (g/mol)	CAS	Structure
Natural progestin in human and fish		Progesterone	P4	Clinical use	314.46	57-83-0	
Natural progestin in fish		17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one	DHP				
Synthetic progestin derived from 19-norprogesterone		Promegestone	R5020	Clinical use	326.47	34184-77-5	
PR antagonist		Mifepristone	RU486	Clinical use	429.60	84371-65-3	
Synthetic progestin retroprogesterone, isomer of P4		Dydrogesterone	DYD	Clinical use	312.45	152-62-5	
Progestins structurally related to progesterone	Derived from 17 α -hydroxyprogesterone	Medroxyprogesterone	MEP	Clinical use	344.49	520-85-4	
		Medroxyprogesterone acetate	MPA	Clinical use	386.52	71-58-9	
		Megestrol acetate	MGA	Clinical use	384.51	595-33-5	
		Chlormadinone acetate	CMA	Clinical use	406.94	302-22-7	
		Cyproterone acetate	CPA	Clinical use	416.94	427-51-0	
	Derived from 19-norprogesterone	Promegestone	R5020	Clinical use	326.47	34184-77-5	
		Nestorone	NES	Clinical use	370.48	7759-35-5	
		Nomegestrol acetate	NGA	Clinical use	370.48	58652-20-3	
	Derived from 17 α -hydroxy-19-norprogesterone	Gestonorone	GRN	Clinical use of gestonorone caproate	316.43	2137-18-0	

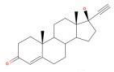
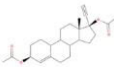
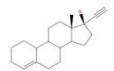
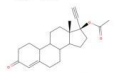
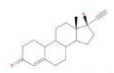
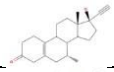
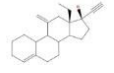
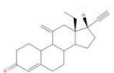


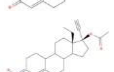


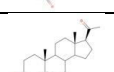
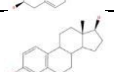
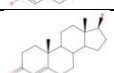
Progestins structurally related to testosterone: derived from 19-nortestosterone	Estranes	Ethisterone	ETH	Stopped	312.45	434-03-7	
		Ethinodiol diacetate	EDA	Clinical use	384.51	297-76-7	
		Lynestrenol	LYN	Clinical use	284.44	52-76-6	
		Norethindrone acetate	NEA	Clinical use	340.46	51-98-9	
		Norethindrone	NET	Clinical use	298.42	68-22-4	
		Tibolone	TIB	Clinical use	312.4	5630-53-5	
	Gonanes	Desogestrel	DSG	Clinical use	310.47	54024-22-5	
		Etonogestrel	ENG	Clinical use, metabolite of desogestrel	324.45	54048-10-1	
		Gestodene	GES	Clinical use	310.43	60282-87-3	
		Levonorgestrel	LNG	Clinical use	312.45	797-63-7	
		Norgestimate	NTE	Clinical use	369.50	35189-28-7	
		Norgestrel	NGL	Clinical use	312.45	6533-00-2	
Progestin structurally related to spironolactone	Drospirenone	DRO	Clinical use	366.49	67392-87-4		
Natural hormones and precursors	Pregnenolone (progesterone precursor)	P5	Clinical use	316.48	145-13-1		
	17β-estradiol	E2	Clinical use	272.38	50-28-2		
	Testosterone	T	Clinical use	288.42	58-22-0		

Table 2: Calculated EC₅₀ and IC₅₀ (nM) in HELN-PRB and U2OS-zfPR cells. REP: Relative potency in HELN-PRB cells (EC₅₀(R5020)/EC₅₀(chemical)) and U2OS-zfPR cells (EC₅₀(DHP)/EC₅₀(chemical)). Standard deviations (sd). n = number of independent experiments.

Classification	Abb	HELN-PRB						U2OS-zfPR					
		Agonism			Antagonism			Agonism			Antagonism		
		n	EC50±sd (nM)	max±sd (%)	REP	n	IC50±sd (nM)	n	EC50±sd (nM)	max±sd (%)	REP	n	IC50±sd (nM)
Reference compounds	P4	8	13.5 ± 7.14	70 ± 9	0.02	2	17.1 ± 15.7	6	1.97 ± 0.57	40 ± 7	0.95	3	2.09 ± 0.33
	R5020	23	0.33 ± 0.10	100	1		-	9	1.93 ± 0.60	64 ± 11	0.97	3	-
	DHP	3	ne			2	576 ± 319	8	1.87 ± 0.44	100	1		-
	RU486	2	ne			3	1.04 ± 0.28	4	ne			3	2253 ± 292
Other progestins	DYD	6	8.03 ± 3.28	66 ± 13	0.04	5	14.5	3	ne			2	24.9 ± 6.38
	MEP	3	249 ± 105	37 ± 8	0.001	4	39.6 ± 23.4	2	ne			2	91.4 ± 55.9
	MPA	4	0.20 ± 0.05	68 ± 15	1.7	3	8.08 ± 5.74	3	ne			2	30.0 ± 7.86
	MGA	3	0.57 ± 0.04	74 ± 14	0.58	3	4.70 ± 3.87	2	ne			2	95.2 ± 55.5
	CMA	4	0.65 ± 0.07	84 ± 7	0.50	2	ne	3	ne			2	125 ± 22
	CPA	3	1.15 ± 0.16	79 ± 0	0.29	2	ne	3	ne			3	244 ± 93.3
	NES	4	0.25 ± 0.03	90 ± 5	1.34	3	ne	4	1.41 ± 0.41	40 ± 2	1.33	4	6.39 ± 4.00
	NGA	3	0.60 ± 0.22	92 ± 14	0.55	3	ne	3	ne			2	17.8 ± 6.99
	GRN	4	18.4 ± 5.11	50 ± 15	0.02	4	34.9 ± 15.0	4	ne			3	26.2 ± 11.3
	ETH	5	6.20 ± 0.61	55 ± 12	0.05	3	14.1 ± 4.42	2	ne			2	69.5 ± 8.17
	EDA	4	15.3 ± 4.80	62 ± 19	0.02	3	156 ± 117	3	ne			2	354 ± 295
	LYN	3	25.7 ± 10.8	56 ± 2	0.01	3	61.9 ± 13.2	4	ne			2	503 ± 110
	NEA	4	0.85 ± 0.57	90 ± 12	0.39	3	ne	3	ne			2	22.2 ± 0.55
	NET	3	0.93 ± 0.27	83 ± 4	0.35	4	ne	3	ne			2	34.3 ± 1.66
	TIB	6	9.97 ± 1.33	85 ± 6	0.03	2	ne	3	ne			1	146
	DSG	6	14.1 ± 6.80	72 ± 24	0.02	3	76.0 ± 51.2	3	ne			1	1002
	ENG	4	0.18 ± 0.04	94 ± 7	1.77	3	ne	3	ne			2	148 ± 98
	GES	3	0.14 ± 0.05	95 ± 5	2.43	3	ne	3	ne			2	15.2 ± 16.2
	LNG	4	0.16 ± 0.04	96 ± 6	2.08	3	ne	5	ne			2	14.0 ± 7.41
	NTE	5	1.11 ± 0.26	78 ± 10	0.30	3	ne	3	ne			2	77.4 ± 4.16
NGL	5	0.47 ± 0.12	101 ± 1	0.70	3	ne	3	ne			2	43.6 ± 17.2	
DRO	7	5.72 ± 1.38	60 ± 14	0.06	4	58.0 ± 66.1	5	14.1 ± 4.49	30 ± 6	0.13	4	16.1 ± 1.44	

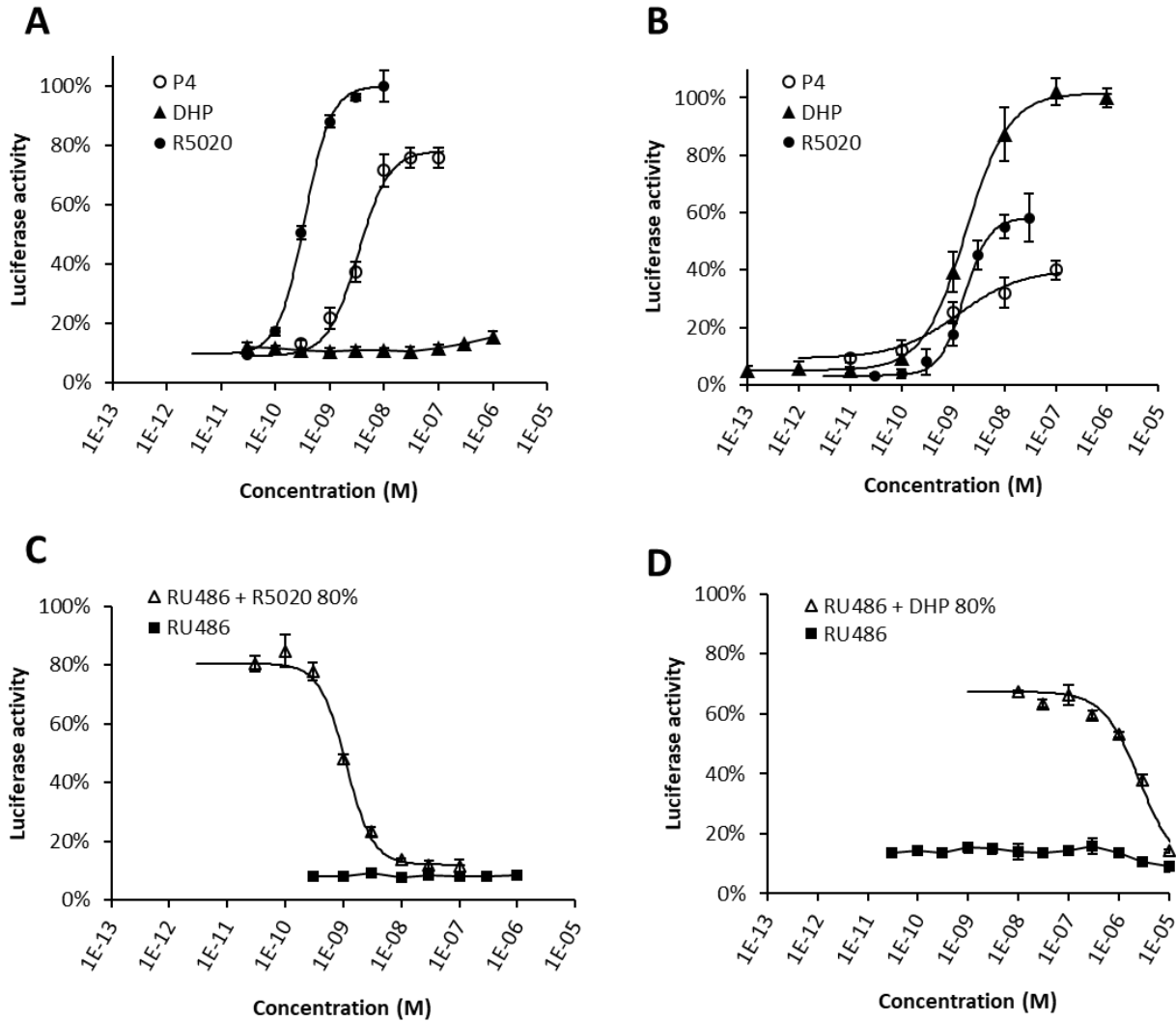


Figure 1: Transactivation of human and zebrafish nuclear progesterone receptor (hPR and zfPR respectively) by reference ligands in HELN-PRB or U2OS-zfPR cells expressing the reporter gene luciferase. $n \geq 3$ independent experiments. Results are expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 3×10^{-8} M R5020 or 3×10^{-8} M DHP, respectively. HELN-PRB cells (A) or U2OS-zfPR (B) cells were treated for 16h with indicated concentrations of progesterone (P4), $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) or promegestone (R5020), and mifepristone (RU486), to estimate half-maximal effective concentrations (EC_{50}) values shown in Table 2. (C) HELN-PRB cells were treated with indicated concentrations of mifepristone (RU486) alone or in combination with R5020 10^{-9} M inducing 80% of the luciferase activity (RU486 + R5020 80%). (D) U2OS-zfPR cells were treated with indicated concentrations of mifepristone (RU486) alone or in combination with

DHP 3×10^{-9} M inducing 80% of the luciferase activity (RU486 + DHP 80%). Error bars represent sd.

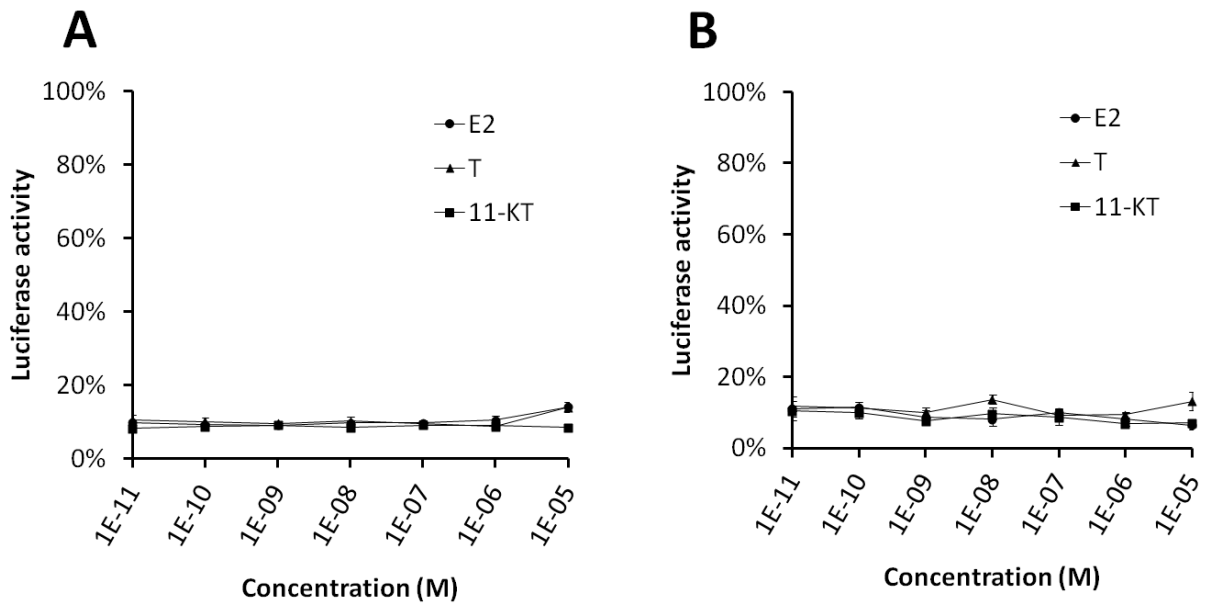


Figure 2: HELN-PRB cells (A) and U2OS-zfPR (B) cells were treated with indicated concentrations of 17 β -estradiol (E2) or testosterone (T). Results are expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 3x10⁻⁸M R5020 (A) or 3x10⁻⁸M DHP (B). Error bars represent sd.

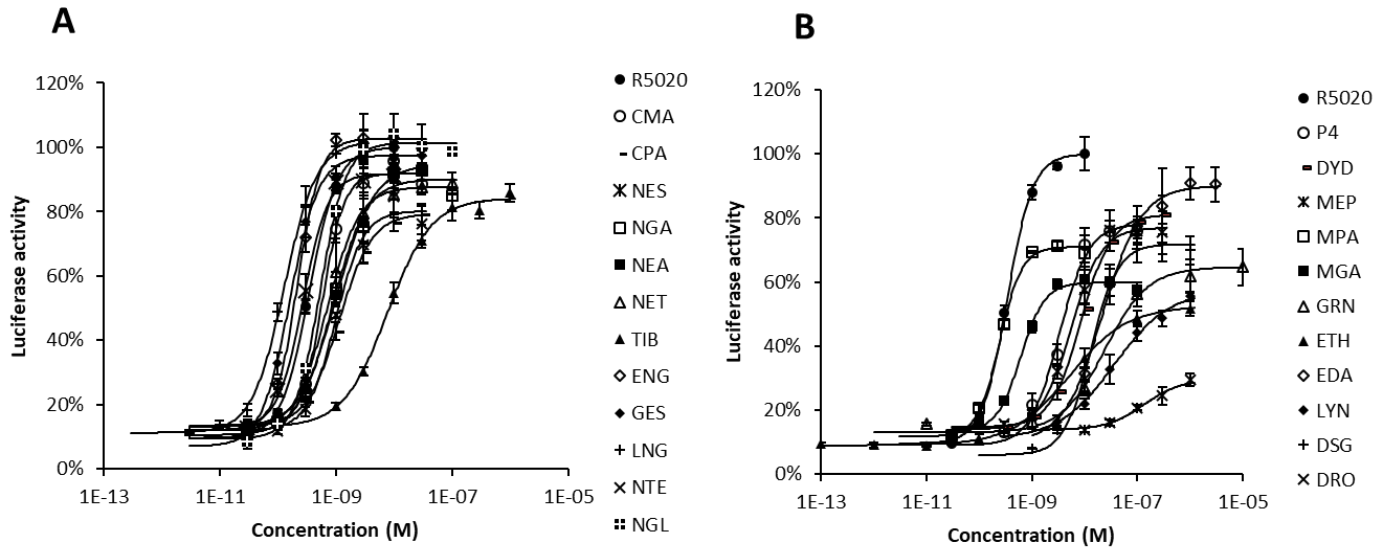


Figure 3: Transactivation of the human nuclear progesterone receptor (hPR) by progestins in HELN-PRB cells expressing the reporter gene luciferase. $n \geq 3$ independent experiments. Results are expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 3×10^{-8} M R5020. (A) Full agonists compounds of the hPR; (B) partial agonists compounds of the hPR. Error bars represent sd.

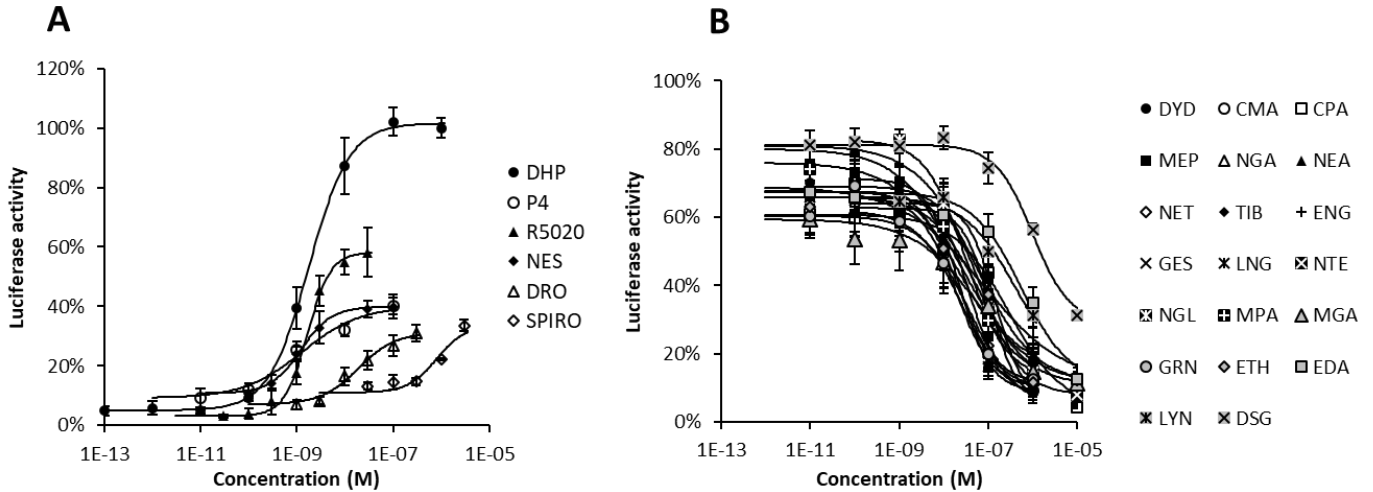
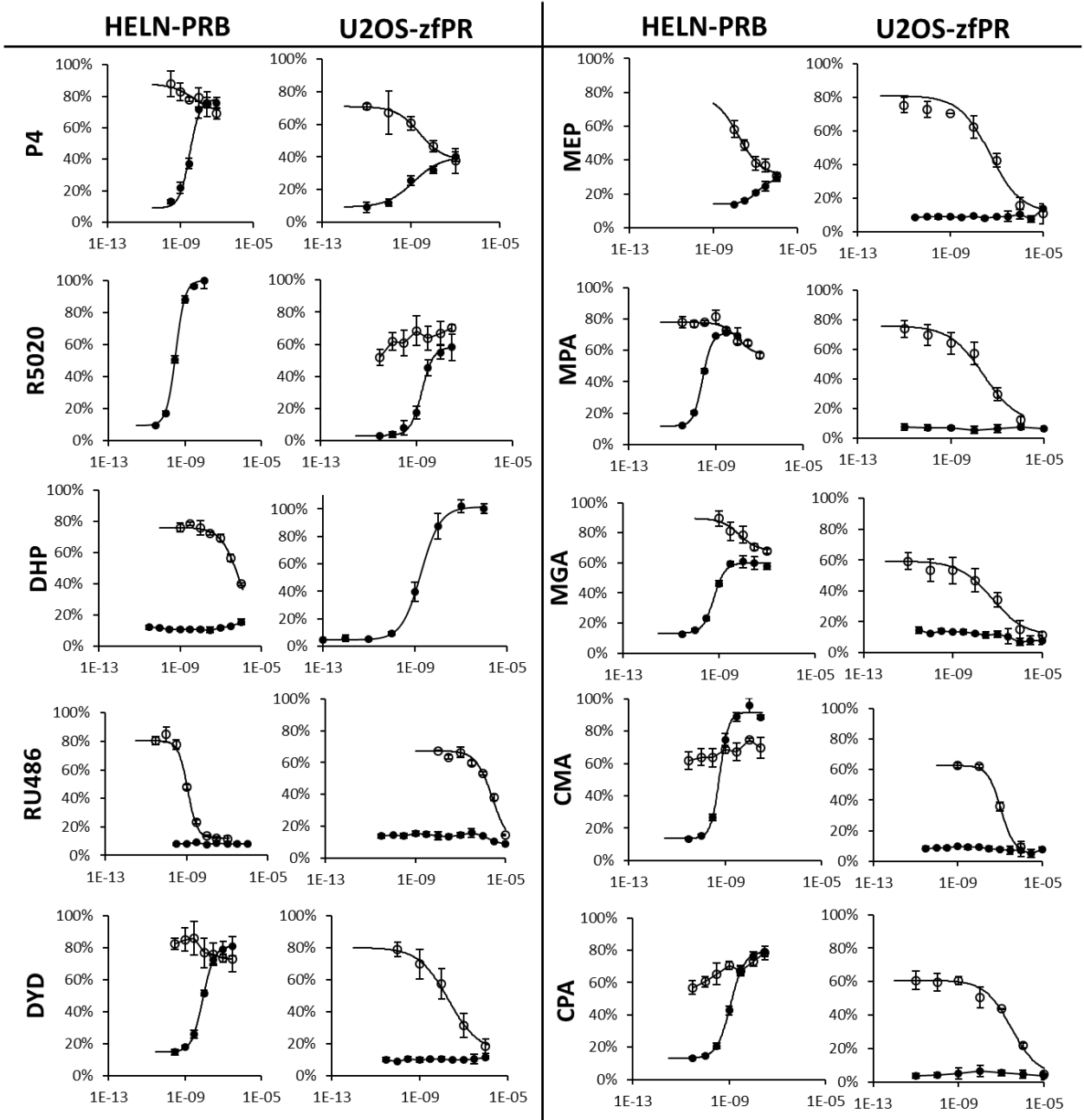
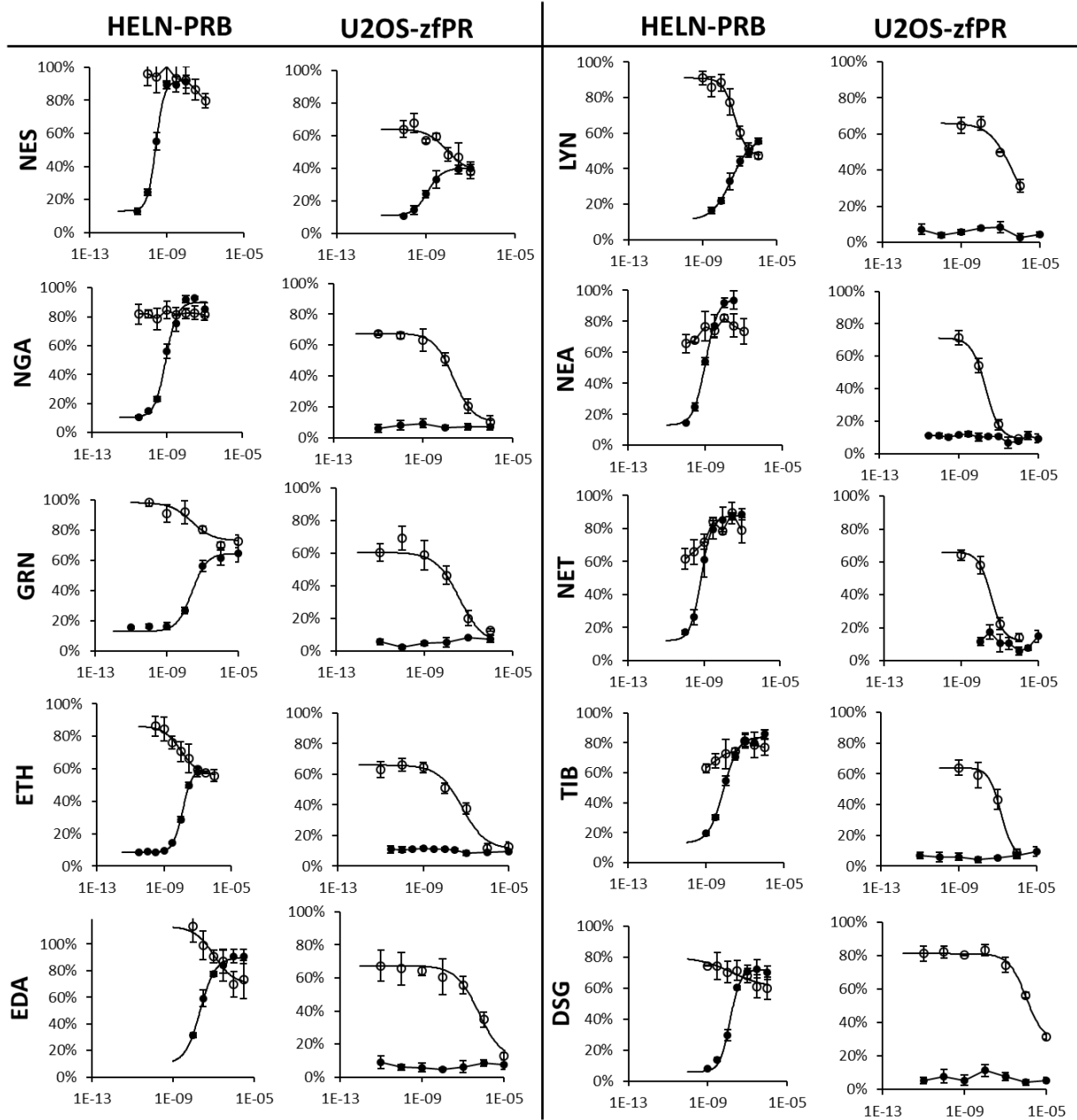


Figure 4: Transactivation zebrafish nuclear progesterone receptor (zfPR) by progestins in U2OS-zfPR cells expressing the reporter gene luciferase. $n \geq 3$ independent experiments. Results are expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 3×10^{-8} M DHP. (A) Agonist compounds of the zfPR; (B) antagonist compounds of the zfPR in U2OS-zfPR cells coexposed with progestins and DHP 3×10^{-9} M inducing 80% of the luciferase activity. Error bars represent sd.





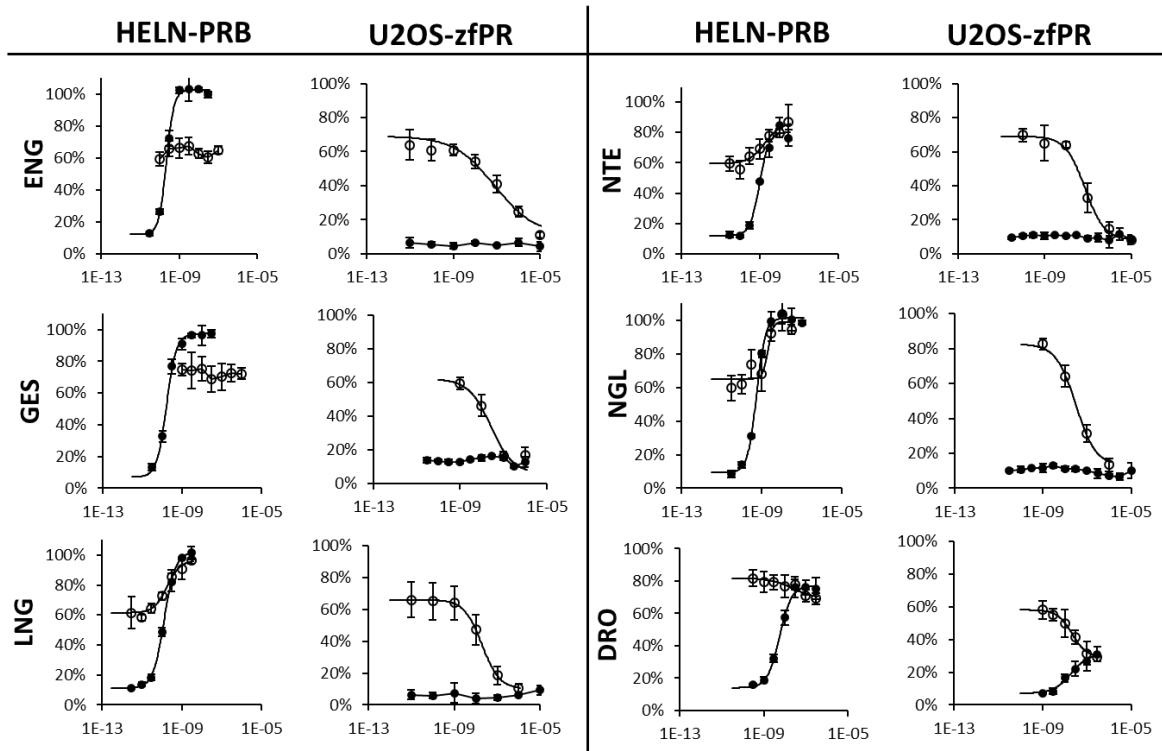


Figure 5: Typical dose-response curves of luciferase expression in the HELN-PRB and U2OS-zfPR cells after progesterin treatment. Cells were treated with DMSO (vehicle control), R5020 (positive control in HELN-PRB), DHP (positive control in U2OS-zfPR) and increasing concentrations of the tested progestins. Results are expressed as percentage of the maximum luciferase activity induced by 3×10^{-8} M R5020 in HELN-PRB or 3×10^{-8} M DHP in U2OS-zfPR. HELN-PRB and U2OS-zfPR were treated with progestins alone (black circles) or in coexposure with R5020 and DHP at concentrations inducing 80% of the maximum luciferase activity (10^{-8} M R5020 and 3×10^{-9} M respectively) (white circles). No activity was detected in procedural blanks (data not shown).

Effet du contexte cellulaire dans la réponse aux progestatifs : données complémentaires

L'objectif est de déterminer si le contexte cellulaire influence la réponse de nos bioessais aux progestatifs ou bien si les résultats obtenus sont spécifiques du récepteur. Pour cela, quelques progestatifs ont été testés sur deux lignées cellulaires transitoires U2OS-hPR (transfection jetPei) et HeLaS3-zfPR (transfection par électroporation) (N. Creusot et P. Balaguer, IRCM Montpellier, Inserm U1194).

Les résultats sont présentés dans le tableau 9. Les progestatifs progestérone (P4), promegestone (R5020) et mifepristone (RU486) ont induit des réponses similaires sur la lignée U2OS-PRB à celles obtenues dans l'article 1 sur la lignée HELN-PRB. L'acétate de medroxyprogestérone (MPA) et l'etonogestrel (ENG) ont induit l'activité luciférase sur les deux lignées avec des EC₅₀ inférieures dans la lignée U2OS-PRB (20 fois et 4,5 fois inférieures respectivement). L'effet antagoniste n'a en revanche pas été testé. La DHP n'a pas eu d'effet agoniste sur les cellules HELN-PRB mais a induit l'activité luciférase dans les cellules U2OS, bien que l'EC₅₀ calculée soit très importante (2404nM). Concernant l'activité des progestatifs vis-à-vis du récepteur zfPR, les composés de référence P4 et R5020 ont très légèrement induit l'activité luciférase (valeurs non calculées) sur les cellules HeLaS3-zfPR alors que leur activité sur U2OS-zfPR était plus importante. Sur les deux lignées zfPR, la DHP a eu un effet agoniste important et la RU486 n'a pas eu d'effet agoniste. Son effet antagoniste n'a pas été testé. Les progestatifs MPA et ENG ont antagonisé l'effet de la DHP sur les deux lignées zfPR.

Dans l'ensemble, les progestatifs activent les récepteurs de façon similaire dans les différents contextes cellulaires. Ces données montrent que les réponses de nos bioessais sont spécifiques du récepteur et non pas dépendantes du contexte cellulaire.

Tableau 9 : ECs et ICs en nM calculées sur les lignées HELN-PRB, U2OS-PRB, U2OS-zfPR et HeLaS3-zfPR. sd : déviations standard. ne : sans effet.

Composé	HELN-PRB		U2OS-PRB		U2OS-zfPR		HeLaS3-zfPR	
	EC ₅₀ ±sd (nM)	IC ₅₀ ±sd (nM)	EC ₅₀ ±sd (nM)	IC ₅₀ ±sd (nM)	EC ₅₀ ±sd (nM)	IC ₅₀ ±sd (nM)	EC ₅₀ ±sd (nM)	IC ₅₀ ±sd (nM)
P4	13,5 ± 7,14	17,1 ± 15,7	0,53 ± 0,71		1,97 ± 0,57	2,09 ± 0,33	+	
R5020	0,33 ± 0,10	-	0,21 ± 0,11		1,93 ± 0,60	-	+	
DHP	ne	576 ± 319	2404 ± 1744		1,87 ± 0,44	-	+++	
RU486	ne	1,04 ± 0,28	ne	3,46	ne	2253 ± 292	ne	
MPA	0,20 ± 0,05	8,08 ± 5,74	0,01		ne	30,0 ± 7,86	ne	antag.
ENG	0.18 ± 0.04	ne	0.04 ± 0.02		ne	148 ± 98	ne	antag.

Chapitre 2 : Évaluation des effets des progestatifs sur la voie de signalisation des œstrogènes

Synthèse de l'article 2 : Activité œstrogéno-mimétique des progestatifs in vivo***Contexte***

Chez les poissons, les études relatives aux mécanismes et aux effets perturbateurs endocriniens des progestatifs de synthèse se sont limités à un nombre restreint de composés et portent principalement sur les perturbations induites sur les organes périphériques et au niveau de la fonction de reproduction (Karl Fent, 2015; Kumar et al., 2015).

Comparativement, les effets de la P4 et des progestatifs de synthèse au cours du développement précoce dans le système nerveux central sont bien moins documentés. Cependant, des travaux récents indiquent que la drospirénone et la progestérone sont capables de déréguler différents gènes connus pour s'exprimer dans le cerveau (Zhao et al., 2015a; Zucchi et al., 2013, 2014) sans pour autant que les mécanismes sous-jacents soient élucidés. En réalité, les rôles de la P4 dans le cerveau sont actuellement mal connus. La P4 est connue pour réguler des signaux dans des régions du cerveau impliquées dans des réponses sexuelles comportementales mais aussi dans des régions non impliquées dans le comportement reproducteur (Graham & Clarke, 1997). Le récepteur PR est fortement exprimé et largement distribué dans différentes régions du SNC suggérant des fonctions qui vont bien au-delà de la fonction de reproduction. Dans le système nerveux central, la P4 exerce des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques importants (Brinton et al., 2008; Jayaraman & Pike, 2014). Chez le poisson zèbre, le nPR est largement distribué et est fortement exprimé dans l'aire pré-optique dans les neurones et les cellules gliales radiaires. La forte expression du nPR dans les cellules gliales radiaires œstrogéno-sensibles suggère une action de la P4 sur l'activité de ces cellules (Diotel, Servili, et al., 2011). Cependant, l'action de la P4 ou des progestatifs de synthèse via le nPR de poisson zèbre dans le cerveau semble peu probable étant donnée la faible activité ou l'absence d'activité agoniste de ces composés sur le récepteur nPR de poisson zèbre (voir article 1) ou chez d'autres espèces de téléostéens (P. a. Bain et al., 2015; Ellestad et al., 2014). Au contraire, les progestatifs de synthèse peuvent agir via d'autres récepteurs nucléaires et potentiellement induire des activités hormonales multiples (Besse & Garric, 2009; Karl Fent, 2015).

Objectifs

À la lumière de ce contexte, l'objectif était ici de renseigner des actions potentielles d'un ensemble de ligands progestatifs de synthèse sur la signalisation œstrogénique dans le système nerveux central. Le manuscrit suivant (article 2) présente les effets d'un large panel

de progestatifs sur l'expression dans les cellules gliales du gène *cyp19a1b* codant pour l'aromatase B grâce à l'utilisation d'un bioessai sur embryons de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b*-GFP (Brion et al., 2012). Les larves *cyp19a1b*-GFP expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b*. Ce gène est régulé par le récepteur des œstrogènes (ER-régulé) (Menuet et al., 2005). L'aromatase B est exprimée dans les cellules gliales radiaires (précurseurs des neurones) dans le cerveau des poissons zèbres et est responsable de l'aromatation d'androgènes en œstrogènes.

Résultats et discussion

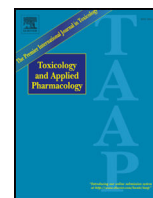
Nos résultats démontrent une absence d'activité œstrogénique de la progestérone et des ligands synthétiques dérivés sur l'expression de la GFP. Au contraire, les progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone présentent tous une activité œstrogénique et induisent de manière concentration-dépendante l'expression de la GFP avec des EC_{50} calculées entre 1,3 nM pour la molécule la plus active (tibolone) et 140 nM pour la moins active (ethistérone). Seul le désogestrel s'est révélé inactif alors que son métabolite actif, l'etonogestrel, exerce une activité œstrogénique. Parmi l'ensemble de ces ligands, seule la drospirénone réduit l'intensité de la fluorescence basale, suggérant une activité anti-œstrogénique.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets des progestatifs sur la signalisation œstrogénique chez le poisson zèbre, des expérimentations *in vitro* ont été réalisées dans des cellules humaines U251-MG cotransfectées avec l'un des trois récepteurs zfERs (zfER α , β 1 ou β 2) et le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur *cyp19a1b* de poisson zèbre. Dans ces cellules, la progestérone n'induit pas l'expression de la luciférase, ce qui confirme les résultats obtenus *in vivo*. Le levonorgestrel et la norethistérone ont induit l'activité luciférase à 10^{-6} M quel que soit le sous-type de récepteur ER, ces effets étant supprimés par ICI 182-780.

Dans les lignées hépatiques ZELH-zfER α et ZELH-ZfER β 2, le levonorgestrel et la norethistérone se comportent comme des ligands agonistes œstrogéniques partiels avec des EC_{50} variant de 2×10^{-7} M à 4×10^{-7} M (levonorgestrel) et de $2,5 \times 10^{-8}$ M à 8×10^{-8} M (norethistérone) selon le sous-type de zfER considéré. Ces résultats démontrent une différence de réponse des modèles *in vitro* utilisés, les cellules hépatiques produisant des réponses complètes typiques de ligands agonistes partiels (résultats non montrés dans l'article 2). Des expérimentations de *binding* ont démontré une absence ou une très faible affinité de ces

composés pour les récepteurs ER de poisson zèbre. L'ensemble de ces résultats suggère donc une étape de métabolisation préalable de ces composés en métabolites capables de se lier et d'activer les ER pour stimuler la signalisation œstrogénique. Ces données vont dans le sens de celles obtenues chez les mammifères, chez qui la 5 α -réductase jouerait un rôle prépondérant dans la formation des métabolites œstrogéniques tetra-hydroxylés du levonorgestrel et de la norethistérone. Cependant, des co-expositions de poisson zèbre au levonorgestrel ou à la norethistérone avec un inhibiteur enzymatique de la 5 α -réductase, la finastéride, n'a pas permis de bloquer l'induction de la GFP.

En conclusion, ces expérimentations ont permis de caractériser le potentiel œstrogénique d'un ensemble de ligands naturels et synthétiques du récepteur PR dans des modèles *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre. Nous démontrons une activité œstrogénique pour l'ensemble des progestatifs de synthèse dérivés de la 19-nortestostérone en induisant l'expression de *cyp19a1b* dans les cellules gliales radiaires. Étant donné le rôle essentiel des cellules gliales radiaires et des neuro-œstrogènes aux stades précoces du développement du cerveau, les conséquences de l'exposition des poissons à ces composés nécessitent d'être davantage investiguées.



Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish



Joel Cano-Nicolau^{a,1}, Clémentine Garoche^{b,1}, Nathalie Hinfray^b, Elisabeth Pellegrini^a, Nouredine Boujrad^c, Farzad Pakdel^c, Olivier Kah^{a,*}, François Brion^{b,*}

^a Team NEED, Institut de recherche en Santé Environnement et Travail (Irset), INSERM U1085, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, SFR Biosit, 35042 Rennes cedex, France

^b Unité d'Ecotoxicologie in vitro et in vivo, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^c TREK, Institut de recherche en Santé Environnement et Travail (Irset), INSERM U1085, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, SFR Biosit, 35042 Rennes cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2016

Revised 24 May 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 28 May 2016

Keywords:

Progestins
Brain aromatase
Radial glial cells
cyp19a1b-GFP
Zebrafish

ABSTRACT

The effects of some progestins on fish reproduction have been recently reported revealing the hazard of this class of steroidal pharmaceuticals. However, their effects at the central nervous system level have been poorly studied until now. Notwithstanding, progesterone, although still widely considered primarily a sex hormone, is an important agent affecting many central nervous system functions. Herein, we investigated the effects of a large set of synthetic ligands of the nuclear progesterone receptor on the glial-specific expression of the zebrafish brain aromatase (*cyp19a1b*) using zebrafish mechanism-based assays. Progesterone and 24 progestins were first screened on transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. We showed that progesterone, dydrogesterone, drospirenone and all the progesterone-derived progestins had no effect on GFP expression. Conversely, all progestins derived from 19-nortestosterone induced GFP in a concentration-dependent manner with EC₅₀ ranging from the low nM range to hundreds nM. The 19-nortestosterone derived progestins levonorgestrel (LNG) and norethindrone (NET) were further tested in a radial glial cell context using U251-MG cells co-transfected with zebrafish ER subtypes (zER α , zER β 1 or zER β 2) and *cyp19a1b* promoter linked to luciferase. Progesterone had no effect on luciferase activity while NET and LNG induced luciferase activity that was blocked by ICI 182,780. Zebrafish-ERs competition assays showed that NET and LNG were unable to bind to ERs, suggesting that the effects of these compounds on *cyp19a1b* require metabolic activation prior to elicit estrogenic activity. Overall, we demonstrate that 19-nortestosterone derived progestins elicit estrogenic activity by inducing *cyp19a1b* expression in radial glial cells. Given the crucial role of radial glial cells and neuro-estrogens in early development of brain, the consequences of exposure of fish to these compounds require further investigation.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

During the past twenty years, numerous studies have examined the effects of estrogenic compounds because these substances were among the first identified as endocrine disrupting compounds (EDCs) responsible for the feminization of wild populations of fish observed worldwide (Sumpter, 2005). Among the most studied xeno-estrogens, a particular attention has been paid to 17 α -ethinylestradiol (EE2), a potent synthetic steroidal estrogen used as pharmaceuticals in contraceptive pills. From these multiple studies, the mechanism of action and the adverse effects of EE2 on reproductive fitness of aquatic species have been largely documented (e.g., Nash et al., 2004, Kidd et al., 2007, Vosges et al., 2010, Frye et al., 2012; Soffker and Tyler, 2012), which permitted the

derivation of Environmental Quality Standard (EQS) for freshwater community (E.C., 2011) and the inscription of EE2 on the watch list of the Water Framework Directive.

In addition to (xeno)-estrogens, there is now evidence of the occurrence of other natural and synthetic steroids released from urban, hospital or industrial waste water treatment plants (WWTPs) effluents (Van der Linden et al., 2008, Chang et al., 2011). In a recent study, the release of hormonally active pharmaceuticals from an industrial WWTP effluent has been associated with altered reproductive physiological functions such as abnormal vitellogenin synthesis, intersex and altered sex-ratio in wild population of gudgeon (Sanchez et al., 2011, Creusot et al., 2014); thereby stressing the need to increase our knowledge of the effects of steroidal pharmaceuticals on aquatic organisms and ecosystems (Creusot et al., 2014, Fent, 2015).

Among steroidal pharmaceuticals, several authors have pointed out the hazard and risks posed by synthetic progestogens on aquatic species (Sumpter 2005, Besse and Garric, 2009, Runnalls et al., 2010, Svensson et al., 2013, Svensson et al., 2014, Säfholm et al., 2014, Fent, 2015).

* Corresponding authors.

E-mail addresses: oliver.kah@univ-rennes1.fr (O. Kah), francois.brion@ineris.fr (F. Brion).

¹ Contribute equally to this work.

Progestagens, also called gestagens or progestins are widely used, not only in the formulation of contraceptive pills, but also in various medical applications such as hormone replacement therapy, secondary amenorrhea, dysfunctional uterine bleeding, endometriosis, and in the treatment of several cancers. A large number of progestins that are used as active ingredients of contraceptive pills are used either alone or in combination with estrogens. Part of them are 19-norprogesterone derivatives, often termed pure progestational molecules since they act only through progesterone receptor (Sitruk-Ware, 2008). This progesterone-derived group includes notably medroxy-progesterone, medroxy-progesterone acetate and nesterone. A second group, referred to as testosterone-derivatives (19-Nortestosterone), includes estranes that have a methyl group at the C13 position and gonanes that do not. Among estranes figure ethisterone, norethindrone (NET; also known as norethisterone), norethindrone acetate, ethynodiol-diacetate, tibolone and etonogestrel. Gonanes include compounds such as levonorgestrel, desogestrel, gestodene and norgestimate (Kumar et al., 2015; Sitruk-Ware, 2008). Finally, new molecules have been produced recently, notably drospirenone, a derivative of spironolactone and an aldosterone antagonist (Kumar et al., 2015; Sitruk-Ware, 2008).

The presence of progestins in aquatic environments is much less documented as compared to xeno-estrogens and available data are limited to only few of them (Kumar et al., 2015; Fent, 2015). Furthermore, it is noteworthy that nothing is known about the potential occurrence of their transformation products issued from biotic and/or abiotic process in aquatic environment. Notwithstanding, various studies reported that some progestins can be detected in industrial and urban WWTPs influents and effluents or surface waters at concentration ranging from low nanograms per liter up to 50 ng/L while in animal farm waste and runoff, their concentrations can reach high levels up to $\mu\text{g/L}$ (Chang et al., 2011; Labadie and Budzinski, 2005; Creusot et al., 2014, for reviews see Orlando and Ellstad, 2014, Kumar et al., 2015 and Fent, 2015). Importantly, recent research performed on different fish and frog vertebrate models documented that some synthetic progestins disrupted expression of hormono-regulated genes and altered reproductive outputs at environmentally relevant concentrations (Bluthgen et al., 2013; Han et al., 2014; Liang et al., 2015; Overturf et al., 2014; Säfholm et al., 2015; Zucchi et al., 2014).

Up to now, studies on the environmental effects of progestins in aquatic species are limited to only few progestins. They mainly focused on peripheral organs, such as liver and gonads, in mature fish and pointed out the risk posed by these substances on fish reproduction (Zeilinger et al., 2009; Paulos et al., 2010; Runnalls et al., 2013). Conversely, investigations on the effects of progesterone and progestins at early developmental stages of fish at the central nervous system are scarce. Notwithstanding, significant dysregulation of various genes in the brain of female zebrafish following exposure to drospirenone, a spironolactone derivative, and progesterone have been recently reported (Zucchi et al., 2013; Zucchi et al., 2014; Zhao et al., 2015). However, the underlying mechanisms are still poorly understood. The mechanisms by which progesterone acts in the brain are not fully defined; however in mammals progesterone is known to regulate signals in the brain involving sexually responsive behavior and also to affect gene expression in areas of the brain not involved in sexual behavior (Graham and Clarke, 2011). Nuclear progesterone receptor (nPR) are strongly expressed and exhibit a very large distribution within the brain, suggesting that the central actions of progestagens in fish probably extend beyond reproductive functions possibly including neurogenesis, neuronal plasticity, and/or neuroprotection (Diotel et al., 2011a). Recent data in zebrafish clearly show that nuclear progesterone receptor (nPR) was found to be highly expressed in the preoptic region of the hypothalamus (Hanna et al., 2010). nPR is expressed both neurons and radial glial cells (Diotel et al., 2011b) and the stronger expression of nPR in estrogen-synthesizing radial glial cells suggests a key role of steroids and a probably local action of neurosteroids on radial glial cells activity (Diotel et al., 2011b).

In zebrafish, nuclear progesterone receptor (nPR) was found to be highly expressed in the preoptic region of the hypothalamus (Hanna et al., 2010), but the effects of progestins through nPR would be minimal given that several progestins seems unable to activate nPR in different fish species (Bain et al., 2015; Ellestad et al., 2014). Conversely, they may act through other pathways as they can interfere with multiple nuclear steroid receptors (e.g., androgen, glucocorticoid, mineralocorticoid and estrogen receptors) potentially inducing multiple hormonal activities (Besse and Garric, 2009; Fent, 2015).

In light of this context, this work aimed to assess the effects of progesterone (P4) and a large set of (anti-)progestins on the brain aromatase in zebrafish embryos, a commonly recognized alternative model in (eco)toxicology (Strähle et al., 2012). Brain aromatase, encoded by the *cyp19a1b* gene, is the enzyme responsible for the biosynthesis of neuro-estrogens. We have previously shown that *cyp19a1b* expression is strongly stimulated by estrogens and that the estrogen-dependent *cyp19a1b* up-regulation requires the presence of functional estrogen receptors (ERs) and a glial X factor (Menuet et al., 2005; Le Page et al., 2008). Furthermore, we showed that expression of brain aromatase is restricted to radial glial cells of embryonic and adult zebrafish (Menuet et al., 2005; Tong et al., 2009).

In the present work, the concentration-dependent effects of P4 and 24 (anti-)progestins (see Table 1) on brain aromatase were quantified using the EASZY assay, a mechanism-based assay in tg(*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryos, that detects substances acting through estrogen receptors (Brion et al., 2012). Among the progestins tested, the molecular mode of action of two of them, levonorgestrel (LNG) and norethindrone (NET) were then further studied in the ER negative glial cell line U251-MG co-transfected with estrogen receptor zfER α , zfER β 1, or zfER β 2 (Menuet et al., 2002) together with a reporter luciferase gene linked to 500pb of the proximal promoter of zf *cyp19a1b* (Le Page et al., 2006).

Herein, we reported that all the 19 nor-testosterone derivatives induced an early developmental effect in the developing brain of zebrafish by targeting radial glial cells and inducing brain aromatase through an ER-dependent mechanism at concentrations ranging from the low nM to hundreds nM. The estrogenic effect likely required metabolic activation of the parent compounds into estrogenic metabolites as they do not bind to zfERs. The (eco)toxicological relevance of this findings is discussed as regards the potential impact of progestins on fish on (neuro)-development.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

17 β -estradiol (E2), 17 α -ethinylestradiol (EE2), testosterone (T), pregnenolone (P5), progesterone (P4), dydrogesterone (DYD), medroxyprogesterone (MEP), medroxyprogesterone acetate (MPA), megestrol acetate (MGA), chlormadinone acetate (CMA), cyproterone acetate (CPA), promegestone (R5020), nesterone (NES), nomegestrol acetate (NGA), ethisterone (ETH), ethynodiol diacetate (EDA), lynestrenol (LYN), norethindrone acetate (NEA), norethindrone (NET), tibolone (TIB), desogestrel (DSG), etonogestrel (ENG), gestodene (GES), levonorgestrel (LNG), norgestimate (NTE), norgestrel (NGL), drospirenone (DRO), mifepristone (RU486), finasteride (FIN) and trislostane (TRI) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Louis, MO). Gestonorone (GRN) was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). ICI 182-780 (ICI) was purchased from Tocris (USA). Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C . Fresh dilutions of test chemicals were prepared before each experiment.

2.2. Animals and exposures to EDCs: EASZY assay

Fertilized tg(*cyp19a1b*-GFP) zebrafish eggs were exposed to chemicals or to solvent control (DMSO; 0.01% v/v). Each experimental

group consisted of 20 embryos exposed in 25 mL of water. Embryos were kept in an incubator at 28 °C, under semi-static conditions. Exposures were performed from 0 to 4 days post-fertilization (dpf). At the end of the exposure period, 4-dpf old zebrafish were processed for fluorescence measurement by *in vivo* imaging using wide-field fluorescence microscopy. Each chemical was tested at least twice.

2.3. *In vivo* imaging: wide-field fluorescence microscopy

Live tg(*cyp19a1b*-GFP) embryos were observed in dorsal view and each was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope equipped with a AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Only the head was photographed using a X10 objective, with a 134 ms exposure time at maximal intensity. Photographs were analyzed using the Zen software and fluorescence quantification was realized using the ImageJ software. For each picture, the integrated density was measured, *i.e.* the sum of the gray-values of all the pixels within the region of interest. A gray-value of 290 was defined as background value.

2.4. Plasmid constructs

The zfER- α , zfER- β 1, and zfER- β 2 expression vectors correspond to TOPO-pcDNA3 expression vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA), containing the coding regions of each cDNA receptor sequence as previously described (Menuet et al., 2002). The *cyp19a1b*-luciferase reporter gene consists of 500pb of the proximal promoter region of zebrafish *cyp19a1b* containing an estrogen response element (ERE), coupled to the luciferase reporter gene, as previously described (Menuet et al., 2005).

2.5. *In vitro* transcription/translation of zfERs

To synthesize zfER proteins, we performed an *in vitro* translation reaction using the TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems kit (Promega) and adding 1 μ g of each ER expression vector. The transcend Non-Radioactive Translation Detection Systems kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) was used to visualize all three receptors.

2.6. Cell culture and transfection

Cell culture and transfection were performed according to Le Page et al. (2006). In brief, U251-MG cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere in phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2.5% non-steroid fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France). The medium was also supplemented with 1 mM Na-Pyruvate (Life Technologies, Saint Aubin, France), 4 mM L-glutamine, and the antibiotics penicillin (20 U/mL), streptomycin (20 μ g/mL), and amphotericin B (50 ng/mL) (Gibco, Carlsbad, CA, USA). For transfection, cells were plated in 24-well plates at a density of 0.25×10^5 cells/mL. In each well, 25 ng of expression vector, 25 ng of cytomegalovirus- β -galactosidase plasmid and 150 ng of luciferase reporter construct were transfected using jetPEI transfection reagent (Polyplus, Transfection, Illkirch, France). After one night, medium was replaced with fresh DMEM with xenoestrogen or vehicle. Luciferase activity was measured 24 h later, using the luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA). β -galactosidase activity was used to normalize transfections efficiency in all experiments. Each experiment was performed in triplicate.

2.7. Estradiol receptor binding studies

The binding properties of LNG and NET to all three zfERs were monitored by radioactive competition assay (Blair et al., 2000). Cytosol aliquots of zfERs were incubated with 10^{-9} M [³H]-E2 at 4 °C overnight, in the absence or presence of increasing concentrations of radioinert E2 (10^{-11} M; 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M) and both synthetic

progestagens LNG and NET (10^{-11} M; 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M). The relative binding affinities of the compounds for cytosolic zfER were evaluated by their capability to displace [³H]-E2 from the zfER binding site. The results were expressed as a percentage of displaced [³H]-E2 binding. The 10^{-7} M E2 contained a 100-fold excess of radioinert E2 compared to [³H]-E2 and thus represents the non-specific binding (Blair et al., 2000).

2.8. Data analysis

Chemicals were tested in at least two independent experiments. Data are expressed as a mean fold induction above solvent control \pm standard error of the mean (SEM). Concentration–response curves were modeled using the Regtox 7.0.6 Microsoft Excel TM macro (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC₅₀. For a given chemical, EC₅₀ was defined as the concentration inducing 50% of its maximal effect. Data were first checked for normality using Shapiro-Wilk test, then homogeneity of variances was checked using Fligner-Killeen test. An ANOVA one-way test was used for the analysis of the variance, followed by Tukey HSD post-hoc test. When the data were not normal, they were log-transformed. If the data were still not normal data or the variances non-homogenous, Kruskal-Wallis test was used for the analysis of the variance. All analyses were conducted in R.

3. Results





























3.1. Effects of progestins on GFP expression in transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos (EASZY assay)

The concentration-dependent-responses of E2, T, P5 as well as P4 and synthetic nPR agonists and antagonist ligands were first established on tg *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos assay. For each compound the effects were quantified using *in vivo* imaging (Fig. 1) and ECs were derived for active compounds (Table 2, Fig. S1). As expected, E2 and T induced GFP expression in a concentration-dependent manner. P5 also significantly up-regulated GFP expression while P4 and its isomer DYD, as well as progestins structurally related to progesterone showed no effect on GFP expression in the radial glial cells of zebrafish (fig. S1). This includes the compounds derived from 17 α -hydroxyprogesterone (MEP, MPA, MGA, CMA and CPA), the compounds derived from 19-norprogesterone (R5020, NES and NGA) and GRN derived from 17 α -hydroxy-19-norprogesterone (Table 2, Fig. S1). Conversely, the progestins derived from 19-nortestosterone ETH, EDA, LYN, NEA, NET, TIB, ENG, GES, LNG, NTE, and NGL induced the expression of GFP in the radial glial cells of zebrafish (Fig. 1). Each of these compounds induced GFP in a concentration-dependent manner (Fig. S1), with EC₅₀ calculated between 0.3 nM for the most active compound (TIB) and 222 nM for the less active (GES) (Table 2). The 19-nortestosterone derived progestin DSG and the nPR antagonist RU486 showed a weak estrogenic effect at the highest tested concentration (10^{-6} M) (Fig. 1, Fig. S1). The progestin derived from spironolactone DRO did not induce GFP expression compared to the solvent control.

3.2. Mode of action of LNG and NET using U251-MG cell lines

In order to get further insights on the mechanisms underlying those estrogenic effects, we used an *in vitro* assay previously developed in our laboratory using the ER negative human astrocyte cell line U251-MG (Le Page et al., 2006; Menuet et al., 2005). To study the respective role of each zfER, cells were co-transfected with one of the three subtypes (zfER α , zfER β 1, or zfER β 2) and the luciferase gene under the control of *cyp19a1b* promoter. The cells were treated for 24 h with the different compounds. Fig. 2 shows that, as expected, E2 (10^{-8} M) used as a positive control caused a strong induction with the three receptors. As documented before (Le Page et al., 2006), the fold induction was much

Table 1
Classification of some natural hormones and natural and synthetic nPR ligands.

Classification	Compound	Abbreviation	Uses	Molecular weight (g/mol)	CAS	Structure		
Natural estrogen	17 β -estradiol	E2	Clinical use	272.38	50-28-2			
Natural androgen	Testosterone	T	Clinical use	288.42	58-22-0			
Natural hormone	Pregnenolone (progesterone precursor)	P5	Clinical use	316.48	145-13-1			
Endogenous progestin in human and fish	Progesterone	P4	Clinical use	314.46	57-83-0			
Synthetic progestin retroprogesterone	Dydrogesterone	DYD	Clinical use	312.45	152-62-5			
Progestins structurally related to progesterone	Derived from 17 α -hydroxyprogesterone	Medroxyprogesterone	MEP	Clinical use	344.49	520-85-4		
		Medroxyprogesterone acetate	MPA	Clinical use	386.52	71-58-9		
		Megestrol acetate	MGA	Clinical use	384.51	595-33-5		
		Chlormadinone acetate	CMA	Clinical use	406.94	302-22-7		
	Derived from 19-norprogesterone	Cyproterone acetate	CPA	Clinical use	416.94	427-51-0		
		Promegestone	R5020	Clinical use	326.47	34,184-77-5		
		Nestorone	NES	Clinical use	370.48	7759-35-5		
		Nomegestrol acetate	NGA	Clinical use	370.48	58,652-20-3		
	Progestins structurally related to testosterone: derived from 19-nortestosterone	Derived from 17 α -hydroxy-19-norprogesterone	Gestonorone	GRN	Clinical use of gestonorone caproate	316.43	2137-18-0	
			Ethinodiol diacetate	ETH	Stopped	312.45	434-03-7	
Estranes		Ethinodiol diacetate	EDA	Clinical use	384.51	297-76-7		
		Lynestrenol	LYN	Clinical use	284.44	52-76-6		
		Norethindrone acetate	NEA	Clinical use	340.46	51-98-9		
		Norethindrone	NET	Clinical use	298.42	68-22-4		
		Tibolone	TIB	Clinical use	312.4	5630-53-5		
		Gonanes	Desogestrel	DSG	Clinical use	310.47	54,024-22-5	
			Etonogestrel	ENG	Clinical use, metabolite of desogestrel	324.45	54,048-10-1	
			Gestodene	GES	Clinical use	310.43	60,282-87-3	
Levonorgestrel	LNG		Clinical use	312.45	797-63-7			
Progestin structurally related to spironolactone	Gonanes	Norgestimate	NTE	Clinical use	369.50	35,189-28-7		
		Norgestrel	NGL	Clinical use	312.45	6533-00-2		
		Drospirenone	DRO	Clinical use	366.49	67,392-87-4		
PR antagonist	Mifepristone	RU486	Clinical use	429.60	84,371-65-3			

stronger with zfER α (25 to 35 times) than with zfER β 1 (10 to 15), or zfER β 2 (15 to 20). In contrast, P4 at concentrations of 10⁻⁹ M to 10⁻⁶ M had absolutely no effect with zfERs (Fig. 2A–F), confirming the results obtained *in vivo*. Fig. 3(A–C) shows that NET causes luciferase induction at 10⁻⁷ M and 10⁻⁶ M, however at the concentration of 10⁻⁷ M, the effect was significant only with zfER β 2. In the context of the U251-MG cells, these effects were completely blocked by ICI

182,780 (10⁻⁶ M), which had no effect by itself. It should be noted that the maximal induction caused by NET on zfER β 2 is within the same range than that observed with zfER α (around 12 times). LNG also increased luciferase expression but only at 10⁻⁶ M and the maximal induction was much lower (around 2–3 times) than with NET (Fig. 4A–C). In the same way these effects were fully blocked by ICI 182,780 at 10⁻⁶ M (Fig. 4D–F).

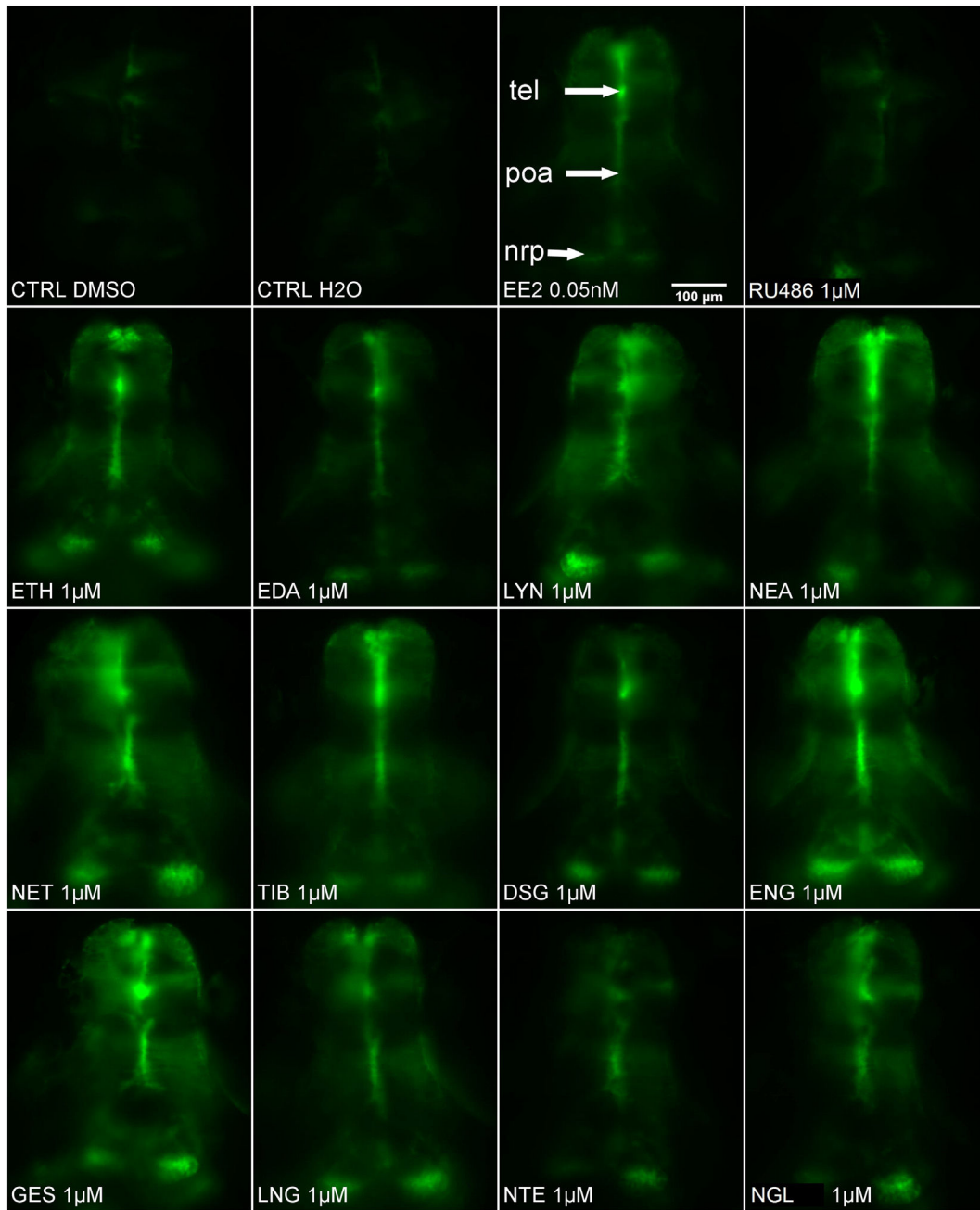


Fig. 1. *In vivo* imaging of 4 dpf old live transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos exposed to progestins inducing GFP expression in radial glial progenitors. Dorsal views. For each chemical the concentration used is indicated. CTRL: solvent control, H2O: water control, EE2: 17 α -ethinylestradiol, RU486: mifepristone, ETH: ethisterone, EDA: ethynodiol diacetate, LYN: lynestrenol, NEA: norethindrone acetate, NET: norethindrone, TIB: tibolone, DSG: desogestrel, ENG: etonogestrel, GES: gestodene, LNG: levonorgestrel, NTE: norgestimate, NGL: norgestrel. tel: telencephalon; poa: preoptic area; nrp: nucleus recessus posterioris of the caudal hypothalamus. Scale bar = 100 μ m.

3.3. Binding activity of NET and LNG on the three zfERs

In order to investigate whether the estrogenic activities of NET and LNG *in vivo* and *in vitro* were due to a direct activation of zfER, we monitored the binding properties of these compounds to the three zfER expressed *in vitro*. Fig. 5A–C shows that, in contrast to E2 that started displacing [3 H]-E2 binding at 10^{-10} M (zfER β 2) or 10^{-9} M (zfER α and zfER β 1), both progestins NET and LNG did not yield any displacement at a concentration of 10^{-6} M. Only concentrations of 10^{-5} M or 10^{-4} M were effective in reducing [3 H]-E2 (data not shown).

3.4. Effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride and 3 β -5 α -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostan on the estrogenic effects of LNG and NET

Because progestins showed no binding to zfERs at relevant concentrations that exhibited *in vivo* and *in vivo* estrogenic activity, we investigated whether the estrogenic effects could be due to metabolism of these compounds by 5 α -reductase and/or 3 β -5 α -hydroxysteroid dehydrogenase as shown in mammals. Exposure of zebrafish to finasteride and trilostane alone had no effect on *cyp19a1b* expression neither *in vivo* nor *in vitro* (Figs. S2–S5). Finasteride and trilostane at a

Table 2

Effects of some natural hormones and synthetic progestins on the EASZY assay, calculated effective concentrations (EC₂₀ and EC₅₀ expressed in nM) and relative estrogenic potency (REP) for active compounds. +: GFP induction, ne: no effect, nc: not calculated.

Classification	Compound	Abbreviation	Effect in EASZY	EC ₂₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	REP
Natural estrogen	17β-estradiol	E2	+	0.62	1.7	1
Natural androgen	Testosterone	T	+	337	505	0.003
Natural hormone	Pregnenolone (progesterone precursor)	P5	+	105	826	0.002
Endogenous progestin in human and fish	Progesterone	P4	ne	—	—	—
Synthetic progestin retroprogesterone	Dydrogesterone	DYD	ne	—	—	—
Progestins structurally related to progesterone	Derived from 17α-hydroxyprogesterone	Medroxyprogesterone	ne	—	—	—
		Medroxyprogesterone acetate	ne	—	—	—
		Megestrol acetate	ne	—	—	—
		Chlormadinone acetate	ne	—	—	—
		Cyproterone acetate	ne	—	—	—
	Derived from 19-norprogesterone	Promegestone	ne	—	—	—
		Nestorone	ne	—	—	—
		Nomegestrol acetate	ne	—	—	—
	Derived from 17α-hydroxy-19-norprogesterone	Gestonorone	ne	—	—	—
	Progestins structurally related to testosterone: derived from 19-nortestosterone	Estranes	Ethisterone	+	5.5	40
Ethinodiol diacetate			+	34	53	0.03
Lynestrenol			+	3.5	16	0.1
Gonanes		Norethindrone acetate	+	0.4	2.4	0.7
		Norethindrone	+	1	4.0	0.4
		Tibolone	+	0.1	0.3	5.7
		Desogestrel	+ ^a	nc	nc	nc
		Etonogestrel	+	7	39	0.04
		Gestodene	+	41	222	0.008
		Levonorgestrel	+	39	89	0.02
Progestin structurally related to spironolactone PR antagonist		Norgestimate	+	65	126	0.01
		Norgestrel	+	73	184	0.009
		Drospirenone	ne	—	—	—
	Mifepristone	RU486	+*	nc	nc	nc

^a Induction of GFP in tg *cyp19a1b*-GFP embryos only at 10⁻⁶ M.

concentration of 10⁻⁶ M failed to prevent the GFP induction caused by NET and LNG in tg(*cyp19a1b*-GFP) embryos (Figs. S2–S4 respectively). Similarly, finasteride and trilostane had no or very little effect on LNG- and NET-induced *cyp19a1b*-luciferase in the U251-MG cells, (Fig. S3–S5). Surprisingly, finasteride caused a significant reduction of the NET luciferase induction, but only with the zFERβ1.

4. Discussion

4.1. All 19-nortestosterone derived progestins up-regulate brain aromatase in an ER-dependent manner

We used the EASZY assay as a screening tool to establish concentration-response curves for 4 natural steroids and 24 (anti-)progestins on *cyp19a1b* expression, hence covering all chemical classes to which progestins belong to. Among all the tested compounds, 17β-estradiol (E2) was, as expected, the most active steroid on brain aromatase while testosterone exhibited a weaker estrogenic activity that likely results from its active aromatization into estradiol (Mouriec et al., 2009, Brion et al., 2012). Pregnenolone, a precursor of steroid hormones that has been already detected in aquatic environment (Creusot et al., 2014), showed an estrogenic activity which could reflect either its capacity to activate ER as shown in human cells (Lemmen et al., 2002, Creusot et al., 2014) or its biotransformation by steroidogenic enzymes that are expressed in the brain of zebrafish (Diotel et al., 2011c). Interestingly, the *in vivo* relative estrogenic potency of pregnenolone we report herein is much higher than previously reported *in vitro* in human cells (Lemmen et al., 2002, Creusot et al., 2014).

Progesterone, the natural ligand of the nPR, exhibited no effect on *cyp19a1b* in radial glial cell context neither *in vivo* nor *in vitro* in U-251 MG cells (Fig. S1, Fig. 2), thus confirming the lack of transactivation activity of P4 in CHO cells co-transfected with ERE-TK-Luc and zebrafish ER subtypes (Menuet et al., 2002). Similarly, we found that all the

progesterone-derived progestins do not exhibit any estrogenic activity similar to what is known in mammals (Botella et al., 1995). Interestingly, the anti-progestin mifepristone significantly induced GFP expression in embryos in an ER-dependent manner but only at high concentrations.

In contrast to progesterone-derived progestins, our data show that all testosterone-derived progestins are able to affect *cyp19a1b*-GFP expression *in vivo* in a concentration-dependent manner. We thus confirmed the effect of LNG and NET on brain aromatase (Brion et al., 2012) and extended these finding to 11 other progestins (ETH, EDA, LYN, NEA, TIB, DSG, ENG, GES, NTE, NGL, RU486) among which 9 had never been studied before in zebrafish embryos.

All active compounds induced full concentration-dependent responses with maximal inductions of GFP that often exceeded those measured in zebrafish exposed to E2 or EE2 (Fig. S1, Brion et al., 2012). Overall, estranes were the most active compounds as compared to gonanes with the exception of ENG which exhibited a similar activity as ETH. All were active at concentrations in the sub nM range to hundreds nM. It is noteworthy that the estrogenic potency of tibolone was more than 5-fold higher than that of E2, while other progestins such as norethindrone acetate and norethindrone had estrogenic activities much closer to that of E2, highlighting the strong estrogenic activity of these compounds in the brain of zebrafish embryos.

4.2. LNG and NET exhibit estrogenic effects in the U251-MG cell line transfected with zFERS but do not bind to zFERS

In order to get further insights into the mechanisms underlying the estrogenic effects of the 19-nortestosterone derivatives, we focused on NET and LNG. Our *in vivo* data using the EASZY assay showed that NET is very active with an EC₅₀ in the nM range, while LNG is less potent. This is confirmed by the *in vitro* assay using the U-251 MG cells indicating that both NET and LNG can induce transactivation of the *cyp19a1b*-luciferase reporter in the presence of one of the three zebrafish ER.

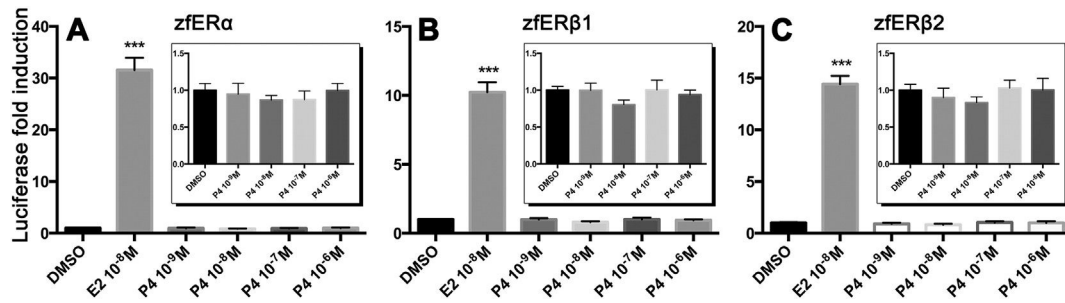


Fig. 2. Luciferase expression after progesterone (P4) treatment. U251-MG cells were transfected with the *cyp19a1b*-luciferase reporter construct and the expression vector zfER α (A), zfER β 1 (B), or zfER β 2 (C). Cells were treated for 24 h with DMSO (vehicle control), E2 (positive control) and increasing concentrations of P4. Squared boxes show the *cyp19a1b*-luciferase induction without E2 treatment. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control ($***P < 0.001$).

However, with the three zebrafish ER, NET is much more efficient than LNG, eliciting a response with a concentration of 10^{-7} M and a maximal fold induction 3 to 5 times higher. Thus, these *in vitro* data confirms the data obtained *in vivo*. In all cases, ICI 182,780 blocked these effects, indicating that they are ER-mediated. However, binding assays showed that NET and LNG were not able to displace [3 H]-E2 binding on the three receptors, except only at very high concentrations (superior to 10^{-6} M). Interestingly, although NET is about ten times more efficient than LNG *in vivo* and in U-251 MG cells, it exhibits a much lower capacity than LNG in displacing [3 H]-E2. This strongly suggests that the *in vitro* and *in vivo* effects of NET and LNG in the U-251 MG and tg *cyp19a1b*-GFP on *cyp19a1b* expression do not involve binding of the parent compounds to zfERs but their estrogenic effects are likely to be due to metabolization into estrogenic metabolites.

In mammalian target tissues, in particular in bones, NET was shown to be biotransformed by 5 α -reductase into 5 α -NET, which can be further metabolized in 3 α ,5 α -tetrahydro-NET (3 α ,5 α -NET) and 3 β ,5 α -tetrahydro-NET (3 β ,5 α -NET) by 3 α -5 α -hydroxysteroid and 3 β -5 α -hydroxysteroid deshydrogenases, respectively (Enriquez et al., 2007; Garcia-Becerra et al., 2006; Lemus et al., 2009). In rat cultured

osteoblastic cells, these reduced derivatives of NET induced significant effects on rat osteoblast proliferation and differentiation, similar to estradiol (Lemus et al., 2009). However, these effects were completely blocked by finasteride, a type II and III 5 α -reductase inhibitor. Finasteride has a molecular weight of 372 g/mol, is lipophilic (Azeem et al., 2009) and has recently been shown to be active in teleost fishes (Lee et al., 2015). Because 5 α -reductase is abundant in the brain of fish (Diotel et al., 2011a; Pasmanik and Callard, 1988), we attempted to block the effects of NET or LNG with this compound. *In vivo*, finasteride alone had no visible effect on the development of embryos. In combination with estradiol, finasteride had no effect on the estradiol-induced GFP expression, and in association with NET or LNG, the 5 α -reductase inhibitor did not affect at all the estrogenic activity of these two progestagens. Because it is possible that finasteride, despite its small size and lipophilic nature, did not penetrate into the embryos, we repeated this experiment *in vitro* in the U-251 MG cells, since 5 α -reductase is known for being expressed in astrocytes (Bruzzone et al., 2010; Kiyokage et al., 2005). Finasteride did not affect the luciferase induction caused by NET or LNG in these cells. Trilostane, an inhibitor of 3 β -5 α -hydroxysteroid deshydrogenases that has been demonstrated to be

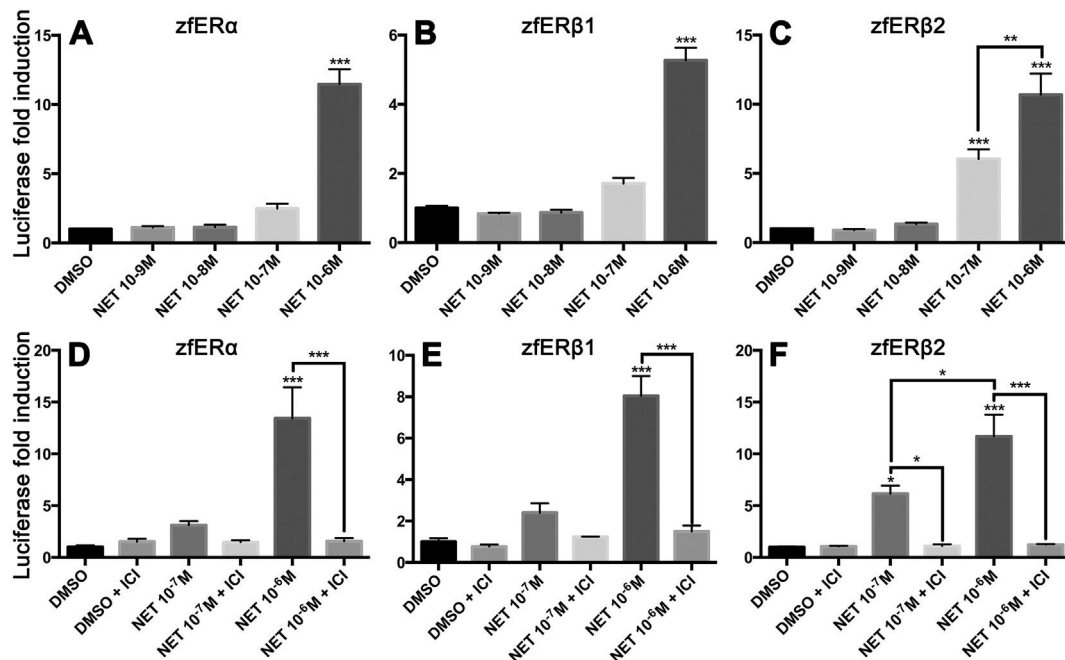


Fig. 3. Luciferase fold induction after norethindrone (NET) treatment. U251-MG glial cells were transfected with the *cyp19a1b*-luciferase reporter construct and the expression vector zfER α (A, D), zfER β 1 (B, E), or zfER β 2 (C, F). Cells were treated with increasing concentrations of NET (A–C). The estrogen receptor antagonist ICI 182,780 (ICI) was also tested with and without the two highest NET concentrations (D–F). DMSO and E2 were used as vehicle control and positive control (data not shown), respectively. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control, with the exception of those located over the lines representing a significant difference between pointed treatments ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$).

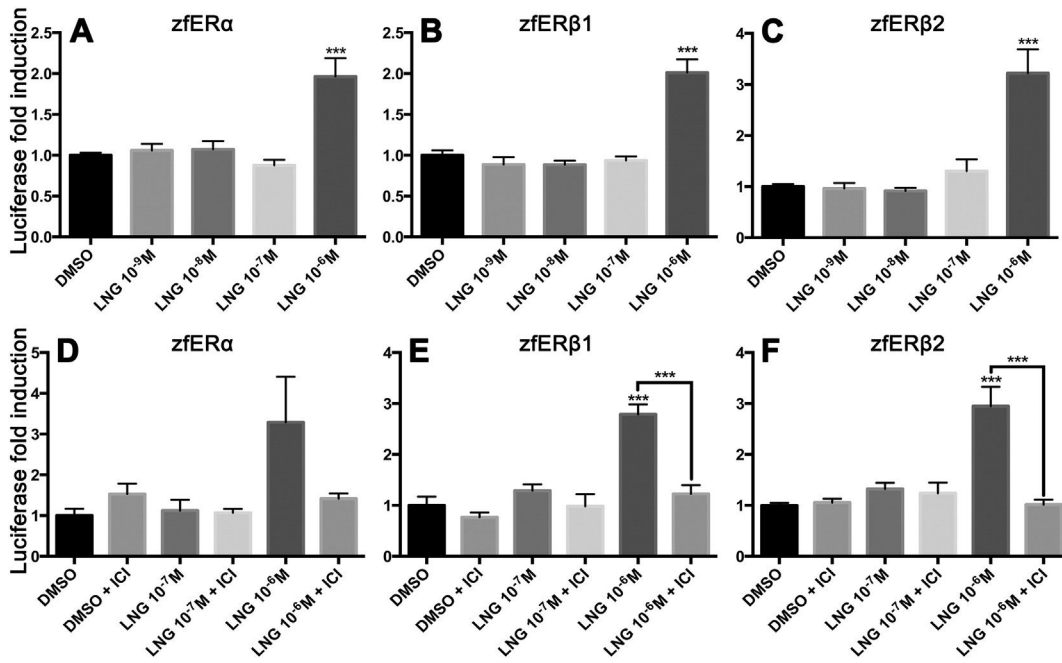


Fig. 4. Luciferase fold induction after levonorgestrel (LNG) treatment. U251-MG cells were transfected with the *cyp19a1b*-luciferase reporter construct and the expression vector zfER α (A, D), zfER β 1 (B, E), or zfER β 2 (C, F). Cells were treated with increasing concentrations of LNG without (A–C) and with ICI 182,780 (ICI) (D–F). DMSO and E2 were used as vehicle control and positive control (data not shown), respectively. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control, with the exception of those located over the lines representing a significant difference between pointed treatments ($***P < 0.001$).

active in medaka fish (Sun et al., 2014) did not affect either the *in vivo* or the *in vitro* estrogenic activities of NET or LNG. The underlying metabolic pathways through which these compounds are metabolized into estrogenic metabolites remain to be identified in fish.

4.3. (Eco)toxicological relevance of progestin-induced *cyp19a1b* expression during embryogenesis

To our knowledge, our study is the first to provide an extensive characterization of the effects of progestins on an estrogen-dependent gene

in brain of fish and to demonstrate that more than half of the nPR ligands tested (*i.e.*, 13 out of 25) act in a similar way to 17 β -estradiol. Even though progestin concentrations used to trigger induction of aromatase in the short-term EASZY assay are higher than those found in e-fluent and surface waters, it should be stressed that due to the hydrophobic nature of progestins with log Kows between 3.1 and 5.4 they tend to accumulate in aquatic organisms (Kumar et al., 2015, Fent, 2015). Furthermore wild fish are very likely exposed to mixtures of progestins together with other EDCs, some of which act as estrogens. Investigating the combined effects of progestins with estrogens on

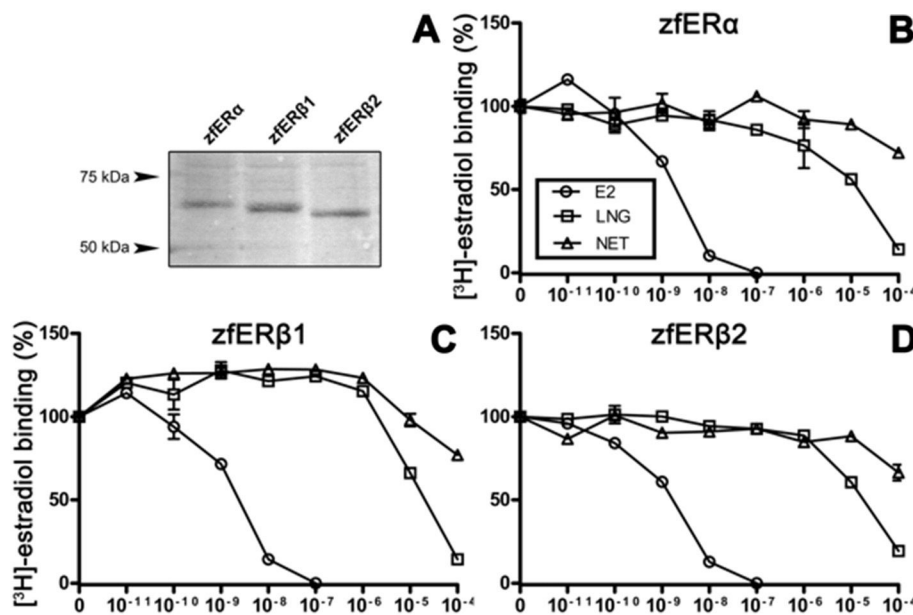


Fig. 5. Binding properties of NET and LNG with zfERs. zfERs proteins synthesized and biotinylated using Promega's kits (see Material and methods) and visualized by colorimetric detection method after SDS-PAGE (A). Competition curves after E2, NET and LNG increasing concentrations treatments with constant [3 H]-E2 10^{-9} M using zfER α (B), zfER β 1 (C), or zfER β 2 (D) synthesized proteins.

cyp19a1b expression thus appears relevant to further assess the hazard of these environmental contaminants (Hinfray et al., in revision).

Previous studies reported effects of P4 and some of the (anti-)progestins tested in this study (i.e., DYD, MPA, NET, LNG, NGL, DRO and RU486) on the transcriptional activity of multiple genes (e.g., steroid hormone receptors, steroidogenic enzymes or circadian rhythm genes) during zebrafish embryogenesis that may affect brain and sex development (Zucchi et al., 2012, Liang et al., 2015, Zhao et al., 2015, for a review see Fent, 2015 and Kumar et al., 2015). Herein, the effects of 17 progestins on zebrafish embryos were newly assessed. By means of fluorescence imaging in progestins exposed-transgenic *cyp19a1b*-GFP embryos, we further describe the negative effect of 13 synthetic (anti)progestins on the brain of fish by demonstrating their capacity to target radial glial cells and to induce brain aromatase expression in an ER-dependent manner. The spatio-temporal expression of ERs subtypes have been well-described during zebrafish embryogenesis revealing that ER β subtypes and brain aromatase are functionally co-expressed very early during brain development (Mouriec et al., 2009). Our data thus demonstrate that several synthetic progestins have the potential to interfere with ER signaling in developing fish. It is important to recall here that progestins are known to act on multiple nuclear receptors and it would therefore be advisable to further document their potential effects on other NR-regulated pathways in developing brain of fish. Among those, activation of fathead minnow (*Pimephales promelas*) AR by progestins has been recently pointed out (Ellestad et al., 2014). However, no information is currently available in zebrafish. Furthermore, as compared to ER, much less information is available on AR signaling pathway during embryogenesis, even though AR was found to be expressed in discrete regions of the brain (Gorelick et al., 2008) and AR-responsive genes have recently been described (Fetter et al., 2015).

An important outcome of this study relies on the fact that progestins act on radial glial cells that play a crucial role in neurogenesis and brain repair as they are brain stem cells in developing and adult fish (Lam et al., 2009; Pellegrini et al., 2007; Zupanc, 2008) giving birth to neurons (Diotel et al., 2013; Pellegrini et al., 2007). It is known that estrogens in adult zebrafish and larvae affect neurogenesis by modulating the neurogenic activity of radial glial cells (Diotel et al., 2013). Consequences of early exposure to environmental progestins on brain development are unknown, but given the estrogenic activity that we report for the majority of progestins studied, it would therefore be advisable to further document their effects on cell proliferation, survival and migration in brain.

5. Conclusion

This study provides an extensive toxicological characterization of a large number of currently used (anti-)progestin pharmaceuticals as regard their estrogenic activity. We demonstrate that a majority of them have the capacity to target radial glial cells and to induce brain aromatase expression in zebrafish embryos in an ER-dependent manner. This work thus provides new information on the effects of progestins in fish at the brain level that deserve further study.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.019>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

The authors wish to express their sincere thanks to the anonymous reviewers for their positive and constructive comments. This research was supported by the ANR PROOFS "Occurrences and effects of environmental ligands of progesterone receptor on fish reproduction and

neuro-development" (ANR-13-CESA-0006-03). Clémentine Garoche was supported by a doctoral fellowship from the ANR PROOFS and the French Ministry of Ecology (P190 "Axe de Recherche Ecotoxicologie"). The authors acknowledge the staff of the zebrafish Biosit facility (LPGP, INRA, Rennes) and Benjamin Piccini (ECOT unit, INERIS, Verneuil-en-Halatte) for his help in performing zebrafish exposures.

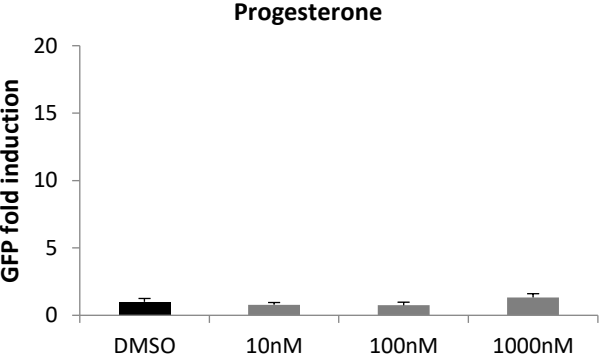
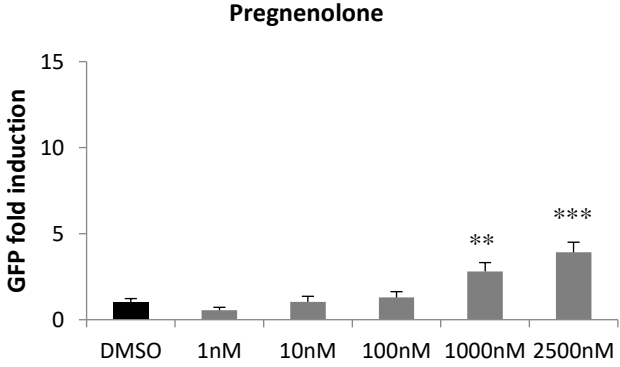
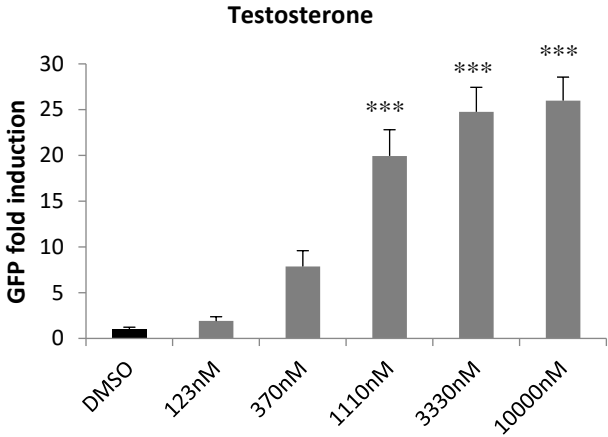
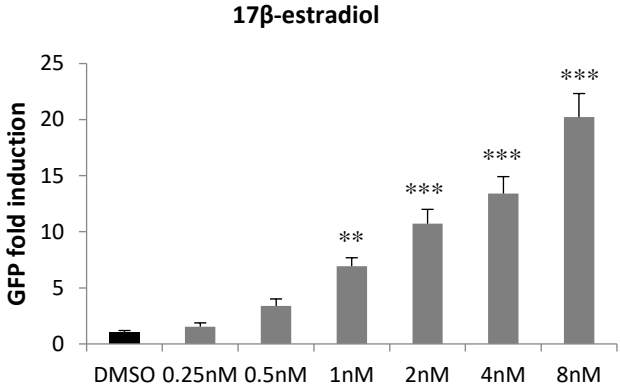
References

- Azeem, A., Khan, Z.I., Aqil, M., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Talegaonkar, S., 2009. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. *Life Sci.* 35, 525–547.
- Bain, P.A., Kumar, A., Ogino, Y., Iguchi, T., 2015. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progesterone receptor of Murray-darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquat. Toxicol.* 163, 97–101.
- Besse, J.P., Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 157 (12), 3485–3494.
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 54, 138–153.
- Bluthgen, N., Castiglioni, S., Sumpster, J.P., Fent, K., 2013. Effects of low concentrations of the anti-progestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 1. Reproductive and early developmental effects. *Aquat. Toxicol.* 144–145, 83–95.
- Botella, J., Duranti, E., Viader, V., Duc, I., Delansorne, R., Paris, J., 1995. Lack of estrogenic potential of progesterone- or 19-nor-progesterone-derived progestins as opposed to testosterone or 19-nor-testosterone derivatives on endometrial Ishikawa cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (1), 77–84.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryos. *PLoS One* 7, e36069.
- Bruzzoze, F., Do Rego, J.L., Luu-The, V., Pelletier, G., Vallarino, M., Vaudry, H., 2010. Immunohistochemical localization and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 5alpha-reductase in the brain of the frog, *Rana esculenta*, during development. *J. Chem. Neuroanat.* 39, 35–50.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 45, 732–740.
- Creusot, N., Ait-Aissa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ. Sci. Technol.* 21;48 (7), 3649–3657.
- Diotel, N., Do Rego, J.L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Mironov, S., Vaudry, H., Kah, O., 2011a. The brain of teleost fish, a source, and a target of sexual steroids. *Front. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2011.00137>.
- Diotel, N., Do Rego, J.L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Mironov, S., Vaudry, H., Kah, O., 2011b. Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* 34, 45–56.
- Diotel, N., Servili, A., Gueguen, M.-M., Mironov, S., Pellegrini, E., Vaillant, C., Zhu, Y., Kah, O., Anglade, I., 2011c. Nuclear progesterone receptors are up-regulated by estrogens in neurons and radial glial progenitors in the brain of zebrafish. *PLoS ONE* 6 (11), e28375. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028375>.
- Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M.M., Anglade, I., Kah, O., Pellegrini, E., 2013. Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Horm. Behav.* 63, 193–207.
- E.C., 2011. Ethinylestradiol EQS Dossier Prepared by the Sub-Group on Review of the Priority Substances List under Working Group E on Chemical Aspects in the Context of the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. p. 36.
- Ellestad, L.E., Cardon, M., Chambers, I.G., Farmer, J.L., Hartig, P., Stevens, K., Villeneuve, D.L., Wilson, V., Orlando, E.F., 2014. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8179–8187.
- Enriquez, J., Lemus, A.E., Chimal-Monroy, J., Arzate, H., Garcia, G.A., Herrero, B., Larrea, F., Perez-Palacios, G., 2007. The effects of synthetic 19-norprogestins on osteoblastic cell function are mediated by their non-phenolic reduced metabolites. *J. Endocrinol.* 193, 493–504.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Env. Int.* 84, 115–130.
- Fetter, E., Smetanova, S., Baldauf, L., Lidzba, A., Altenburger, R., Schüttler, A., Scholz, S., 2015. Identification and Characterization of Androgen-Responsive Genes in Zebrafish Embryos. *Environ. Sci. Technol.* 49 (19), 11789–11798. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b01034>.
- Frye, C.A., Bo, E., Calamandrei, G., Calza, L., Dessi-Fulgheri, F., Fernandez, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K., Panzica, G.C., 2012. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* 24, 144–159.
- Garcia-Becerra, R., Borja-Cacho, E., Cooney, A.J., Smith, C.L., Lemus, A.E., Perez-Palacios, G., Larrea, F., 2006. Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99, 108–114.

- Gorelick, D.A., Watson, W., Halpern, M.E., 2008. Androgen receptor gene expression in the developing and adult zebrafish brain. *Dev. Dyn.* 237 (10), 2987–2995. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21700>.
- Graham, J.D., Clarke, C.L., 2011. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308>.
- Han, J., Wang, Q., Wang, X., Li, Y., Wen, S., Liu, S., Ying, G., Guo, Y., Zhou, B., 2014. The synthetic progestin megestrol acetate adversely affects zebrafish reproduction. *Aquat. Toxicol.* 150, 66–72.
- Hanna, R.N., Daly, S.C., Pang, Y., Anglade, I., Kah, O., Thomas, P., Zhu, Y., 2010. Characterization and expression of the nuclear progestin receptor in zebrafish gonads and brain. *Biol. Reprod.* 82 (1), 112–122.
- Hinfray, N., Tebby, C., Garoche, C., Piccini, B., Bourguine, G., Ait-Aïssa, S., Kah, O., Pakdel, F., Brion, F. (2016). Additive effects of levonorgestrel and ethynylestradiol on brain aromatase (cyp19a1b) in zebrafish specific in vitro and in vivo bioassays. *Tox. Appl. Pharmacol.* (in revision).
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 104 (21), 8897–8901.
- Kiyokage, E., Toida, K., Suzuki-Yamamoto, T., Ishimura, K., 2005. Localization of 5alpha-reductase in the rat main olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 493, 381–395.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumova, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kroupova, H.K., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2625–2638.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1199–1205.
- Lam, C.S., Marz, M., Strahle, U., 2009. Gfap and nestin reporter lines reveal characteristics of neural progenitors in the adult zebrafish brain. *Dev. Dyn.* 238, 475–486.
- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ. Health Persp.* 114, 752–758.
- Lee, M.R., Loux-Turner, J.R., Oliveira, K., 2015. Evaluation of the 5alpha-reductase inhibitor finasteride on reproduction and gonadal development in medaka, *Oryzias latipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 216, 64–76.
- Legmen, J.G., van den Brink, C.E., Legler, J., van der Saag, P.T., van der Burg, B., 2002. Detection of oestrogenic activity of steroids present during mammalian gestation using oestrogen receptor alpha- and oestrogen receptor beta-specific in vitro assays. *J. Endocrinol.* 174, 435–446.
- Lemus, A.E., Enriquez, J., Hernandez, A., Santillan, R., Perez-Palacios, G., 2009. Bioconversion of norethisterone, a progesterone receptor agonist into estrogen receptor agonists in osteoblastic cells. *J. Endocrinol.* 200, 199–206.
- Liang, Y.Q., Huang, G.Y., Liu, S.S., Zhao, J.L., Yang, Y.Y., Chen, X.W., Tian, F., Jiang, Y.X., Ying, G.G., 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 160, 172–179.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66, 1881–1892.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485, 304–320.
- Mouriec, K., Gueguen, M.M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M.L., Pakdel, F., Kah, O., 2009. Androgens upregulate cyp19a1b (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biol. Reprod.* 80, 889–896.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Orlando, E.F., Ellstad, L.E., 2014. Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 241–249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcn.2014.03.038>.
- Overturf, M.D., Overturf, C.L., Carty, D.R., Hala, D., Huggett, D.B., 2014. Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquat. Toxicol.* 148, 152–161.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122, 1349–1356.
- Paulos, P., Runnalls, T.J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A.P., Sumpter, J.P., Huggett, D.B., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquat. Toxicol.* 99, 256–262.
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Marmignon, M.H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 150–167.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2077–2084.
- Runnalls, T.J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., Sumpter, J.P., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 16 (6), 1318–1338.
- Säffholm, M., Jansson, E., Fick, J., Berg, C., 2015. Mixture effects of levonorgestrel and ethynylestradiol: estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquat. Toxicol.* 161, 146–153.
- Säffholm, M., Ribbenstedt, A., Fick, J., Berg, C., 2014. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 369.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Ait-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfray, N., Porcher, J.M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ. Int.* 237 (8), 1342–1348.
- Sitruk-Ware, R., 2008. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 61, 151–157.
- Soffker, M., Tyler, C.R., 2012. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 653–668.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33 (2), 128–132.
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33 (1). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 9–16 (CODEN: AHCBAU; ISSN:0323-4320).
- Sun, L., Jin, R., Peng, Z., Zhou, Q., Qian, H., Fu, Z., 2014. Effects of trilostane and fipronil on the reproductive axis in an early life stage of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology* 23, 1044–1054.
- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., Brunstrom, B., 2013. The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 2043–2051.
- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., Brunstrom, B., 2014. Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* 147, 84–91.
- Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67–73.
- Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42 (15), 5814–5820.
- Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B.C., Combarous, Y., Porcher, J.M., Kah, O., Brion, F., 2010. 17alpha-ethynylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 15;99 (4), 479–491.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (12), 2663–2670.
- Zhao, Y., Castiglioni, S., Fent, K., 2015. Synthetic progestins medroxyprogesterone acetate and dydrogesterone and their binary mixtures adversely affect reproduction and lead to histological and transcriptional alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 7;49 (7), 4636–4645.
- Zucchi, S., Castiglioni, S., Fent, K., 2012. Progestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5183–5192.
- Zucchi, S., Castiglioni, S., Fent, K., 2013. Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 12548–12556.
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., Fent, K., 2014. Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 3523–3531.
- Zupanc, G.K., 2008. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *J. Physiol.* 102, 357–373.

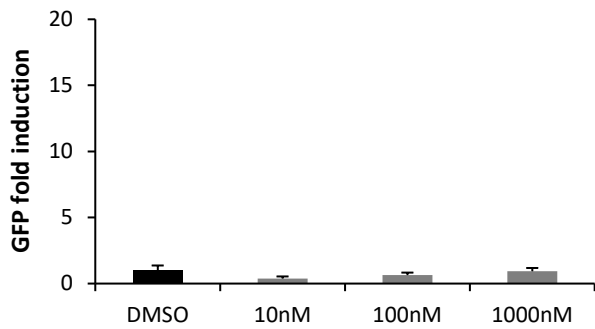
Supplementary Information

Natural steroids

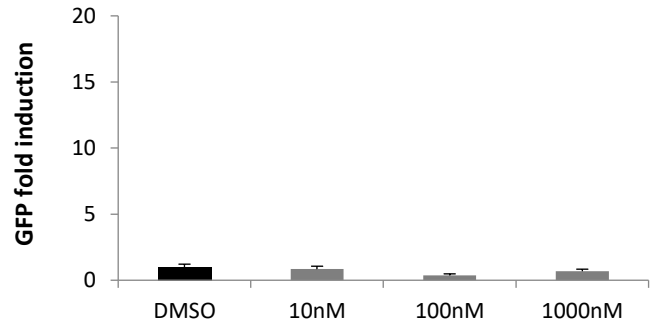


Progestins structurally related to progesterone

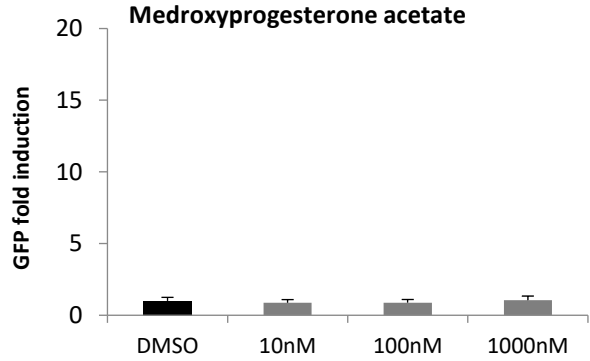
Dydrogesterone



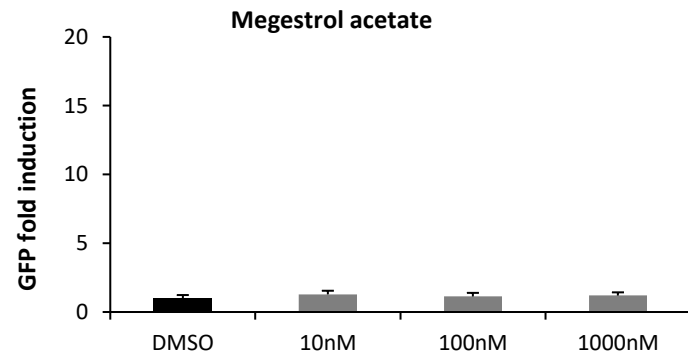
Medroxyprogesterone



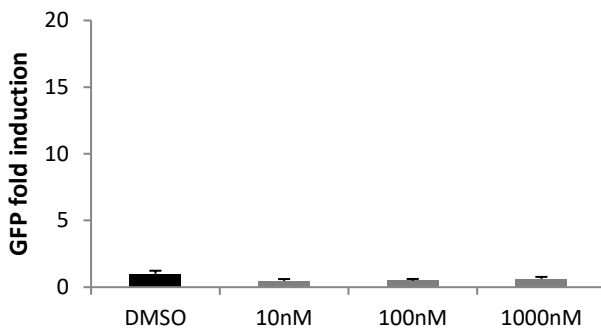
Medroxyprogesterone acetate



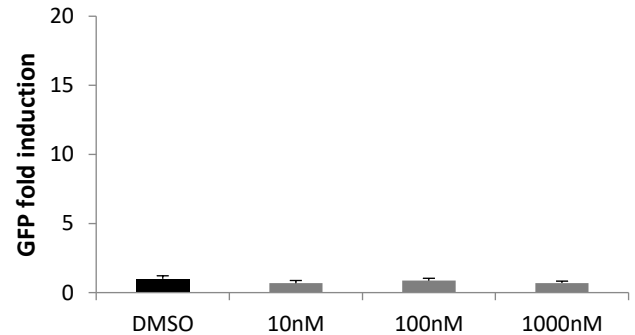
Megestrol acetate



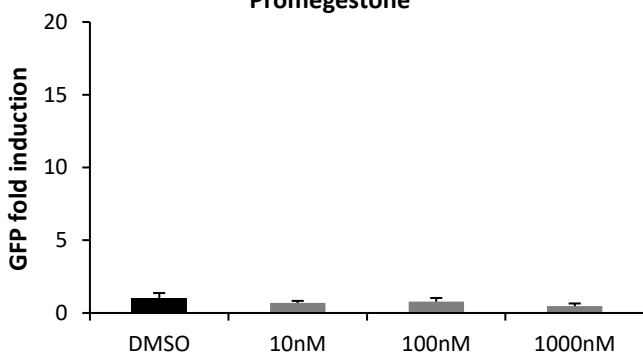
Chlormadinone acetate



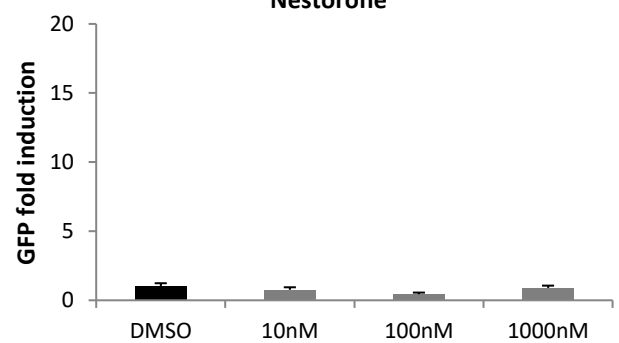
Cyproterone acetate



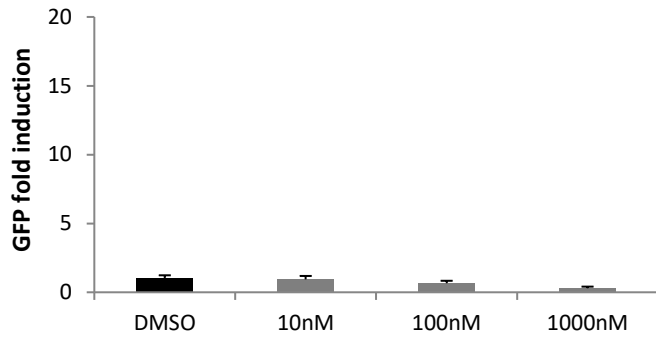
Promegestone



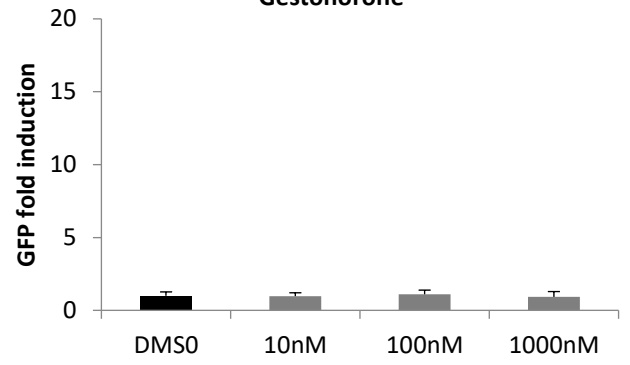
Nestorone



Nomegestrol acetate

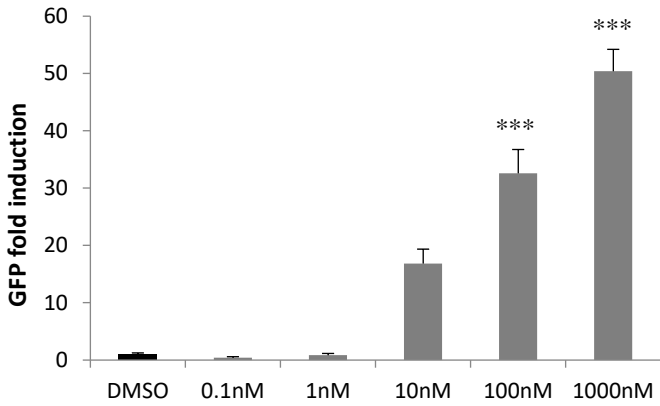


Gestonorone

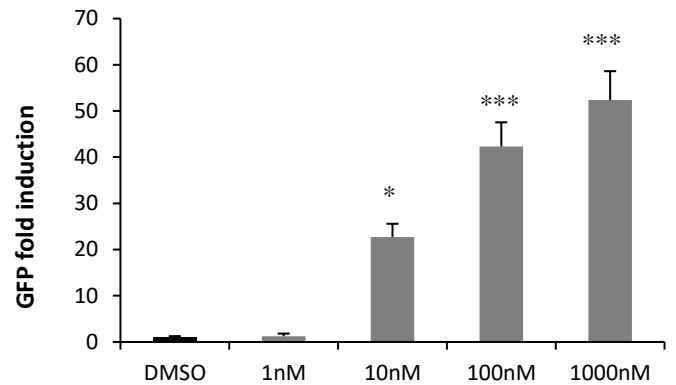


Progestins structurally related to testosterone

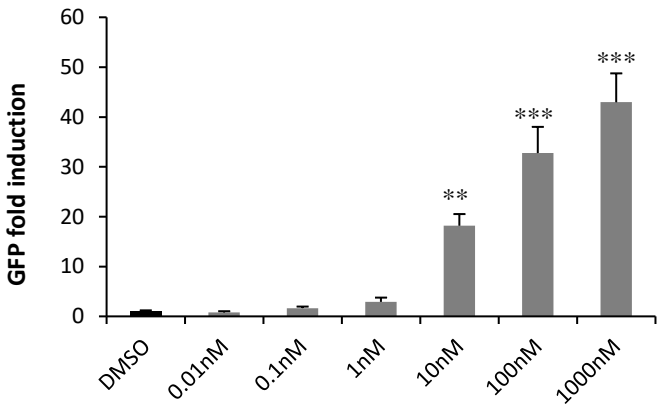
Ethisterone



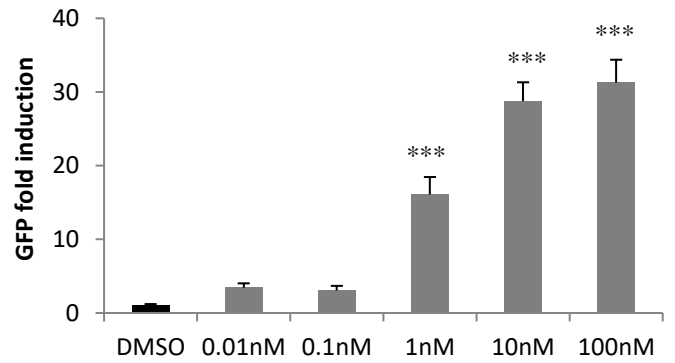
Ethinodiol diacetate



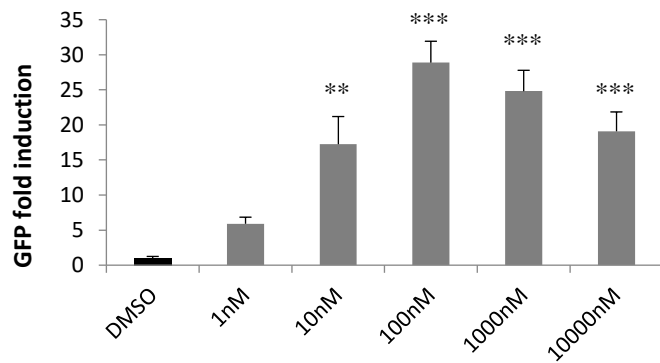
Lynestrenol



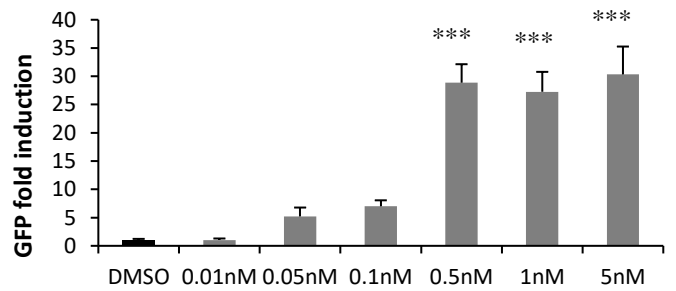
Norethindrone acetate



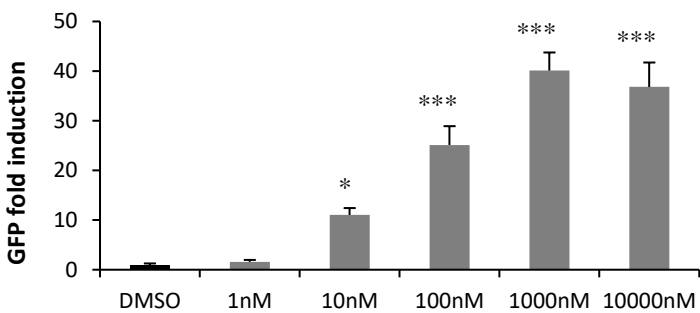
Norethindrone



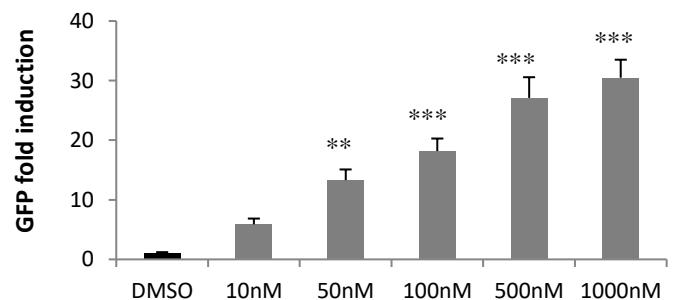
Tibolone

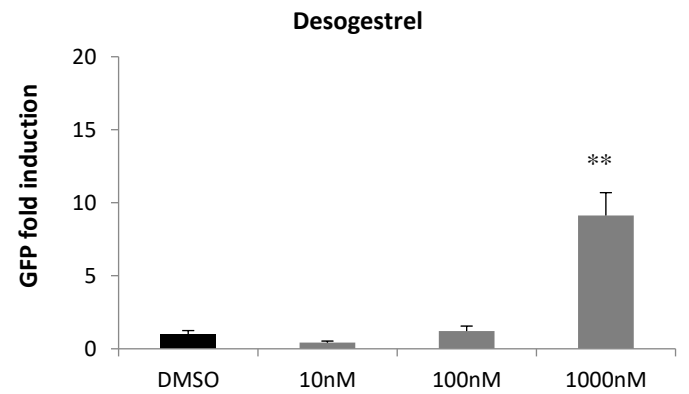
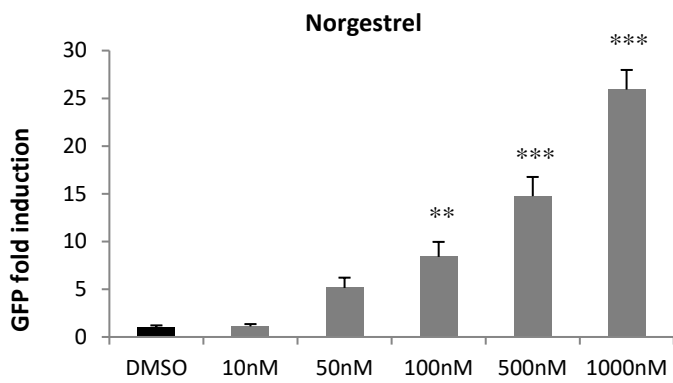
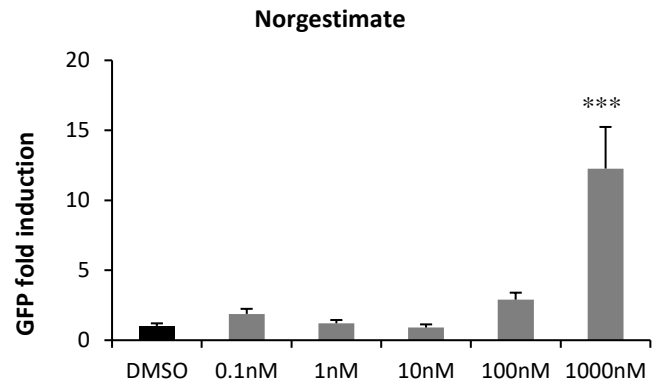
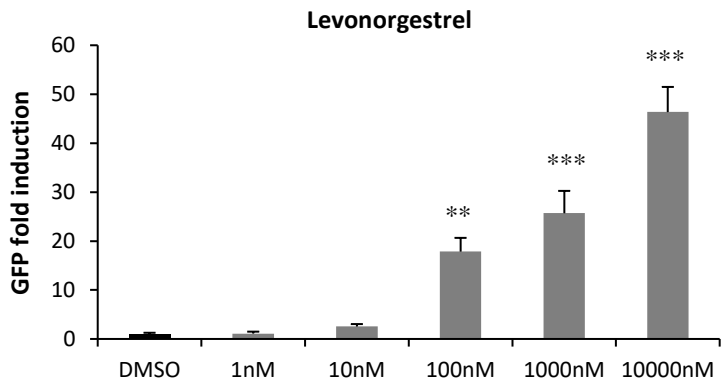


Etonogestrel

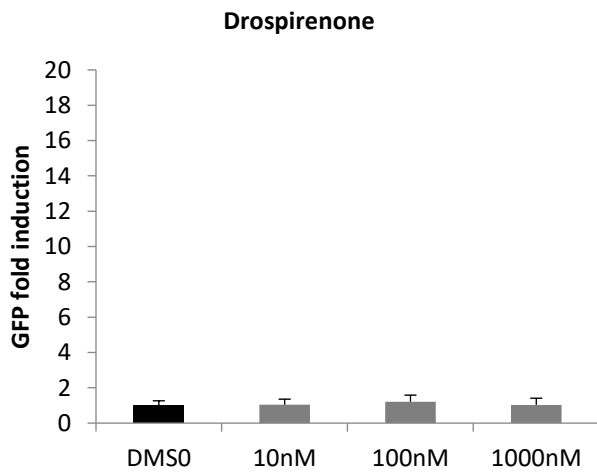


Gestodene





Progestin structurally related to spironolactone



Anti-progestin

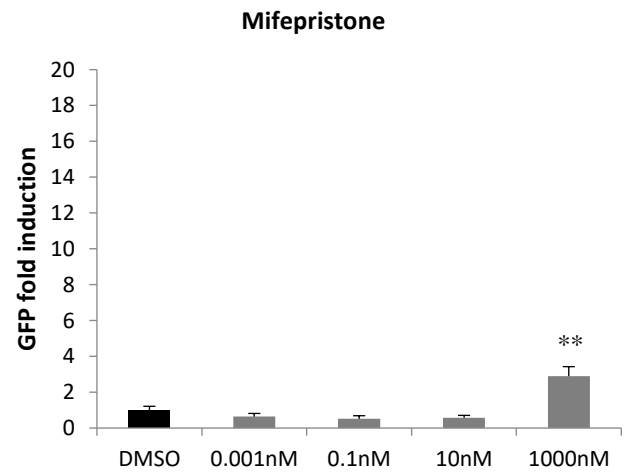


Fig. S1. GFP expression in 4-dpf zebrafish embryos exposed for 96 hours to increasing concentrations of natural steroids and synthetic progestins. Results are expressed as fold induction above control (means \pm SEM, n=15-20 fish embryos per conditions). Curves are representatives of N=3 independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA one-way test followed by Tukey HSD post-hoc test or the Kruskal-Wallis test. Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

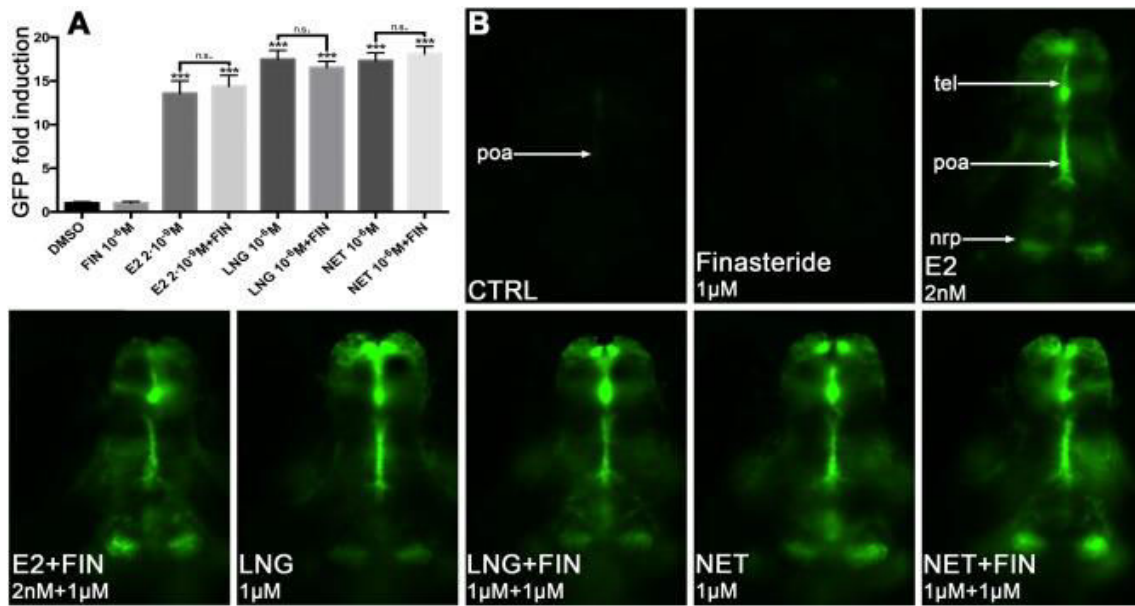


Fig. S2. *In vivo* effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride (FIN) on the GFP induction of transgenic zebrafish larvae caused by LNG and NET. Transgenic zebrafish embryos *tg(cyp19a1b-GFP)* were treated with DMSO (vehicle control), E2 2x10⁻⁹M (positive control), NET 10⁻⁶M and LNG 10⁻⁶M in combination or not of FIN 10⁻⁶M for 96 hours (A). Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control (***) $P < 0.001$, n.s. located over the lines representing a non-significant difference between pointed treatments. Micrographs (B) show a dorsal view of the telenchepalon (tel), preoptic area (poa), and nucleus recessus posterioris (nrp) of the caudal hypothalamus of a 4-dpf *tg(cyp19a1b-GFP)* larva after 96 hours of indicated treatment.

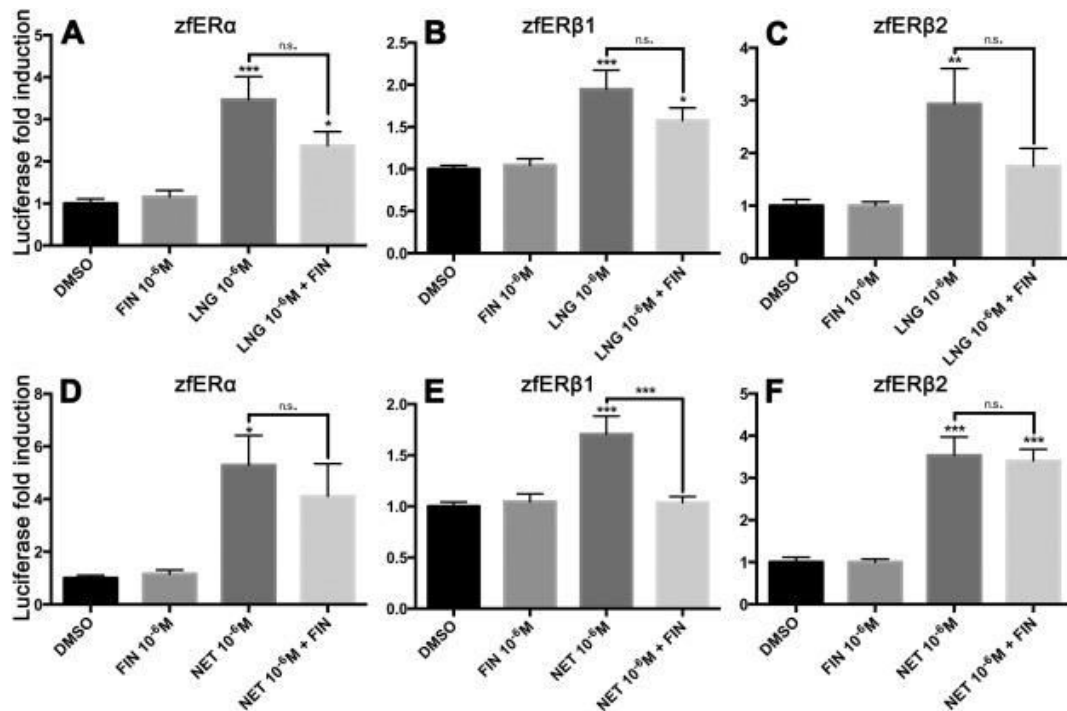


Fig. S3. *In vitro* effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride (FIN) on the luciferase induction caused by LNG and NET. U251-MG glial cells were transfected with the *cyp19a1b*-luciferase reporter construct and the expression vector zfER α (A, D), zfER β 1 (B, E), or zfER β 2 (C, F). Cells were treated with LNG 10⁻⁶M (A-C) or NET 10⁻⁶M (D-F) with or without FIN 10⁻⁶M. DMSO and E2 were used as vehicle control and positive control (data not shown), respectively. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control (* P < 0.05; *** P < 0.001), n.s. located over the lines representing a non-significant difference between pointed treatments.

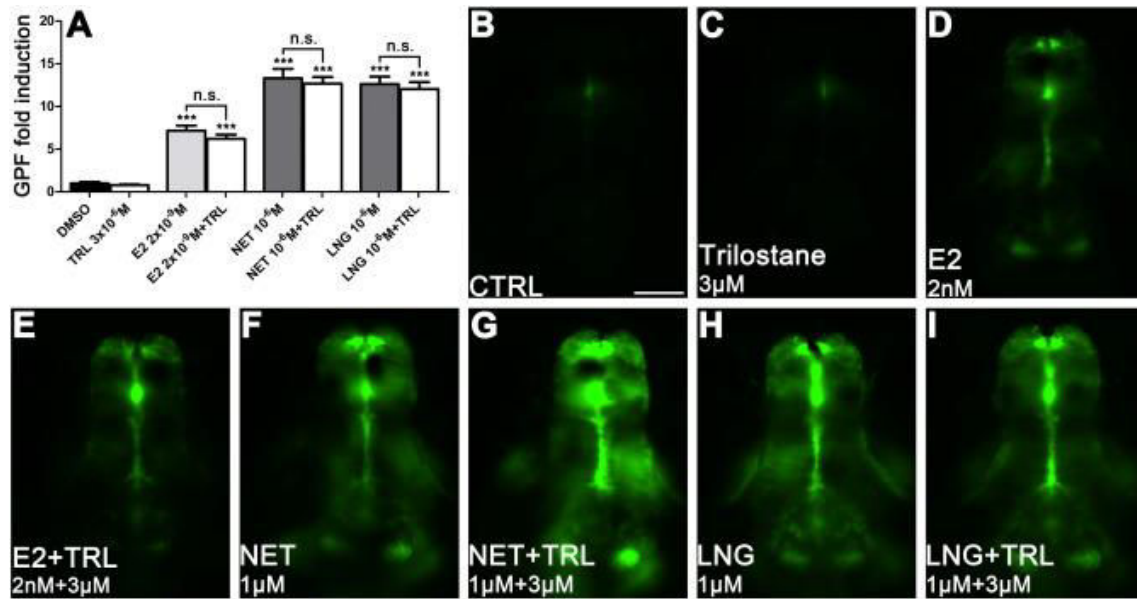


Fig. S4. *In vivo* effects of the 3β - 5α -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane (TRL) on the GFP expression of transgenic zebrafish larvae caused by LNG and NET. Transgenic zebrafish embryos *tg(cyp19a1b-GFP)* were treated with DMSO (vehicle control), E2 2×10^{-9} M (positive control), NET 10^{-6} M and LNG 10^{-6} M in combination or not with TRL 3×10^{-6} M for 96 hours. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means \pm SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control ($***P < 0.001$), n.s. located over the lines representing a non-significant difference between pointed treatments.

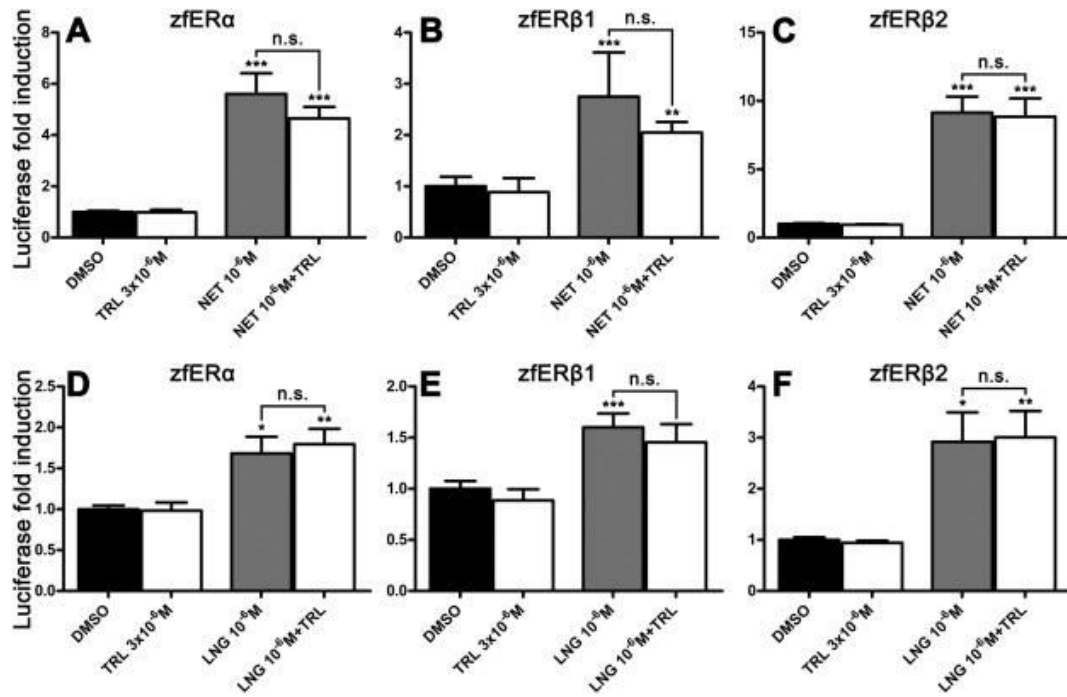


Fig. S5. *In vitro* effects of the 3β-5α-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane (TRL) on the luciferase induction caused by LNG and NET. U251-MG cells were transfected with the *cyp19alb*-luciferase reporter construct and the expression vector zfERα (**A, D**), zfERβ1 (**B, E**), or zfERβ2 (**C, F**). Cells were treated with LNG 10⁻⁶M (**A-C**) or NET 10⁻⁶M (**D-F**) with or without TRL 3x10⁻⁶M. DMSO and E2 were used as vehicle control and positive control (data not shown), respectively. Data are expressed as fold induction relative to DMSO (means ± SEM). Asterisks indicate a significant difference between treatment and vehicle control (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001), n.s. located over the lines representing a non-significant difference between pointed treatments.

Synthèse de l'article 3 : Effets additifs de LNG et EE2 sur l'aromatase B dans des bioessais poissons zèbres in vitro et in vivo***Contexte***

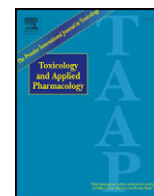
Dans l'article 2, nous avons mis en évidence pour la première fois les propriétés œstrogéno-mimétiques des progestatifs de synthèse dérivés de la 19-nortestostérone *in vivo* en démontrant leurs capacités à induire l'expression de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires selon un mécanisme ER-dépendant. Dans l'environnement aquatique, ces substances sont susceptibles d'être présentes en mélange avec d'autres composés œstrogéno-mimétiques. De fait, dans les pilules contraceptives, les PR sont très souvent associés aux œstrogènes. Aussi convient-il de renseigner les effets combinés de ces deux classes de stéroïdes chez les organismes aquatiques pour en évaluer les dangers et les risques. À ce jour, très peu d'informations sont disponibles concernant les effets combinés des œstrogènes et des progestatifs naturels et de synthèse.

Objectif

Cet article avait donc pour objectif d'étudier les effets de l'ethinylestradiol (EE2) et du levonorgestrel (LNG) seuls et en mélange sur l'expression du gène ER-régulé *cyp19a1b*. Pour ce faire, nous avons employé une stratégie expérimentale similaire à celle précédemment utilisée dans l'article 2, *i.e.* une combinaison de modèles *in vitro* (cellules U251-MG) et *in vivo* (embryons de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b*-GFP).

Résultats et discussion

Les résultats obtenus confirment l'effet œstrogénique de la LNG sur le cerveau du poisson zèbre en développement, à savoir une induction concentration-dépendante de l'aromatase B. En mélange, les effets de EE2 et LNG se sont révélés être additifs que ce soit *in vitro* sur les cellules U251-MG ou *in vivo* sur les embryons de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b*-GFP. Ce résultat suggère que la présence de progestatifs œstrogéno-mimétiques dans l'environnement aquatique est susceptible de générer des effets additifs en association avec des xeno-œstrogènes. L'article 3 confirme ainsi la pertinence des bioessais utilisés pour l'évaluation des dangers perturbateurs endocriniens de composés seuls et en mélanges.



Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (*cyp19a1b*) in zebrafish specific *in vitro* and *in vivo* bioassays

N. Hinfray^{a,*}, C. Tebby^b, C. Garoche^a, B. Piccini^a, G. Bourguine^c, S. Aït-Aïssa^a, O. Kah^c, F. Pakdel^d, F. Brion^a

^a INERIS, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Verneuil-en-Halatte, France

^b INERIS, Unité Modèles pour l'écotoxicologie et la Toxicologie, Verneuil-en-Halatte, France

^c IRSET, équipe NEED, Université de Rennes 1, Rennes, France

^d IRSET, Inserm U1085, équipe TREC, Université de Rennes 1, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2016

Revised 25 July 2016

Accepted 30 July 2016

Available online 1 August 2016

Keywords:

Levonorgestrel

Ethinylestradiol

Mixture

Brain aromatase

Transgenic zebrafish

U251-MG cells

ABSTRACT

Estrogens and progestins are widely used in combination in human medicine and both are present in aquatic environment. Despite the joint exposure of aquatic wildlife to estrogens and progestins, very little information is available on their combined effects. In the present study we investigated the effect of ethinylestradiol (EE2) and Levonorgestrel (LNG), alone and in mixtures, on the expression of the brain specific ER-regulated *cyp19a1b* gene. For that purpose, recently established zebrafish-derived tools were used: (i) an *in vitro* transient reporter gene assay in a human glial cell line (U251-MG) co-transfected with zebrafish estrogen receptors (zfERs) and the luciferase gene under the control of the zebrafish *cyp19a1b* gene promoter and (ii) an *in vivo* bioassay using a transgenic zebrafish expressing GFP under the control of the zebrafish *cyp19a1b* gene promoter (*cyp19a1b*-GFP). Concentration-response relationships for single chemicals were modeled and used to design the mixture experiments following a ray design. The results from mixture experiments were analyzed to predict joint effects according to concentration addition and statistical approaches were used to characterize the potential interactions between the components of the mixtures (synergism/antagonism). We confirmed that some progestins could elicit estrogenic effects in fish brain. In mixtures, EE2 and LNG exerted additive estrogenic effects both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that some environmental progestin could exert effects that will add to those of environmental (xeno-)estrogens. Moreover, our zebrafish specific assays are valuable tools that could be used in risk assessment for both single chemicals and their mixtures.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) have been extensively studied during the last decade due to their adverse effects on aquatic organism reproduction and development. To date, most attention on EDCs has been focused on compounds able to interact with the estrogen receptors (ERs). The occurrence, fate and effects of both natural and synthetic estrogens (estradiol (E2), estriol, estrone and ethinylestradiol (EE2)) and estrogen-like compounds are now well documented. As estrogens can be found in mixtures in the aquatic environment, a number of studies evaluated the effects of their combined exposure on estrogen signaling in aquatic organisms. Results from these studies demonstrate that binary or multi-component mixtures of ER agonists generally act in an additive manner on the expression of ER-regulated genes in both brain and liver (Thorpe et al., 2001; Rajapakse et al., 2004; Lin and Janz, 2006; Kortenkamp, 2007; Petersen and Tollefsen, 2011; Brion et al., 2012; Petersen et al., 2013). In some cases, some deviations from additivity

can be observed, especially with infra-additive effects, both in *in vitro* and *in vivo* experiments (Rajapakse et al., 2004; Lin and Janz, 2006; Petersen and Tollefsen, 2011; Petersen et al., 2013).

Estrogens and progestins are widely used in combination in human medicine, especially in oral contraceptives and hormone replacement therapy (Zeilinger et al., 2009). Their extensive use and poor removal by sewage treatment plants have led to contamination of the aquatic environment (Besse and Garric, 2009; Liu et al., 2011). However, compared to estrogens, the occurrence, fate and effects of progestins were poorly studied. They are found in effluents and in surface waters (rivers, lakes, streams) and ground waters at concentrations up to tens of ng/L, but also in sediments from rivers at concentrations up to tens of ng/g (for review see (Besse and Garric, 2009; Liu et al., 2011; Fent, 2015)). Moreover, progestins are potent developmental and reproductive toxicants for aquatic organisms (for review see Zeilinger et al., 2009; Kumar et al., 2015). Among these progestins, levonorgestrel (LNG) is a synthetic progestin structurally related to testosterone (19-Nortestosterone derivative), used alone or in association with an estrogen such as ethinylestradiol for contraception purposes (emergency contraceptives or birth control pills). LNG has been detected in some effluents,

* Corresponding author.

E-mail address: nathalie.hinfray@ineris.fr (N. Hinfray).

sediments, ground water, tap water, but also in surface water of rivers at concentrations up to 38 ng/L (Vulliet et al., 2008; Besse and Garric, 2009; Al-Odaini et al., 2010; Liu et al., 2011; Vulliet and Cren-Olivé, 2011; Fent, 2015). LNG exerts biological activities that differ from the natural progestin (progesterone) since it has progestagenic and androgenic activities (Besse and Garric, 2009) and also estrogenic activities both *in vitro* and *in vivo* (Jeng et al., 1992; Brion et al., 2012; Zucchi et al., 2012; Creusot et al., 2014; Kroupova et al., 2014). However, despite the joint exposure of aquatic wildlife to estrogens and progestins, very little information is available on their combined toxicity (Runnalls et al., 2015; Säfholm et al., 2015).

This study aims at investigating the effects of single and combined exposure to EE2 and LNG on the expression of the zebrafish *cyp19a1b* gene both in *in vitro* and *in vivo* models. In zebrafish, the *cyp19a1b* gene encodes the brain form of aromatase (aromatase B) which is only expressed in radial glial cells that act as neuronal progenitors both in developing and adult brain (Pellegrini et al., 2007). The *cyp19a1b* gene is extremely sensitive to (xeno-)estrogens and this regulation is ER-dependent (Le Page et al., 2008; Brion et al., 2012). In the past few years, we developed both *in vitro* and *in vivo* bioassays, based on zebrafish *cyp19a1b* gene, that were used in this study: i) a human glial cell culture (U251-MG) co-transfected with zebrafish ER subtypes (zER α , zER β 1 and zER β 2) and a luciferase gene under the control of the zebrafish *cyp19a1b* promoter (Le Page et al., 2006), ii) a transgenic zebrafish (*cyp19a1b*-GFP) line expressing GFP under the control of the zebrafish *cyp19a1b* promoter which is suitable to detect estrogenicity of chemicals alone and in mixtures (Brion et al., 2012; Petersen et al., 2013). These *in vivo* and *in vitro* bioassays were used to assess the estrogenic responses of EE2 and LNG in mixtures; responses that were modeled using the concentration-addition (CA) prediction model. Deviations from this no-interaction model were characterized in terms of synergism or antagonism, modeled using Jonker's interaction terms (Jonker et al., 2005) and their significance was tested. By this approach, the present study reports additive estrogenic effects of EE2 and LNG in mixtures on the expression of an estrogen-regulated gene in a glial cell context.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

EE2 (purity \geq 98%, CAS number: 57-63-6; reference: E4876) and LNG (purity \geq 98%; CAS number: 797-63-7; reference: N2260) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Zebrafish maintenance and breeding

Animal culture, handling and experimentation were approved by the INERIS life science ethics committee and in accordance with French ethical laws. The *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish (Tong et al., 2009) were held at the Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France). They were maintained in 3.5 L aquaria in a recirculation system (Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Italy) on a 14 h light: 10 h dark cycle at a temperature of 25.1 ± 1.0 °C. They were allowed to reproduce (ratio of 2 males for 1 female). Fertilized eggs were harvested and disinfected 5 min in water supplemented with 0.1% of commercial bleach (2.6% of sodium hypochlorite).

2.3. Zebrafish exposure to EDCs

Fertilized *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish eggs were exposed to chemicals (alone or in mixtures) or to solvent control (DMSO, 0.02% v/v) according to (Brion et al., 2012) with minor modifications. Briefly, for each experimental condition, 20 embryos were exposed in 100 mL of water. Embryos were kept at 28 °C, under semi-static conditions. Exposures were performed from 0 days post fertilization (dpf) to

4 dpf without water renewal. At the end of the exposure period (96 h), non-transgenic zebrafish were removed and 4-dpf old transgenic zebrafish were processed for fluorescence measurement by image analysis. Experiments were performed in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 2010/63/UE).

2.4. *In vivo* imaging

In vivo fluorescence imaging was performed according to (Brion et al., 2012). Each live *cyp19a1b*-GFP transgenic embryo was photographed once in dorsal view using a Zeiss Axiolmager Z1 fluorescence microscope equipped with an AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Each photograph was acquired under the same exposure conditions ($\times 10$ objective, 134 ms of fluorescent light exposure, maximal light intensity). Fluorescence quantification was performed using Image J software (available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For each picture, the integrated density (IntDen) was measured, i.e. the sum of the grey-values of all the pixels within the region of interest. All grey-values of 300 or less were defined as background values.

2.5. U251-MG cell bioassay

The ER-negative human glial cell line U251-MG (ECACC) culture, handling and the luciferase assay were performed according to (Le Page et al., 2006).

U251-MG cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere in phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 8% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 20 U/mL penicillin, 20 μ g/mL streptomycin and 50 ng/mL amphotericin B.

For transfection experiments, U251-MG cells were plated in 24-well plates at a density of 0.2×10^5 cells/mL. After 24 h, the medium was replaced with fresh phenol red-free DMEM containing 2% FCS. In each well, 25 ng of zER expression vector (i.e. Topo-pcDNA3 expression vector containing the coding region of zER α or zER β 2 complementary DNA and the neomycin resistance gene (Menuet et al., 2002)), 25 ng of cytomegalovirus- β -galactosidase control plasmid and 150 ng of luciferase reporter construct (i.e. proximal promoter region of the zebrafish *cyp19a1b* gene coupled to the luciferase reporter gene (Menuet et al., 2005)) were transfected using JetPEI™ reagent, as indicated by the manufacturer (Polyplus-transfection, France). After one night, medium was replaced with fresh DMEM-F12 containing 2% charcoal/dextran FCS with xeno-estrogens or vehicle (DMSO, 0.1% v/v). The luciferase activities were assayed after 48 h using the luciferase assay system (Promega). β -galactosidase activity was used to normalize transfection efficiency in all experiments. Results were expressed as fold induction relative to the solvent.

2.6. Data normalization

In the *in vivo* assay with *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish, induction of GFP fluorescence was measured as IntDen and normalized by dividing by the geometric mean of the IntDen in the DMSO control group. In the preliminary single chemical experiments used for the design of mixture experiments, the concentration-response relationships were obtained in separate experiments. For that reason, the log-inductions were further normalized by the logarithm of the geometric mean of the positive controls (EE2; 0.05 nM), which corresponds to a maximum response level.

In the *in vitro* assay with U251-MG cell cultures, the data were normalized by dividing by the geometric mean of the corresponding solvent control group. EE2 and levonorgestrel as single chemicals were tested on the same plate therefore no additional normalization was required.

2.7. Concentration-response modeling

The relationship between concentration and log-induction was modeled with a 3-parameter Hill model, where the basal level was set to 0:

$$\Phi(c) = \frac{Max}{1 + \left(\frac{c}{EC50}\right)^\beta} \quad (1)$$

where *Max* is the maximum level of induction, *c* is the concentration, *EC50* is the concentration producing 50% of the maximum induction, and β is the Hill slope. In both *in vivo* and *in vitro* single chemical experiments, common values of *Max* and β were estimated for EE2 and levonorgestrel. Lack-of-fit F-tests were performed to check the model fit compared to an analysis of variance, and to check that the model did not fit less well with common values for both compounds. The parameters were estimated by least squares, using R 3.1.1 (R Core Team, 2014) and package drc (Ritz and Streibig, 2005).

2.8. Mixture experimental designs

Preliminary single chemical experiments were performed in order to construct the mixture experimental designs.

In the *in vivo* assay, three concentration-response datasets for EE2 and two concentration-response datasets for levonorgestrel were used. Each concentration-response was successfully modeled with the Hill model and common values for the maximum response level and the slope were successfully estimated. These models were used to build a ray design with single chemicals and three mixture ratios (3:1, 1:1, and 1:3 in terms of relative toxicity quantified by the *EC50*), with five concentrations along each ray, centered around the *EC50* with 4-fold dilutions (range of EE2 concentrations from 9.77×10^{-8} μM (28.9 pg/L) to 1×10^{-4} μM (29.6 ng/L) and range of LNG concentrations from 0.293 nM (91 ng/L) to 0.3 μM (93 $\mu\text{g/L}$) (Supplemental Table 1). In theory, the equimolar mixture ratio is the one where interactions are likely to be most visible.

In the *in vitro* assay, one experiment with EE2 and levonorgestrel on the same plate was used to calibrate the design. With levonorgestrel, no response saturation was observed in the range of concentrations used to test for ER receptor activation. The maximum response and Hill slope were therefore imputed from the EE2 dose-response. The data were successfully modeled with the 3-parameter Hill model. Given that the levonorgestrel ray and likely some of the mixture rays would not be modeled with the 3-parameters Hill model independently from the rest of the data because of the absence of response saturation, a factorial design for the mixture experiment was preferred over a ray design. This was built with 3 levels of levonorgestrel (0, 1, and 10 μM) and 6 levels of EE2 (0, 0.001 nM to 10 nM with 10-fold dilutions).

2.9. Mixture concentration-response modeling

Concentration-response surfaces were modeled with the concentration addition (CA) model (Loewe, 1953) using Berenbaum's general solution (Berenbaum, 1985). This CA model is only defined when all mixture components produce the same maximum response and when the basal response is equal. In view to model mixture experiment data with the CA model, several adjustments were performed. Since the data for single compounds were obtained from several independent experiments, they were normalized (data were divided by the geometric mean of the non-treated group) to be able to compare the concentration-responses curves. The single compound data were modeled with a null basal response without detriment to the modeling (F-test, $p < 0.05$) and with no significant change of the *EC50*s. Then, common maximum responses were estimated. At present, there is still a discussion on the validity of the CA model when single compounds produce different slopes because this would suggest that the mode of action is

different (Backhaus et al., 2004; Gennings et al., 2005): the concept of Toxic Equivalent Factor is a more restrictive version of CA (Webster, 2013). For that reason, when this was not detrimental to the model fit, a common slope was also estimated for single compounds. The only free remaining parameter was then the *EC50*. All these constraints do artificially slightly reduce the uncertainty round the *EC50*, but when they are not detrimental to the model fit, the estimation of the *EC50* is not significantly affected by setting these three parameters (except for LNG in the U251-MG cells transfected with zfER β 2 where no saturation response was observed).

Interaction terms for simple antagonism/synergy (SA), dose-ratio dependent interactions (DR), and dose-level dependent interactions (DL) were subsequently added to the CA model (Jonker et al., 2005). Significance of the interactions was assessed using approximate F-tests on the residual sums of squares by considering that the models were nested. Acceptability of the concentration-response surface models was assessed with a lack-of-fit F-test compared to the analysis of variance model.

3. Results

No effect due to chemical exposure was observed on lethality or time to hatch during any of the *in vivo* single chemical and mixture studies.

3.1. *In vitro* effects of single test compounds

The effect of EE2 and LNG alone was assessed in U251-MG glial cells co-transfected with zf-ERs and the *Zf-cyp19a1b* promoter-luciferase reporter (one exposure experiment for each compound and each ER, 3 measure replicates for each condition). EE2 treatment induced expression of luciferase activity in a concentration-dependent manner, and *EC50* (median effective concentration) of 1.4×10^{-10} M for ER α and 6.63×10^{-12} M for ER β 2 were calculated (Supplemental Fig. 1). LNG alone was poorly effective in inducing luciferase activity and no saturation of the response was observed. *EC50*s for LNG equal to 36.1×10^{-6} M for ER α and 12.6×10^{-6} M for ER β 2 were calculated in that *in vitro* model by assuming that the maximum response and the slope were equal to those of EE2.

3.2. *In vitro* effects of binary mixtures of EE2 and LNG

EC50 for EE2 and LNG were calculated from mixture experiments to confirm *EC50* previously obtained in single test compounds experiments. *EC50* for EE2 were 1.29×10^{-10} M and 1.19×10^{-11} M for U251-MG glial cells transfected with ER α and ER β 2 respectively. For LNG, *EC50* were 22×10^{-6} M and 8.6×10^{-6} M for U251-MG glial cells transfected with ER α and ER β 2 respectively. All these *EC50*s are in the same range of order than those previously calculated in the single test compound experiments.

In vitro, mixtures of EE2 and LNG led to a concentration-dependent induction of luciferase activity in U251-MG cells transfected both with ER α and ER β 2 (Fig. 1). The measured inductions of luciferase activity can be modeled by the CA model (lack-of-fit F-test compared to the analysis of variance model: $p = 0.548$ for ER α and $p = 0.164$ for ER β 2). None of the interactions added to the CA model improved the model fit significantly and using different slopes for both compounds in the CA model did not improve the model fit either (approximate F-test: $p = 0.44$ for ER α and $p = 0.68$ for ER β 2).

3.3. *In vivo* effects of single test compounds

Exposure of transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish to EE2 for 96 h led to a concentration-dependent induction of GFP expression, with an *EC50* of $5.0 \times 10^{-12} \pm 1.2 \times 10^{-12}$ M (Supplemental Fig. 2; 3 independent experiments with 8–19 transgenic zebrafish per condition). This expression of GFP is localized to radial glial cells of the brain (Fig. 2). LNG

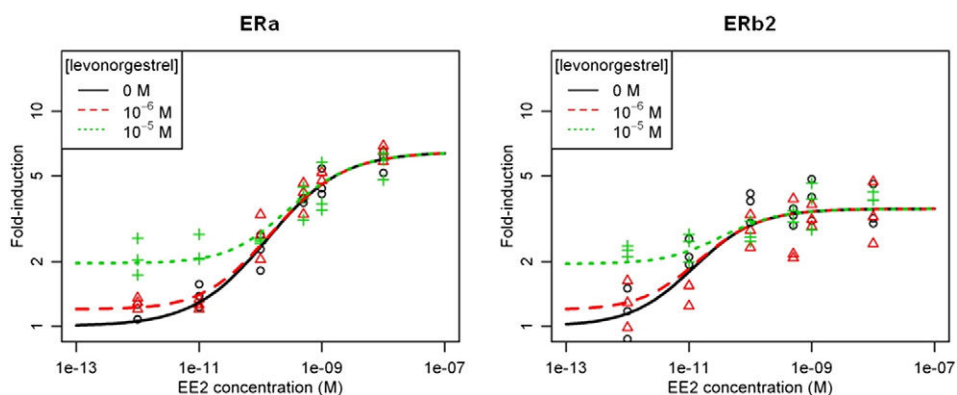


Fig. 1. Concentration-response curves of luciferase activity in U251-MG cells transfected with ER α or ER β 2 after exposure to ethinylestradiol (EE2) alone or in combination with levonorgestrel (LNG) at different concentrations. All the data were modeled by fitting the concentration-addition model to the concentration-response surface. The points represent the triplicate of each measure.

alone also led to a concentration-dependent induction of GFP expression in radial glial cells of the brain with an EC50 of $1.68 \times 10^{-8} \text{ M} \pm 0.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ (Supplemental Fig. 3; 2 independent experiments with 8–19 transgenic zebrafish per condition).

3.4. *In vivo* effects of binary mixtures of EE2 and LNG

In mixture experiment with transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish, EC50 were $6.18 \times 10^{-12} \text{ M}$ for EE2 and $4.55 \times 10^{-8} \text{ M}$ for LNG.

The mixtures of EE2 and LNG induced GFP expression in radial glial cells of the brain of transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish in a concentration-dependent manner (Fig. 3). Observed responses were compared to the concentration-response surfaces modeled with the CA model with identical slopes for each compound (Loewe, 1953). Observed responses were in good agreement with the CA model (lack-of-fit F-test compared to the analysis of variance model: $p = 1.00$) and no deviation of the EC50 isobole was observed (Fig. 4). Interactions were then added to the CA model but none showed a significant improvement of the adjustment quality of the model (approximate F-tests: $p = 0.43$ for SA, $p = 0.82$ for DR and $p = 0.92$ for DL), indicating that EE2 and LNG exerted additive effects in mixture. Using different slopes for both compounds in the CA model did not improve the model fit either (approximate F-test: $p = 0.42$).

4. Discussion

The synthetic estrogen EE2 showed a high estrogenic potency *in vivo* in transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish with an EC50 of $6.18 \times 10^{-12} \text{ M}$ (1.84 ng/L) for the induction of GFP expression in the radial glial cells of the brain similar to previous studies using the same *in vivo* model (Brion et al., 2012; Petersen et al., 2013). In transgenic medaka stably

expressing GFP under the control of the choriogenin gene promoter and in transgenic zebrafish stably expressing luciferase under the control of an ERE, EE2 was less potent (EC50s of $2.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ (71.9 ng/L) and of $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ (296.4 $\mu\text{g/L}$) respectively) than in the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish, confirming the sensitivity of both the *cyp19a1b* gene and the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line to synthetic estrogens (Legler et al., 2002; Brion et al., 2012; Spirhanzlova et al., 2016). In U251-MG cells transfected with ER α or ER β 2, EC50s are similar to those obtained using the same *in vitro* models in a previous study (Le Page et al., 2006) and to those calculated from the zfERs transactivation assays using human embryonic kidney cells (293HEK) cells (Legler et al., 2002). Both the *in vitro* (U251-MG cells transfected with ZfERs) and the *in vivo* (*cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish) models proved to be suitable tools to detect estrogenic compounds as previously stated by (Le Page et al., 2006; Brion et al., 2012; Petersen et al., 2013).

Due to the potential risk LNG represents for aquatic organisms, numerous *in vivo* studies have been conducted the last few years to determine its negative impacts to non-target organisms, notably to fish and amphibian reproduction (for review see Kumar et al., 2015).

Studies on the effects of LNG in aquatic organisms focused essentially on peripheral reproductive organs, *i.e.* gonads and liver, while very few data are available on other target tissues such as the central nervous system. *In vivo*, in adult fish, LNG has clear androgenic effects since it induces spiggin production by the kidney in male and female sticklebacks (Svensson et al., 2013; Svensson et al., 2014) and also male secondary sexual characteristics in female fathead minnows (Zeilinger et al., 2009; Runnalls et al., 2013; Runnalls et al., 2015). On the other hand, information on the estrogenic effects of LNG in fish is scarce. For instance, effects of LNG on the expression of vitellogenin (*vtg*), a hepatic ER-regulated gene, are rather heterogeneous. While in adult female three-spined sticklebacks, an inhibition of *vtg* gene expression was observed

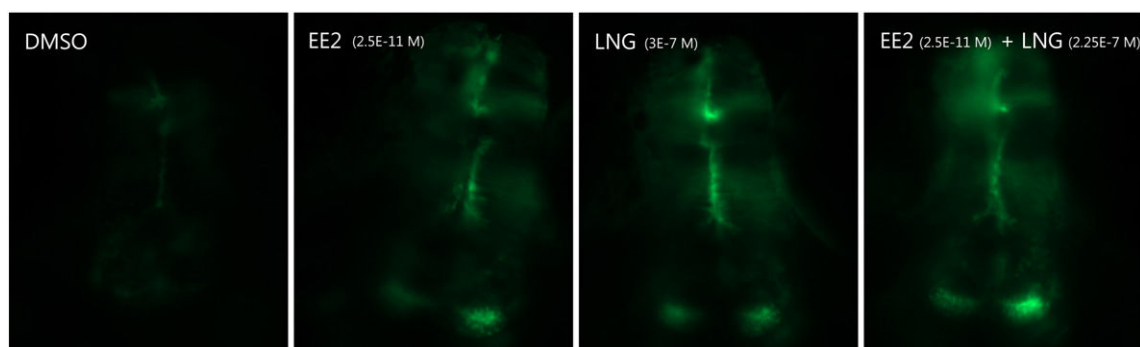


Fig. 2. *In vivo* imaging of 4-dpf old live transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos exposed to chemicals inducing GFP expression in radial glial cells. Dorsal view of the brain. For each chemical the concentration used is indicated. DMSO: dmsolvent control; EE2: ethinylestradiol; LNG: levonorgestrel.

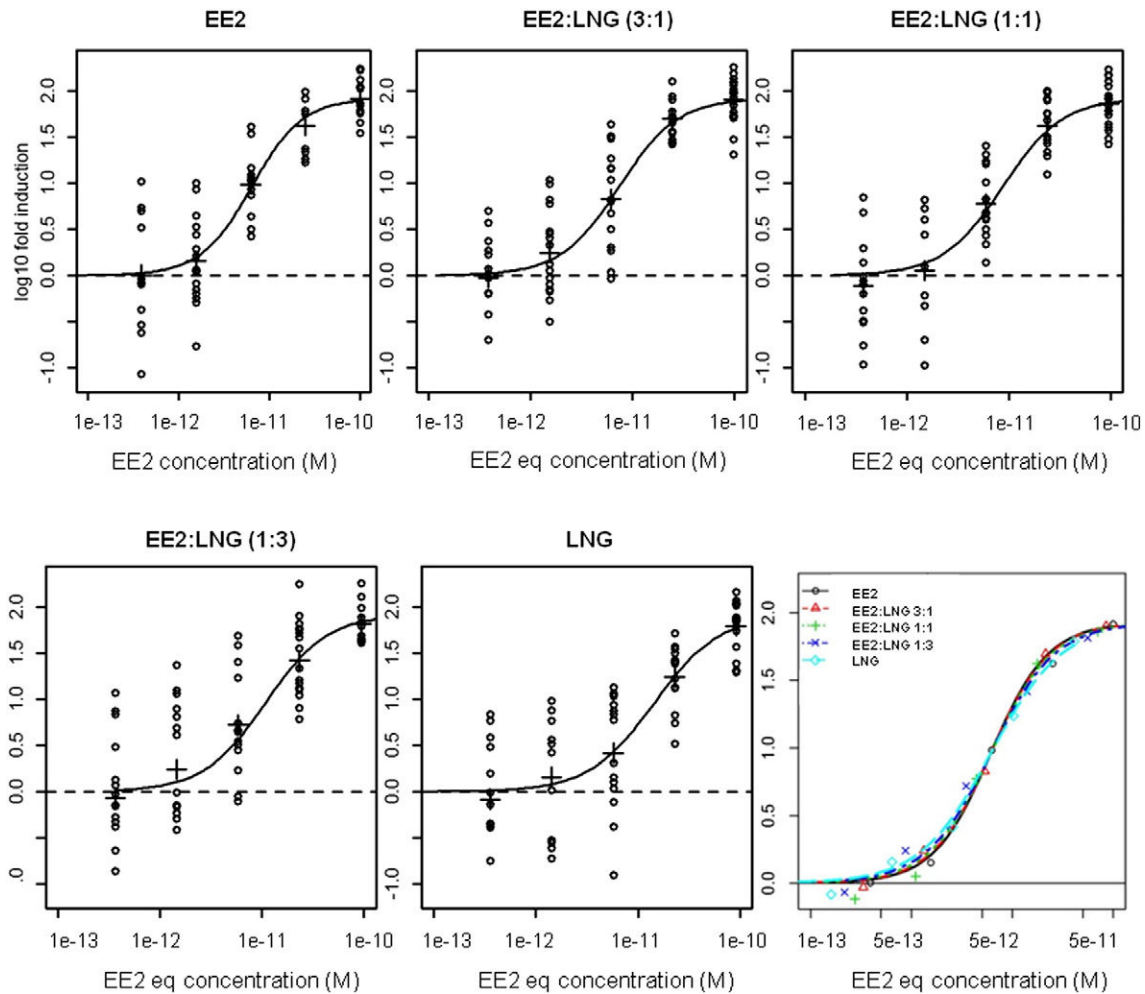


Fig. 3. Concentration-response curves of GFP in *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish after exposure to ethinylestradiol (EE2) and levonorgestrel (LNG) alone or in combinations (3 different ratios of substances). These data originated from the first exposure experiment and are representative of all the experiments performed. All the data were modeled by the concentration-addition model. Open circle represents one measure of GFP realized in one transgenic fish brain ($n = 8$ –19 fish per condition). In the last graphic (right, bottom) which gathers all the concentration-response curves, the points represent the means of the GFP experimentally measured.

in parallel to spiggin production induction after LNG exposure (Svensson et al., 2013), in male and female pubertal roach, LNG exposure led to an induction of *vtg* expression (Kroupova et al., 2014). The discrepancy between these studies may be attributed to the differences in LNG concentrations used (one order of magnitude higher in roach (3 $\mu\text{g/L}$) as compared to three-spined stickleback), to the different developmental stages of the fish (adult three-spined stickleback vs pubertal roach), and to different metabolism/biotransformation capabilities between the two species. Nevertheless, in our study, LNG induced GFP expression in the brain of *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish after 4 days of exposure with an EC_{50} of 4.55×10^{-8} M (14.2 $\mu\text{g/L}$), confirming our previous findings on the estrogenic potency of LNG (Brion et al., 2012; Cano-Nicolau et al., 2016). In zebrafish, exposure to 231.95 ng/L of LNG from 4 h post fertilization (hpf) to 144 hpf also led to a slight induction of *vtg* expression (1.2 fold), supporting this estrogenic effect of LNG in zebrafish larvae (Zucchi et al., 2012).

In vitro, in the U251-MG cells transfected with zfERs and the luciferase gene under the control of the promoter of the *cyp19a1b* gene, LNG stimulates luciferase activity both with zfER α (EC_{50} of 22×10^{-6} M) and zfER β 2 (EC_{50} of 8.6×10^{-6} M). Moreover, the estrogenic effect of LNG is mediated by zfERs since luciferase induction is blocked by the addition of ICI 182-780, a pure ER antagonist (Cano-Nicolau et al., 2016). Only little information on the *in vitro* estrogenic potency of LNG is available in the literature. In the human breast cancer cells MCF-7 (expressing hER α), LNG stimulates the ER-dependent growth of the cells, and

this effect is blocked by an ER antagonist, ICI 164-384, demonstrating this effect is mediated by ERs (Jeng et al., 1992). In MELN cells (cells derived from the MCF-7 stably transfected with the luciferase gene under the control of an ERE (ZELH-zfER)), LNG induces the expression of luciferase with an EC_{20} of 6.4×10^{-8} M (Creusot et al., 2014) and an EC_{50} of 2×10^{-7} M (personal communication from N. Creusot). In zebrafish liver cell lines co-transfected with zfERs and the luciferase gene under the control of an ERE (ZELH-zfER) (Cosnefroy et al., 2012), LNG exerted EC_{50} s of 4×10^{-7} M and 2×10^{-7} M for ER α and ER β 2 respectively (personal communication from S. Aït-Aïssa). The sensitivity differences between all these models clearly highlight the necessity of using fish specific models in risk assessment of chemicals for aquatic organisms.

In mammals, while LNG does not bind to the ERs, its metabolites do and they seem to be responsible for the estrogenic effects observed (Lemus et al., 1992; Santillán et al., 2001; García-Becerra et al., 2002). In human cells, the estrogenic activity of LNG was attributed to its metabolite 3 β ,5 α -tetrahydro-LNG and is mainly mediated by hER α (García-Becerra et al., 2002; Escande et al., 2006). LNG metabolism into 3 β ,5 α -tetrahydro-LNG also occurs in rat hypothalamus and pituitary (Larrea et al., 1987). Moreover, LNG does not bind to zebrafish ERs either (Cano-Nicolau et al., 2016), suggesting its conversion into estrogenic metabolites, especially in the brain. The differences of sensitivity to LNG of the different biological models (*in vitro* human with hERs or zfERs, *in vitro* fish, *in vivo* fish) could thus rely on differences in LNG metabolism capabilities of these different cell lines/organisms and

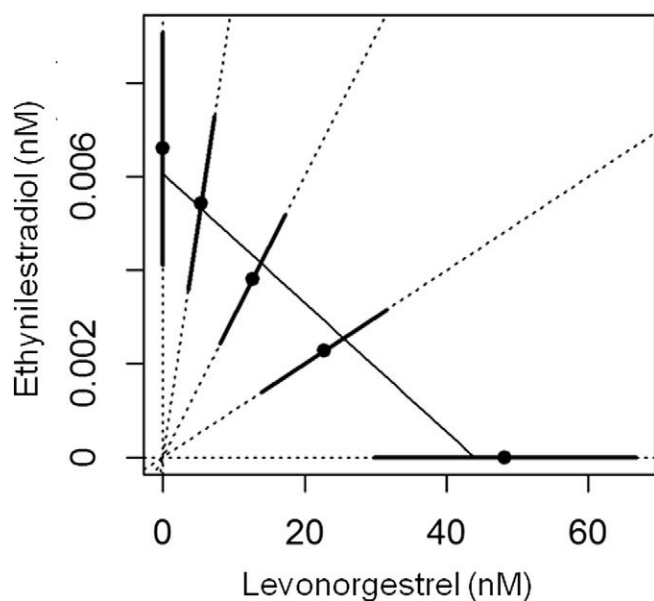


Fig. 4. Illustration of the EC50 for each ray of the ethynylestradiol + levonorgestrel mixtures. The points represent the EC50 and the bars represent the standard error. These data originated from the first exposure experiment with the *cyp19a1a*-GFP transgenic zebrafish line (described in Fig. 3) and are representative of all the experiments performed.

on differences in binding affinity of metabolites to hERs and zERs. Also, the possibility that these differences of sensitivity could rely on an ability of LNG to increase the levels of ERs expression in the brain of fish could not be ruled out. Nevertheless, our results clearly suggest that LNG (or its metabolites) could interact both with zER α and zER β 2. Altogether, our results give interesting information on the ability of LNG to interact with the zebrafish estrogenic pathway.

Given that simultaneous exposure to synthetic progestins and estrogens occurs in aquatic wildlife, information on mixture effect of these compounds is relevant. In the present study, we investigated the combined estrogenic effects of EE2 and LNG on the expression of the *cyp19a1b* gene of zebrafish. The results show that EE2 and LNG exert additive effects on the expression of the zebrafish *cyp19a1b* gene both *in vivo* and *in vitro* but with a better sensitivity of the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line compared to U251-MG cells. *In vitro*, in yeast cultures co-transfected with hER α and the β -galactosidase under the control of an ERE, EE2 and different metabolites of LNG showed additive effects on the β -galactosidase activity while LNG alone had no effect (Santillán et al., 2001), reinforcing the idea that LNG estrogenicity is mediated by its metabolites. In fathead minnow, EE2 and LNG co-exposure reduced egg production in an additive manner while the increase of *vtg* expression was only explained by exposure to EE2 with no contribution of LNG (Runnalls et al., 2015). In the same way, in the juvenile African clawed frog, no estrogenic effect of LNG alone or in mixture with EE2 is observed on the ER-regulated expression of *vtg beta1* gene or on the sex ratio (Säfholm et al., 2015). All these studies show that additive mixture responses of EE2 and LNG do not occur on all ER-regulated endpoints in all tissues and, as previously stated by others, at all levels of biological organization (Runnalls et al., 2015; Säfholm et al., 2015).

In the present study, the effects of LNG alone or in combination are observed for quite high concentrations (high ng/L range to low μ g/L range) as compared to environmental LNG concentrations (dozens of ng/L). Some endpoints were showed to be disturbed at lower concentrations such as reduced egg production in female fathead minnow after exposure to 0.8 ng/L for 21 days or masculinization of female zebrafish exposed to 10 ng/L LNG during the process of sexual differentiation (0–63 dpf) (Zeilinger et al., 2009; Hua et al., 2015). However, LNG was showed to strongly bioconcentrate in fish since exposure to a

water concentration of 1 ng/L of LNG gave rise to ng/mL plasma concentrations in rainbow trout, exceeding the human therapeutic plasma concentration (Fick et al., 2010). Although the effective concentrations of LNG in the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line are higher than in other assays, it should be kept in mind that this bioassay allows the detection of the estrogenic effects of LNG after only 96 h of exposure in a simple and reliable *in vivo* assay. Moreover, the flexibility and space-saving character of this assay allows the assessment of a great number of conditions at the same time, ideal for complete experimental design needed for mixture testing. Thus, the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line clearly emerges as a relevant *in vivo* assay to assess the effect of mixtures of chemicals on the ER-signaling pathway at early critical developmental stages. And, although extrapolation from this assay to environmental scenarios is challenging, studies using the *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish line could possibly identify compounds/mixtures that will need further investigations in *in vivo* studies with more integrative endpoints.

In conclusion, in the present study we demonstrated (i) that our *in vivo* (*cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish) biological model is a valuable tool that can be used in risk assessment for both single chemicals and their mixtures, (ii) the interest of employing complete experiment design models such as ray design to allow a better characterization of the effects of mixtures, even if no synergistic/antagonistic interaction was highlighted in mixtures of EE2 and LNG in our study, (iii) that EE2 and LNG in mixtures exert additive estrogenic effects both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that some environmental progestins could exert effects that will add to those of environmental (xeno-)estrogens. Furthermore, the additive effects we observed on the expression of *cyp19a1b* occurred at early life stages, for very short exposure duration time and located in radial glial cells that are progenitor cells of the brain. Our present work did not explore the potential adverse effects of these compounds alone and in mixture on the (neuro)development of zebrafish although these radial glial cells are known to play a crucial role in neurogenesis (Pellegrini et al., 2007; Diotel et al., 2013). Moreover, neurogenesis is affected by exposure to (xeno-)estrogens by means of a modulation of the neurogenic activity of these radial glial cells (Diotel et al., 2013). These considerations naturally argue in favor of further studies on the physiological consequences of these early perturbations of the *cyp19a1b* gene expression on fish brain development.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.07.023>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgement

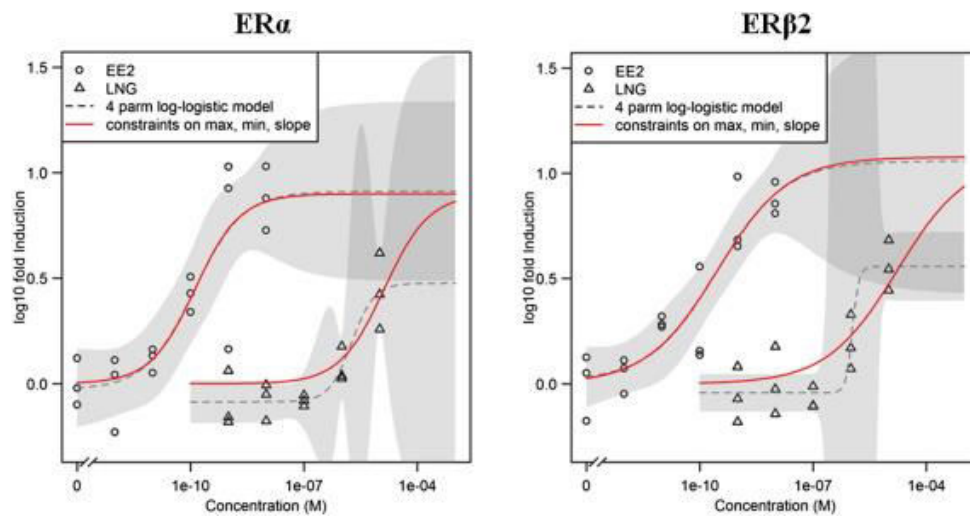
This work was supported by the French National Research Program on Endocrine Disruptors (PNRPE) from the French Ministry of Environment [MIXEZ program no. 11-MRES-PNRPE-7-CVS-033] and the French National Research Agency [ANR; PROOFS program no. ANR-13-CESA-0006-03].

References

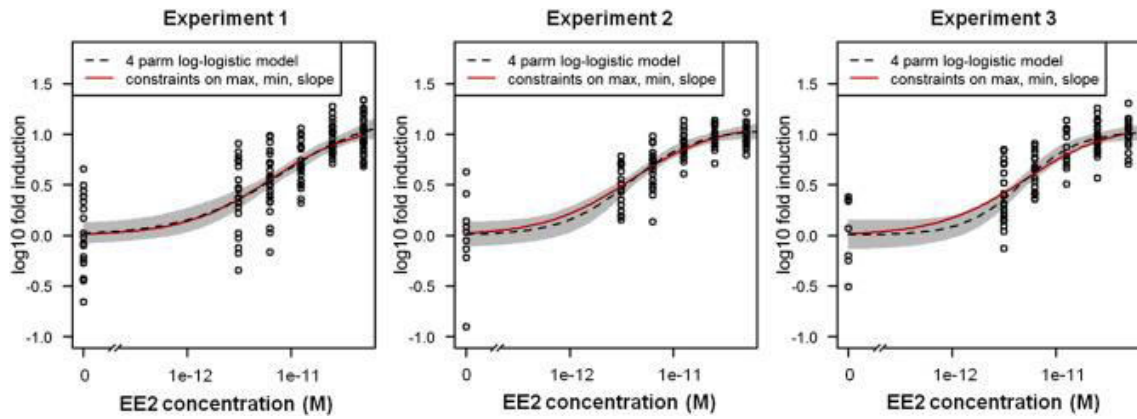
- Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.L., Surif, S., 2010. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (44), 6791–6806.
- Backhaus, T., Arrhenius, A., Blanck, H., 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ. Sci. Technol.* 38 (23), 6363–6370.
- Berenbaum, M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* 114 (3), 413–431.
- Besse, J.-P., Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 157 (12), 3485–3494.

- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS One* 7 (5), e36069.
- Cano-Nicolau, J., Garoché, C., Hinfray, N., Pellegrini, E., Boujrad, N., Pakdel, F., Kah, O., Brion, F., 2016. Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305, 12–21.
- Cosnefrey, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci.* 125 (2), 439–449.
- Creusot, N., Ait-Aissa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48 (7), 3649–3657.
- Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M.-M., Anglade, I., Kah, O., Pellegrini, E., 2013. Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Horm. Behav.* 63 (2), 193–207.
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., Balaguer, P., 2006. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.* 71 (10), 1459–1469.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disruptors in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Environ. Int.* 84, 115–130.
- Fick, J., Lindberg, R.H., Parkkonen, J., Arvidsson, B., Tysklind, M., Larsson, D.G., 2010. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ. Sci. Technol.* 44 (7), 2661–2666.
- García-Becerra, R., Borja-Cacho, E., Cooney, A.J., Jackson, K.J., Lemus, A.E., Pérez-Palacios, G., Larrea, F., 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82 (4–5), 333–341.
- Gennings, C., Carter Jr., W.H., Carchman, R.A., Teuschler, L.K., Simmons, J.E., Carney, E.W., 2005. A unifying concept for assessing toxicological interactions: changes in slope. *Toxicol. Sci.* 88 (2), 287–297.
- Hua, J., Han, J., Guo, Y., Zhou, B., 2015. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* 166, 1–9.
- Jeng, M.H., Parker, C.J., Jordan, V.C., 1992. Estrogenic potential of progestins in oral-contraceptive stimulate human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 52 (23), 6539–6546.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (10), 2701–2713.
- Kortenkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 115 (Suppl. 1), 98–105.
- Kroupova, H.K., Trubiroha, A., Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Lutz, I., Grabic, R., Kocour, M., Kloas, W., 2014. The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat. Toxicol.* 154 (0), 154–162.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumova, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kroupova, H.K., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 49 (5), 2625–2638.
- Larrea, F., Vilchis, F., Chavez, B., Perez, A.E., Garzaflares, J., Perezpalacios, G., 1987. The metabolism of 19-Nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuro-endocrine level. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 27 (4–6), 657–663.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ. Health Perspect.* 114 (5), 752–758.
- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (10), 1549–1557.
- Legler, J., Zeinstra, L.M., Schuitemaker, F., Lanser, P.H., Bogerd, J., Brouwer, A., Vethaak, A.D., De Voogt, P., Murk, A.J., Van der Burg, B., 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 36 (20), 4410–4415.
- Lemus, A.E., Vilchis, F., Damsky, R., Chavez, B.A., Garcia, G.A., Grillasca, I., Perez-Palacios, G., 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (3–8), 881–890.
- Lin, L.L., Janz, D.M., 2006. Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 80 (4), 382–395.
- Liu, Z.-H., Ogejo, J.A., Pruden, A., Knowlton, K.F., 2011. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: a review. *Sci. Total Environ.* 409 (24), 5149–5161.
- Loewe, S., 1953. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* 3 (6), 285–290.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66 (6), 1881–1892.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485 (4), 304–320.
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Marmignon, M.H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501 (1), 150–167.
- Petersen, K., Tollefsen, K.E., 2011. Assessing combined toxicity of estrogen receptor agonists in a primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 186–195.
- Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S., Tollefsen, K.E., 2013. Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 88–97.
- R Core Team, 2014. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rajapakse, N., Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2004. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ. Sci. Technol.* 38 (23), 6343–6352.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassays analysis using R. *J. Stat. Softw.* 12 (5), 1–22.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47 (4), 2077–2084.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Kugathas, S., Margiotta-Casaluci, L., Scholze, M., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2015. From single chemicals to mixtures – reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 169, 152–167.
- Säfhölm, M., Jansson, E., Fick, J., Berg, C., 2015. Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquat. Toxicol.* 161, 146–153.
- Santillán, R., Pérez-Palacios, G., Reyes, M.N., Damián-Matsumura, P., García, G.A., Grillasca, I., Lemus, A.E., 2001. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* 427 (2), 167–174.
- Spirhanzlova, P., Leleu, M., Sébillot, A., Lemkine, G.F., Iguchi, T., Demeneix, B.A., Tindal, A.J., 2016. Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 179, 64–71.
- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., Brunstrom, B., 2013. The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ. Sci. Technol.* 47 (4), 2043–2051.
- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., Brunstrom, B., 2014. Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* 147, 84–91.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Scholze, M., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 35 (12), 2476–2481.
- Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47 (2), 67–73.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ. Pollut.* 159 (10), 2929–2934.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.-F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1210 (1), 84–91.
- Webster, T.F., 2013. Mixtures of endocrine disruptors: how similar must mechanisms be for concentration addition to apply? *Toxicology* 313 (2–3), 129–133.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (12), 2663–2670.
- Zucchi, S., Castiglioni, S., Fent, K., 2012. Progestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 46 (9), 5183–5192.

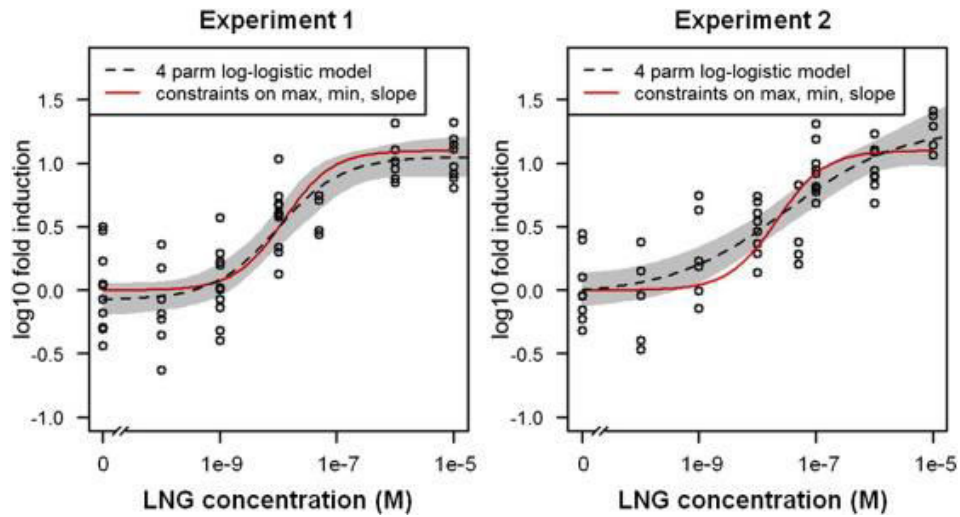
Supplementary data



Supplemental Fig. 1. Concentration-response curves of luciferase activity in U251-MG cells transfected with ER α or ER β 2 after exposure to ethinylestradiol (EE2) or levonorgestrel (LNG) alone at different concentrations. All the data were modeled by the 4 parameters log-logistic model both without any constraint (black dotted line) and with constraints applied on the max, the min and the slope (red line). The points represent the triplicate of each measure. The grey surfaces represents the 95% confidence intervals.



Supplemental Fig. 2. Concentration-response curves of GFP in *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish after exposure to ethinylestradiol (EE2) at different concentrations in three independent experiments. All the data were modeled by the 4 parameters log-logistic model both without any constraint (black dotted line) and with constraints applied on the max, the min and the slope (red line). Open circle represents one measure of GFP realized in one transgenic fish brain ($n = 8-19$ fish per condition). The grey surfaces represents the 95% confidence intervals.



Supplemental Fig. 3. Concentration-response curves of GFP in *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish after exposure to Levonorgestrel (LNG) at different concentrations in two independent experiments. All the data were modeled by the 4 parameters log-logistic model both without any constraint (black dotted line) and with constraints applied on the max, the min and the slope (red line). Open circle represents one measure of GFP realized in one transgenic fish brain (n = 6–12 fish per condition). The grey surfaces represents the 95% confidence intervals.

Supplemental Table 1. Experimental ray design for the assessment of the effects of ethinylestradiol (EE2) and levonorgestrel (LNG) alone and in mixtures on the expression of GFP in the brain of cyp19a1b-GFP transgenic zebrafish line.

Condition	[EE2] (μM)	[LNG] (μM)	Ray
1	0	0	/
2	1.00E-04	0	1:0
3	2.50E-05	0	1:0
4	6.25E-06	0	1:0
5	1.56E-06	0	1:0
6	3.91E-07	0	1:0
7	7.50E-05	0.075	3:1
8	1.88E-05	0.0188	3:1
9	4.69E-06	0.00469	3:1
10	1.17E-06	0.00117	3:1
11	2.93E-07	0.000293	3:1
12	5.00E-05	0.15	1:1
13	1.25E-05	0.0375	1:1
14	3.13E-06	0.00938	1:1
15	7.81E-07	0.00234	1:1
16	1.95E-07	0.000586	1:1
17	2.50E-05	0.225	1:3
18	6.25E-06	0.0563	1:3
19	1.56E-06	0.0141	1:3
20	3.91E-07	0.00352	1:3
21	9.77E-08	0.000879	1:3
22	0	0.3	0:1
23	0	0.075	0:1
24	0	0.0188	0:1
25	0	0.00469	0:1
26	0	0.00117	0:1

Données complémentaires

1. Effet des progestatifs vis-à-vis des différents sous-types du récepteur des œstrogènes

En complément des résultats obtenus *in vitro* pour les effets de LNG et NET, l'ensemble des progestatifs a été testé dans un contexte cellulaire humain exprimant les différents sous-types de récepteur ER humain ou poisson zèbre afin de comparer les effets entre les espèces. Les progestatifs ont donc été testés sur les lignées cellulaires HG5LN-zfER α , HG5LN-zfER β 1 et HG5LN-zfER β 2 exprimant les différents sous-types du récepteur des œstrogènes poisson zèbre (cellules HeLa exprimant les plasmides Gal4(DBD)-zfER(LBD) et GalRE-luciférase) et sur les lignées HG5LN-hER α et HG5LN-hER β exprimant les isoformes α et β du récepteur des œstrogènes humain (cellules HeLa exprimant les plasmides Gal4(DBD)-hER(LBD) et GalRE-luciférase¹).

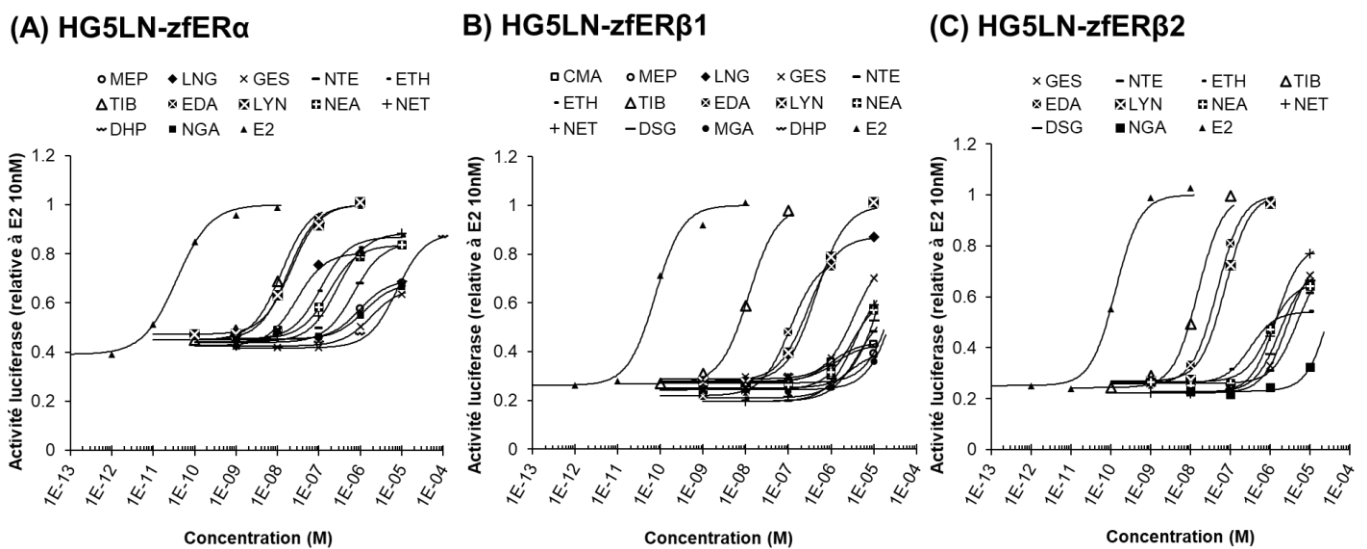


Figure 13 : Transactivation des différents sous-types du récepteur poisson zèbre des œstrogènes (zfER) dans les lignées cellulaires HG5LN-zfER α , HG5LN-zfER β 1 et HG5LN-zfER β 2 exprimant le gène rapporteur luciférase. N=3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du maximum d'activité luciférase induite par l'estradiol (E2) 10nM.

Dans l'ensemble, les composés ont induit l'activité luciférase sur les trois modèles cellulaires exprimant les récepteurs zfER avec des EC₅₀ plus faibles sur la lignée HG5LN-zfER α (EC₅₀ calculées variant entre 13nM et 6,2 μ M), légèrement plus élevées sur la lignée HG5LN-zfER β 1 (EC₅₀ calculées variant entre 12nM et 47 μ M) et globalement plus importantes sur la lignée HG5LN-zfER β 2 (EC₅₀ calculées variant entre 15nM et 41 μ M) (figure 13 et tableau 10). La tibolone est le composé le plus actif sur les trois sous-types, ce

¹ Ces expériences ont été réalisées par Nicolas Creusot à l'ICRM de Montpellier (Inserm U1194).

qui concorde avec le résultat obtenu *in vivo* sur le bioessai EASZY. Les EC₅₀ de E2 sont plus faibles *in vitro* que dans EASZY (environ 10 fois), mais pour la plupart des progestatifs testés, elles sont plus faibles *in vivo*. Certains composés inactifs sur EASZY ont induit une activité luciférase dans les modèles HG5LN-zfER α (MEP et NGA), HG5LN-zfER β 1 (MEP, MGA, CMA, DSG) et HG5LN-zfER β 2 (NGA, DSG).

Tableau 10 : Comparaison des EC₅₀ (nM) calculées sur les bioessais EASZY, HG5LN-zfER α , HG5LN-zfER β 1, HG5LN-zfER β 2, HG5LN-hER α et HG5LN-hER β . ne : pas d'effet ; nt : non testé.

Composés	EASZY EC ₅₀ (nM)	HG5LN- zfER α EC ₅₀ (nM)	HG5LN- zfER β 1 EC ₅₀ (nM)	HG5LN- zfER β 2 EC ₅₀ (nM)	HG5LN- hER α EC ₅₀ (nM)	HG5LN- hER β EC ₅₀ (nM)
E2	1.7	0,04	0,08	0,13	0,14	0,30
RU486	ne					
P4	ne					
DYD	ne					
DHP	nt	6222	28071		1110	
DRO	ne				79262	
MEP	ne	5352	40252		132114	
MPA	ne					
MGA	ne		46724			
CMA	ne		12577		6439	
CPA	ne					
R5020	ne					
NES	ne					
NGA	ne	1243		40604		
GRN	ne				9225	
ETH	40	127	33298	328	22	310
EDA	53	20	107	46	2,2	67
LYN	16	22	423	70	15	101
NEA	2.4	295	7045	973	71	3171
NET	4.0	502	8184	2303	100	1371
TIB	0.3	13	12	15	2,7	107
DSG	ne		15959	3697	161	
ENG	39				1223	
GES	222	6194	5511	4432	107	
LNG	89	22	305	77	1522	
NTE	126		11063	8497	37	
NGL	184				948	

Les EC₅₀ de LNG sont très comparables entre EASZY, HG5LN-zfER α et HG5LN-zfER β 2, tandis qu'elle est beaucoup plus importante sur HG5LN-zfER β 1. Il en va de même pour les composés EDA et LYN. Pour NET en revanche, l'EC₅₀ calculée sur EASZY est beaucoup plus faible que celles calculées *in vitro* sur HG5LN-zfER α , HG5LN-zfER β 1 et HG5LN-zfER β 2.

Dans l'article 2, LNG et NET ont induit l'activité luciférase dans les cellules gliales radiaires U251-MG co-transfectées avec les différents sous-types du zfER (zfER α , zfER β 1 ou zfER β 2) et le gène-rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b*. LNG a induit l'activité luciférase dans les cellules exprimant les trois sous-types à 1000nM mais pas 100nM. Les EC₅₀ calculées sur les cellules HG5LN exprimant zfER α , zfER β 1 et zfER β 2 sont plus faibles, de 22, 305 et 77nM, respectivement. NET a induit l'activité luciférase à 100nM dans les cellules U251-MG exprimant zfER β 2 (pour une EC₅₀ de 2303nM sur HG5LN-zfER β 2) et à 1000nM dans les cellules U251-MG exprimant zfER α et zfER β 1 (pour des EC₅₀ de 502 et 8184nM sur HG5LN-zfER α et HG5LN-zfER β 1 respectivement).

Sur les lignées cellulaires HG5LN-hER α et HG5LN-hER β exprimant les isoformes α et β du récepteur des œstrogènes humain, l'activité de E2 est comparable à celle observée sur les lignées HG5LN exprimant les récepteurs ER de poissons zèbres. L'activité des estranes est très similaire entre les sous-types α de hER et zfER ainsi qu'entre les sous-types β de hER et β 1 de zfER. En revanche, l'EC₅₀ de LNG est plus faible pour zfER α que pour hER α .

Ces résultats montrent que dans l'ensemble, les progestatifs activent de la même manière les récepteurs zfER selon le contexte cellulaire utilisé, malgré des différences d'EC₅₀. De même, les résultats sur les récepteurs ER poissons zèbres vont dans le même sens que ceux sur les ER humains.

2. *Effet de l'estradiol, de la progestérone et de la norethistérone sur le comportement de réponse au stress des larves de poissons zèbres*

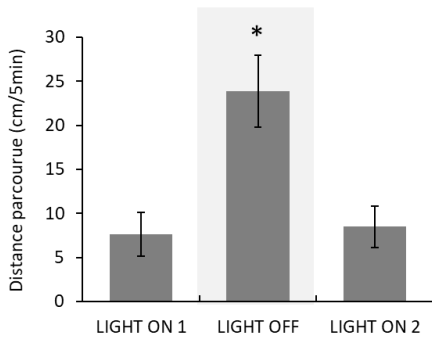
Étant donné les effets très précoces des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur le système nerveux central des poissons montrés dans les articles 2 et 3, des expériences complémentaires ont été réalisées à l'IFREMER au laboratoire de Xavier Cousin (L'Houmeau, France) afin d'évaluer les comportements de réponse au stress de larves exposées de 0 à 4 jpf à trois molécules : l'estradiol (E2), la progestérone (P4) et la norethistérone (NET), avec renouvellement quotidien des solutions. Ces trois molécules présentent des profils de réponses différents vis-à-vis de l'aromatase B de poisson zèbre. L'E2 et la NET sont toutes deux capables d'induire l'expression du gène *cyp19a1b* selon un mécanisme ER-dépendant tandis que la P4 ne présente aucune activité œstrogénique. Il s'agissait ici de savoir si différentes réponses comportementales pouvaient être observées selon le profil d'activité *in vivo* sur l'aromatase B. Cette hypothèse faisant un lien entre expression de l'aromatase B et comportement est supportée par des données récentes qui mettent en avant un lien entre l'aromatase et l'activité de neurogenèse (Diotel, Do Rego, Anglade, Vaillant, Pellegrini, Gueguen, et al., 2011; Pellegrini et al., 2007) ainsi qu'un lien entre l'induction de l'aromatase B et l'hyperactivité induite par le BPA, une substance œstrogéno-mimétique (Kinch, Ibhazehiebo, Jeong, Habibi, & Kurrasch, 2015).

Les réponses photomotrices (PMR) de larves soumises à un « *light/dark challenge* » ont été mesurées (figure 14). Des expériences préliminaires ont été réalisées avec un nombre restreint de larves par condition (n=12) pour définir les concentrations à tester par la suite avec davantage d'individus. Les larves exposées au solvant DMSO (0,01% v/v) ont parcouru davantage de distance pendant la période de lumière éteinte (light off) que pendant les périodes de lumière allumée (light on1 et light on2), confirmant la validité de l'expérimentation (figure 14A). La progestérone a induit une hyperactivité en lumière éteinte pour les concentrations 1nM et 3nM (figure 14B et B'). Les quatre plus faibles concentrations d'estradiol ont augmenté la réponse des larves en lumière éteinte, mais pas de façon significative (figure 14C et C'). La norethistérone a augmenté la réponse en lumière éteinte pour les concentrations 10nM et 100nM, mais pas de façon significative (figure 14D et D').

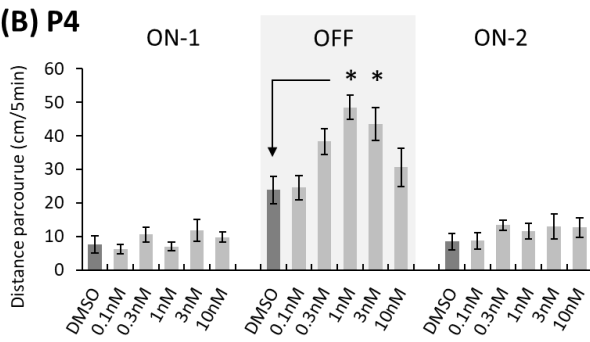
Une seconde expérience de PMR a donc été réalisée en choisissant les concentrations 1nM pour P4, 0.1nM pour E2 et 10nM pour NET, en exposant cette fois 40 larves (figure 15). Dans cette deuxième expérience, P4 1nM a également augmenté la réponse des larves (figure 15A et A'). E2 0.1nM a augmenté la réponse des larves, cette fois de manière significative

(figure 15B et 2B'). En revanche, NET 10nM a diminué la réponse des larves par rapport au contrôle pendant la période de lumière éteinte (figure 15C et C'), mais pas de manière significative. Ces résultats suggèrent qu'il serait intéressant d'investiguer davantage les effets de ces molécules sur les comportements de réponse au stress afin de savoir s'il existe un lien entre ces réponses et la perturbation de l'expression de l'aromatase B dans le cerveau. Il est certain que l'utilisation d'un modèle *knock-out* pour le gène *cyp19a1b* constituerait une approche pertinente pour explorer d'éventuels liens fonctionnels entre l'aromatase B et le comportement.

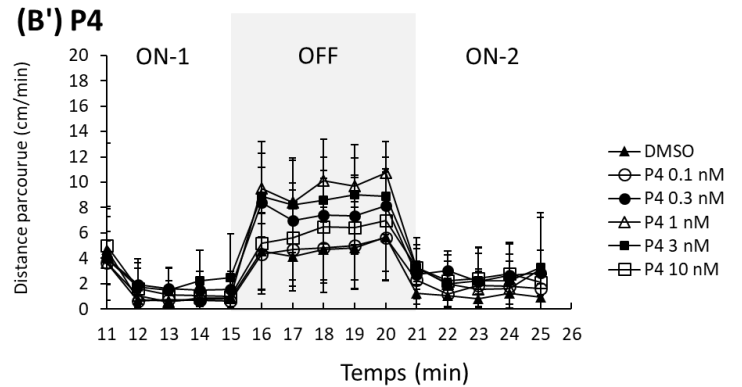
(A) DMSO



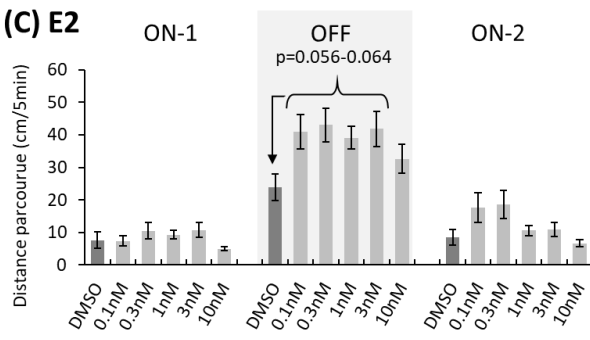
(B) P4



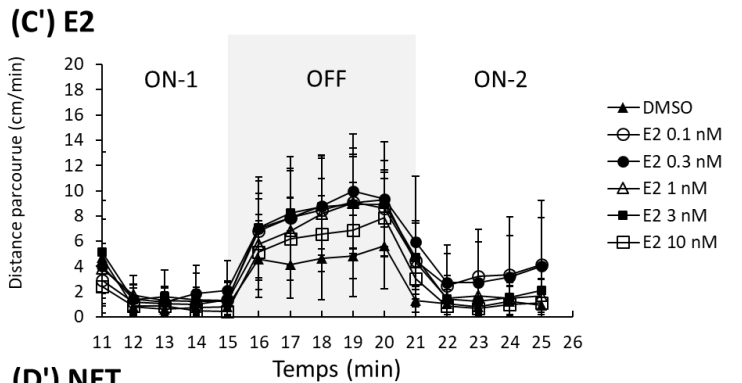
(B') P4



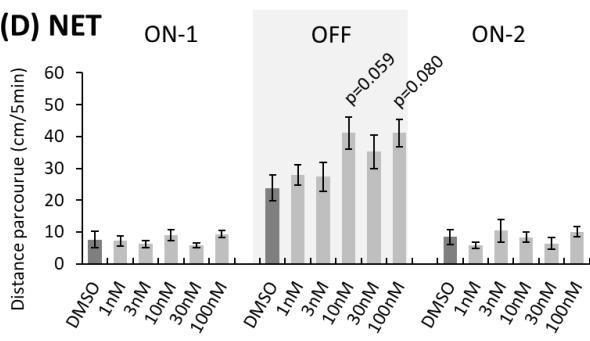
(C) E2



(C') E2



(D) NET



(D') NET

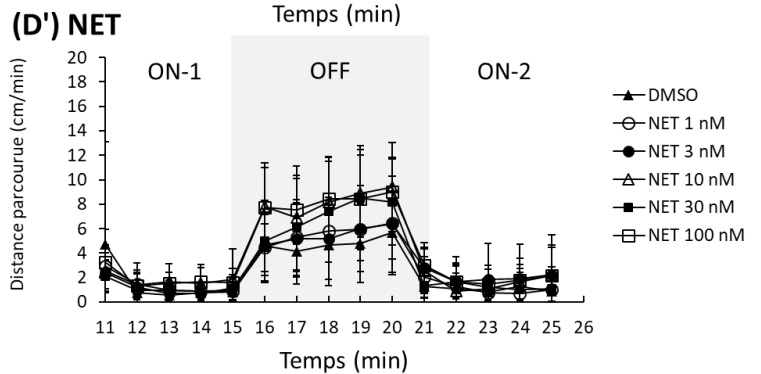
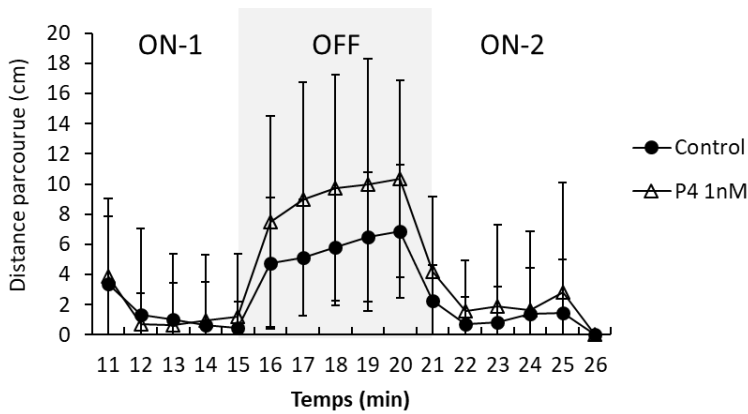
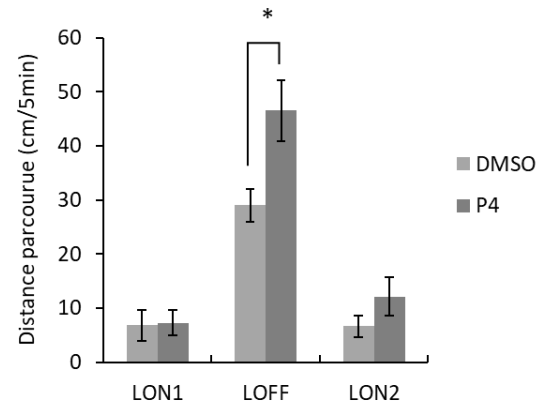


Figure 14 : Réponse photomotrice de larves WT-AB exposées de 0 à 4 jpf au DMSO 0,01% v/v (A) ou à des concentrations croissantes de progestérone (P4) (B,B'), estradiol (E2) (C,C') ou norethistérone (NET) (D,D'). La distance parcourue est mesurée par périodes de 5min de lumière allumée (ON-1 et ON-2) et lumière éteinte (OFF) et exprimée en cm/5min (A,B,C,D) ou cm/min (B',C',D'). Analyse statistique : ANOVA à mesures répétées suivie d'un test *post-hoc* de Newman-Keuls, comparaison au sein d'un état lumineux ; pour la validation des contrôles (A) : comparaison entre deux états lumineux, ANOVA. * : $p < 0.01$.

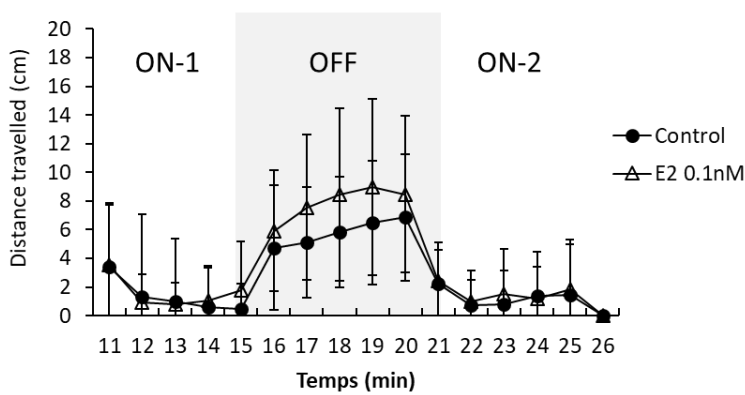
(A) P4 1nM



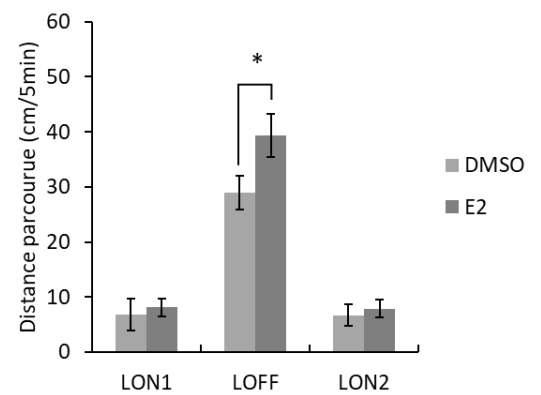
(A') P4 1nM



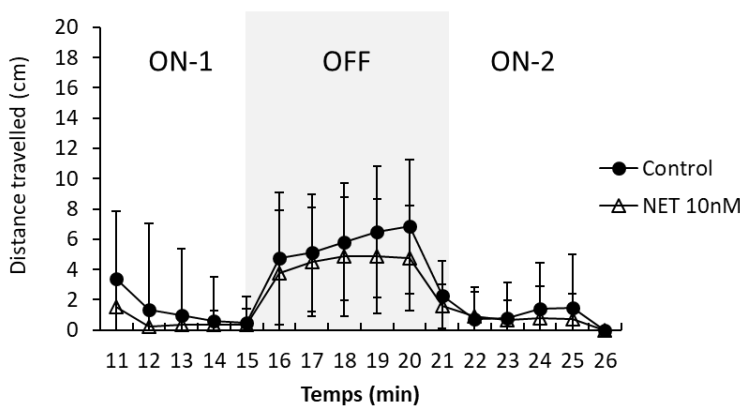
(B) E2 0.1nM



(B') E2 0.1nM



(C) NET 10nM



(C') NET 10nM

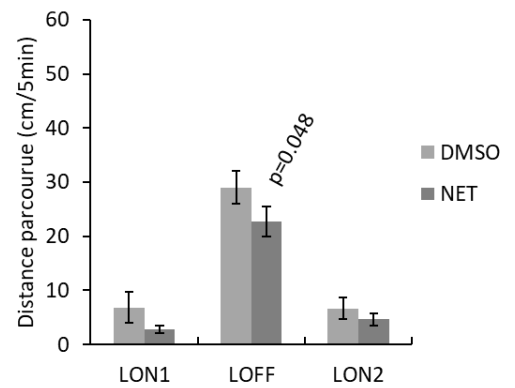


Figure 15 : Réponse photomotrice de larves WT-AB exposées de 0 à 4 jpf au DMSO 0,01% v/v (A) ou à P4 1nM (A,A'), E2 0.1nM (B,B') ou NET (C,C'). La distance parcourue est mesurée par périodes de 5min de lumière allumée (ON-1 et ON-2) et lumière éteinte (OFF) et exprimée en cm/min (A,B,C) ou cm/5min (A',B',C'). Analyse statistique : ANOVA à mesures répétées suivie d'un test *post-hoc* de Newman-Keuls, comparaison au sein d'un état lumineux ; * : $p < 0.01$.

Chapitre 3 : Effets des ligands du nPR sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes

Synthèse de l'article 4 : Caractérisation du modèle poisson zèbre *cyp11c1-GFP*

Contexte

Les progestatifs présentent une multiplicité d'action vis-à-vis des différents récepteurs nucléaires stéroïdiens. En plus des activités androgéniques qui sont les plus étudiées, ces composés peuvent exercer des activités (anti-)progestatives (voir article 1) et des activités œstrogéno-mimétiques à des stades précoces du développement (voir articles 2 et 3) sur des modèles poissons. Dans la littérature, des activités glucocorticoïdes et anti-glucocorticoïdes ont été montrées pour certains progestatifs *in vitro* et *in vivo* chez les mammifères, dont l'humain (Kontula, Paavonen, Luukkainen, & Andersson, 1983). Chez le poisson, beaucoup moins d'informations sont disponibles concernant les interactions des progestatifs avec le récepteur des glucocorticoïdes (GR) et leurs effets sur l'expression de gènes GR-régulés. Le GR régule pourtant des processus physiologiques clés de par son implication dans la biosynthèse de cortisol qui agit sur l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI). Cet axe régulant notamment la corticostéroïdogenèse et la réponse au stress, sa perturbation par des progestatifs pourrait poser un risque pour les organismes exposés. Des activités (anti-)glucocorticoïdes ont été montrées pour certains progestatifs chez le poisson. En effet, chez le medaka, il a été montré que la progestérone et la DHP pouvaient se lier *in vitro* au GR (Miyagawa et al., 2014). Chez le poisson zèbre adulte et en développement, la progestérone et le norgestrel ont dérégulé l'expression de plusieurs gènes de l'axe HPI (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Y.-Q. Liang et al., 2017; Y.-Q. Liang, Huang, Liu, et al., 2015; Y.-Q. Liang, Huang, Ying, et al., 2015a, 2015b). Ces études restent néanmoins peu nombreuses et limitées à quelques progestatifs. Afin d'apporter davantage d'informations concernant les effets des ligands du nPR vis-à-vis du GR et sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes, nous avons utilisé une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* basées sur les mécanismes d'action des PEs chez le poisson zèbre.

Objectif

En premier lieu, l'objectif était de caractériser le modèle poisson zèbre *cyp11c1-GFP* conçu pour exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp11c1* codant pour l'enzyme 11 β -hydroxylase. Cette enzyme est exprimée au niveau des cellules interrénales chez le poisson zèbre embryon-larvaire et adulte où elle biosynthétise le cortisol. Le modèle poisson zèbre *cyp11c1-GFP* a été développé dans le cadre du projet NEMO (TEFOR,

AMAGEN). L'objectif était de déterminer si ce modèle peut être utilisé pour évaluer l'expression et la perturbation du gène de la stéroïdogénèse *cyp11c1* dans les cellules interrénales de poissons zèbres en développement.

Résultats et discussion

Nous avons montré que la GFP s'exprime dès 3-4 jpf dans le développement et mime l'expression de *Cyp11c1* dans les cellules interrénales. Il est possible de quantifier le signal *in vivo* chez des larves vigiles sous microscope à épifluorescence. L'apparition du signal à ces stades du développement concorde avec le développement des constituants de l'axe HPI décrit dans la littérature.

Pour caractériser la régulation de la GFP dans notre modèle, des ligands de référence du GR ont été testés : un agoniste de synthèse puissant, la dexaméthasone (DEX), et l'antagoniste mifepristone (RU486). L'imagerie de larves exposées de 4 à 5 jpf à des concentrations croissantes de DEX a révélé une induction concentration-dépendante du signal GFP. Cet effet a été bloqué par la RU486, suggérant un rôle du GR dans la régulation de l'expression de *cyp11c1* dans les cellules interrénales.

L'effet de DEX a été testé sur l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC) au niveau de l'hypophyse antérieure. POMC est un précurseur protéique dont le clivage aboutit à la production de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui agit sur les cellules interrénales pour stimuler la synthèse de cortisol. POMC joue donc un rôle de rétrocontrôle sur l'axe HPI. La DEX a réprimé l'expression de POMC au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure, confirmant le rétrocontrôle négatif exercé par la DEX sur l'axe HPI. Cet effet n'a pas été empêché par la RU486, contrairement à ce qui a été observé dans le modèle *cyp11c1*-GFP. Ces résultats suggèrent que DEX peut induire la corticostéroïdogénèse au niveau des cellules interrénales via le GR, et que le rétrocontrôle négatif de l'axe HPI au niveau de l'hypophyse antérieure n'a pas le temps de se mettre en place avec la fenêtre d'exposition spécifique que nous avons choisie.

Les résultats de l'article 4 nous permettent de conclure que le nouveau modèle poisson zèbre transgénique *cyp11c1*-GFP peut être un bon outil pour évaluer l'expression du gène de la stéroïdogénèse *cyp11c1* et sa perturbation par des substances pharmaceutiques ; notamment les progestatifs présents dans l'environnement.

En complément de ces résultats, nous avons testé la betamethasone et le propionate de clobetasol, d'autres ligands agonistes du GR, sur le modèle *cyp11c1*-GFP. Tout comme DEX, ces composés ont dérégulé le signal GFP mais pas de façon reproductible. Il est possible que cette variabilité des résultats soit due à la fenêtre d'exposition très courte et aux variations de développement des larves entre les différentes pontes. Néanmoins, la tendance de ces agonistes du GR à induire l'expression de la GFP concorde avec les résultats obtenus pour DEX. Ces résultats ne font pas l'objet d'une valorisation.

Generation and characterization of the novel *cyp11c1*-eGFP transgenic zebrafish model

Clémentine Garoche ^{a, b}, Frédéric Sohm ^c, Benjamin Piccini ^a, Marie Picot ^a, Nathalie Hinfray ^a, Edith Chadili ^a, Lucette Joassard ^d, Jean-Marc Porcher ^a, Thomas Dickmeis ^e, Xavier Cousin ^d, Olivier Kah ^b, François Brion ^{a,*}

^a *INERIS, Direction des Risques Chroniques, Pôle VIVA, Unité d'Écotoxicologie in vitro et in vivo, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France*

^b *Team NEED, IRSET, BIOSIT, Rennes, France*

^c *UMS AMAGEN, CNRS, INRA, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France*

^d *IFREMER, L'houmeau, France*

^e *Institute of Toxicology and Genetics, KIT, Karlsruhe, Germany*

* Corresponding author:

Dr François Brion

INERIS, Direction des risques chroniques, Pôle VIVA, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Phone : +33(0)3 44 55 65 12

Email : francois.brion@ineris.fr

Keywords:

Transgenic zebrafish, *cyp11c1*, 11 β -hydroxylase, Interrenal cells, *pomc*.

Abstract

The *cyp11c1* gene codes for 11 β -hydroxylase (11 β -H), a critical enzyme involved in the synthesis of 11-ketotestosterone or cortisol depending on its tissue-specific expression. The *cyp11c1* gene is known to be expressed very early during zebrafish development. Although its localization is not precisely known, it is most likely expressed in interrenal cells to synthesize cortisol. In this study, we aimed at developing a stable transgenic zebrafish line that expresses Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the zebrafish *cyp11c1* promoter to investigate its expression and its perturbation by dexamethasone (DEX), a cortisol analogue. The characterization of the transgenic fish revealed an early expression of GFP in interrenal cells which colocalized with the endogenous 11 β -H protein expression. *In vivo* fluorescence imaging of GFP in DEX-treated larvae from 4 to 5 days post-fertilization (dpf) revealed a concentration-dependent induction of GFP that was blocked by mifepristone (RU486), a glucocorticoid receptor (GR) antagonist, suggesting a putative role of the GR in the regulation of *cyp11c1* expression in interrenal cells. At the anterior pituitary level, DEX alone or in combination with RU486 completely repressed *pomc* expression, which agrees with the negative feedback exerted by DEX on the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis. Altogether, our data suggest that the *cyp11c1*-GFP zebrafish model is a valuable tool for investigating the regulation of *cyp11c1* and its potential disruption by pharmaceuticals.

1. Introduction

In zebrafish, the *cyp11c1* gene (also referred to as *cyp11b2* or *cyp11b1*) codes for the cytochrome P450 11 β -hydroxylase (11 β -H). Depending on its tissue-specific expression, 11 β -H is involved in the biosynthesis of the 11-oxygenated androgen 11-ketotestosterone (a predominant androgen in fish) in gonads (Borg 1994; Baroiller et al. 1999; Young et al. 2005) or the synthesis of cortisol, the major glucocorticoid in all vertebrates, in interrenal cells.

In fish, notably in zebrafish, expression of *cyp11c1* have been well studied at the gonadal level with a predominant expression in testes as compared to ovaries (Baudiffier et al. 2012; Caulier et al. 2015). Accordingly, the circulating and gonadal concentrations of 11-KT are known to be higher in males than females in zebrafish (Wang & Orban 2007; Liu et al. 2012; Liu et al. 2013). Furthermore, testicular localization in Leydig cells and spermatogonia is consistent with the requirement of androgens for spermatogenesis. In addition to its physiological role, several toxicological studies have shown that the testicular expression of *cyp11c1* and/or 11 β -H activity are targeted by diverse environmental contaminants, hence demonstrating that the biosynthesis of 11-oxygenated androgens can be disrupted through this molecular and biochemical pathway (Baudiffier et al. 2012; Liu et al. 2012; Liu et al. 2013).

Much less information is available regarding the expression and the localization of *cyp11c1* during the embryonic and larval development. However, *cyp11c1* transcripts were detected prior to hatching as early as 24 hours post-fertilization (hpf), followed by a dynamic expression up to 120 hpf-old zebrafish (Alsop & Vijayan 2009; Alderman & Bernier 2009; Bluthgen et al. 2013). The investigation of the ontogenic expression of two steroidogenic markers, *star* and *cyp11a1*, using *in situ* hybridization (ISH) on zebrafish embryos revealed that these genes are expressed from 2 days post-fertilization (dpf) in interrenal cells and their expression partly controlled by the pituitary gland from 4 dpf (To et al. 2007). At the pituitary level, the

adrenocorticotrophic hormone (ACTH), a key pituitary-derived peptide controlling steroidogenesis in interrenal, is encoded by the proopiomelanocortin (POMC) gene. POMC positive cells are first expressed at 18-20 hpf (Liu et al. 2003) but the effects on the interrenal steroidogenic component and control of steroid hormone production by pituitary occur later in the development from 4 dpf (Mommsen et al. 1999; Alsop & Vijayan 2008; Alsop & Vijayan 2009; Liu 2007; To et al. 2007; Alderman & Bernier 2009; Tokarz 2012). Control of steroidogenic activity in interrenal requires cleavage of POMC into ACTH that acts on melanocortin 2 receptor (MC2R) on the interrenal cells to control synthesis and release of cortisol. In vertebrates, cortisol is the major stress hormone acting through the glucocorticoid receptor (GR) to play key roles in many physiological processes such as development, stress response and behaviour (Kloet et al. 2005; Fuzzen et al. 2010; Hrabe et al. 2013; Wilson et al. 2013; Wilson et al. 2015; Wilson et al. 2016). Until now, studies dedicated to the actions of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on the reproductive axis have been concerned with their effects at the gonadal level. Neuroendocrine effect of EDCs have been less investigated although it is now well-known that they can act at the brain level by inducing expression of the brain aromatase B, the key steroidogenic enzyme controlling the synthesis of neuroestrogens (Vosges et al. 2010; Vosges et al. 2012; Brion et al. 2012; Cano-Nicolau et al. 2016). In contrast, effects of EDCs on interrenal steroidogenesis have been much less investigated, albeit there exist evidence to show that some substances can alter the expression of molecular actors of the pituitary and interrenal cells in zebrafish early life-stages (Sun et al. 2010; Weger et al. 2012; Liu et al. 2017).

Notwithstanding, this lack of information reflects the need for appropriate models to assess the action of chemicals on interrenal steroidogenesis. In light of this context, the purpose of this study was to generate a transgenic zebrafish line with eGFP driven by the zebrafish *cyp11c1*

promoter. Herein, we characterized the *cyp11c1*-GFP zebrafish line and documented its ability to respond to dexamethasone a known adrenergic agent.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Dexamethasone (DEX) and mifepristone (RU486) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Louis, MO). Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C . Fresh dilutions of test chemicals in medium were prepared before each experiment.

2.1. Generation of transgenic *cyp11c1*-eGFP zebrafish

The promoter of zebrafish *cyp11c1* was isolated from genomic DNA of AB strain zebrafish. Genomic DNA was retrieved using a proteinase K protocol as described in (Hinfrey et al. 2017). We used the transgenesis vectors designed by AMAGEN as ‘all fish species’ transgenesis carriers. Briefly, the vectors were designed upon the multiple Gateway® cloning system described in (Roure et al. 2007) and carried 2 expression cassettes. The first cassette is an enhanced Cyan Fluorescent Protein (eCFP) coding sequence under the control of the zebrafish betacrystallin-b1 promoter (CrystBB1 cassette) which allows to follow the presence of the transgene in zebrafish from 48 hours post-fertilisation (hpf) onward (Emelyanov & Parinov 2008). The second expression cassette allows to clone a promoter of interest (*cyp11c1* in the present study) in front of an enhanced GFP (eGFP) reporter coding sequence. The insertion of the promoter is realized as described in (Hinfrey et al. 2017). The 7.8 kb region upstream of the start codon of *cyp11c1* was used as promoter to drive GFP expression. The PCR was designed in order to use the initiation codon and the Kozak consensus translation start of *cyp11c1* fused to the eGFP coding sequence. The promoter was inserted using Gateway® cloning system (Invitrogen) as described in (Roure et al. 2007) into the donor vector. Briefly, a first fragment

was amplified from genomic DNA and a second reaction was used to improve specificity and insert the attB3 and attB5 Gateway recombination sites necessary for the cloning. The attB3-attB5 tagged PCR fragment was purified using QIA quick PCR purification kit (Qiagen) (Hinfray et al. 2017). Transgenic zebrafish were generated by injecting the expression vector into one cell stage zebrafish eggs. At 48 hpf, the embryos were sorted according to eCFP expression in the lens under an epifluorescence dissecting microscope (MZFLIII Leica). Embryos which displayed differential expression from one eye to the other, strong mosaicism, weak or absence of CFP/GFP expression were eliminated.

2.2. Zebrafish husbandry

Zebrafish were maintained in our laboratory facility (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France) in 3.5 L aquaria in a recirculation system (Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Italy) at a temperature of $27 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 14:10h light:dark photoperiod. For each experiment, tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish eggs were collected from outcross breeding between wild-type zebrafish (AB strain) and tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish. The eggs were disinfected 5 min in water supplemented with 0.1% of commercial bleach (2.6% of sodium hypochlorite) then raised under semi-static conditions in an incubator.

2.3. Immunohistochemistry

For cryoslices, 7 dpf-old tg(*cyp11c1*-GFP) larvae were euthanized in 4°C water (Wilson et al. 2009; Strykowski & Schech 2015) then fixed for 24h in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer saline (PBS) at 4°C . After fixation, samples were treated in successive baths of sucrose/PBS for 24h each, (10%, 20%, 30%) then embedded in Neg-50 cryo-compound (Microm Microtech, France). Larvae were then sliced in 10 μm sections. Slides were rinsed in PBS to remove Neg-50 cryo-compound. For paraffin slices, 7 dpf-old tg(*cyp11c1*-GFP) larvae were euthanized in 4°C water then fixed in Davidson modified medium (22% v/v formaldehyde

37-40%; 11.5% v/v glacial acetic acid; 33% v/v ethyl alcohol 96%; 33.5% v/v distilled water) for 24h at room temperature. After fixation, samples were dehydrated in ethanol 96%, cleared in toluene then embedded in paraffin. Larvae were then sliced in 5 μ m sections, dried, dewaxed and rehydrated, and antigens were unmasked for 3 hours at 80°C in EDTA buffer (1mM, pH 8.5). Immunohistochemistry was carried out using an InsituPro VSI robotic station (Intavis, Germany) as previously described in (Hinfray et al. 2013). Tissue sections were washed three times in PBS and incubated for 1 hour in a blocking solution (PBS containing 0.2% Triton X-100 and 1% milk powder). Incubation with primary antibodies was performed overnight with 0.5% milk powder in PBS at room temperature. For GFP localization, a primary antibody produced in mouse was used at a dilution of 1:500 for paraffin slices and 1:750 for cryoslices (polyclonal mouse anti-GFP, abcam ab38689, Invitrogen Paris, France). For 11 β -Hydroxylase localization, a primary antibody produced in rat was used at a dilution of 1:600 for paraffin slices and 1:1000 for cryoslices (polyclonal rat anti-11 β -Hydroxylase, Rat SER 161). For colocalization experiments, slides were incubated with a mix of these two antibodies. Sections were rinsed three times with PBS containing 0.2% Triton X-100 and incubated for 1h30 with secondary antibodies goat anti-mouse (anti-GFP) coupled to AlexaFluor 488 or AlexaFluor 594 (Invitrogen, Praisley, UK) (1:200 with 0.5% milk powder in PBS) or goat anti-rat (anti-11 β -H) coupled to AlexaFluor 594 (Invitrogen, Praisley, UK) (1:200 with 0.5% milk powder in PBS). Nuclei were revealed with Hoechst 33342. The specificity of the immunoreactivity was controlled with negative controls (primary or secondary antibodies only) and no cross-reactivity was seen for any of the antibodies (data not shown). Fluorescence was observed using a Zeiss AxioImager Z1 fluorescence microscope equipped with an AxioCam Mrm camera (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Germany) and the Zen imaging software or with the confocal microscope Olympus Fluoview 1000.

2.4. *Exposures to chemicals*

CFP-positive 4 dpf-old tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish larvae were exposed to chemicals or to solvent control (DMSO; 0.01% v/v). Each experimental group consisted of 20 larvae exposed in 25 mL of water. Larvae were kept in an incubator at 28°C under semi-static conditions. Exposures were performed from 0 to 5 dpf, from 3 to 5 dpf or from 4 to 5 dpf. Each chemical was tested at least three times. Zebrafish being subject to regulations for animal experiments from 120 hpf onwards (Strähle et al. 2012), (Directive 2010/63/UE), experiments did not exceed 5 dpf.

2.5. *Live- imaging of the larvae with wide-field fluorescence microscopy*

Live tg(*cyp11c1*-GFP) 5 dpf-old larvae were observed in lateral views and each was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope equipped with a AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). The anatomical region of the interrenal cells was photographed using a X20 objective. To reduce the influence of high autofluorescence on GFP measurement, pictures of each larva were acquired using 38 HE GFP and 43 HE DsRed filter sets (maximal intensity, 400 ms in each channel). The fluorescence intensity measured with the DsRed filter was subtracted to the one measured with the GFP filter. An intensity threshold was applied to remove background and allow a specific GFP fluorescence quantification using the ImageJ software. For each picture, the integrated density was measured, *i.e.* the sum of the gray-values of all the pixels within the region of interest. A gray-value of 350 was defined as background value.

2.6. *Whole-mount in situ hybridization (WMISH)*

RNA probes were produced from PCR product obtained by following amplification of linearized plasmids (pCRII Bst XI, KIT, Karlsruhe) containing the zebrafish *pomc*. Vectors were linearized with HindIII enzyme in digest buffer for 45 min at 37°C. Linearized plasmids were

precipitated by phenol/chloroform extraction. PCR amplification was carried out on 1 µg of linearized plasmid using digoxigenin (DIG)-RNA labeling mix (Roche, France) and T7 RNA polymerase (Roche, France) following standard protocols. Labeled RNA probes were then stored at -80°C until use. Wild-type AB zebrafish larvae were sampled at 5 dpf and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS 1X for 24h at 4°C. After fixation, larvae were rinsed 3 times 5 min in PBST (PBS 1X with 0.1% Tween 20) and dehydrated in MeOH (5 min in PBST-MeOH 50% then MeOH 100%) and stored at -20°C. WMISH was carried out using an In Situ Pro (Intavis) robotic station. Larvae were rehydrated (5 min in PBST-MeOH 50%, 5 min in PBST-MeOH 30%, twice 5 min in PBST) and pigmentation was removed by hydrogen peroxide treatment for 10 min at room temperature (3% H₂O₂/0.5% KOH in PBS 1X). Larvae were permeabilized by proteinase K treatment (10 µg/ml in PBS 1X) for 30 min at room temperature and post-fixed for 20 min in PFA 4%. Pre-hybridization and hybridization buffers (HYB) contained 50% formamide, 5X SCC, 0.1% Tween 20, 50 µg/ml heparin, 500 µg/ml tRNA (pH 6). Larvae were pre-hybridized in HYB buffer for 4h30 at 70°C then hybridized overnight at 70°C in HYB buffer containing 100 ng/200 µl *pomc* probe. Larvae were washed in HYB(-) buffer (50% formamide, 2X SCC, 0.1% Tween 20) at 70°C then washed in 0.2X SCC at room temperature (3 times 10 min in 75%, 50% and 25% 0.2 SCC in PBST). Larvae were pre-incubated for 4h at room temperature in blocking buffer (BSA 2 mg/ml/2% sheep serum in PBST) then alkaline phosphatase coupled anti-DIG antibody was added (1:5000, Roche) and larvae were incubated for 12h at 4°C. After washes, larvae were put in coloration buffer (100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.10% Tween 20) then coloration was done for 3h20 at room temperature using NBT/BCIP (Roche) (50 mg/ml nitroblue tetrazolium/50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate). Coloration was stopped in stop solution (PBST pH 5.5) then larvae were fixed 20 min in PFA 4%. After washes, larvae were embedded in glycerol (15 min in 20%, 50%, 70% and 100% glycerol) at 4°C. Brightfield

pictures of larvae were taken using a binocular microscope and the IC Capture software.

2.7. Data analysis

For the live-imaging of larvae, chemicals were tested in at least three independent experiments. Data are expressed as a mean fold induction above solvent control \pm standard error of the mean (SEM). Data were first checked for normality using Shapiro-Wilk test, then homogeneity of variances was checked using Fligner-Killeen test. An ANOVA one-way test was used for the analysis of the variance, followed by Tukey HSD post-hoc test or Kruskal-Wallis or the Student t-test ($p \leq 0.05$). All analyses were conducted in R (The R Foundation for Statistical Computing).

3. Results

3.1. Transmission of the transgene in the *cyp11c1*-GFP transgenic zebrafish line

For each reproduction, adult *cyp11c1*-eGFP heterozygote transgenic zebrafish were allowed to reproduce with wild-type AB-strain zebrafish. Transgenic larvae were identified by monitoring fluorescence in the eyes that express CFP under the control of the β -crystallin promoter (Figure 2). Transmission of the transgene occurred for males and females transgenic fish and the transmission rate was about 50% for each reproduction, suggesting a unique insertion of the transgene in these transgenic fish.

3.2. Characterization of GFP expression in the interrenal cells of *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae

To characterize the expression of the transgene, we first performed immunostainings with anti-GFP antibodies on transverse sections of *cyp11c1*-GFP larvae. Cryoslices allowed us to visualize endogenous GFP. The endogenous signal colocalized with the anti-GFP antibody in the interrenal cells region (Figure 3). The anti-GFP antibody led to some artefact immunostaining in regions where no endogenous GFP was detected. To assess whether GFP

mimics the expression of 11 β -H, transverse sections of transgenic fish larvae were colabeled with anti-GFP and anti-11 β -H antibodies on paraffin slices, then examined under the microscope. All GFP-positive cells were also labeled with the 11 β -H antibody in the interrenal cells, thus indicating that GFP mimics Cyp11c1 expression in this model (Figure 4). In live tg(*cyp11c1*-GFP) larvae, no fluorescent signal was visible from 0 to 2 dpf. In some larvae, GFP was first detected from 3 dpf in a discrete region at the base of the head, in the anatomical region of the interrenal cells. This signal was detected in all 4 dpf-old larvae (Figure 5). The signal persisted at 5, 6 and 7 dpf, but GFP intensity was lower at 7 dpf than 5 and 6 dpf (Figure 6). Larvae older than 7 dpf were not observed. In wild-type larvae, no GFP signal was observed in this area from 0 to 7 dpf (data not shown). The high autofluorescence seen in transverse sections of *cyp11c1*-GFP larvae on cryoslices and in live *cyp11c1*-GFP larvae could be reduced to allow a specific GFP quantification (Figure 7).

3.3. Exposure of *cyp11c1*-GFP larvae to dexamethasone and mifepristone

DEX 10 μ M was first tested by exposing zebrafish with different exposure windows, *i.e.* from 0 to 5 dpf, 3 to 5 dpf and 4 to 5 dpf. Exposure of zebrafish to DEX 10 μ M from 0 to 5 dpf or from 3 to 5 dpf resulted in a slight decrease of GFP intensity but this effect was not significant. In contrast, a significant induction was measured in zebrafish larvae exposed to DEX 10 μ M from 4 to 5 dpf, (Figure 8). This effect was confirmed in three independent assays. We then further characterized the inducing effect of DEX by performing a concentration-response experiment from 0.001 μ M to 10 μ M (Figure 9). Although a concentration-dependent induction was observed, only the highest concentration of DEX induced a significant effect as compared to controls. Interestingly, coexposure of zebrafish to DEX 10 μ M and RU486 1 μ M inhibited the DEX-induced GFP while RU486 1 μ M alone had no effect on GFP. Importantly, this effect was consistently observed in several independent experiments.

3.4. *Characterization of pomc expression in the anterior pituitary*

The expression of *pomc* in the anterior pituitary was observed using whole-mount *in situ* hybridization on wild-type AB larvae exposed from 4 to 5 dpf to DMSO, DEX 10 μ M, RU486 1 μ M or coexposed to DEX 10 μ M and RU486 1 μ M. In control larvae, *pomc* hybridization is shown in the anterior pituitary, posterior pituitary and *nucleus lateralis tuberis* (Figure 10A). Exposures of larvae to DEX 10 μ M repressed *pomc* expression in the anterior pituitary (Figure 10B). RU486 1 μ M did not change *pomc* expression in this area (Figure 10C). The repression of *pomc* by DEX was not prevented by RU486 (Figure 10D).

4. Discussion

4.1. *GFP mimics 11 β -hydroxylase expression in the interrenal cells of cyp11c1-GFP zebrafish larvae*

In this study, we developed and characterized a stable transgenic zebrafish model expressing GFP under the control of *cyp11c1* promoter. We showed that GFP can be detected on slices and quantified *in vivo* in live transgenic larvae. Importantly, the colocalization of GFP and endogenous 11 β -H shows that GFP mimicked the expression of 11 β -H in the interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae.

The transgenic zebrafish possess convenient and interesting features making this line easy to maintain, such as only one transgene insertion with the possibility of inheritance of the transgene from both males and females and the possibility to sort transgenic from non-transgenic fish by observing CFP in the eyes as early as 2 dpf.

We were able to detect and quantify GFP in the interrenal cells of live transgenic *cyp11c1*-GFP larvae from 3-4 dpf. Previous studies have shown an early expression of different steroidogenic markers such as *star*, *cyp11a1* (Liu et al., 2003) or *cyp11c1* (Wilson et al., 2013) as early as 24 hpf corresponding most likely to transcripts of maternal origin. In contrast, it has

been shown that the expression of steroidogenic genes into functionally differentiated interrenal tissues commenced later and that the hormonal control of interrenal steroidogenesis by *pomc*, *acth* and *mc2R* occurred at larval stage and not before (Liu et al., 2013). Also, the genetic manipulation of *cyp11c1* expression by specific morpholinos or the use of pharmacological treatment with a specific inhibitor of 11β -H enzyme activity (metyrapone) had no effect at 72 hpf but modified whole-body cortisol concentration between 72 and 120 hpf (Wilson et al., 2013). Altogether, our data suggest that the onset of GFP expression at 3-4 dpf corresponds to the expression of a functional enzyme in differentiated interrenal cells that are already under the control of the pituitary gland via POMC and ACTH.

In our study, we found that at later stages of development, a decrease of GFP intensity was observed from 5 to 7 dpf. This decrease might be due to the pigmentation that prevents a correct visualization of the GFP signal when the larvae grow in size. It is likely that improvement of *in vivo* GFP imaging could be achieved by developing transgenic *cyp11c1*-GFP in Casper zebrafish strain to obtain transparent larvae as it was done for estrogen sensitive zebrafish model (Green et al. 2016).

4.2. *cyp11c1* expression can be regulated by reference ligands of the glucocorticoid receptor

Dexamethasone (DEX) at a concentration of $10\mu\text{M}$ had no significant effect on GFP expression in *cyp11c1*-GFP larvae exposed from 0 to 5 or from 3 to 5 dpf, although a slight inhibition can be observed. This data support the results of (Wilson et al. 2016) in which *cyp11c1* mRNA levels were unchanged when exposed to $100\mu\text{M}$ DEX from 0 to 5 or from 0 to 3 dpf. Inhibition of *cyp11c1* was observed after an exposure to DEX from 1 to 5 dpf but for a highest concentration of DEX ($40\mu\text{M}$) which might reflect the effect of the compound on the proliferation of interrenal cells (Sun et al. 2010).

When the *cyp11c1*-GFP larvae were exposed to DEX 10 μ M from 4 to 5 dpf, the results differed from the previous window of exposure as DEX induced GFP expression in the interrenal cells. Furthermore, this inducing effect was blocked by mifepristone, an antagonist of the glucocorticoid receptor (GR). These data suggest that functional GR are involved in the effect mediated by DEX on *cyp11c1*. It has been well-demonstrated that DEX can interfere with the GR signaling pathway as an agonist. For instance, in GRE:Luc larvae exposed from 5 to 6 dpf, DEX has been shown to induce luciferase activity in a concentration-dependent manner, revealing an activation of the GR signaling pathway (Weger et al. 2012). The concentrations needed to induce luciferase were higher than that used in their GRE:Luc cell line (nM range) most probably due to differential uptake, metabolism and excretion of DEX; but was similar to the effective concentration leading to GFP in our tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish (μ M range). In our model, the GR antagonist mifepristone (RU486) blocked the response induced by DEX, suggesting that the expression of *cyp11c1* might be GR-regulated.

Interestingly, the inhibitory effect of RU486 on DEX-induced GR activity was also shown in GRE:Luc larvae and cells (Weger et al. 2012). In larvae exposed from 0 to 5 dpf, RU486 reduced *cyp11c1* transcripts levels (Bluthgen et al. 2013). The potential regulation of *cyp11c1* expression through GR is also supported by the parallel expression of *gr* and *cyp11c1* transcripts during zebrafish development (Bluthgen et al. 2013; Wilson et al. 2013). In addition to its antagonism activity toward GR, mifepristone is also known to act as an antagonist of the progesterone receptor (PR) and a putative regulation of *cyp11c1* by the PR receptor can be considered. However, in human cells expressing either the zfGR or the zfPR, we found that mifepristone is 800-fold more affine for the GR than for the PR (Garoché et al., in prep.) hence suggesting a potential regulation of *cyp11c1* by GR rather than PR.

4.3. *Dexamethasone can modulate pomc expression in the anterior pituitary*

In our model, we showed that dexamethasone (DEX) 10 μ M can repress *pomc* expression in the anterior pituitary. This result is consistent with DEX being an analogue of cortisol, exerting a negative feedback on the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis. DEX treatment (25 and 50 μ M) also suppressed anterior pituitary *pomc* expression via negative feedback in Tg (POMC:EGFP) zebrafish larvae exposed from 1 to 5 dpf (Liu et al. 2003; Sun et al. 2010). DEX at 40 μ M reduced *pomc* transcripts in the anterior domain of corticotrophs in larvae exposed from 1 to 2 dpf and completely suppressed endogenous *pomc* expression in larvae exposed from 1 to 3, 1 to 4 and 1 to 5 dpf (To et al. 2007). Interestingly, we showed that mifepristone could not rescue *pomc* expression in the anterior pituitary of larvae exposed to DEX, while it blocked DEX-induced GFP in *cyp11c1*-GFP larvae. This result suggests that DEX might induce steroidogenesis through a direct pathway to interrenal cells, likely through the GR (Figure 11). The role of GR in the regulation of steroidogenesis in the interrenal cells have been shown in rainbow trouts, as RU486 suppressed head kidney StAR mRNA abundance in adult fish fed for 3 days with RU486 (10 mg.kg⁻¹ body weight) (Alderman et al. 2012). This study also showed that central GR signaling is involved in the stressor-mediated HPI axis functioning, as RU486 exposure also reduced brain CRF mRNAs. This suggests that DEX could disrupt the HPI axis through the GR at the hypothalamus and pituitary levels, in addition to the interrenal level. With a negative feedback of DEX on the HPI axis at the pituitary level, a repression of *cyp11c1* expression is expected. The exposure lasting only 24 hours in our experiments, it is possible that the negative feedback regulation of the axis is not occurring at the interrenal level yet. Moreover, it has been shown that *cyp11c1* transcripts levels greatly differed in larvae exposed to EDCs (progestins) depending on concentrations and developmental stages (Y. Q. Liang et al. 2015; Y.-Q. Liang et al. 2015; Liang et al. 2017).

It could be interesting to measure *cyp11c1* mRNA levels in larvae exposed to DEX with the specific exposure window 4 to 5 dpf.

4.4. Conclusion

In this study, we characterized a new transgenic zebrafish model *cyp11c1*-GFP expressing GFP under the control of the *cyp11c1* promoter. We showed that the fluorescence signal could be detected from 3-4 dpf and modulated in interrenal cells by the agonist ligand of the GR dexamethasone to induce GFP driven by the zebrafish *cyp11c1* promoter. Furthermore, the DEX-induced expression was blocked by RU486, suggesting a putative role of GR in the regulation of *cyp11c1* in interrenal cells at this developmental stage. While the interrenal steroidogenesis is known to be under the control of the pituitary expression of *pomc*, it seems that the inhibitory action of DEX on *pomc* did not have the time to produce its negative regulation on *cyp11c1* after the short treatment period from 4 to 5 dpf. Overall, our data suggest that this model could be a valuable tool for investigating the expression of the *cyp11c1* gene in interrenal cells and its disruption by pharmaceuticals and environmental contaminants.

Acknowledgements

This research was supported by the ANR PROOFS “Occurrences and effects of environmental ligands of progesterone receptor on fish reproduction and neurodevelopment” (ANR-13-CESA-0006-03). Clémentine Garoche was supported by a doctoral fellowship from the ANR PROOFS and the French Ministry of Ecology (P190 “Axe de Recherche Ecotoxicologie”).

References

- Alderman, S.L. et al., 2012. Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), pp.79–85.
- Alderman, S.L. & Bernier, N.J., 2009. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. *General and comparative endocrinology*, 164(1), pp.61–9.
- Alsop, D. & Vijayan, M.M., 2008. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 294(3), pp.R711-9.
- Alsop, D. & Vijayan, M.M., 2009. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 153(1), pp.49–54.
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y. & Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 55, pp.910–931.
- Baudiffier, D. et al., 2012. A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish. *Toxicology*, 298(1–3), pp.30–39.
- Bluthgen, N. et al., 2013. Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 2. Gene expression analysis and in vitro activity. *Aquatic Toxicology*, 144–145, pp.96–104.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(3), pp.219–245.
- Brion, F. et al., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 7(5), p.e36069.
- Cano-Nicolau, J. et al., 2016. Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305, pp.12–21.
- Caulier, M. et al., 2015. Localization of steroidogenic enzymes and Foxl2a in the gonads of mature zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188, pp.96–106.
- Emelyanov, A. & Parinov, S., 2008. Mifepristone-inducible LexPR system to drive and control gene expression in transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 320(1), pp.113–121.
- Fuzzen, M., Van Der Kraak, G. & Bernier, N., 2010. Stirring up new ideas about the regulation

- of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). , 7(4), pp.349–358.
- Green, J.M. et al., 2016. High-Content and Semi-Automated Quantification of Responses to Estrogenic Chemicals Using a Novel Translucent Transgenic Zebrafish. *Environmental science & technology*, 50(12), pp.6536–45.
- Hinfray, N. et al., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 216(3), pp.375–388.
- Hinfray, N. et al., 2017. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line. *General and Comparative Endocrinology*.
- Hrabe, M. et al., 2013. Zebrafish 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Is Important for Glucocorticoid Catabolism in Stress Response. , 8(1), pp.1–14.
- Kloet, E.R. De, Joëls, M. & Holsboer, F., 2005. STRESS AND THE BRAIN: FROM ADAPTATION TO DISEASE. , 6(June), pp.463–475.
- Liang, Y. et al., 2017. Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 195, pp.60–67.
- Liang, Y.-Q. et al., 2015. The effects of progesterone on transcriptional expression profiles of genes associated with hypothalamic–pituitary–gonadal and hypothalamic–pituitary–adrenal axes during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 128, pp.199–206.
- Liang, Y.Q. et al., 2015. A time-course transcriptional kinetics of the hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in zebrafish eleutheroembryos after exposure to norgestrel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), pp.112–119.
- Liu, N.-A. et al., 2003. Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic zebrafish. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(5), pp.959–66.
- Liu, X. et al., 2013. Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 134–135, pp.104–111.
- Liu, X.-H. et al., 2017. Effects of subchronic exposure to waterborne cadmium on H-P-I axis hormones and related genes in rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.
- Liu, X., Ji, K. & Choi, K., 2012. Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 114–115, pp.173–81.

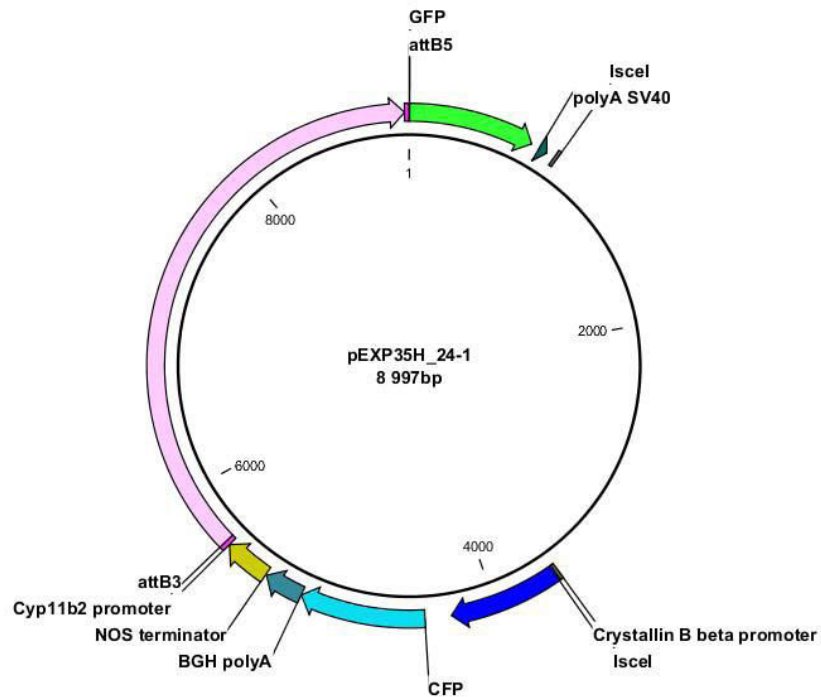
- Liu, Y.-W., 2007. Interrenal organogenesis in the zebrafish model. *Organogenesis*, 3(1), pp.44–48.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. , pp.211–268.
- Roure, A. et al., 2007. A multicassette Gateway vector set for high throughput and comparative analyses in ciona and vertebrate embryos. J.-N. Volff, ed. *PloS one*, 2(9), p.e916.
- Strähle, U. et al., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2), pp.128–132.
- Strykowski, J.L. & Schech, J.M., 2015. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 54(1), pp.81–4.
- Sun, L. et al., 2010. In vivo alternative assessment of the chemicals that interfere with anterior pituitary POMC expression and interrenal steroidogenesis in POMC: EGFP transgenic zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology*, 248(3), pp.217–25.
- To, T.T. et al., 2007. Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(2), pp.472–85.
- Tokarz, J.J., 2012. Catabolism of glucocorticoids – novel pathways for stress reduction in zebrafish Table of contents.
- Vosges, M. et al., 2010. 17alpha-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 99(4), pp.479–91.
- Vosges, M. et al., 2012. 17 α -Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(2), pp.198–204.
- Wang, X.G. & Orban, L., 2007. Anti-Müllerian hormone and 11 β -hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Developmental Dynamics*, 236(5), pp.1329–1338.
- Weger, B.D. et al., 2012. A chemical screening system for glucocorticoid stress hormone signaling in an intact vertebrate. *ACS chemical biology*, 7(7), pp.1178–83.
- Wilson, J.M., Bunte, R.M. & Carty, A.J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(6), pp.785–9.
- Wilson, K.S. et al., 2016. Early-life glucocorticoids programme behaviour and metabolism in

adulthood in zebrafish.

Wilson, K.S. et al., 2015. Molecular and Cellular Endocrinology Early-life perturbations in glucocorticoid activity impacts on the structure , function and molecular composition of the adult zebra fi sh (*Danio rerio*) heart. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 414, pp.120–131.

Wilson, K.S. et al., 2013. Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of physiology*, 591(Pt 24), pp.6209–20.

Young, G. et al., 2005. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In pp. 155–223.



Name	Type	Origin	Beginning	End	Comment
Enhanced Green Fluorescent Protein	Open Reading Frame	Aequorea victoria	4	723	genetically Engineered. also known as GFP-mut1
polyA SV40	terminator of transcription		773	823	
IsceI	cleavage site		871	888	
IsceI	cleavage site		3599	3616	
beta crystallin promoter	promoter	Danio rerio	3625	4259	zebrafish Crystallin beta B promoter from zebrafish genomic DNA
Cyan Fluorescent Protein	Open Reading Frame	Aequorea victoria	4410	5129	genetically engineered. Cyan derivative of the classical GFP
NOS (nopaline synthetase) terminator	terminator of transcription		5361	5626	
attB3	recombination site		5628	5652	
Cyp11b2 promoter	promoter	Danio rerio	5653	8972	
attB5	recombination site		8973	8997	

Figure 1: Diagram showing the *cyp11c1*-GFP construct that was injected to produce F0 founders.

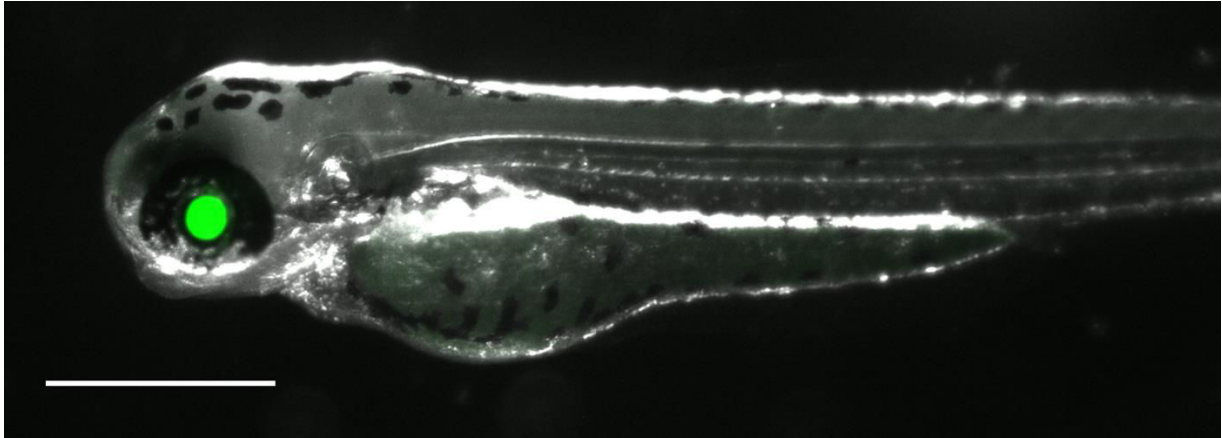


Figure 2: Expression of CFP in the eye of a 3 days post fertilization-old *cyp11c1*-GFP *zebrafish* larva. Composite image of CFP in the eye (in green) and brightfield image. Lateral view. Scale bar: 500 μ m.

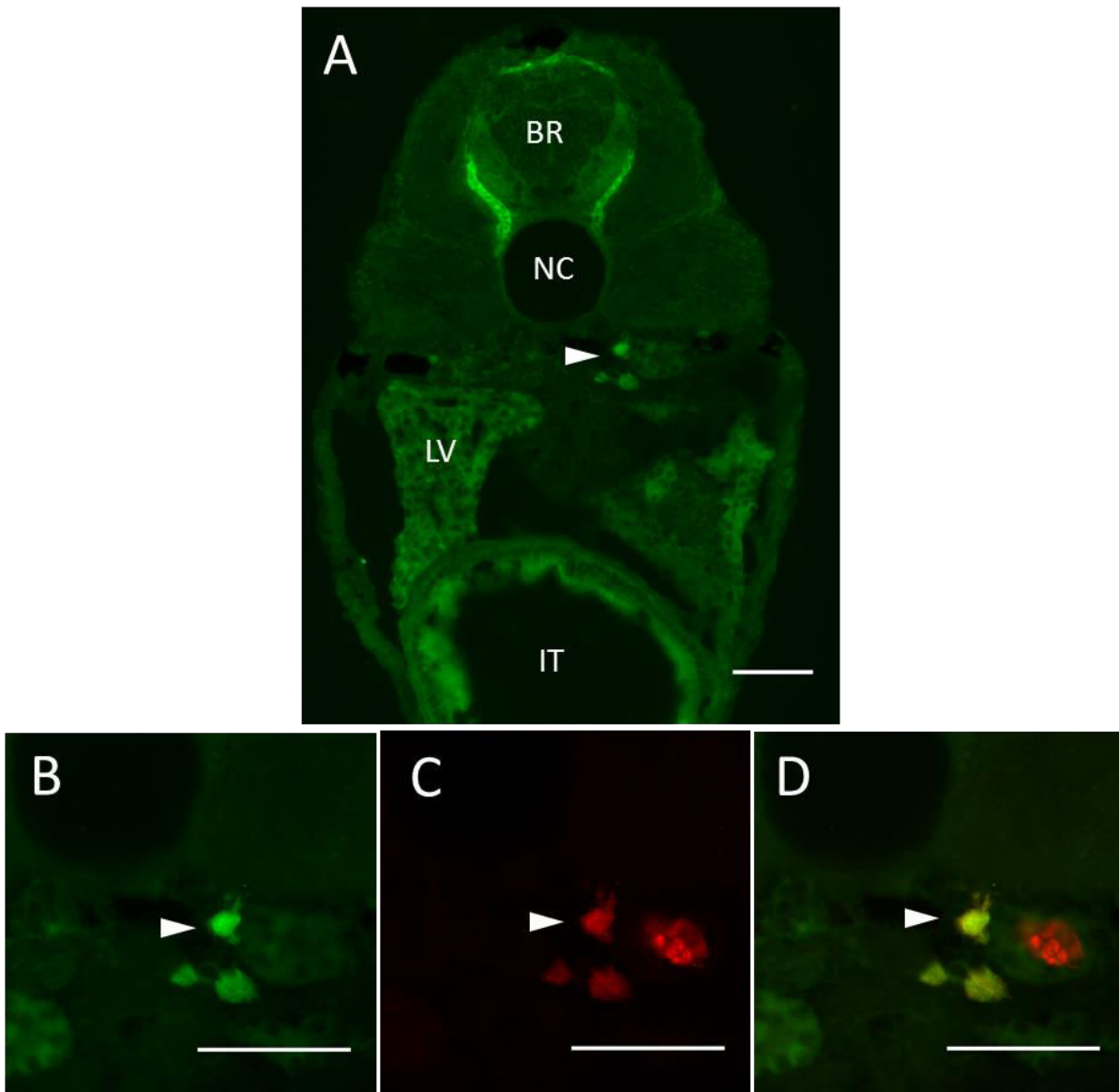


Figure 3: Colocalization of endogenous GFP and anti-GFP antibodies in interrenal cells of *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae. Cross sections of 7 days post-fertilization (dpf) zebrafish are shown with the dorsal to the top. GFP was localized in the interrenal cells under the notocord (NC). Endogenous GFP signal (A and B) ; anti-GFP antibody (C) ; merge of endogenous GFP signal and anti-GFP (D). Interrenal cells are indicated with the arrow head. (A) X20; (B), (C), (D) X40. Imaging was realized with a Zeiss epifluorescence microscope. BR: brain; NC: notocord; LV: liver; IT: intestines. Scale bars: 50 μm .

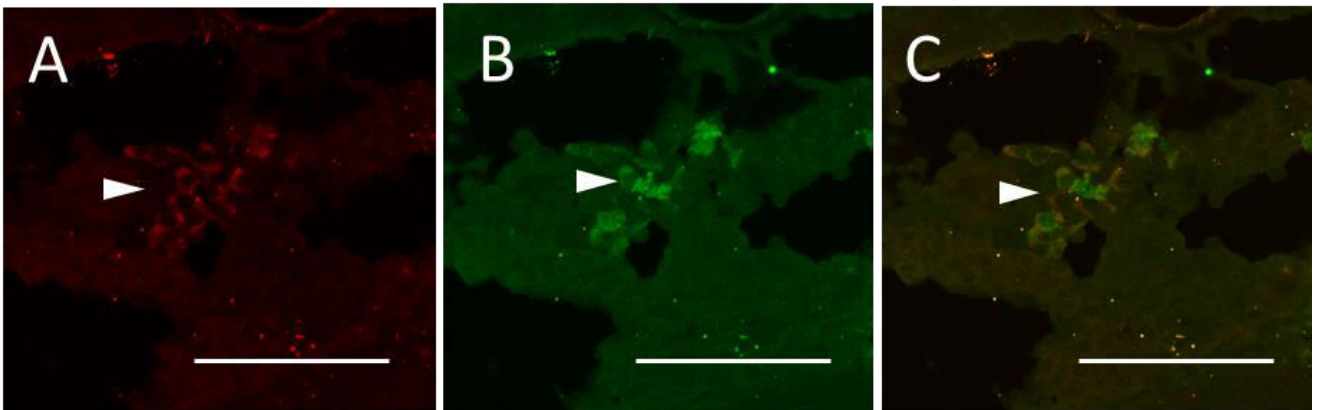


Figure 4: Colocalization of anti-GFP and anti-11 β -hydroxylase antibodies in interrenal cells of *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae. Cross sections of 7 days post-fertilization (dpf) zebrafish are shown with the dorsal to the top. GFP was localized in the interrenal cells. Anti-11 β -hydroxylase (A) ; anti-GFP (B) ; merge of anti-11 β -hydroxylase and anti-GFP (C). Interrenal cells are indicated with the arrow head. Imaging was realized with a confocal microscope Olympus Fluoview 1000 with a X40 objective. Interrenal cells are indicated by the white arrow head. Scale bars: 50 μ m.

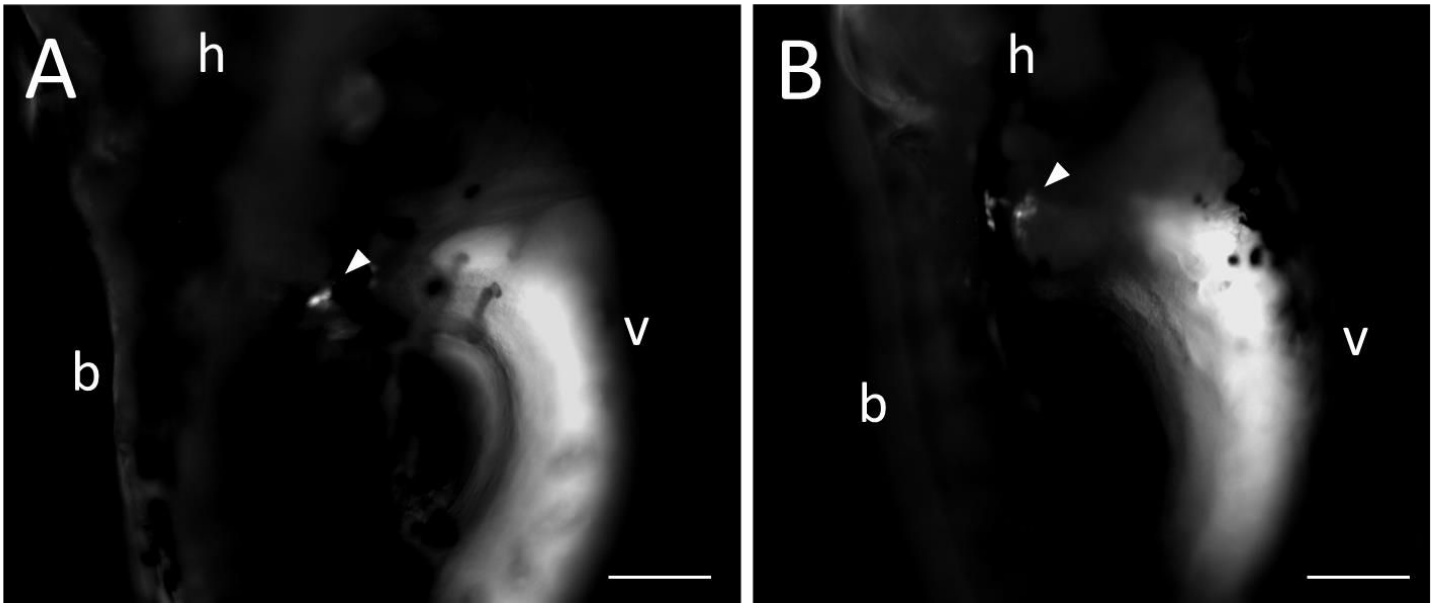


Figure 5: *In vivo* imaging of *cyp11c1*-GFP larvae expressing GFP in the interrenal cells.

Lateral views. Interrenal cells are indicated by white arrow heads. (A) : 4 days post-fertilization (dpf)-old larva ; (B) 7 dpf old larva. h : head ; b : back ; v : vitellus. Photos are taken using a Zeiss epifluorescence microscope with the 38 HE filter set at 400 ms and maximal intensity with a X10 objective. Scale bars: 200 μ m.

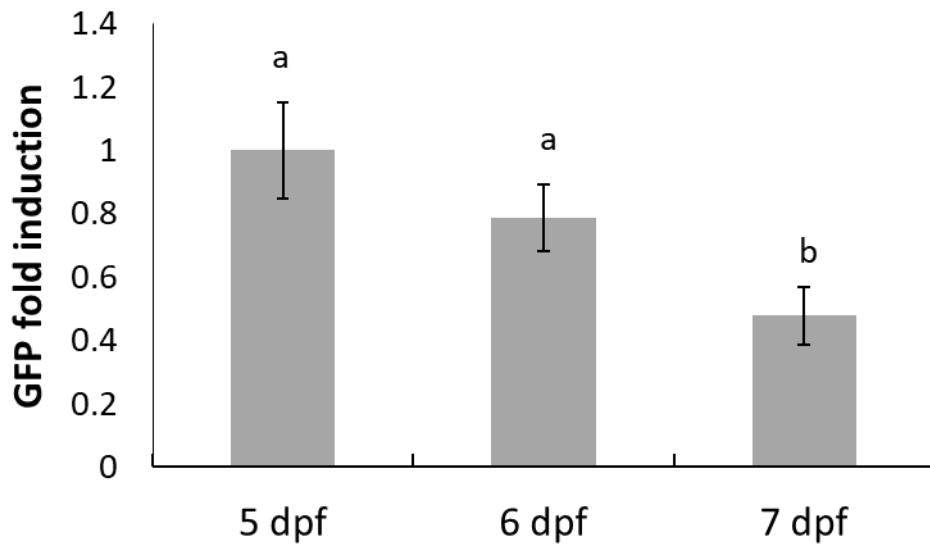


Figure 6: GFP expression in the interrenal cells of live zebrafish larvae at 5, 6 and 7 days post-fertilization (dpf). Results are expressed as fold induction above control (means \pm SEM, n=15-20 fish embryos per condition). Statistical analysis was performed using the Student t-test ($p \leq 0.05$).

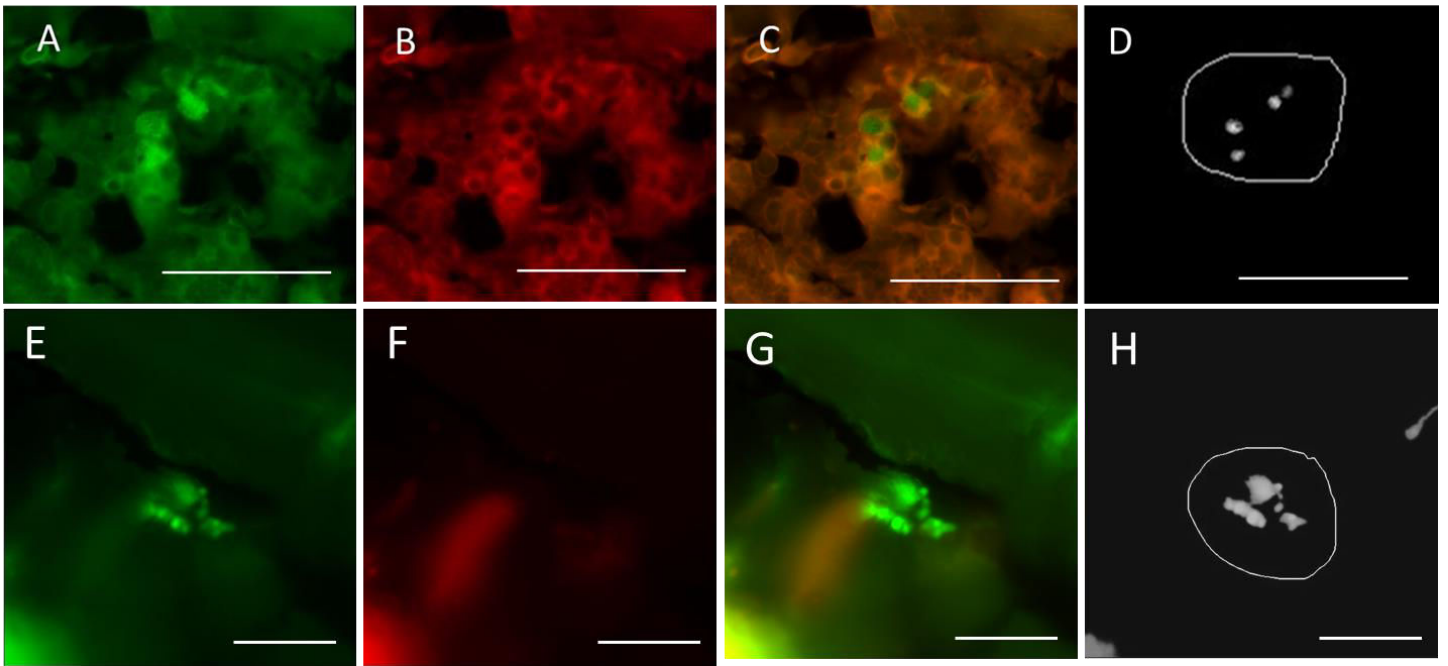


Figure 7: Endogenous GFP and autofluorescence in interrenal cells of *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae on cryoslices and in live larvae. GFP was localized in the interrenal cells. 10 μm cross sections (cryoslices) of 7 days post-fertilization (dpf)-old *cyp11c1*-GFP larva are shown with the dorsal to the top (A-D). Live 5 dpf-old *cyp11c1*-GFP larva, lateral view (E-H). Endogenous GFP signal (A, E) ; autofluorescence (B, F) ; merge of endogenous GFP signal and autofluorescence (C, G) ; subtraction of autofluorescence and application of an intensity threshold (D, H). Imaging was realized with a Zeiss epifluorescence microscope with a X63 objective (A-D) or with a X20 objective (E-H). Scale bars: 100 μm .

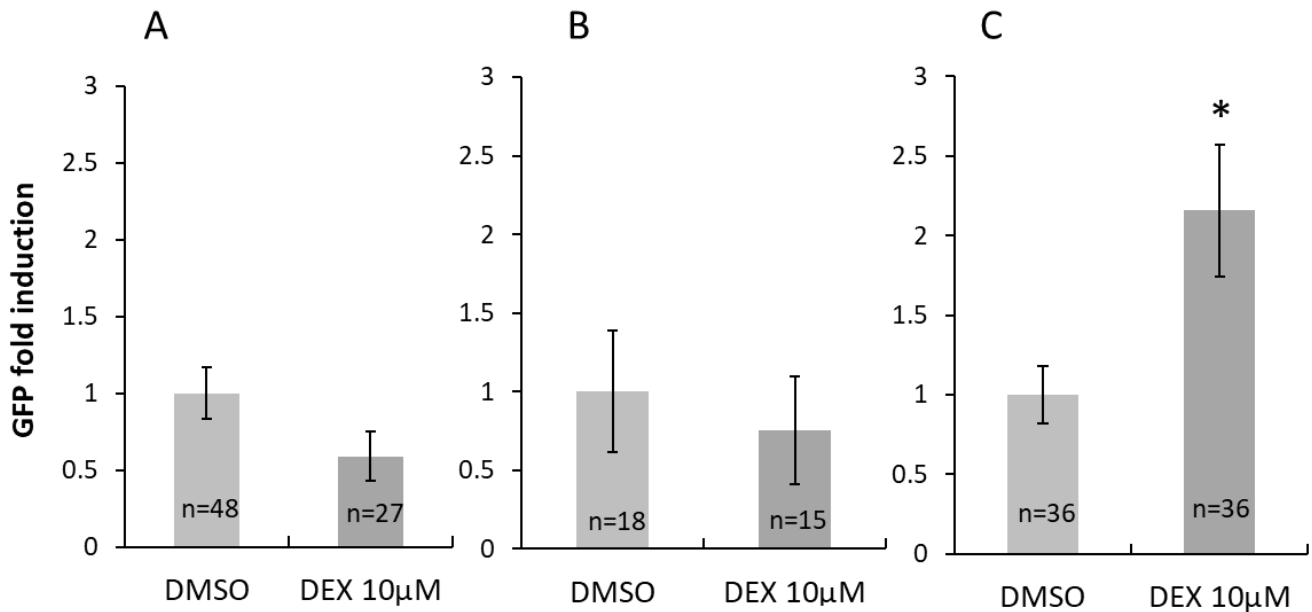


Figure 8: GFP expression in the interrenal cells of live 5 days post-fertilization (dpf) zebrafish larvae. Results are expressed as fold induction above control (means \pm SEM). Larvae are exposed to solvent control DMSO (0.01% v/v) or to dexamethasone (DEX) 10µM from 0 to 5 dpf (A) ; from 3 to 5 dpf (B) ; or from 4 to 5 dpf (C). Statistical analysis was performed using the Student t-test ($p \leq 0.05$).

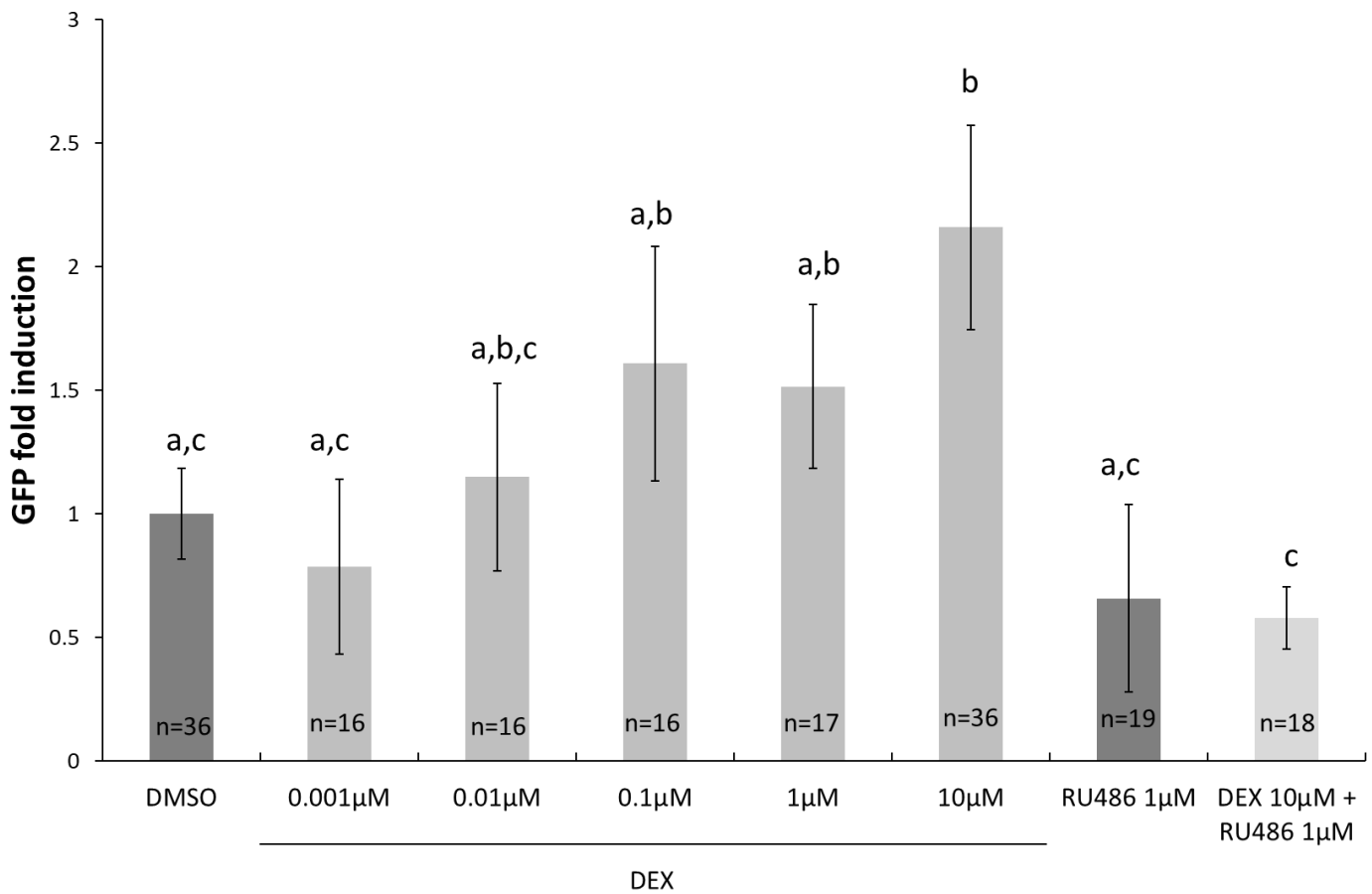


Figure 9: GFP expression in the interrenal cells of live 5 dpf zebrafish larvae. Larvae are exposed for 24 hours to solvent control DMSO (0.01% v/v), to increasing concentrations of dexamethasone (DEX), to 1 µM mifepristone (RU486) or to a coexposure of DEX 10µM and RU486 1µM. Results are expressed as fold induction above control (means ± SEM, n=15-20 fish embryos per condition). N=3 independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA one-way test followed by Tukey HSD post-hoc test or the Student t-test ($p \leq 0.05$).

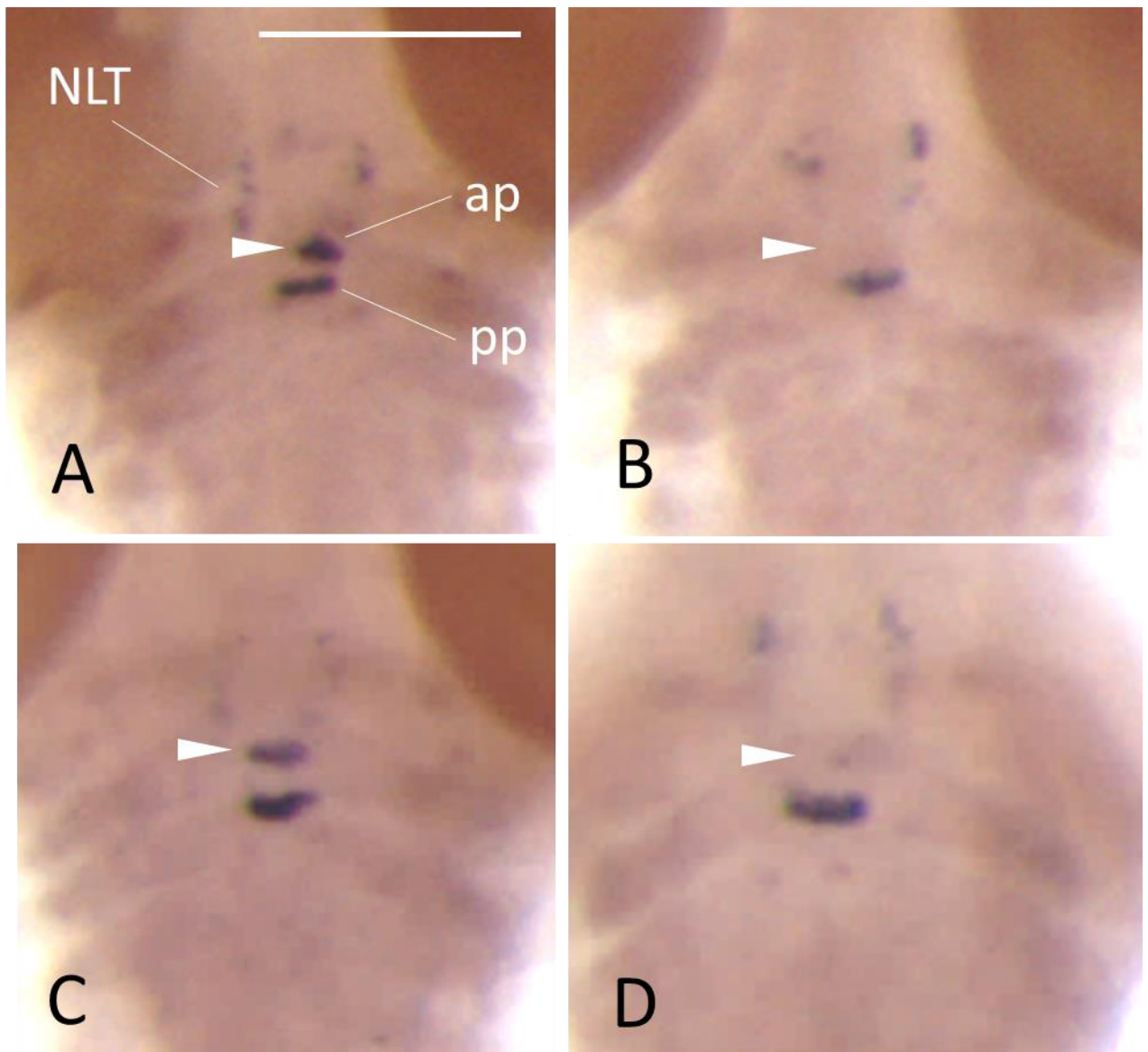


Figure 10: Whole-mount in situ hybridization of *pomc* in WT-AB larvae exposed from 4 to 5 days post fertilization to DMSO 0.01% v/v (A) ; Dexamethasone (DEX) 10µM (B) ; mifepristone (RU486) 1µM (C) and DEX 10µM + RU486 1µM (D). NLT: nucleus lateralis tuberis ; ap: anterior pituitary ; pp: posterior pituitary. Ventral views. Scale bar: 250 µm.

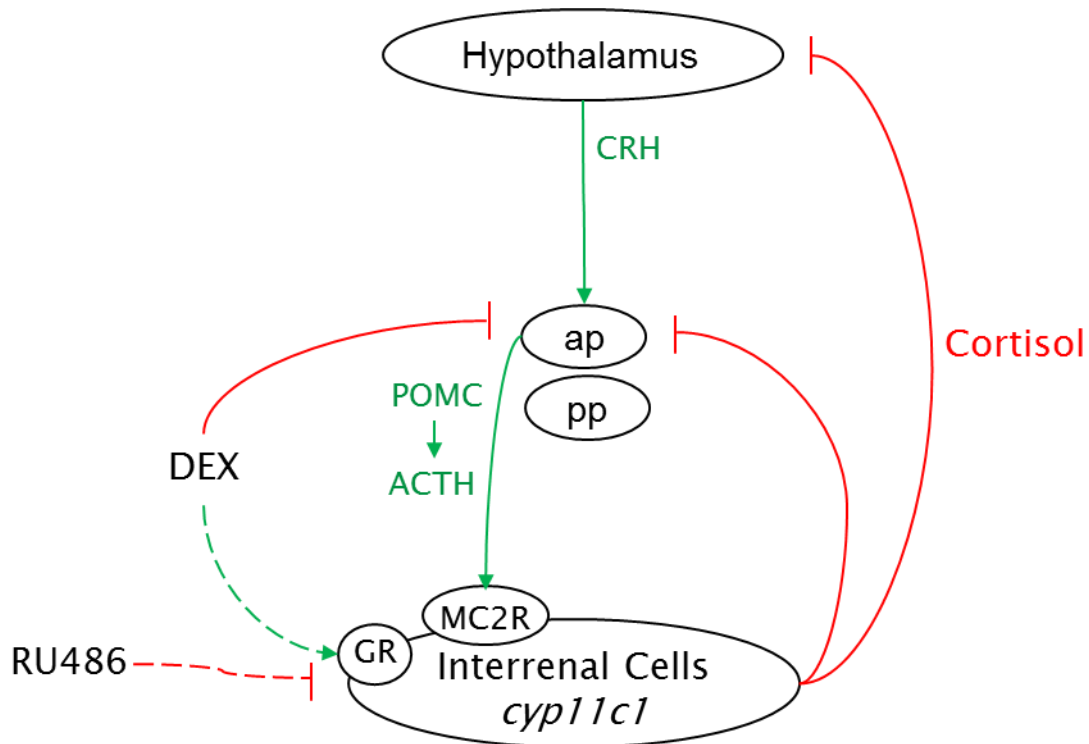


Figure 11: The hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis and its feedback regulation.

ap: anterior pituitary ; pp: posterior pituitary ; GR: glucocorticoid receptor; MC2R: melanocortin receptor 2; CRH: Corticotropin-releasing hormone; POMC: proopiomelanocortin; ACTH: adrenocorticotropic hormone; DEX: dexamethasone; RU486: mifepristone. The hypothalamus secretes the CRH hormone which stimulates anterior pituitary POMC expression. Active ACTH is then secreted from the anterior pituitary corticotrophs to promote and sustain steroidogenesis in the interrenal cells through the MC2R receptor. Endogenous cortisol and exogenous glucocorticoids such as DEX exert a negative feedback on the anterior pituitary and the hypothalamus. DEX and RU486 might regulate steroidogenesis in the interrenal cells through the GR, thus disrupting the HPI functioning (dashed lines).

Synthèse de l'article 5 : Le progestatif norethistérone (NET) perturbe la voie de signalisation des glucocorticoïdes in vitro et la corticostéroïdogénèse in vivo***Contexte***

Suite à la caractérisation du modèle *cyp11c1*-GFP présenté dans l'article 4, nous avons choisi de nous intéresser à un progestatif en particulier pour évaluer son interaction avec le zfGR et son effet sur la voie de signalisation associée. Un criblage préliminaire de 9 progestatifs a été réalisé sur le modèle *cyp11c1*-GFP (P4, R5020, NET, LNG, NES, MPA, GES, ETH, DRO). Pour certains de ceux-ci, une tendance à l'inhibition du signal GFP a été observée (NET, LNG, ETH, DRO). La NET s'est avérée très active vis-à-vis du modèle *cyp11c1*-GFP puisqu'elle a été capable de diminuer de manière significative et répétée l'intensité de la GFP. Cette molécule a donc été choisie pour investiguer de manière plus approfondie son interaction avec le GR et ses effets sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes. La NET est un progestatif très utilisé en tant que produit pharmaceutique, notamment dans les contraceptifs. Il a été montré que cette molécule pouvait déréguler l'expression de gènes AR- et ER-régulés (voir l'article 2). Chez les mammifères, l'interaction de certains progestatifs avec le GR a été mise en évidence, mais l'information est manquante chez le poisson.

Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif était d'étudier la capacité de NET à interférer avec le GR poisson zèbre et à déréguler la voie de signalisation des glucocorticoïdes et la corticostéroïdogénèse en utilisant une combinaison d'outils poissons zèbres *in vitro* et *in vivo* basés sur les modes d'action des PEs.

Résultats et discussion

La NET a été testée sur la lignée cellulaire HG5LN-zfGR (cellules HeLa exprimant les plasmides Gal4(DBD)-zfGR(LBD) et GalRE-luciférase). Cette molécule a antagonisé l'activité luciférase induite par DEX de façon concentration-dépendante, suggérant une activité antagoniste du zfGR.

La NET a également été testée de 4 à 5 jpf sur le modèle *cyp11c1*-GFP et a inhibé l'expression de la GFP au niveau des cellules interrénales de façon concentration-dépendante dans plusieurs expériences indépendantes. À 30µM, la NET a complètement éteint la

fluorescence basale. Cet effet inhibiteur de la NET sur le modèle *cyp11c1*-GFP s'est accompagné d'une baisse du niveau basal de cortisol. Il est intéressant de noter que ce progestatif a également baissé les niveaux de cortisol induits par la pregnénolone (P5), le précurseur du cortisol, concordant avec l'effet inhibiteur de NET sur le modèle *cyp11c1*-GFP. Ces résultats se recoupent avec ceux de l'équipe de T. Dickmeis au KIT qui a observé cet effet de la NET sur le cortisol induit par P5 (communication personnelle). NET a induit l'expression de POMC au niveau de l'hypophyse antérieure, suggérant un rétrocontrôle positif de l'axe HPI.

Cet effet anti-GR de la NET a été investigué au niveau physiologique par l'étude de comportements de réponses au stress. Les larves ont été soumises à un stress osmotique (NaCl 250mM) et leur capacité à répondre à ce stress a été perturbée par le traitement par la NET. En effet, les larves exposées à la NET et au NaCl ont cessé de répondre aux stimuli plus tôt que les larves exposées uniquement à NaCl. Dans le test de réponse photomotrice, NET a induit une hyperactivité des larves, suggérant un effet anxiogène. Cette induction d'hyperactivité est inattendue étant donné l'effet de la NET sur les niveaux de cortisol.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la NET peut induire une suite d'événements allant de l'échelle moléculaire (antagonisation du zfGR) à l'échelle cellulaire et tissulaire (inhibition de *cyp11c1* et baisse du cortisol). Ces effets semblent également se traduire à l'échelle physiologique avec une perturbation des comportements de réponse aux stress, mais le lien reste à établir. Cette étude suggère que la NET et potentiellement d'autres progestatifs ayant des profils toxicologiques similaires peuvent poser des risques pour les poissons en développement.

The progestin norethindrone (NET) disrupts the glucocorticoid signaling pathway *in vitro* and the corticosteroidogenesis *in vivo* in zebrafish larvae

Clémentine Garoche ^{a, b}, Nicolas Creusot ^c, Sélim Aït-Aïssa ^a, Patrick Balaguer ^c, Lucette Joassard ^d, Jean-Marc Porcher ^a, Thomas Dickmeis ^e, Xavier Cousin ^d, Olivier Kah ^b, François Brion ^{a, *}

^a *INERIS, Direction des Risques Chroniques, Pôle VIVA, Unité d'Écotoxicologie in vitro et in vivo, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France*

^b *Team NEED, IRSET, BIOSIT, Rennes, France*

^c *Inserm U1194, IRCM, Montpellier, France*

^d *IFREMER, L'houmeau, France*

^e *Institute of Toxicology and Genetics, KIT, Karlsruhe, Germany*

* Corresponding author:

Dr François Brion

INERIS, Direction des risques chroniques, Pôle VIVA, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Phone : +33(0)3 44 55 65 12

Email : francois.brion@ineris.fr

Highlights:

- NET is an antagonist of the zebrafish glucocorticoid receptor (zfGR) *in vitro*.
- NET inhibited the GFP expression in transgenic *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae.
- NET lowered whole-body cortisol levels and disrupted pituitary expression of POMC.

Abstract

Norethindrone (NET), also called norethisterone, is a synthetic progestin mostly used in oral contraceptives and in post-menopausal treatment. This compound was detected in surface waters and effluents at concentrations in the low ng/L range. NET has been reported in mammals and fish to alter the expression genes regulated by the estrogen receptor (ER) or androgen receptor (AR) *in vitro* and *in vivo*. Interaction of some progestins with the glucocorticoid receptor (GR) signaling has been shown in mammals, but information is lacking in fish. In light of this context, there is a need to investigate the effects of NET on fish GR-regulated genes. In the present study, we aimed at investigating the capacity of NET to interfere with the nuclear GR in fish using mechanism-based *in vitro* assays and to investigate its effect on corticosteroidogenesis *in vivo* in a tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish bioassay. In the transfected human cell line HG5LN-zfGR (HeLa cells with Gal4(DBD)-zfGR(LBD) and GalRE-luciferase expressing plasmids), we showed that NET inhibited the dexamethasone-induced luciferase activity. The effect of NET was further evaluated with the transgenic zebrafish model *cyp11c1*-GFP expressing Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the promoter of the steroidogenic gene *cyp11c1*. This gene codes for the enzyme 11 β -hydroxylase, involved in cortisol biosynthesis in interrenal cells. In this model, NET inhibited GFP expression in a concentration-dependent manner. In addition, exposure to NET decreased the whole-body cortisol concentrations as compared to controls. NET induced the expression of *pomc* in the anterior pituitary, suggesting a positive feedback on the hypothalamus-pituitary-interrenal axis. The consequences of NET exposure on zebrafish larvae stress responses have been investigated using salt stress and photomotor responses. It was shown that NET could disrupt the ability of larvae to cope with saline stress and could have anxiogenic effects. Overall, this study demonstrates that NET is capable of inducing a suite of molecular events which supports the hypothesis of a disruption of the glucocorticoid signaling pathway and corticosteroidogenesis

in developing embryos and larvae. This study raises further questions regarding the developmental effects of NET and potentially other progestins in fish.

Keywords: Norethindrone, glucocorticoid receptor, *in vitro* and *in vivo* zebrafish-based bioassays, hypothalamus-pituitary-interrenal axis.

1. Introduction

Norethindrone (NET), also called norethisterone, is a synthetic progestin used as a pharmaceutical, notably in oral contraceptives and in post-menopausal treatment. This compound was detected in surface waters and effluents at concentrations in the low ng/L range (Vulliet et al. 2007; Fernandez et al. 2007; Al-Odaini et al. 2010; Chang et al. 2011; Fick et al. 2010; Vulliet & Cren-olivé 2011; Liu et al. 2012; Creusot et al. 2014). In fish, NET has been shown to exert multiple hormonal activities. For instance, NET displayed (anti-)androgenic activities in medaka and fathead minnow as revealed by its capacity to reduce VTG levels in females and 11-ketotestosterone concentration in males and to decreased fecundity (Paulos et al. 2010; Overturf et al. 2012; Petersen et al. 2015). In zebrafish eleuthero-embryos, NET induced transcriptional changes indicating either an androgenic activity (reduced AR expression) or estrogenic activity (*esr1* and *vgt* induction) (Zucchi et al. 2012). In another study, NET was found to exert an estrogenic activity in the developing brain of zebrafish as shown by its capacity to induce the ER-dependent expression of aromatase B in transgenic *cyp191ab*-GFP (Brion et al. 2012; Cano-Nicolau et al. 2016).

In mammals, some progestins can interact with the Glucocorticoid Receptor (GR) to exert either agonistic and or antagonistic activities, notably megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate (Kontula et al. 1983). In fish, much less information are available on the interaction of natural or synthetic progestins with GR and the expression of GR-regulated genes. However, in medaka, it was shown that progesterone and DHP alone activated GR subtypes *in vitro* in a transient transactivation assay while P4 and DHP inhibited the cortisol-induced GR activity (Miyagawa et al. 2015). In developing and adult zebrafish, disruption of transcript levels of several genes of the corticosteroid axis in zebrafish have been reported after exposure to progesterone (Bluthgen et al. 2013; Y.-Q. Liang, Huang, Liu, et al. 2015; Y.-Q. Liang, Huang, Ying, et al. 2015) and norgestrel (Y. Q. Liang et al. 2015; Y.-Q. Liang, Huang,

Liu, et al. 2015; Liang et al. 2017), pointing out the potential physiological consequences for the exposed fish. Altogether, these studies showed that progestins can interfere with multiple nuclear receptors (NRs) and some NR-regulated genes including the GR and genes of the corticosteroid axis. Notwithstanding, information is limited to some natural and synthetic progestins and their physiological consequences remain to be determined.

In light of this context, the objective of our study was to investigate the effects of NET on the zebrafish GR, the expression of genes along the pituitary-interrenal axis and to evaluate the effect NET on cortisol concentration and stress response. For that purpose we used a set of complementary *in vitro* and *in vivo* mechanism-based assays developed in zebrafish. We first tested the activity of NET towards the zebrafish nuclear glucocorticoid receptor (zfGR) using the HG5LN-zfGR model (human cells HeLa cotransfected with Gal4(DBD)-zfGR(LBD) and GalRE-luciferase expressing plasmids). The interference of NET on the pituitary-interrenal axis was then further evaluated using a newly developed transgenic zebrafish model expressing Green Fluorescent Protein (GFP) under the expression of the zebrafish promoter of the steroidogenic gene *cyp11c1*. The *cyp11c1* gene codes for the cytochrome P450 11 β -hydroxylase that catalyses the biosynthesis of cortisol. The tg(*cyp11c1*-GFP) model has been shown to allow the quantification of GFP in interrenal cells in response to GR ligands (Garoche et al., in prep). The endocrine and physiological consequences of NET-induced-disruption of *cyp11c1* were then evaluated by assessing the pituitary expression of the proopiomelanocortin hormone (POMC). This precursor polypeptide is known to be cleaved into the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), secreted by the corticotrophic cells of the pituitary to regulate the synthesis and the secretion of cortisol in the interrenal cells. Cortisol is the major stress hormone acting through the GR and plays key roles in many physiological processes and stress responses. Given its crucial roles in stress response, we evaluated the ability of NET to disrupt the whole-body concentrations of cortisol and the stress responses of zebrafish larvae.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Pregnenolone (P5), metyrapone (MP), norethindrone (NET), mifepristone (RU486), and dexamethasone (DEX) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Louis, MO). Stock solutions of chemicals were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. Fresh dilutions of test chemicals in medium were prepared before each experiment.

2.2. HG5LN-zfGR cell line

The HG5LN-zfGR cell line are human HeLa cells cotransfected with Gal4(DBD)-zfGR(LBD) and GalRE-luciferase expressing plasmids. Cell lines were grown in phenol red containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 1 g/l glucose, supplemented with 2.5% of fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotic (penicillin/streptomycin) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. Exposures were made in phenol red-free medium supplemented with 6% dextran-coated charcoal (DCC)-treated FCS and 1% antibiotic (penicillin/streptomycin). Selection of HG5LN-zfGR cells was made with 0.5µg/ml puromycin and 1mg/L G418. Cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar; Dutscher, Brumath, France) at a density of 7×10^4 cells per well in 100µl culture medium. After 24 h, cells were exposed by adding in each well 50µl of serial dilutions of compounds or solvent control (DMSO; 0.1% v/v) in triplicates and left to incubate for 16 h. For antagonist activity assessment, cells were exposed to different concentrations of the tested compounds and to the concentration of the reference compound that yield 80% of the maximal response (3×10^{-8} M DEX). At the end of the incubation, the medium was removed and replaced with 50 µL per well of medium containing 0.3 mM luciferin. Luminescence signal was monitored in living cells for 2 s per well with the BioTek Synergy H4 Hybrid Microplate Reader and Gen5 software. Results were expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 10^{-7} M DEX. Each chemical was tested in at least three independent experiments. Concentration–response

curves were modeled using the Regtox 7.0.6 Microsoft Excel™ macro (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html), which uses the Hill equation model. Effective concentrations (EC) and inhibitory concentrations (IC) were derived. For a given chemical, EC₅₀ is defined as the concentration inducing 50% of its maximal effect and IC₅₀ is defined as the concentration inducing 50% inhibition.

2.3. *Zebrafish husbandry*

Zebrafish were maintained in our laboratory facility (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France) in 3.5 L aquaria in a recirculation system (Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Italy) at a temperature of $27 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 14:10h light:dark photoperiod. For each experiment, tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish (Garoché et al., unpublished) eggs were collected from outcross breeding between wild-type zebrafish (AB strain) and tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish. The eggs were disinfected 5 min in water supplemented with 0.1% of commercial bleach (2.6% of sodium hypochlorite) then raised under semi-static conditions in an incubator.

2.4. *Exposures of larvae to chemicals*

CFP-positive 4 dpf-old tg(*cyp11c1*-GFP) zebrafish larvae were exposed to chemicals or to solvent control (DMSO 0.1% v/v for live-imaging and DMSO 0.1% v/v for cortisol). For live-imaging of larvae, each experimental group consisted of 20 larvae exposed in 25 mL of water. For cortisol measurements, each experimental group consisted of triplicates of 30 larvae exposed in 25 mL of water. Larvae were kept in an incubator at 28°C under semi-static conditions. Exposures were performed from 4 to 5 dpf. Each chemical was tested at least three times. Zebrafish being subject to regulations for animal experiments from 120 hpf onwards (Strähle et al. 2012), (Directive 2010/63/UE), experiments did not exceed 5 dpf.

2.5. *Live- imaging of the larvae: wide-field fluorescence microscopy*

Live tg(*cypl1c1*-GFP) 5 dpf-old larvae were observed in lateral views and each was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope equipped with a AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). The anatomical region of the interrenal cells was photographed using a X20 objective. To reduce the influence of high autofluorescence on GFP measurement, pictures of each larva were acquired using 38 HE GFP and 43 HE DsRed filter sets (maximal intensity, 400 ms in each channel). The fluorescence intensity measured with the DsRed filter was subtracted to the one measured with the GFP filter. An intensity threshold was applied to remove background and allow a specific GFP fluorescence quantification using the ImageJ software. For each picture, the integrated density was measured, *i.e.* the sum of the gray-values of all the pixels within the region of interest. A gray-value of 350 was defined as background value.

2.6. *Cortisol extraction and ELISA dosage*

Wild-type AB larvae were exposed from 4 to 5 dpf in triplicates with n=30 larvae in 25 ml per condition. At the end of the exposure period, larvae were sampled in tubes containing microbeads, excess water was removed and larvae were snap frozen in liquid nitrogen. Samples were thawed and 150 µl of water was added before the larvae homogenization using a Precellys homogenizer (Bertin Instruments, France) for 2 x 20 seconds. Cortisol was extracted using 1000 µl ethyl acetate. The solvent was evaporated under a stream of nitrogen gas at 30°C, and the residue was dissolved in 60 µl 0.2% BSA in 1X PBS and stored at -20°C until assayed. ELISA is performed on the samples using commercial ELISA kits (SE120037, Sigma-Aldrich) for competitive dosage of cortisol. Basically, samples are thawed and diluted in cortisol enzyme conjugate and are incubated for 1 hour at room temperature in wells coated with anti-cortisol monoclonal antibodies. Cortisol in samples competes with cortisol-enzyme (horseradish

peroxidase) conjugate for binding sites. Unbound cortisol and cortisol-enzyme conjugate are washed off by washing buffer. Upon the addition of the TMB substrate for 15 min, the intensity of color is inversely proportional to the concentration of cortisol in the samples. The reaction is stopped with a stop solution (acid) and absorbance is read at 450 nm with a plate reader.

2.7. Whole-mount *in situ* hybridization (WMISH)

RNA probes were produced from PCR product obtained by following amplification of linearized plasmids (pCRII Bst XI, KIT, Karlsruhe) containing the zebrafish *pomc*. Vectors were linearized with HindIII enzyme in digest buffer for 45 min at 37°C. Linearized plasmids were precipitated by phenol/chloroform extraction. PCR amplification was carried out on 1 µg of linearized plasmid using digoxigenin (DIG)-RNA labeling mix (Roche, France) and T7 RNA polymerase (Roche, France) following standard protocols. Labeled RNA probes were then stored at -80°C until use. Wild-type AB zebrafish larvae were sampled at 5 dpf and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS 1X for 24h at 4°C. After fixation, larvae were rinsed 3 times 5 min in PBST (PBS 1X with 0.1% Tween 20) and dehydrated in MeOH (5 min in PBST-MeOH 50% then MeOH 100%) and stored at -20°C. WMISH was carried out using an In Situ Pro (Intavis) robotic station. Larvae were rehydrated (5 min in PBST-MeOH 50%, 5 min in PBST-MeOH 30%, twice 5 min in PBST) and pigmentation was removed by hydrogen peroxide treatment for 10 min at room temperature (3% H₂O₂/0.5% KOH in PBS 1X). Larvae were permeabilized by proteinase K treatment (10 µg/ml in PBS 1X) for 30 min at room temperature and post-fixed for 20 min in PFA 4%. Pre-hybridization and hybridization buffers (HYB) contained 50% formamide, 5X SCC, 0.1% Tween 20, 50 µg/ml heparin, 500 µg/ml tRNA (pH 6). Larvae were pre-hybridized in HYB buffer for 4h30 at 70°C then hybridized overnight at 70°C in HYB buffer containing 100 ng/200 µl *pomc* probe. Larvae were washed in HYB(-) buffer (50% formamide, 2X SCC, 0.1% Tween 20) at 70°C then washed in 0.2X SCC at room temperature (3 times 10 min in 75%, 50% and 25% 0.2 SCC in PBST). Larvae

were pre-incubated for 4h at room temperature in blocking buffer (BSA 2 mg/ml/2% sheep serum in PBST) then alkaline phosphatase coupled anti-DIG antibody was added (1:5000, Roche) and larvae were incubated for 12h at 4°C. After washes, larvae were put in coloration buffer (100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.10% Tween 20) then coloration was done for 3h20 at room temperature using NBT/BCIP (Roche) (50 mg/ml nitroblue tetrazolium/50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate). Coloration was stopped in stop solution (PBST pH 5.5) then larvae were fixed 20 min in PFA 4%. After washes, larvae were embedded in glycerol (15 min in 20%, 50%, 70% and 100% glycerol) at 4°C. Brightfield pictures of larvae were taken using a binocular microscope and the IC Capture software.

2.8. *Osmotic stress response*

The exposure experiment for touch response was performed in duplicate with 15 wild-type AB larvae per condition. Larvae were exposed from 4 to 5 dpf to either the control DMSO (0.1% v/v) or to 30µM NET. At 5 dpf, larvae were exposed to either DMSO (0.1% v/v) or to NaCl salt 15 ng/L (250 mM) and the touch response was examined every ten minutes for each larva. The exposure patterns is explicitated in Figure 1. The larvae were stimulated with a cone and were considered touch-responsive when they fled under the stimulation. Results are expressed as percentages of touch-responsive larvae with time.

2.9. *Photomotor response*

We monitored the photomotor response (PMR) in 5 dpf wild-type AB larvae exposed to NET from 4 to 5 dpf in a light/dark challenge, following a method described in details in (Vignet et al. 2013). This method is used in the behavioral profiling of zebrafish larvae to assess anxiety levels induced by drugs. Briefly, at 4 dpf, single larvae are transferred to individual wells of a 24-well plate (Krystal 24, opaque wall and clear bottom micro-plate) where they are visually isolated from each other. The 24-well plates are kept overnight in the breeding incubator. The

following day, well plate are placed in the DanioVision (Noldus), which allows the larvae to be filmed under both light and dark conditions. After a 10-min acclimation period, video recordings of larvae are made over three 5-min periods: Light on-1 (70 lx.), Light off (<1 lx.) and Light on-2. Challenges are conducted between 13:00 and 18:00 PM, the most stable activity period in zebrafish larvae. Locomotor activity was assessed by measuring the distance travelled in cm (Vignet et al. 2015).

2.10. Data analysis

Chemicals were tested in at least three independent experiments. Data were first checked for normality using Shapiro-Wilk test, then homogeneity of variances was checked using Fligner-Killeen test. An ANOVA one-way test was used for the analysis of the variance, followed by Tukey HSD post-hoc test or Kruskal-Wallis or the Student t-test ($p \leq 0.05$). All analyses were conducted in R. For the live-imaging of larvae, data are expressed as a mean fold induction above solvent control \pm standard error of the mean (SEM). For *in vitro* data, data are expressed as a percentage of maximum luciferase activity induced by the reference compound \pm standard deviation (SD). Concentration–response curves were modeled using the Regtox 7.0.6 Microsoft Excel™ macro ([http:// www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)), which uses the Hill equation model and allows calculation of EC₅₀. For a given chemical, EC₅₀ was defined as the concentration inducing 50% of its maximal effect.

3. Results

3.1. Effect of NET on luciferase activity in HG5LN-zfGR cells

The GR agonist dexamethasone (DEX) and the GR antagonist mifepristone (RU486) were first tested on the transfected human cell line HG5LN-zfGR. DEX induced luciferase activity in a concentration-dependent manner with an EC₅₀ of 11.0 nM (Figure 2A). RU486 was tested from 3×10^{-10} M to 10^{-7} M. RU486 alone did not induce luciferase activity (data not shown).

Cells were coexposed with DEX $3 \times 10^{-8} \text{M}$ (*i.e.*, a concentration inducing 80% of the maximal luciferase activity) and RU486 from $3 \times 10^{-10} \text{M}$ to 10^{-7}M . RU486 antagonized the DEX-induced luciferase activity with an IC_{50} of 2.74 nM (Figure 2B). The progestin norethindrone (NET) was tested from 10^{-8}M to 10^{-5}M . NET alone did not induce luciferase activity (data not shown). Cells were coexposed with DEX $3 \times 10^{-8} \text{M}$ and NET from 10^{-8}M to 10^{-5}M . Under these experimental conditions, NET inhibited the DEX-induced luciferase activity in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 634 nM (Figure 2C).

3.2. Effect of NET exposure on transgenic *cyp11c1*-GFP zebrafish larvae

The transgenic *cyp11c1*-GFP larvae were exposed from 4 to 5 dpf to increasing concentrations of NET. Several independent experiments ($n=3$) showed that NET consistently inhibited GFP fluorescence in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 927 nM (Figure 3) while DEX induced GFP as compared to the control tg zebrafish larvae (Garoche et al., in prep). In larvae exposed to NET $30 \mu\text{M}$, a complete extinction of the GFP signal was observed. Interestingly, the cortisol precursor pregnenolone (P5) did not induce fluorescence in our model (Figure 4). The 11β -hydroxylase inhibitor metyrapone (MP) $40 \mu\text{M}$ was also tested and did not change the signal intensity (data not shown).

3.3. Effect of NET on whole-body cortisol concentrations in zebrafish larvae

Wild-type AB zebrafish larvae were exposed from 4 to 5 dpf to either the solvent alone (DMSO 0.1%), the cortisol precursor pregnenolone $5 \mu\text{M}$, the 11β -hydroxylase inhibitor metyrapone (MP) $40 \mu\text{M}$ or the progestin norethindrone (NET) $30 \mu\text{M}$. In control larvae, whole-body cortisol levels measured in 30 larvae homogenates were between 6 and 25 ng/ml (data not shown). As compared to control larvae, whole-body cortisol levels were 4 times higher in P5-exposed larvae (Figure 5). In larvae exposed to MP or NET, whole-body cortisol levels were significantly lower than in control larvae (37% and 25% of the solvent control, respectively)

(Figure 5). Larvae were coexposed to P5 and MP or to P5 and NET. In both these conditions, whole-body cortisol levels were similar to basal levels measured in control larvae (Figure 5).

3.4. Effect of NET on POMC expression in the anterior pituitary

POMC expression in the pituitary was observed using whole-mount *in situ* hybridization in wild-type AB larvae exposed from 4 to 5 dpf to DMSO, DEX 10 μ M, P5 5 μ M, NET 30 μ M or coexposed to DEX 10 μ M and NET 30 μ M or to P5 5 μ M and NET 30 μ M. In control larvae, POMC was observed in the anterior pituitary, posterior pituitary and *nucleus lateralis tuberis* (Figure 6). Exposures of larvae to DEX 10 μ M and to P5 5 μ M repressed *pomc* expression in the anterior pituitary (Figure 6). NET 30 μ M induced POMC expression in this area (Figure 6). NET 30 μ M did not prevent the repression of POMC by DEX but prevented the repression of POMC by P5 (Figure 6).

3.5. Effect of NET on stress responses

Larvae were exposed from 4 to 5 dpf to either the control DMSO (0.1% v/v) or to NET 30 μ M. At 5 dpf, larvae were exposed to either DMSO (0.1% v/v) or to NaCl salt 15 ng/L (250 mM) and the touch response was examined every ten minutes for each larvas. The larvae were considered touch-responsive when they fled under the stimulation. Larvae exposed to solvent or NET only were still responsive after 90 minutes (Figure 7). Larvae exposed to solvent DMSO from 4 to 5 dpf then exposed to NaCl stopped being responsive between 30 min and 80 min (Figure 7). Larvae exposed to NET 30 μ M then exposed to NaCl stopped being responsive between 10 min and 70 min (Figure 7).

We monitored the photomotor response (PMR) in 5 dpf-old wild-type AB larvae exposed to NET 0.3 μ M, 3 μ M and 30 μ M from 4 to 5 dpf in a light/dark challenge (Figure 8). In control larvae (DMSO 0.1% v/v), the light change produced a significant increase in activity that lasted

throughout the following dark period and decreased during the light on-2 period to reach levels observed during light on-1 period (Figure 8A). Larvae exposed to NET 0.3 μ M and 3 μ M displayed higher levels of activity than control larvae during the light off period (Figure 8B,C). In larvae exposed to NET 0.3 μ M, the activity decreased during light on-2 period but did not reach the levels observed during light on-1 period (Figure 8B). NET 30 μ M did not induce a significant increase of activity during light off period as compared to control larvae (Figure 8B). All treated larvae avoided the center area of wells during the light off period was observed (data not shown).

4. Discussion

4.1. *Norethindrone is a zfGR antagonist in HG5LN-zfGR cells*

The GR agonist dexamethasone (DEX) induced luciferase activity in a concentration-dependent manner in HG5LN-zfGR cells with an EC₅₀ of 11.0 nM. This effect was blocked by the GR antagonist mifepristone (RU486) with an IC₅₀ of 2.74 nM, suggesting that this cell line responds in a GR-dependent and GR-specific manner. Previous studies reported the agonist effect of DEX in several bioassays expressing human GR, namely GR-CALUX (Van der Linden et al. 2008; Sonneveld 2004; Schriks et al. 2013; Jia et al. 2015), GR-GeneBLAzer (Huang et al. 2011; Jia et al. 2015; Chen et al. 2016) and GR-Switchgear (Jia et al. 2015) with EC₅₀ ranging from 0.7 to 4nM which agrees with the EC₅₀ of DEX reported herein.. Mifepristone antagonized the effect of DEX in GR-CALUX and GR-GeneBLAzer bioassays with IC₅₀ between 0.4 and 6.0nM (Jia et al. 2015). As humans, zebrafish express a single GR gene that can give two isoforms A and B through alternative splicing, suggesting that the results in literature can be compared to the ones we obtained with cells expressing a zebrafish GR LBD. Interestingly, the agonist effect of DEX was shown in GRE:luc cells with an EC₅₀ of 13nM (Weger et al. 2012).

NET alone did not induce luciferase activity, but inhibited the DEX-induced luciferase activity in a concentration-dependent manner with an IC₅₀ of 634 nM. To our knowledge, this is the first time the zfGR activity of NET is assessed. Interestingly, the binding of NET to the human GR was assessed in (Kontula et al. 1983) and NET did not show any significant binding affinity to the GR. It is possible that NET can bind to the zebrafish GR but not to the human GR, highlighting a species-specificity as shown with the human and zebrafish PR (Garoche et al., in prep). In medaka, it was shown that progesterone and DHP alone activated GR subtypes *in vitro* in a transient transactivation assay (Miyagawa et al. 2015), suggesting that progestins can bind to fish GRs.

4.2. NET downregulates the expression of GFP in interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae

In transgenic *cyp11c1*-GFP larvae, NET consistently inhibited GFP fluorescence in a concentration-dependent manner as compared to the control tg zebrafish larvae with an IC₅₀ of 927nM. It was shown that in this model, DEX induced GFP in a concentration-dependent manner and that mifepristone inhibited DEX-induced fluorescence, suggesting that functional GRs are required for GFP fluorescence (Garoche et al., in prep). The potential regulation of *cyp11c1* expression through GR is also supported by the parallel expression of *gr* and *cyp11c1* transcripts during zebrafish development (Bluthgen et al. 2013; Wilson et al. 2013). The inhibiting effect of NET in this model is thus consistent with its antagonizing effect in HG5LN-zfGR cells. Other studies recently reported the effects of some progestins on *cyp11c1* transcript levels in zebrafish larvae. For instance, in zebrafish embryos exposed from 0 to 120 hpf to progesterone (P4) 254 ng/L (0.8 nM), a downregulation of *cyp11c1* transcripts was observed (Bluthgen et al. 2013). In (Y.-Q. Liang, Huang, Ying, et al. 2015), P4 significantly upregulated *cyp11c1* transcript levels at 24 hpf at the concentrations 6, 45 and 90 ng/L. Levels were also upregulated at 72, 96 and 120 hpf although the effect was not significant. At 48 hpf and 144

hpf, P4 downregulated *cyp11c1* transcript levels but not in a significant manner. The induction of *cyp11c1* transcripts was also observed in 24 hpf and 96 hpf-old zebrafish larvae exposed to 5, 50 and 100 ng/L (0.015, 0.15 and 1.5nM) norgestrel (Y. Q. Liang et al. 2015). However, NGL 50, 500 and 5000 ng/L also downregulated *cyp11c1* transcripts in 96 hpf-old zebrafish larvae (Liang et al. 2017). Transcripts of *cyp11c1* transcripts were downregulated in 48 hpf, 72 hpf, 120 hpf (except 5 ng/L) and 144 hpf-old larvae exposed to norgestrel, although the effect was not significant (Y. Q. Liang et al. 2015). In juveniles zebrafish, long-term exposure from 20 to 60 dpf to P4 33 and 63 ng/L and NGL 4 ng/L downregulated *cyp11c1* transcripts (Y.-Q. Liang, Huang, Liu, et al. 2015). Altogether, these studies showed that P4 and norgestrel are able to disrupt transcript levels of *cyp11c1* in a complex manner. However, one limit of the approach used is the the lack of tissue- or cell-specific expression of *cyp11c1*. In our study, our data indicate for the first time a down-regulation of GFP in interneal cells of the developing zebrafish larvae exposed to northindrone which was consistently observed through the several independent experiments performed. Most importantly, the inhibitory effect of NET on GFP was accompanied by changes in whole-body concentrations of cortisol.

4.3. *NET downregulates cortisol levels in whole-body zebrafish larvae*

In an attempt to characterize the effect of NET-induced *cyp11c1* inhibition, cortisol concentrations were assessed in wild-type AB zebrafish larvae exposed under identical experimental conditions as transgenic *cyp11c1*-GFP larvae. In control larvae, whole-body cortisol levels measured in 30-larvae homogenates were between 6 and 25 ng/ml, which represents between 0.2 and 0.8 ng cortisol/larva. Our data support the whole-body cortisol levels reported by other studies which were around 0.2 ng/larva in 4-dpf old zebrafish larvae (Massarsky et al. 2014) and 3-4 ng/larva in 4 and 5 dpf-old zebrafish larvae (Wilson et al. 2013).

In larva exposed to the cortisol precursor pregnenolone (P5) whole-body cortisol levels were 4 times higher as compared to control. This result is consistent with the higher whole-

body cortisol levels measured in 5 dpf-old larvae exposed to P5 albeit the fold-induction reported by (Weger et al. 2012) were higher as compared to our study.

In larvae exposed to the 11 β -hydroxylase inhibitor metyrapone (MP) 40 μ M, whole-body cortisol levels were significantly lower than in control larvae (63.4% reduction as compared to control). In (Wilson et al. 2013), MP reduced whole-body cortisol levels in 5 dpf-old larvae in a concentration-dependent manner, with the highest MP concentration (10 μ M) resulting in a 65.5% reduction; and cortisol levels were decreased in 5 dpf-old zebrafish larvae treated with *cyp11c1*-morpholinos. In our experiments, larvae coexposed to P5 and MP displayed whole-body cortisol levels similar to control, indicating that functional 11 β -hydroxylase enzyme is needed for P5-induced cortisol. Altogether, the data collected in P5 and MP-treated larvae shows that at this life stage, the 11 β -hydroxylase enzyme is functional, which agrees with the data reported by (Wilson et al. 2013).

In larvae exposed to NET 30 μ M, whole-body cortisol levels were lower than in control larvae (75.5% reduction). Larvae coexposed to P5 and NET had whole-body cortisol levels similar to basal levels measured in control larvae. These results are consistent with the downregulation of GFP fluorescence in interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae exposed to NET. While the lower levels of cortisol measured in fish exposed to NET are likely due to a downregulation of the transcriptional activity of the *cyp11c1*, a direct effect of NET on the P450 11 β -hydroxylase enzymatic complex cannot be ruled out but additional investigations are required to test this hypothesis.

Overall, our data demonstrated for the first time that NET can alter the corticosteroidogenesis by inhibiting the interrenal *cyp11c1* expression and affecting the cortisol concentrations in zebrafish larvae.

4.4. *NET modulates POMC expression in the anterior pituitary*

It has been previously demonstrated that modulation of cortisol concentration is accompanied by changes of genes expression along the HPI, notably POMC expression. In an attempt to further investigate the effect of *cyp11c1* and cortisol changes in NET-exposed fish on the HPI functioning, we assessed POMC expression in the pituitary using whole-mount *in situ* hybridization in larvae exposed from 4 to 5 dpf. In control larvae, POMC was observed in the anterior pituitary, posterior pituitary and *nucleus lateralis tuberis*. Exposures of larvae to DEX 10 μ M repressed *pomc* expression in the anterior pituitary. This result is consistent with DEX being an analogue of cortisol, exerting a negative feedback on the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis. DEX treatment (25 and 50 μ M) also suppressed anterior pituitary *pomc* expression via negative feedback in Tg (POMC:EGFP) zebrafish larvae exposed from 1 to 5 dpf (Liu et al. 2003; Sun et al. 2010). DEX at 40 μ M reduced *pomc* transcripts in the anterior domain of corticotrophs in larvae exposed from 1 to 2 dpf and completely suppressed endogenous *pomc* expression in larvae exposed from 1 to 3, 1 to 4 and 1 to 5 dpf (To et al. 2007). Interestingly, we previously showed that mifepristone could not rescue *pomc* expression in the anterior pituitary of larvae exposed to DEX, while it blocked DEX-induced GFP in *cyp11c1*-GFP larvae (Garoché et al., in prep.). This result suggests that DEX might induce corticosteroidogenesis through a direct pathway to interrenal cells, likely through the GR. As observed with DEX 10 μ M, exposures of larvae to P5 5 μ M repressed POMC expression in the anterior pituitary, suggesting a negative feedback consistent with the induction of cortisol levels in larvae exposed to P5.

NET 30 μ M induced POMC expression in the anterior pituitary. Given that NET downregulates GFP expression in the interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae and lowers cortisol levels, it is likely that a positive feedback is exerted on the HPI axis at the pituitary level to

stimulate the corticosteroidogenesis in order to counteract the inhibitory of NET on cortisol levels. This is supported by the data reported in tg(POMC:EGFP) zebrafish larvae treated from 24 hpf to 5 dpf with 0.2mM aminoglutethimide (AG), an inhibitor of the enzyme P450_{scc} converting cholesterol to pregnenolone. Indeed, the authors found that there was a significant induction of EGFP expression and endogenous *pomc* expression in the anterior pituitary (Sun et al. 2010)

Interestingly, NET 30 μ M did not prevent the repression of POMC by DEX but prevented the repression of POMC by P5. Indeed, since DEX is a cortisol analogue, it will act directly at the pituitary level to exert a negative feedback and the repression of *cyp11c1* expression by NET will not affect POMC expression at the pituitary level in DEX-treated larvae. P5 being a precursor of cortisol, *cyp11c1* expression is needed to produce cortisol. NET represses *cyp11c1* expression, thus preventing the negative feedback exerted by P5 alone at the pituitary level.

4.5. NET alters stress responses in larvae

NET-treated larvae were tested for touch-response after a salt treatment (NaCl 250mM). The salt treatment altered the touch-response of larvae treated both with DMSO or to NET 30 μ M but the effect occurred earlier in NET-treated larvae, suggesting that NET altered the ability of larvae to cope with saline stress. In literature, cortisol levels in 5 dpf-old zebrafish larvae were induced by NaCl 250mM (Yeh et al. 2013; Weger et al. 2012) and 100mM (Krug et al. 2014) and induced luciferase activity in GRE:luc larvae (Weger et al. 2012). According to our results, NET lowers cortisol levels and prevents *de novo* cortisol biosynthesis despite the addition of P5 by repressing *cyp11c1* expression in the interrenal cells. It is likely that NET alters the ability of larvae to cope with saline stress by preventing a rise in cortisol levels in salt-stressed larvae.

We monitored the photomotor response (PMR) in 5 dpf-old larvae exposed to NET from 4 to 5 dpf in a light/dark challenge. Larvae exposed to NET displayed higher levels of activity as

compared to control larvae and an avoidance of the center area of wells during the light off period, indicating an hyperactivity and suggesting an anxiogenic effect of NET (Steenbergen et al. 2011; Schnörr et al. 2012). Interestingly, in larvae exposed to NET 0.3 μ M, the activity decreased during light on-2 period but did not reach the levels observed during light on-1 period, indicating a lasting effect. NET 30 μ M did not induce a significant increase of activity during light off period as compared to control larvae, indicating that the effect of NET is not concentration-dependent. The hyperactivity of NET-treated larvae was not expected as NET lowered whole-body cortisol levels.

The link between cellular and tissular effects of NET and physiological outputs such as behaviour remains to be demonstrated. The use of zebrafish-based bioassays such as corticotrope-deficient *rx3* mutants could be of major interest to investigate this link, since their pituitary defects are accompanied with significantly reduced cortisol levels and the absence of normal GR signaling (Rojas-mun et al. 2005; Dickmeis et al. 2007).

5. Conclusion

Using a set of *in vitro* and *in vivo* mechanism-based bioassays, we report herein for the first time that NET can act on zfGR as an antagonist. This molecular effect is likely responsible for the inhibitory effect on *cyp11c1* expression in interrenal cells as shown in *tg(cyp11c1-GFP)* larvae. These effects were accompanied by changes of POMC expression in the anterior pituitary and the capacity of fish to maintain normal levels of cortisol which could also explain the stress responses observed. Overall, we found that NET induces a suite of molecular events supporting the disruption of GR signaling pathways and corticosteroidogenesis in zebrafish larvae with potential consequences at the physiological level with a disruption of stress response behaviour (Figure 9). As NET belongs to a large family of substances that have similar chemical structures, their effect on GR and corticosteroidogenesis should also be investigated.

Acknowledgements

This research was supported by the ANR PROOFS “Occurrences and effects of environmental ligands of progesterone receptor on fish reproduction and neurodevelopment” (ANR-13-CESA-0006-03). Clémentine Garoche was supported by a doctoral fellowship from the ANR PROOFS and the French Ministry of Ecology (P190 “Axe de Recherche Ecotoxicologie”) and by the GDR 3606 REPRO fellowship (2016).

References

- Al-Odaini, N.A. et al., 2010. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1217(44), pp.6791–806.
- Bluthgen, N. et al., 2013. Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 2. Gene expression analysis and in vitro activity. *Aquatic Toxicology*, 144–145, pp.96–104.
- Brion, F. et al., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 7(5), p.e36069.
- Cano-Nicolau, J. et al., 2016. Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305, pp.12–21.
- Chang, H. et al., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*, 45(2), pp.732–740.
- Chen, Q. et al., 2016. Glucocorticoid activity detected by in vivo zebrafish assay and in vitro glucocorticoid receptor bioassay at environmental relevant concentrations. *Chemosphere*, 144, pp.1162–1169.
- Creusot, N. et al., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental science & technology*, 48(7), pp.3649–3657.
- Dickmeis, T. et al., 2007. Glucocorticoids Play a Key Role in Circadian Cell Cycle Rhythms U. Schibler, ed. *PLoS Biology*, 5(4), p.e78.
- Fernandez, M.P., Ikonomidou, M.G. & Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic

- contaminants in Canadian wastewaters. *The Science of the total environment*, 373(1), pp.250–69.
- Fick, J. et al., 2010. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environmental science & technology*, 44(7), pp.2661–6.
- Huang, R. et al., 2011. Chemical Genomics Profiling of Environmental Chemical Modulation of Human Nuclear Receptors. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), pp.1142–1148.
- Jia, A. et al., 2015. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Research*, 80, pp.1–11.
- Kontula, K. et al., 1983. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. *Biochemical Pharmacology*, 32(9), pp.1511–1518.
- Krug, R.G. et al., 2014. A transgenic zebrafish model for monitoring glucocorticoid receptor activity. *Genes, brain, and behavior*, pp.478–487.
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Liu, S.-S., et al., 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 160, pp.172–179.
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Ying, G.-G., et al., 2015. The effects of progesterone on transcriptional expression profiles of genes associated with hypothalamic–pituitary–gonadal and hypothalamic–pituitary–adrenal axes during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 128, pp.199–206.
- Liang, Y.-Q. et al., 2017. Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 195, pp.60–67.
- Liang, Y.Q. et al., 2015. A time-course transcriptional kinetics of the hypothalamic-pituitary-

- gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in zebrafish eleutheroembryos after exposure to norgestrel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), pp.112–119.
- Van der Linden, S.C. et al., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental science & technology*, 42(15), pp.5814–20.
- Liu, N.-A. et al., 2003. Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic zebrafish. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(5), pp.959–66.
- Liu, S. et al., 2012. Fate and occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 170, pp.190–201.
- Massarsky, A. et al., 2014. Acute embryonic exposure to nanosilver or silver ion does not disrupt the stress response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults. *Science of the Total Environment*, 478, pp.133–140.
- Miyagawa, S. et al., 2015. Characterization of *Oryzias latipes* glucocorticoid receptors and their unique response to progestins. *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), pp.302–309.
- Overturf, M.D. et al., 2012. Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(3), pp.455–464.
- Paulos, P. et al., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, 99(2), pp.256–262.
- Petersen, L.H. et al., 2015. Effects of progesterone and norethindrone on female fathead minnow (*Pimephales promelas*) steroidogenesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(2), pp.379–390.

- Rojas-mun, A., Dahm, R. & Nu, C., 2005. *chokh / rx3* specifies the retinal pigment epithelium fate independently of eye morphogenesis. , 288, pp.348–362.
- Schnörr, S.J. et al., 2012. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 228(2), pp.367–374.
- Schriks, M. et al., 2013. Occurrence of glucocorticogenic activity in various surface waters in The Netherlands. *Chemosphere*, 93(2), pp.450–454.
- Sonneveld, E., 2004. Development of Androgen- and Estrogen-Responsive Bioassays, Members of a Panel of Human Cell Line-Based Highly Selective Steroid-Responsive Bioassays. *Toxicological Sciences*, 83(1), pp.136–148.
- Steenbergen, P.J., Richardson, M.K. & Champagne, D.L., 2011. The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), pp.1432–1451.
- Strähle, U. et al., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2), pp.128–132.
- Sun, L. et al., 2010. In vivo alternative assessment of the chemicals that interfere with anterior pituitary POMC expression and interrenal steroidogenesis in POMC: EGFP transgenic zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology*, 248(3), pp.217–25.
- To, T.T. et al., 2007. Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(2), pp.472–85.
- Vignet, C. et al., 2015. Exposures of zebrafish through diet to three environmentally relevant mixtures of PAHs produce behavioral disruptions in unexposed F1 and F2 descendant. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), pp.16371–16383.
- Vignet, C., Pe, S. & Lyphout, L., 2013. Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. , 0(0).

- Vulliet, E. et al., 2007. Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(6), pp.2143–51.
- Vulliet, E. & Cren-olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale , in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159(10), pp.2929–2934.
- Weger, B.D. et al., 2012. A chemical screening system for glucocorticoid stress hormone signaling in an intact vertebrate. *ACS chemical biology*, 7(7), pp.1178–83.
- Wilson, K.S. et al., 2013. Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of physiology*, 591(Pt 24), pp.6209–20.
- Yeh, C.-M., Glöck, M. & Ryu, S., 2013. An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval zebrafish. *PloS one*, 8(11), p.e79406.
- Zucchi, S., Castiglioni, S. & Fent, K., 2012. Progestins and Antiprogestins Affect Gene Expression in Early Development in Zebra fish (*Danio rerio*) at Environmental Concentrations. *Environmental science & technology*, 46(46), pp.5183–5192.

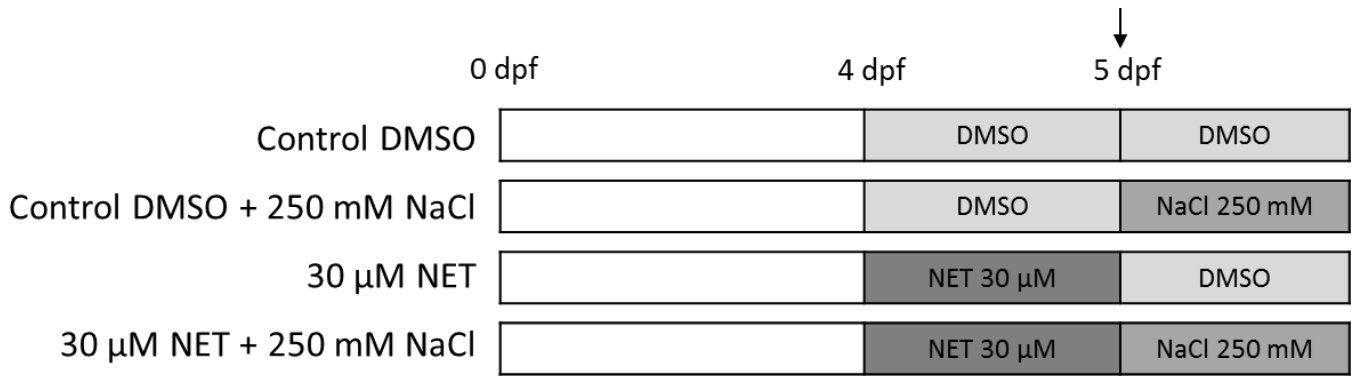


Figure 1: Exposure pattern of wild-type AB larvae for stress response assay. Wild-type AB larvae are exposed from 4 to 5 dpf to either the control DMSO (0.1% v/v) or to 30 μ M NET. At 5 dpf, larvae were exposed to either DMSO (0.1% v/v) or to NaCl salt at 15 ng/L (250 mM) and the touch response was examined every ten minutes for each larva. The larvae were stimulated with a cone and were considered touch-responsive when they fled under the stimulation.

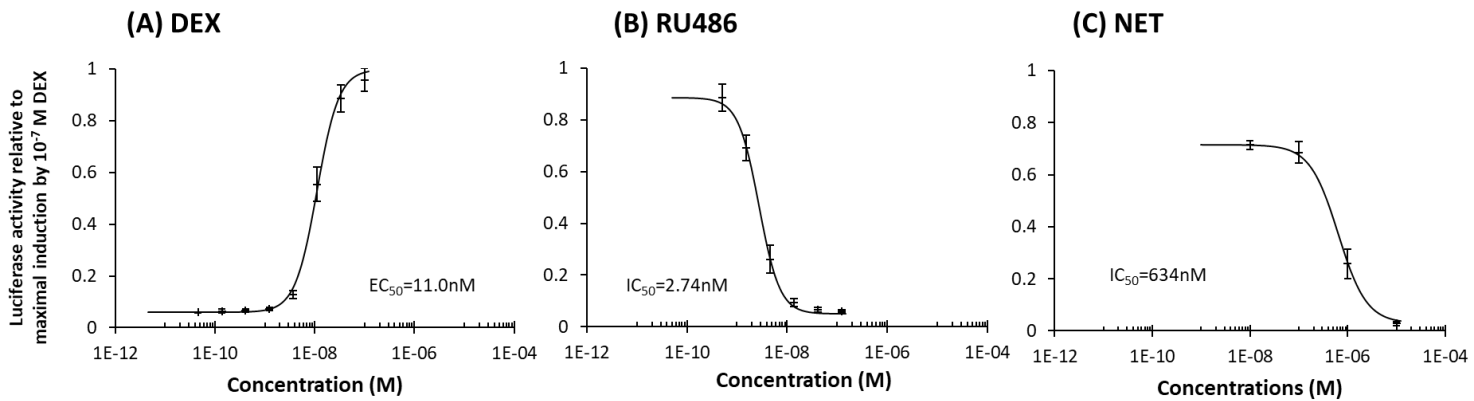


Figure 2: Transactivation of zebrafish nuclear glucocorticoid receptor in HG5LN-zfGR cells expressing the reporter gene luciferase. n=3 independent experiments. Results are expressed as the percentage of the maximum luciferase activity induced by 10^{-7} M dexamethasone (DEX). HG5LN-zfGR cells were treated with indicated concentrations of DEX, mifepristone (RU486) or norethisterone (NET) coexposed with DEX at a concentration of 3×10^{-8} M inducing 80% of the luciferase activation for 16h, to estimate half-maximal effective concentrations (EC_{50}) and IC_{50} (inhibition) values. Error bars represent sd.

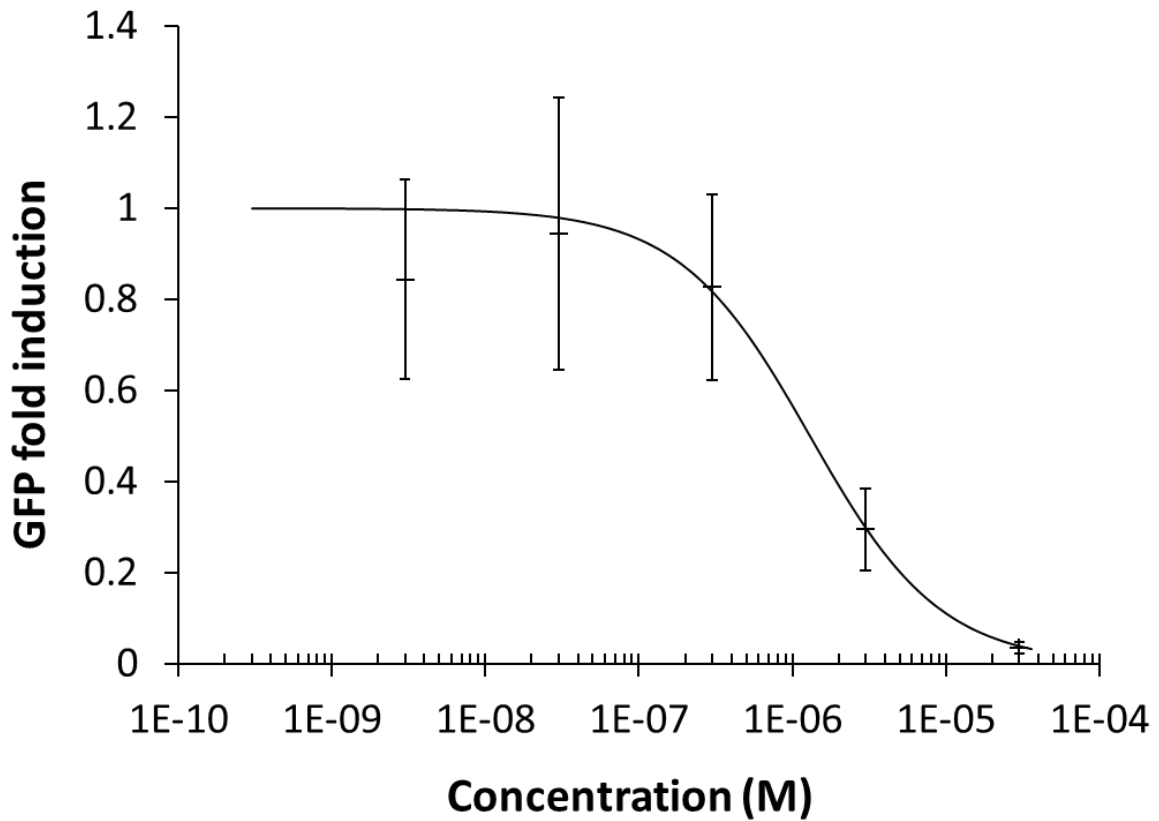


Figure 3: Effect of norethindrone (NET) on GFP expression in the interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae exposed from 4 to 5 days post-fertilization (dpf). Calculated NET IC₅₀ = 927nM. Results are expressed as fold induction above control (means ± SEM, n=20 fish embryos per condition). N=3 independent experiments.

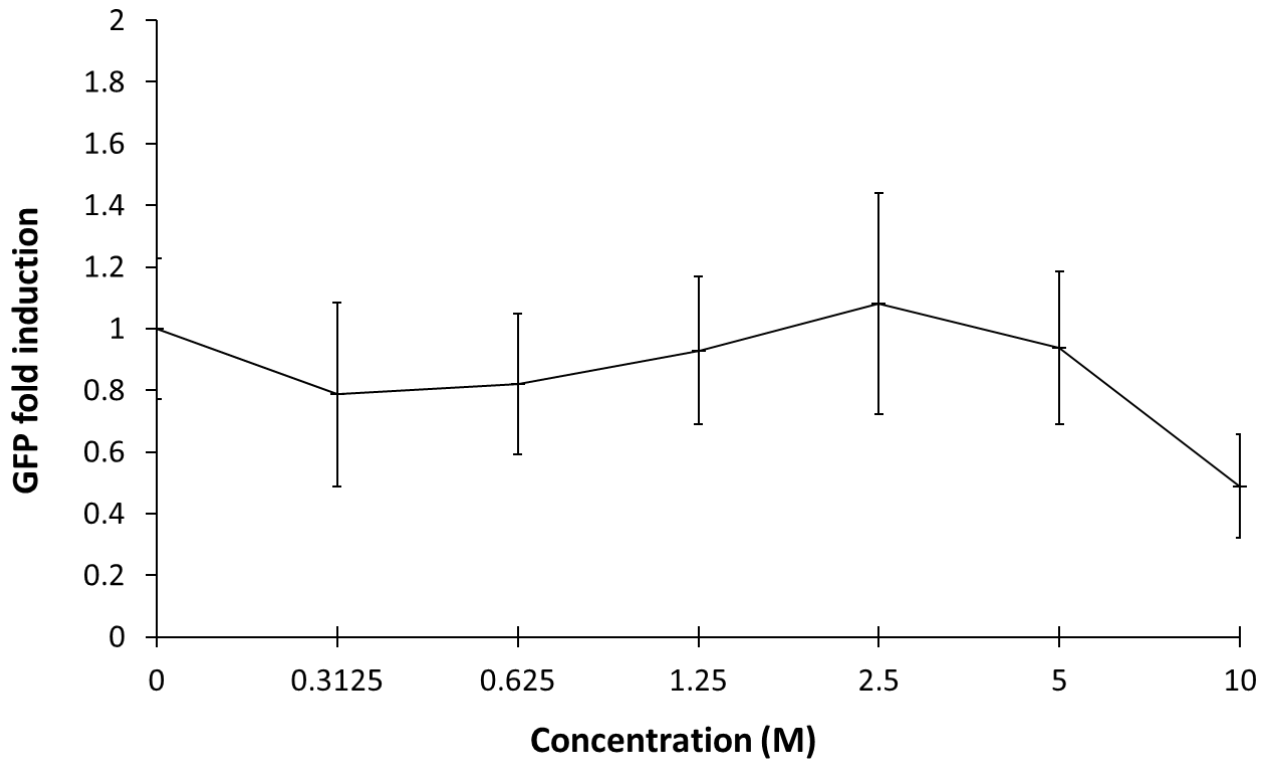


Figure 4: Effect of pregnenolone (P5) on GFP expression in the interrenal cells of *cyp11c1*-GFP larvae exposed from 4 to 5 days post-fertilization (dpf). Results are expressed as fold induction above control (means \pm SEM, n=20 fish larvae per condition). N=3 independent experiments. Treatments were not significantly different from control $p < 0.05$.

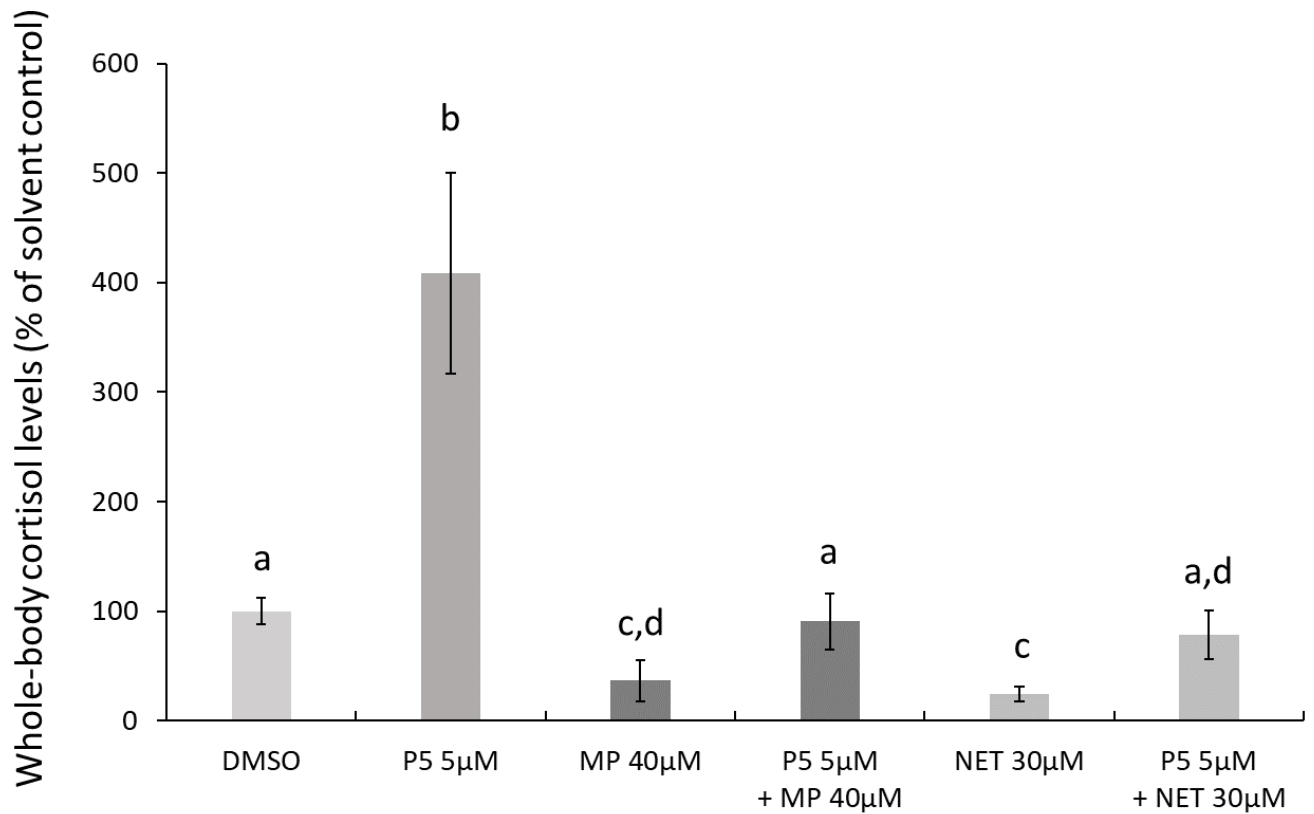


Figure 5: Effect of pregnenolone (P5) 5µM, metyrapone (MP) 40µM and norethindrone (NET) 30µM on whole-body cortisol levels in wild-type AB larvae exposed from 4 to 5 days post-fertilization (dpf). Results are expressed as a percent of the control (means \pm SD, n=30 fish larvae per condition). N=3 independent experiments.

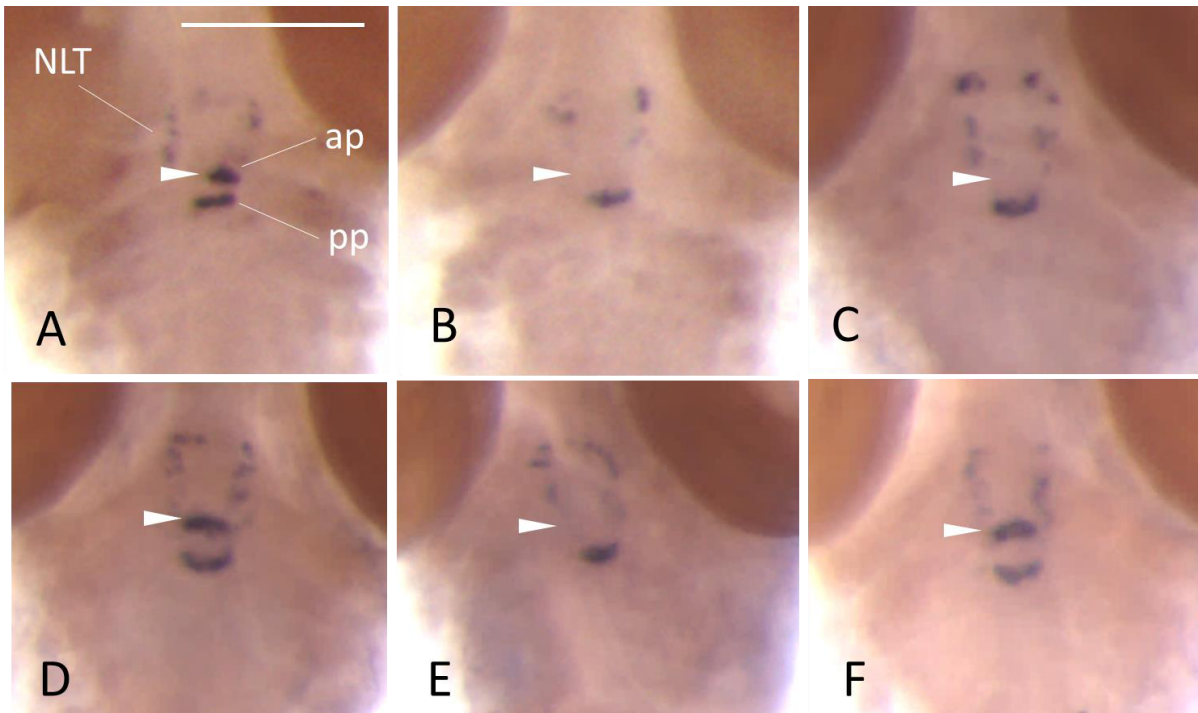


Figure 6: Whole-mount in situ hybridization of *pomc* in WT-AB larvae exposed from 4 to 5 days post fertilization to DMSO 0.1% v/v (A) ; dexamethasone (DEX) 10 μ M (B) ; pregnenolone (P5) 5 μ M (C), norethindrone (NET) 30 μ M (D), DEX 10 μ M + NET 30 μ M (E) and P5 5 μ M + NET 30 μ M (F). NLT: nucleus lateralis tuberis ; ap: anterior pituitary ; pp: posterior pituitary. Ventral views. Scale bar: 250 μ m.

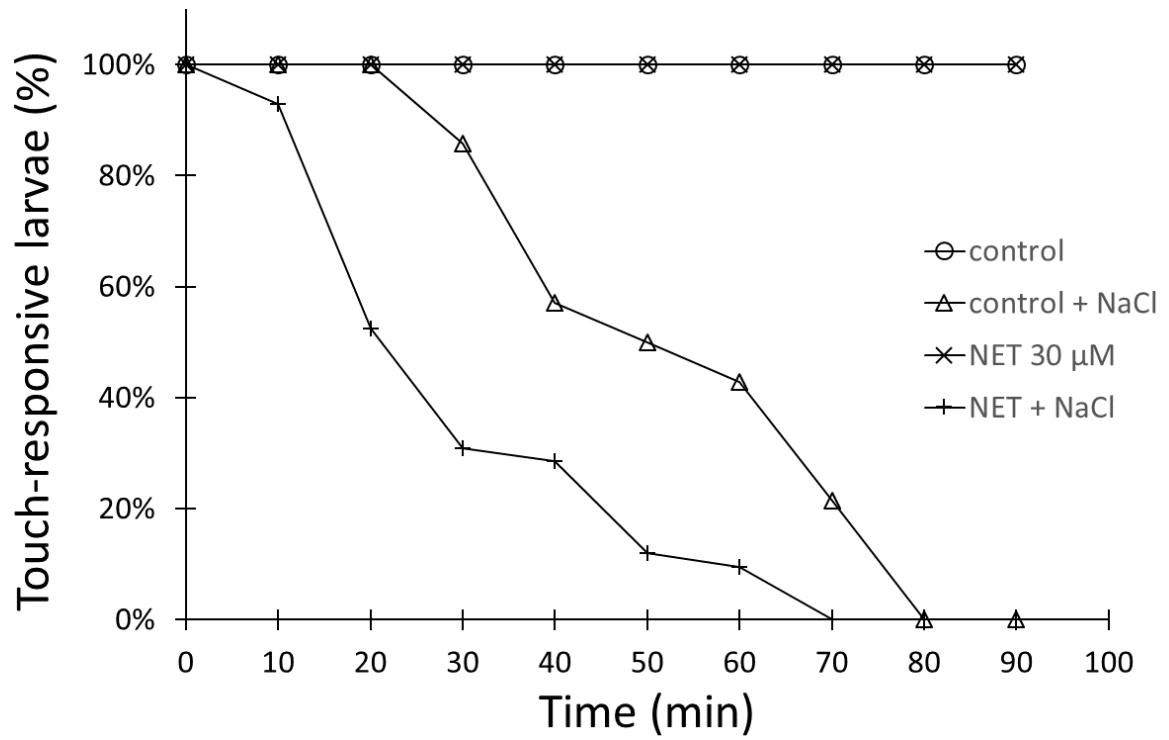


Figure 7: Touch-response assay in WT-AB larvae exposed from 4 to 5 days post fertilization to DMSO 0.1% v/v or NET 30μM then exposed to NaCl 15g/L or not and tested for touch-response every ten minutes.

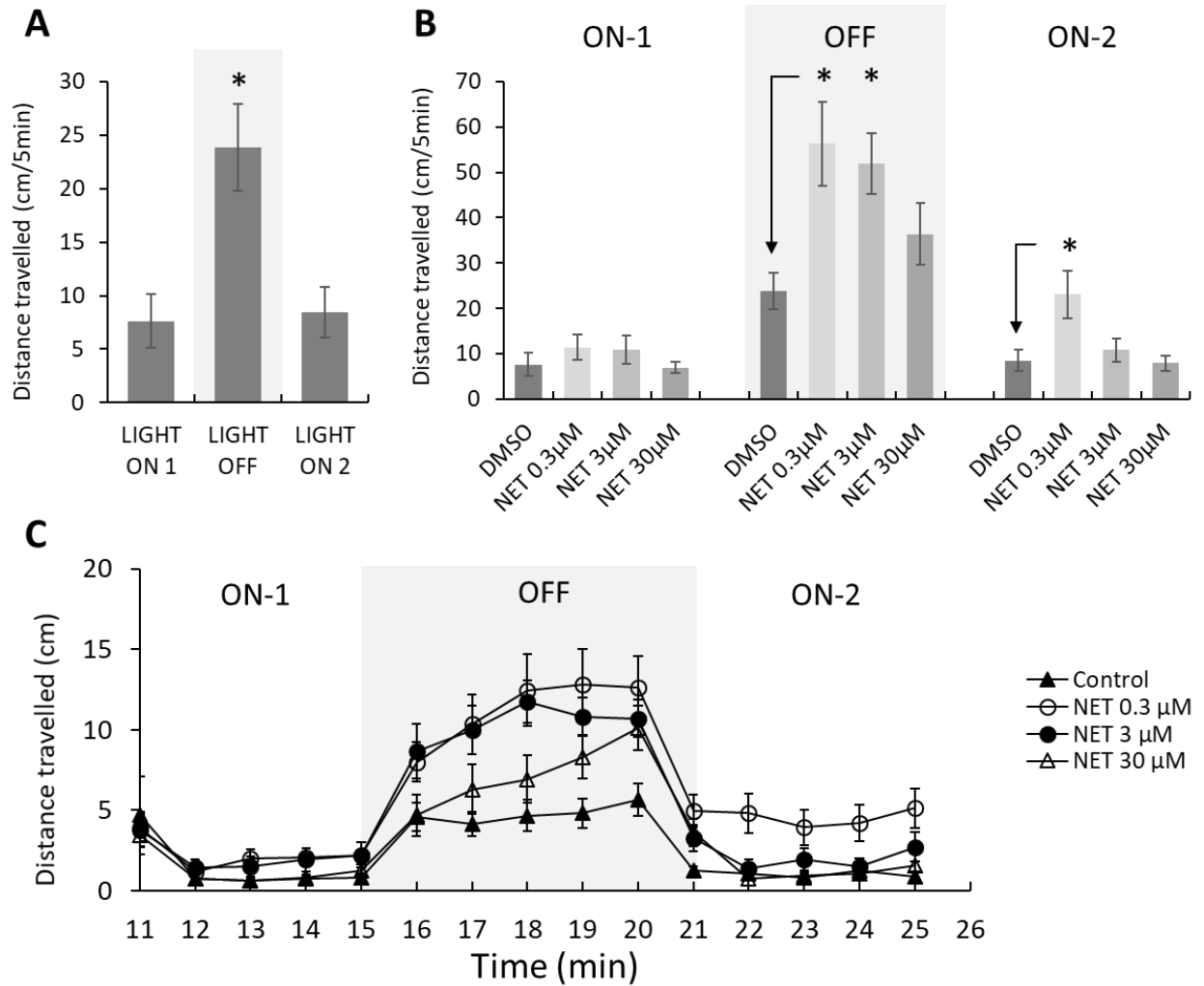


Figure 8: Photomotor response of WT-AB larvae exposed from 4 to 5 days post fertilization to DMSO 0.1% v/v or NET 0.3, 3 and 30 μM. Distance travelled per 5-min periods of light on (ON-1), light off (OFF) and light-on (ON-2) expressed in cm/5min (A,B) or cm/min (C). (A) Locomotor activity in control larvae (DMSO 0.1% v/v); (B,C) Locomotor activity in larvae exposed to DMSO or to NET in cm/5min periods (B) or detailed in cm/min (C).

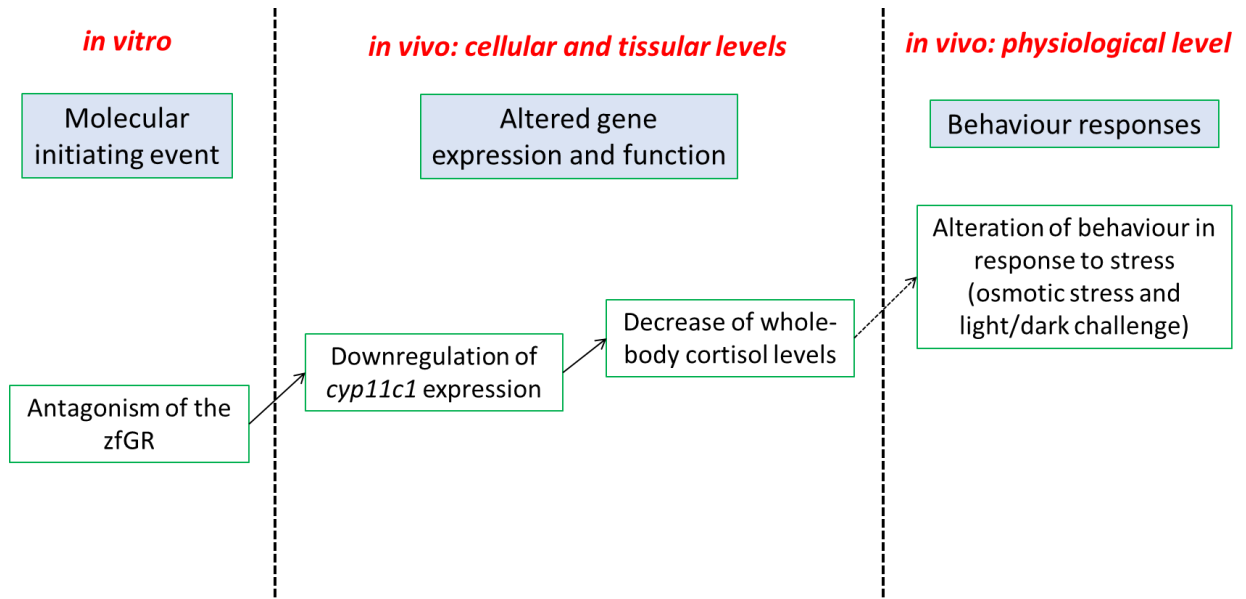


Figure 9: Putative adverse outcome pathway (AOP) of NET in zebrafish mechanism-based bioassays.

Données complémentaires

1. Effet des progestatifs vis-à-vis du récepteur des glucocorticoïdes zfGR in vitro

En complément de l'article 5, l'ensemble des progestatifs a été testé sur la lignée cellulaire HG5LN-zfGR exprimant un récepteur chimérique poisson zèbre des glucocorticoïdes (cellules HeLa exprimant les plasmides Gal4(DBD)-zfGR(LBD) et GalRE-luciférase)². Les composés sont inactifs seuls (données non montrées) mais sont tous anti-zfGR (à l'exception de R5020, NES et TIB) en cela qu'ils antagonisent le composé de référence dexaméthasone (DEX) 3×10^{-8} M de manière concentration-dépendante (figure 16 et tableau 11). Les IC₅₀ calculées varient entre 18,5 nM et 11,6 μM selon le progestatif considéré. Ces résultats sont cohérents avec l'effet antagoniste de NET montré dans l'article 5. Il est intéressant de noter que la NET n'est pas la molécule la plus antagoniste du zfGR *in vitro*, bien que son activité inhibitrice sur *cyp11c1*-GFP soit très marquée. Cette différence permet de mettre en évidence l'importance de combiner cette approche *in vitro* avec des approches *in vivo* afin de prendre en compte la dynamique toxicologique des composés.

Les progestatifs sont en cours de criblage sur une lignée cellulaire exprimant un récepteur chimérique humain des glucocorticoïdes, afin de pouvoir établir des potentielles différences inter espèces.

² Ces expériences ont été réalisées par Nicolas Creusot à l'ICRM de Montpellier (Inserm U1194).

Tableau 11 : Concentrations induisant 50% d'inhibition de l'effet maximum induit par DEX $10^{-7}M$ (IC_{50}) en nM dans la lignée cellulaire HG5LN-zfGR exprimant le gène rapporteur luciférase. N=3 expériences indépendantes. Les cellules sont traitées par dexaméthasone seule (DEX) ou coexposées avec des progestatifs et DEX $3 \times 10^{-8}M$, concentration induisant 80% du maximum.

Classe	Composé	Abréviation	IC_{50} sur HG5LN-zfGR (nM)	
Glucocorticoïde	Dexaméthasone	DEX	$EC_{50} = 11.0$	
Antagoniste de GR et PR	Mifepristone	RU486	2.74	
Progestatif endogène	Progestérone	P4	11561	
Rétroprogestérone	Dydrogestérone	DYD	2157	
Progestatif endogène téléostéen	$17\alpha,20\beta$ -dihydroxyprogestérone	DHP	2045	
Structurellement apparentés à la progestérone	Medroxyprogestérone	MEP	284	
	Pregnanes	Acétate de medroxyprogestérone	MPA	23.8
		Acétate de mégestrol	MGA	515
		Acétate de chlormadinone	CMA	108
		Acétate de cyproterone	CPA	906
		Norpregnanes	Acétate de nomégestrol	NGA
	Gestonorone		GRN	372
	Structurellement apparentés à la testostérone : dérivés de la 19-nortestostérone	Éthistérone	ETH	18.5
		Estranes	Diacétate d'éthynodiol	EDA
Lynestrénol			LYN	891
Acétate de norethistérone			NEA	464
Norethistérone			NET	634
Gonanes			Désogestrel	DSG
		Étonogestrel	ENG	116
		Gestodène	GES	437
		Levonorgestrel	LNG	232
		Norgestimate	NTE	386
		Norgestrel	NGL	390
		Dérivé de la spironolactone	Drospirénone	DRO

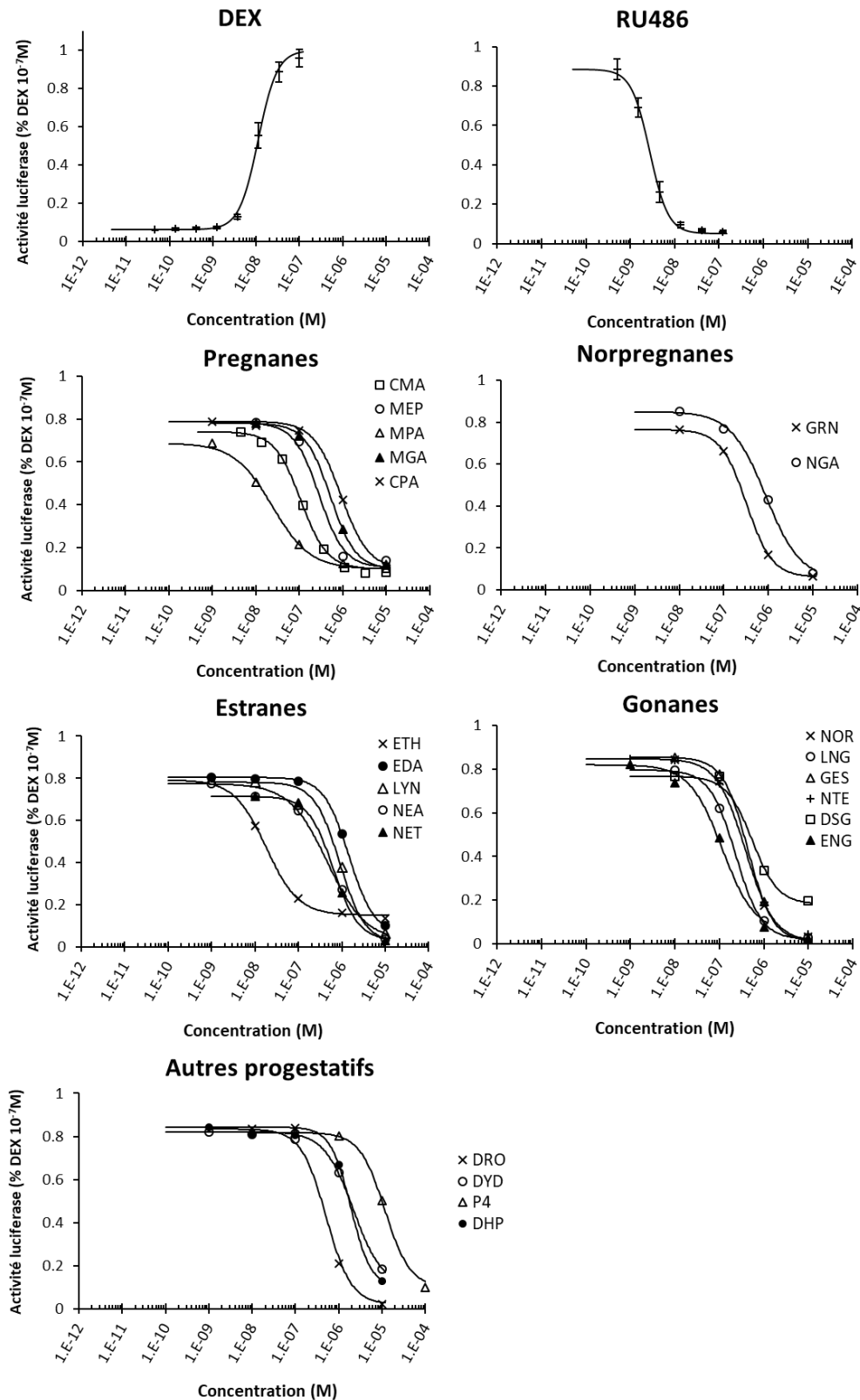


Figure 16 : Transactivation du récepteur poisson zèbre des glucocorticoïdes (zfGR) dans la lignée cellulaire HG5LN-zfGR exprimant le gène rapporteur luciférase. N=3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du maximum d'activité luciférase induite par DEX 10^{-7} M. Les cellules sont traitées par dexaméthasone seule (DEX) ou coexposées avec des progestatifs et DEX $3 \cdot 10^{-8}$ M, concentration induisant 80% du maximum. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

2. Interaction des progestatifs avec les éléments de réponse des glucocorticoïdes

Des expériences complémentaires ont également été menées au Karlsruher Institut für Technologie (KIT) dans le laboratoire de Thomas Dickmeis afin d'évaluer la capacité de ligands du nPR à interagir directement ou indirectement avec les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs). Pour cela, 14 progestatifs (tableau 12) ont été testés sur le modèle poisson zèbre GRE:Luc (bioessai GRIZLY, Glucocorticoid Responsive In vivo Zebrafish Luciferase activity assay) exprimant quatre GREs associés au gène rapporteur luciférase (Weger et al. 2012) (figure 17). Sur ce modèle, la dexaméthasone, la betaméthasone, l'hydrocortisone et la pregnénolone induisent l'activité luciférase de façon concentration-dépendante et l'effet de DEX est bloqué par la mifepristone (Weger et al. 2012).

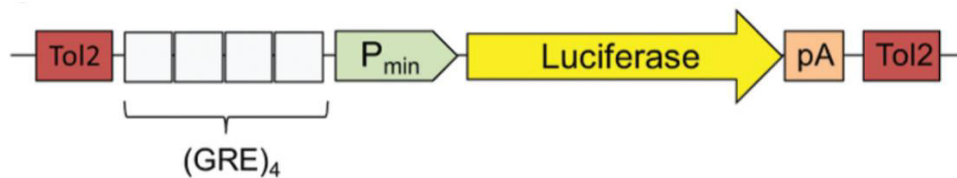


Figure 17 : Construction de la lignée GRE :Luc. Tol2 : sites transposase pour faciliter l'intégration dans le génome ; (GRE)₄ : quatre éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs) ; P_{min} : promoteur minimal ; pA : site de polyadénylation (Weger et al., 2012).

Les progestatifs ont été testés de 4 à 5 jpf. Ces travaux complètent les travaux de l'équipe de T. Dickmeis au KIT qui a précédemment testé 11 progestatifs de 5 à 6 jpf³ (tableau 12).

³ Travaux réalisés par Melanie Macherey au KIT (Karlsruhe, Allemagne).

Tableau 12 : Liste des progestatifs testés sur les larves GRE:Luc.

Classe	de 4 à 5 jpf	de 5 à 6 jpf	
Antagoniste de GR et PR		RU486	
Progestatif endogène		P4	
Rétroprogestérone	DYD		
Structurellement apparentés à la progestérone		MEP	
		MPA	
	Pregnanes		
		MGA	
		CMA	
		CPA	
Structurellement apparentés à la testostérone : dérivés de la 19-nortestostérone		R5020	
	Norpregnanes	NES	
		NGA	
		GRN	
			ETH
	Estranes	EDA LYN NEA	NET TIB
Dérivé de la spironolactone	Gonanes	DSG ENG GES	LNG
		NTE	
		NGL	

Les progestatifs testés de 4 à 5 jpf n’ont pas induit d’activité luciférase (données non montrées) à l’exception de ENG, GRN et NES (figure 18). La luminescence induite par ces trois composés a été inhibée par la RU486 de façon concentration-dépendante (figure 15), mais pas par l’inhibiteur de 11 β -hydroxylase metyrapone (MP) (données non montrées).

Les progestatifs précédemment testés de 5 à 6 jpf par l’équipe de T. Dickmeis au KIT n’ont pas induit d’activité luciférase et certains progestatifs comme la NET ont antagonisé l’effet de la pregnénolone de façon significative (communication personnelle).

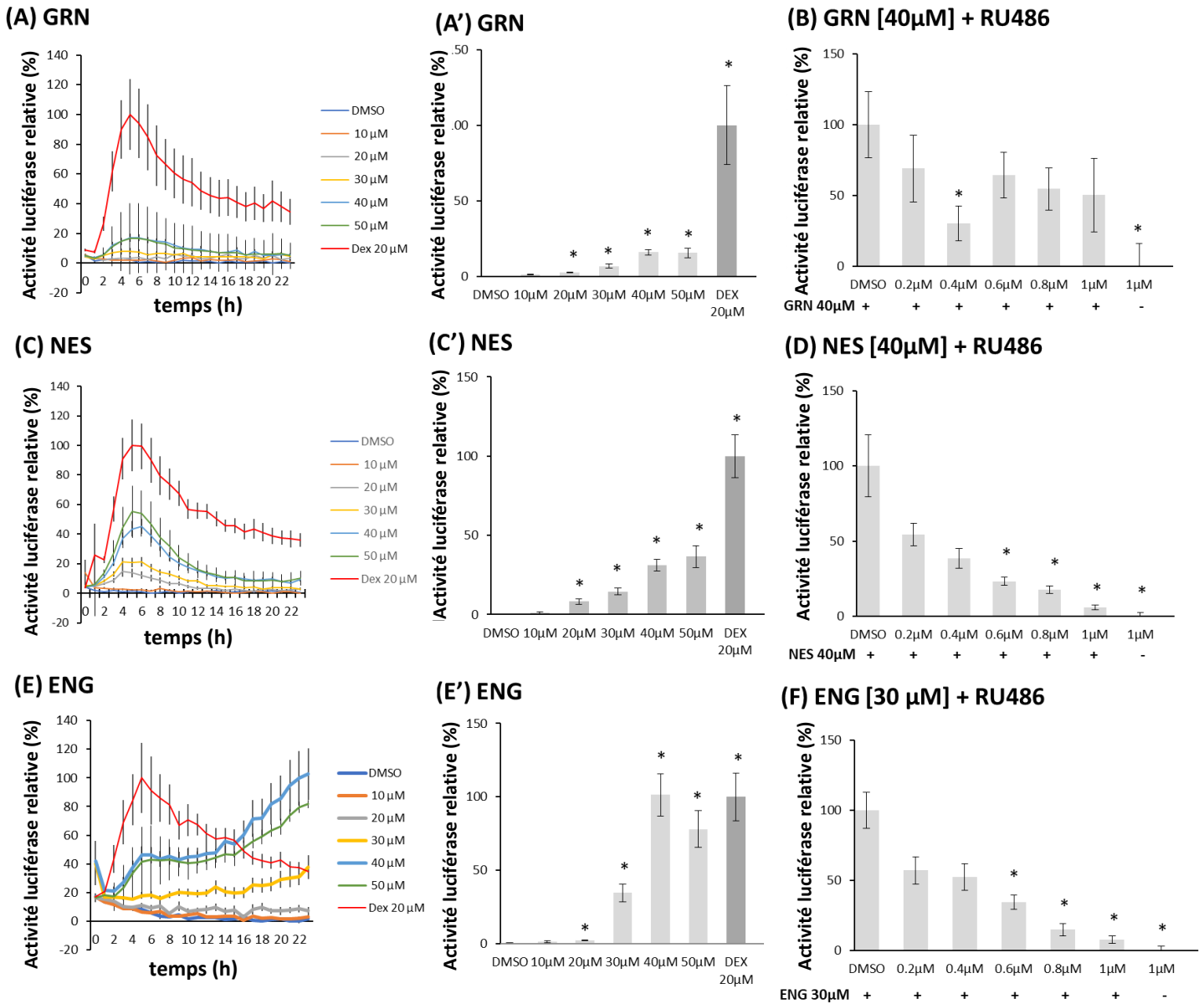


Figure 18 : Activité luciférase relative (en % de DEX 20μM à 6 heures) dans des larves GRE:Luc exposées de 4 à 5 jpf au contrôle DMSO (0,1% v/v) ou des concentrations croissantes de gestonone (GRN), nestorone (NES) ou etonogestrel (ENG). (A,C,E) Activité luciférase relative en fonction du temps (h) ; (A',B',C') Activité luciférase relative cumulée après 24h d'exposition ; (B,D,F) Activité luciférase relative cumulée après 24h d'exposition aux progestatifs et à une concentration croissante de mifepristone (RU486). Statistiques : t-test multiple et correction Holm-Šidák ; * : résultat significatif avec $p < 0,001$.

Ce criblage montre la capacité des ligands du nPR à interagir directement ou indirectement avec les GREs, la plupart ayant un effet antagoniste. Cependant, les résultats obtenus sur ce bioessai pour ENG, GRN et NES diffèrent de ceux obtenus sur la lignée cellulaire HG5LN-zfGR.

Synthèse des résultats

Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier les mécanismes d'action et les effets biologiques de ligands environnementaux du nPR sur le poisson zèbre. Pour cela, la stratégie a été de combiner des outils *in vitro* et *in vivo* poissons zèbres basés sur les mécanismes d'action des PEs.

Nous avons montré que hPR et zfPR sont activés différemment *in vitro* par les progestatifs naturels et de synthèse (article 1) et que les profils toxicologiques de ces molécules sont très variés. En effet, nous avons montré leurs capacités à interagir avec les récepteurs ER *in vitro* et la signalisation œstrogénique *in vivo* (articles 2 et 3), mais aussi sur la voie GR et la corticostéroïdogénèse (article 5). Ces dernières données ont pu être générées à l'aide d'un nouveau modèle *cyp11c1*-GFP caractérisé dans le cadre de cette thèse (article 4).

Les composés dérivés de la 19-nortestostérone ont tous induit une réponse œstrogénomimétique au niveau du système nerveux central des poissons zèbres en développement, et cet effet est probablement dû à une métabolisation des progestatifs. Pour certains progestatifs, les effets observés *in vivo* sont différents de ceux observés sur différentes lignées cellulaires exprimant les sous-types du récepteur zfER. Nous avons montré que le mélange de l'un de ces progestatifs actifs, le levonorgestrel (LNG), avec l'œstrogène ethinylestradiol (EE2) induit un effet additif *in vitro* et *in vivo*. L'estradiol (E2), la progestérone (P4) et la norethistérone (NET) ont induit des changements dans le comportement de réponse au stress des larves exposées.

Les progestatifs ont également eu des effets au niveau de la voie de signalisation des glucocorticoïdes et de la corticostéroïdogénèse. Ils se sont tous révélés être des antagonistes du zfGR *in vitro*. La NET a inhibé l'expression de la GFP dans le modèle embryo-larvaire *cyp11c1*-GFP. La caractérisation de ce modèle a permis de montrer que l'expression de la GFP est potentiellement régulée par le GR. L'effet de la NET sur le modèle *cyp11c1*-GFP s'est accompagné d'une baisse des niveaux de cortisol ainsi que d'une perturbation des comportements de réponse au stress. La NET a également eu un effet antagoniste direct ou indirect au niveau des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs) dans les larves GRE:Luc.

Dans l'ensemble, les travaux de cette thèse mettent en évidence la multiplicité d'action de nombreux progestatifs vis-à-vis de différents récepteurs nucléaires stéroïdiens et leurs effets variés sur l'expression de gènes de la stéroïdogénèse NR-régulés. Les effets des progestatifs dans les différents bioessais sont résumés dans les tableaux 13 et figure 19 pages suivantes.

Tableau 13 : Résumé des effets des progestatifs sur les différents bioessais. Ago. : agonisme ; antag. : antagonisme. Vert : effet agoniste ; rouge : effet antagoniste ; gris : pas d'effet ; blanc : non testé.

Composé	PR				ER							GR				
	HELN-PRB ago.	HELN-PRB antag.	U2OS-zfPR ago.	U2OS-zfPR antag.	EASZY ago.	U251-MG ago.	HG5LN-zfERa ago.	HG5LN-zfERb1 ago.	HG5LN-zfERb2 ago.	HG5LN-hERa ago.	HG5LN-hERb ago.	HG5LN-zfGR ago.	HG5LN-zfGR antag.	<i>cyp11c1</i> -GFP antag.	Larves GRE:Luc ag.	Larves GRE:Luc antag.
P4	Vert	Rouge	Vert	Rouge	Gris								Rouge			
DYD	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Gris								Rouge			
DHP	Gris	Rouge	Vert	Gris	Gris		Vert	Vert		Vert			Rouge			
MEP	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Gris		Vert	Vert					Rouge			
MPA	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Gris								Rouge			
MGA	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Gris			Vert					Rouge			
CMA	Vert	Gris	Gris	Rouge	Gris			Vert					Rouge			
CPA	Vert	Gris	Gris	Rouge	Gris								Rouge			
R5020	Vert	Gris	Vert	Gris	Gris								Gris			
NES	Vert	Gris	Vert	Rouge	Gris										Vert	
NGA	Vert	Gris	Gris	Rouge	Gris		Vert		Vert				Rouge			
GRN	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Gris				Vert				Rouge		Vert	
ETH	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge			
EDA	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge			
LYN	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge			
NEA	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge			
NET	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge	Rouge		Rouge
TIB	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert	Vert			Rouge			
DSG	Vert	Rouge	Gris	Rouge	Rouge			Vert	Vert				Rouge			
ENG	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert								Rouge		Vert	
GES	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert		Vert	Vert	Vert				Rouge			
LNG	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert				Rouge			
NTE	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert			Vert					Rouge			
NGL	Vert	Gris	Gris	Rouge	Vert								Rouge			
DRO	Vert	Rouge	Vert	Rouge	Gris				Vert				Rouge			
RU486	Gris	Rouge	Gris	Rouge	Vert								Rouge			

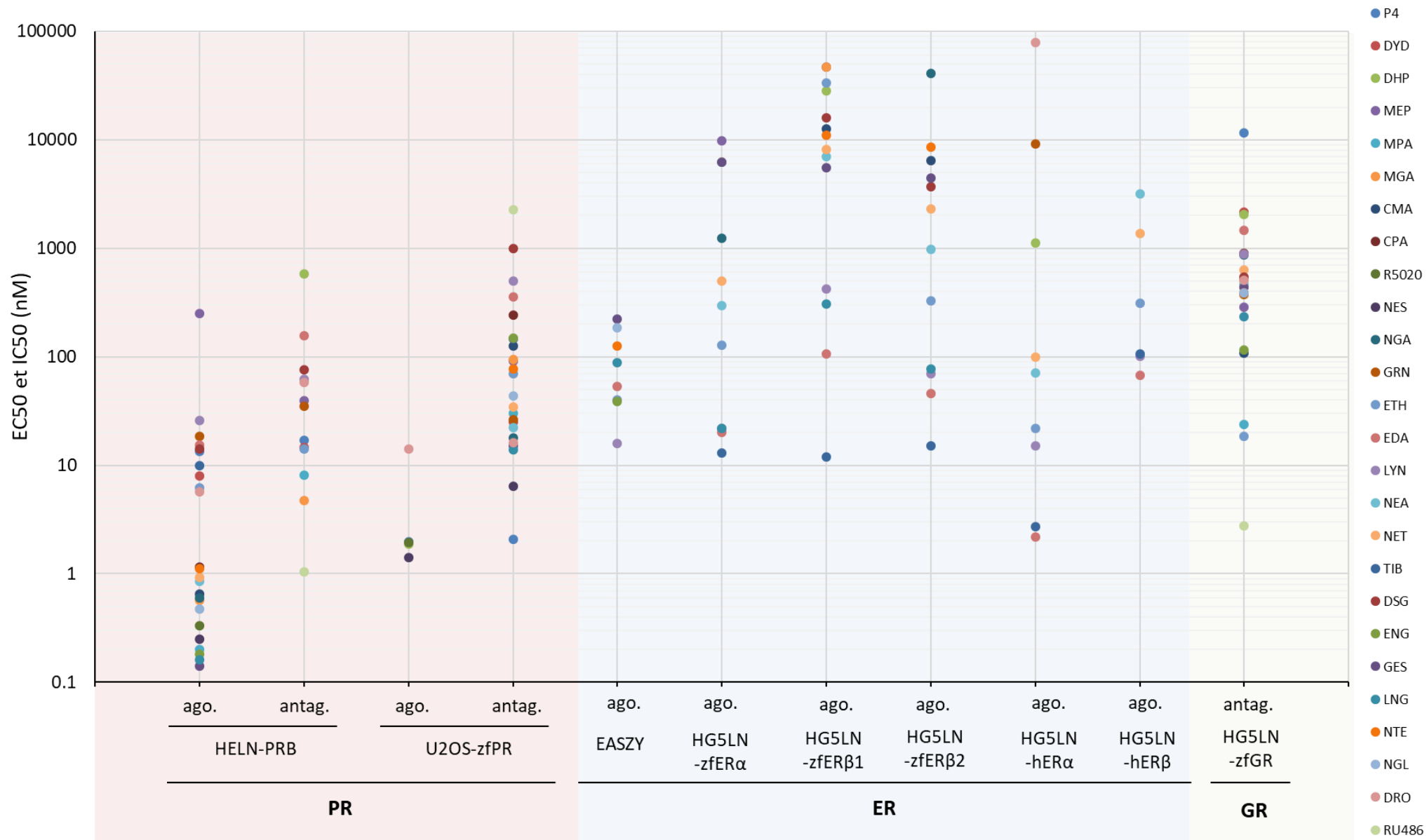


Figure 19 : EC₅₀ et IC₅₀ calculées sur les différents bioessais (nM).

V. Discussion générale

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la problématique globale des perturbateurs endocriniens et de leurs effets sur les organismes aquatiques. Depuis une vingtaine d'années, la question des effets de substances capables de déréguler le système endocrinien et d'altérer des fonctions physiologiques clés telles que la reproduction a fait l'objet de très nombreux travaux en raison des risques associés à la présence de ces molécules dans l'environnement pour les organismes et les milieux aquatiques. Les préoccupations et les questionnements liés aux perturbateurs endocriniens restent cependant d'actualité malgré les avancées majeures réalisées, que ce soit sur la meilleure compréhension des mécanismes d'action ou sur leurs effets biologiques avérés sur les individus et dans certains cas, sur les populations.

Cependant, il convient de souligner que les efforts de recherche ont majoritairement porté sur les composés œstrogéno-mimétiques et en particulier sur les œstrogènes naturels et de synthèse. Pourtant, la présence d'autres composés stéroïdiens d'origine naturelle ou de synthèse est aujourd'hui avérée dans les effluents de stations d'épuration urbains, hospitaliers ou industriels ainsi que dans les eaux de surface (Chang et al., 2009; Creusot et al., 2014; Labadie & Budzinski, 2005; Van der Linden et al., 2008; K. Zhang et al., 2017) sans pour autant que l'on puisse en appréhender pleinement les conséquences et prendre les mesures de gestion adéquates. Au demeurant, des normes de qualité environnementales (NQE) ont été dérivées pour les composés stéroïdiens œstrogéniques E1, E2 et EE2 qui font l'objet de programmes de mesures au niveau européen en raison de leurs inscriptions sur la Watch List de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE).

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est spécifiquement focalisé sur un ensemble de progestatifs, des composés stéroïdiens qui sont largement utilisés en tant que substances pharmaceutiques souvent en association avec des œstrogènes comme l'EE2. Des études récentes rapportent que certains de ces progestatifs sont détectés et quantifiés dans l'environnement aquatique notamment dans les eaux de surface et les effluents de STEPs à des concentrations de l'ordre du ng/L (Besse & Garric, 2008, 2009; Chang et al., 2011; Creusot et al., 2014; Runnalls et al., 2010; Vulliet et al., 2007). De plus, des études récentes menées en laboratoire sur des espèces modèles de vertébrés aquatiques (poissons et amphibiens) ont permis de démontrer les activités biologiques de certaines de ces molécules sur des cibles endocriniennes et des fonctions physiologiques, notamment la reproduction (Bluthgen, Castiglioni, et al., 2013; Brion et al., 2012; Matthew D. Overturf et al., 2014; Paulos et al., 2010; Runnalls et al., 2013; Svensson et al., 2013; Tokumoto et al., 2011; Zeilinger et al., 2009; Zucchi et al., 2012). Si ces études mettent clairement en avant des effets

biologiques à des concentrations représentatives de la contamination environnementale, il n'en reste pas moins que les mécanismes sous-jacents ne sont pas totalement élucidés. En outre, ces informations sont restreintes à un nombre limité de composés et de cibles endocriniennes. Il en résulte un manque d'informations qu'il est nécessaire de combler dans l'optique d'évaluer les dangers et les risques que les progestatifs posent pour les espèces aquatiques et l'environnement.

Ainsi, ce travail de thèse visait essentiellement à acquérir des informations nouvelles sur les interactions potentielles d'un ensemble de substances, choisies *a priori*, avec différentes cibles endocriniennes choisies en fonction de leur pertinence dans le fonctionnement du système endocrinien et de leurs rôles dans les fonctions physiologiques. Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'un projet de recherche plus général impliquant différents instituts et équipes nationales (projet ANR PROOFs - Occurrence and Effect of environmental progesterone receptor ligands on fish reproduction and neurodevelopment). Le projet PROOFs vise d'une part à 1) investiguer les mécanismes d'action et les effets biologiques de ligands environnementaux du récepteur de la progestérone et d'autre part à 2) évaluer l'occurrence des activités (anti-)progestatives de matrices environnementales et 3) identifier les ligands environnementaux du nPR responsables de ces activités à travers une démarche bioanalytique combinant outils cellulaires et analyse chimique (démarche dite EDA pour *Effect-directed analysis*).

Dans ce travail, la stratégie expérimentale retenue pour acquérir des informations toxicologiques nouvelles sur un ensemble de 26 progestatifs de synthèse repose sur une combinaison de modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* de type gène-rapporteur. Il s'agit d'outils de criblage basés sur le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens chez une espèce cible, le poisson zèbre. Ces modèles étaient pour certains déjà en place au sein du laboratoire et du consortium ou bien ont été développés dans le cadre de cette thèse pour explorer des mécanismes peu étudiés jusqu'à présent (*i.e.* modèle poisson zèbre transgénique *cyp11c1*-GFP présenté dans l'article 4 et impacts sur la voie de signalisation GR-dépendante et la corticostéroïdogénèse présentés dans l'article 5). Cette stratégie – dont nous discuterons ci-après les avantages et les limites – nous a permis de démontrer qu'*in vitro* les récepteurs nucléaires de la progestérone (PR) humain (hPR) et poisson zèbre (zfPR) sont activés différemment par les progestatifs naturels et de synthèse en rapportant des activités antagonistes chez le poisson zèbre alors que ces mêmes substances se comportent comme des agonistes du hPR (article 1). Outre leurs capacités à interagir avec le récepteur PR, ce travail

a permis de démontrer que ces molécules peuvent interférer avec d'autres voies de signalisation récepteur nucléaire-médiées. Ainsi, nous avons mis en évidence leurs capacités à interagir avec les récepteurs ERs *in vitro* et *in vivo* avec la signalisation œstrogénique dans le cerveau chez le poisson zèbre (article 2) à des concentrations proches ou inférieures à celles de l'estradiol, le ligand endogène des récepteurs ERs. De manière intéressante, l'additivité des effets d'un progestatif dit « œstrogénique » avec l'éthinylestradiol a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* (article 3). Enfin, les interactions de ces substances avec la voie de signalisation des glucocorticoïdes et la corticostéroïdogénèse ont pu être étudiées en particulier pour la norethistérone (article 5) grâce à un modèle cellulaire zfGR-luciférase et une lignée transgénique poisson zèbre *cyp11c1*-GFP (modèle présenté dans l'article 4).

L'ensemble de ces données met clairement en évidence des mécanismes d'action multiples vis-à-vis de cibles endocriniennes, que ce soit *in vitro* de par leurs capacités à interférer avec différents récepteurs nucléaires, ou *in vivo* de par leurs capacités à perturber très tôt au cours du développement l'expression tissu-spécifique de gènes cibles de la stéroïdogénèse impliqués dans la biosynthèse des neuro-œstrogènes (*e.g.* induction de l'aromatase B dans le cerveau) ou des glucocorticoïdes (inhibition de l'expression du gène codant pour la 11 β -hydroxylase dans les cellules interrénales et baisse du niveau de cortisol circulant).

Dans la suite du chapitre, les avantages et les limites de l'approche utilisée seront discutés tout en soulignant en quoi les travaux réalisés peuvent être utiles à la fois pour la problématique des progestatifs en tant que telle et de façon plus générale dans l'étude des polluants environnementaux. De même, la question des impacts biologiques sur des fonctions physiologiques est discutée en proposant des stratégies qui pourraient être mise en œuvre pour combler les manques de cette thèse. Enfin, sur la base de nos travaux, nous replacerons ces données à la lumière des données acquises dans le cadre de PROOFs sur les activités biologiques mesurées dans les échantillons environnementaux et les substances identifiées.

1. Intérêts et limites de la démarche expérimentale

1.1. Modèles cellulaires gène-rapporteur basés sur les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

En raison du peu d'informations disponibles concernant les progestatifs, il s'agissait d'acquérir des données toxicologiques nouvelles sur un nombre de composés relativement important sur différentes cibles endocriniennes.

L'intérêt des modèles gène-rapporteur réside dans le fait qu'ils représentent des outils particulièrement bien adaptés au criblage haut-débit permettant ainsi de générer des données fiables et spécifiques pour un mode d'action donné sur un nombre important de molécules. À ce titre, ils constituent des outils de choix dans les stratégies d'évaluation des dangers PE des substances avec l'existence de lignes directrices de l'OCDE pour certaines activités endocrines (*e.g.*, ligne directrice TG455 pour la mesure de l'activité œstrogénique dans la lignée HeLa-9903). Ainsi, l'utilisation de lignées cellulaires exprimant différents récepteurs nucléaires stéroïdiens a permis de mettre en évidence des profils toxicologiques complexes de ces molécules chez le poisson zèbre en raison de leurs capacités à interagir avec les récepteurs PR (article 1), ER (article 2) et GR (article 5).

Néanmoins, il convient de considérer que les réponses obtenues s'opèrent dans des contextes cellulaires et des conditions de cultures bien spécifiques dont on sait qu'elles peuvent influencer les réponses biologiques. Dans le cas des PEs, de nombreux travaux relatent des différences de réponses s'agissant de l'interaction de substances œstrogéniques vis-à-vis d'un même récepteur s'exprimant dans différentes lignées cellulaires. Elles peuvent être dues à des différences d'expressions de cofacteurs transcriptionnels et/ou à l'existence d'interactions entre des voies de signalisation dont la nature même peut varier d'un modèle à un autre (*e.g.*, interactions ER/AhR positives ou négatives en fonction du contexte cellulaire considéré). De même, il convient de prendre en compte que la température influence la transactivation des récepteurs comme démontré pour les récepteurs ERs de truite ou de poisson zèbre (A. Cosnefroy et al., 2009; Matthews et al., 2002; Pinto et al., 2014). Dans le contexte de notre étude, l'influence de la température de culture sur la transactivation du récepteur zfPR n'a pas été étudiée mais il s'agirait de pouvoir l'appréhender. Il est certain que l'expression d'un récepteur zfPR dans une lignée cellulaire de poisson zèbre (*e.g.*, lignée ZFL cultivée à 28°C) constituerait un modèle intéressant.

Enfin, il est important de considérer que l'une des limites de ces modèles repose aussi sur leurs capacités métaboliques. Malgré de récents progrès réalisés dans la caractérisation du métabolisme de xénobiotiques dans différents systèmes cellulaires gène-rapporteur couramment utilisés pour le criblage des activités *in vitro* (e.g. Le Fol et al. 2015), le métabolisme des xénobiotiques dans les lignées cellulaires ne reflète pas nécessairement celui de l'organisme ou de l'organe cible. Dans le cas des progestatifs de synthèse, cela apparaît particulièrement important au regard de l'activation de la signalisation œstrogénique. En effet, l'activation de cette voie de signalisation n'est probablement pas le fait des molécules mères mais de leurs métabolites hydroxylés (article 2). À notre connaissance, les informations relatives au métabolisme des progestatifs dans les modèles ichthyens sont manquantes mais il semble important d'identifier les métabolites produits dans les systèmes biologiques (*in vitro* et *in vivo*) et d'en connaître les propriétés toxicologiques. Ce point sera abordé de nouveau dans le dernier chapitre de discussion qui replace nos données dans le contexte de l'occurrence environnementale des activités PR (voir paragraphe 3 page 262).

Malgré ces limites, les modèles cellulaires se sont avérés très utiles pour acquérir des données originales sur les interactions des progestatifs de synthèse avec certains récepteurs nucléaires stéroïdiens. L'analyse comparative des données obtenues pour les récepteurs hPR et zfPR ont révélé en particulier des différences inter-espèces majeures dans l'activation de ces récepteurs par les progestatifs de synthèse (article 1). Comme évoqué ci-dessus, différents paramètres inhérents aux modèles peuvent potentiellement expliquer ces différences. Cependant, des expériences de transfection transitoires des récepteurs hPR et zfPR dans les deux modèles cellulaires utilisées (*i.e.* HeLa et U2OS) conduisent à des résultats identiques, à savoir 1) une action de type agoniste pour les progestatifs de synthèse vis-à-vis du hPR, 2) une absence d'effet agoniste de ces mêmes ligands vis-à-vis du zfPR et 3) un antagonisme du zfPR dans le cas d'une co-exposition avec la DHP (le ligand endogène le plus affiné pour le zfPR). Les différences observées dans la transactivation des récepteurs hPR et zfPR ne sont pas connues à ce jour, et il s'agirait de pouvoir réaliser des analyses structurales des récepteurs et de leur sélectivité par des tests de liaison au récepteur et une analyse des interactions moléculaires des ligands avec des récepteurs cristallisés. De telles approches ont été entreprises avec succès pour élucider des différences de sélectivité de ligands pour les sous-types des récepteurs zfER (Pinto et al., 2014).

Quoiqu'il en soit, ces données illustrent bien l'importance d'utiliser des bioessais spécifiques de l'espèce cible considérée dès les phases de criblage des substances chimiques.

Ce constat, fait à la lumière des données obtenues sur le hPR et zfPR pour les 26 progestatifs testés, doit être étendu à d'autres récepteurs nucléaires. Dans le cas des récepteurs ERs, des différences d'affinité et de sélectivité de substances vis-à-vis des différents sous-types des récepteurs ERs humains et poissons ont été rapportés récemment pour des substances seules mettant en avant une sélectivité plus importante de certaines molécules comme les stéroïdes naturels et de synthèse ou bien encore certains substituts du BPA vis-à-vis du récepteur zfER β 2 (Anne Cosnefroy et al., 2012; Le Fol et al., 2017; Pinto et al., 2014). Plus récemment, le criblage de contaminants aquatiques sur des lignées MELN et ZELH-zfERs a permis de révéler des différences parfois marquées notamment pour le triphenylphosphate (TPP) qui présente une activité œstrogénique dans la lignée humaine mais aucune activité dans les cellules ZELH-zfERs (Neale et al., 2017). Des différences dans les réponses des lignées cellulaires humaines (MELN) et de poissons zèbre (ZELH-zfERs) ont aussi été rapportées pour des mélanges environnementaux soulevant la question de ligands œstrogéniques spécifiques chez les poissons (Sonavane et al., 2016). Dans le cas des progestatifs de synthèse, de telles différences ne sont cependant pas rapportées. En effet, les profils de réponse obtenues pour les différents sous-types des récepteurs ERs humains et de poissons zèbres sont similaires (voir partie Résultats, Chapitre 2). L'ensemble des estranes dérivés de la 19-nortestostérone présente une activité œstrogéniques marquée pour les sous-types de récepteurs hER α et zfER α comparativement aux sous-types hER β et zfER β . La sélectivité préférentielle de ces composés pour un sous-type de récepteur donné peut apparenter ces substances à des SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) pouvant conduire à des réponses œstrogéniques *in vivo* tissu-spécifiques (voir paragraphe 2 page 253).

La stratégie basée sur les modèles cellulaires s'est donc avérée utile pour acquérir des données originales sur les interactions des progestatifs de synthèse avec certains récepteurs nucléaires stéroïdiens. Plus encore, l'analyse comparée des réponses obtenues avec les récepteurs humains versus poissons a mis en avant l'importance du choix des modèles dans une perspective d'évaluation des dangers des substances pour les organismes aquatiques. Il apparaît important d'étendre ces approches à d'autres récepteurs nucléaires et de poursuivre les efforts d'analyse comparée humain versus poisson que ce soit pour les progestatifs de synthèse mais plus globalement pour les substances chimiques contaminants les milieux aquatiques. Afin d'aller plus loin, cette stratégie a été complétée par des analyses réalisées à l'échelle de l'organisme via notamment l'utilisation de modèles de poissons zèbres transgéniques afin de renseigner d'impacts potentiels *in vivo*.

1.2. Mesure des effets des progestatifs à l'échelle de l'organisme : avantages et limites des bioessais basés sur les modèles transgéniques

Dans le cadre de ce travail, les effets biologiques des progestatifs ont été investigués à l'échelle cellulaire (voir paragraphe ci-dessus) mais aussi à l'échelle de l'organisme. Cette stratégie intégrant des réponses mesurées *in vivo* est importante afin de replacer les mécanismes observés *in vitro* à l'échelle de l'organisme. Durant ces dernières années, le développement de modèles *in vivo* de criblage aptes à apporter des informations sur les mécanismes d'action des substances a fait l'objet d'importants travaux de recherche au niveau international et notamment à l'OCDE. Ils ont abouti au développement de lignes directrices (ou *test guidelines*) telles que les TG 229/230 capables de révéler les propriétés (anti-)œstrogéniques des substances chez les poissons. Cependant, ces essais ne peuvent répondre aux besoins de criblage à moyen débit. Aussi, des stratégies nouvelles ont été développées basées en particulier sur l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM). L'utilisation d'OGM a connu un développement récent et grandissant dans de nombreuses disciplines de la biologie telles que la génétique et la biologie du développement. L'intérêt de la transgénèse, c'est-à-dire l'introduction d'un gène étranger dans le génome d'un organisme, s'est vu renforcé par des évolutions techniques récentes qui ont été appliquées à différents organismes modèles, dont les poissons. Le poisson zèbre et le medaka sont devenus les espèces de poissons modèles les plus couramment utilisées pour l'établissement de lignées transgéniques du fait de leur facilité d'élevage en laboratoire, de coûts de maintenance associés relativement faibles, d'une fécondité élevée, de la transparence des embryons, d'une organogenèse rapide et de la disponibilité du génome séquencé. De plus, pour le poisson zèbre, le chorion de l'œuf facilite la micro-injection d'ADN. Avec l'émergence de la problématique des perturbateurs endocriniens et des enjeux relatifs à cette famille de polluants, le développement de lignées de poissons zèbres transgéniques a connu des développements significatifs ces dernières années (Lee, Green, & Tyler, 2014). Ces modèles permettent de renseigner des mécanismes d'action des substances chimiques sur l'activation de voies de signalisations transcriptionnelles et de gènes hormono-régulés. Généralement, les lignées de poissons zèbres transgéniques expriment des rapporteurs luminescents (luciférase) ou fluorescents (*e.g.*, protéine fluorescente verte ou GFP) sous le contrôle de promoteurs ou d'éléments de réponses inductibles par des substances hormono-mimétiques.

Dans cette thèse, deux lignées exprimant la GFP sous le contrôle de promoteurs de gènes de la stéroïdogénèse de poisson zèbre ont été utilisées : la lignée *cyp19a1b*-GFP (Brion

et al., 2012; Tong et al., 2009) et la lignée *cyp11c1*-GFP qui a fait l'objet d'un développement spécifique (article 4). Ces deux lignées ont permis de révéler des effets qui n'avaient pas été renseignés jusqu'à présent en démontrant les propriétés œstrogéno-mimétiques *in vivo* des estranes et des gonanes (article 2 et 3) et l'inhibition de l'expression du gène de la 11 β -hydroxylase par la norethistérone (article 5). Outre le fait que ces modèles permettent une quantification *in vivo* de la réponse biologique de manière non invasive à des stades précoces du développement (non soumis à l'expérimentation animale), ils permettent de révéler des propriétés toxicologiques des molécules qui sont en cohérence avec celles mesurées dans les modèles cellulaires (*cyp11c1* et GR ; *cyp19alb* et ER). Les perturbations de l'expression de gènes de la stéroïdogénèse par des progestatifs chez les embryons sont en accord avec des données obtenues chez le poisson zèbre par RT-PCR (Zhao & Fent, 2016; Zucchi et al., 2012, 2013). Bien que très performantes, ces approches de PCR ne permettent pas d'avoir des informations sur les cellules ou les tissus impactés. Au contraire, l'imagerie en fluorescence *in vivo* permet une spatialisation fine des réponses biologiques. Ainsi, nous démontrons des altérations tissu/cellules spécifiques de l'expression de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires (articles 2 et 3) et de la 11 β -hydroxylase dans les cellules interrénales (article 5) par certains progestatifs de synthèse. La combinaison des données obtenues *in vitro* et *in vivo* permet de replacer ces réponses biologiques dans des schémas conceptuels permettant de faire le lien entre un événement moléculaire initiateur (*e.g.* liaison d'un ligand à un récepteur) et un effet néfaste à un niveau pertinent pour l'évaluation des risques, par exemple à l'échelle d'un individu ou d'une population) (Ankley et al., 2010) (figure 20) (voir paragraphe 2 page suivante).

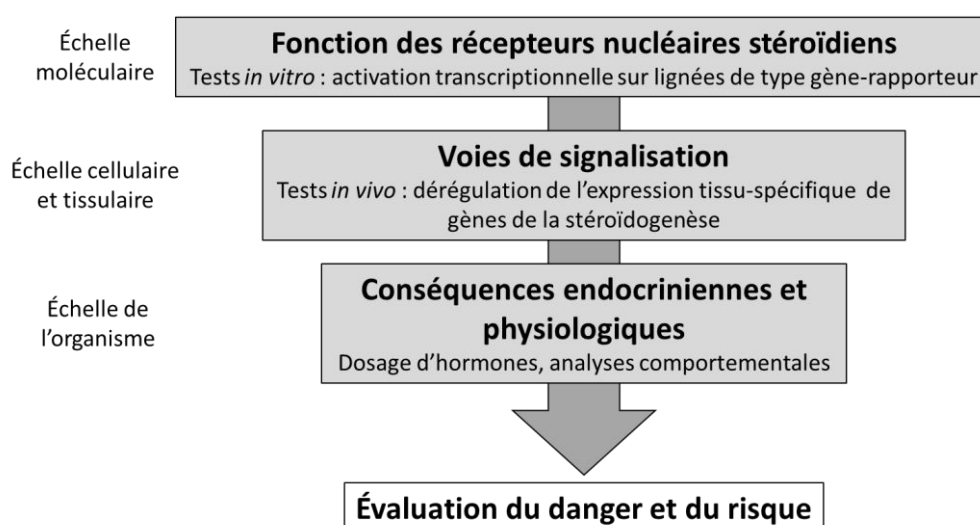


Figure 20 : Organisation du cadre de travail pour évaluer les récepteurs nucléaires stéroïdiens en tant qu'initiateurs moléculaires de la perturbation des voies de signalisation. D'après (Ankley, LaLone, Gray, Villeneuve, & Hornung, 2016).

L'une des limites de cette approche réside dans les lignées transgéniques disponibles qui doivent être suffisamment sensibles pour être utilisées dans un contexte de toxicologie environnementale. Dans le cadre de cette thèse, les effets antagonistes des progestatifs de synthèse sur la signalisation de la voie du récepteur nPR n'ont pu être investigués *in vivo* faute de modèle transgénique disponible. Il est certain que le développement de nouvelles lignées constitue un axe de développement important à poursuivre à l'avenir pour répondre aux enjeux liés aux perturbateurs endocriniens.

2. Mise en perspective des données obtenues *in vitro* et *in vivo* : Conséquences fonctionnelles pour les organismes

Dans une démarche d'évaluation des dangers et des risques des substances, il est nécessaire de se poser la question des impacts fonctionnels des substances sur les individus ou les populations. Dans cette optique, le concept d'« AOP » ou *Adverse Outcome Pathway* (chemin de l'effet néfaste en français) apparaît pertinent puisqu'il s'agit d'une construction conceptuelle permettant de faire le lien entre un événement moléculaire initiateur (*e.g.* liaison d'un ligand à un récepteur) et un effet néfaste à un niveau pertinent pour l'évaluation des risques, par exemple à l'échelle d'un individu ou d'une population (Ankley et al., 2010). Le concept d'AOP permet donc une caractérisation du danger à partir de données mécanistiques obtenues *in silico* et/ou *in vitro* et *in vivo*. Dans ce chapitre, l'objectif est donc de mettre en perspective les données obtenues sur les mécanismes d'action des progestatifs avec les fonctions endocriniennes et physiologiques des organismes.

1.1. Dérégulation de la voie de signalisation du récepteur nPR : effets neuro-endocriniens et reproductifs ?

Nos travaux ont mis en évidence l'absence d'activité agoniste de la majorité des progestatifs sur le zfPR (article 1) renforçant les données acquises précédemment sur quelques progestatifs chez différentes espèces de poissons (P. A. Bain et al., 2014; Ellestad et al., 2014). Nos résultats démontrent au contraire une capacité des composés à inhiber l'activation de ce récepteur par la DHP, un progestatif endogène chez les poissons. Ces effets anti-zfPR posent la question de l'impact de ces molécules sur les processus physiologiques régulés par ce récepteur.

Dans ce contexte, les informations obtenues dans des modèles dépourvus de récepteur nPR (Knock-Out nPR -/-) s'avèrent particulièrement pertinentes. Chez le poisson zèbre, un

modèle Knock-Out nPR $-/-$ a été récemment développé par Zhu et al. (2015). Une série d'expérimentations a permis de mettre en évidence le rôle de ce récepteur dans la régulation directe de l'expression du gène codant pour la sous unité β de la FSH (*fshb*) dans les cellules hypophysaires (C. Wang et al., 2016). Chez le poisson zèbre mâle, les auteurs ont montré que la DHP est capable de stimuler l'expression de la *fshb* mais cet effet est partiellement bloqué par la RU486 (un antagoniste du nPR) et absent chez les animaux nPR $-/-$ (C. Wang et al., 2016). Chez les poissons, les gonadotropines (FSH et LH) sont les principaux acteurs régulant la physiologie testiculaire, à savoir la stéroïdogénèse et la gamétogénèse (Schulz et al., 2010). Cependant les poissons zèbres nPR $-/-$ sont toujours fertiles, ce qui rejoint des observations faites chez des souris KO nPR $-/-$ (Schneider et al., 2005). Sur la base des informations obtenues par Wang et al., 2016 et nos données qui démontrent une action antagoniste des progestatifs sur le nPR (article 1), l'hypothèse d'une diminution de l'expression de *fshb* peut être formulée. Cependant, il convient de noter que chez l'épinoche, le levonorgestrel induit une expression de la sous unité β de LH (Svensson et al., 2014). Plus récemment, ces mêmes auteurs rapportent des augmentations et des inhibitions de l'expression de *fshb* hypophysaire chez l'épinoche exposée au levonorgestrel selon le temps d'exposition (Svensson et al. 2016). Sur la base de ces données, il est clair qu'une exploration plus poussée des effets des progestatifs de synthèse sur des circuits neuro-endocriniens contrôlant la reproduction est pertinente.

Chez les femelles, l'impact fonctionnel d'une délétion de l'expression du nPR est plus évident. Ainsi, Zhu et al., 2015 rapportent que l'ovogénèse se déroule normalement chez les femelles nPR $-/-$ mais elles se caractérisent par une anovulation démontrant ainsi le rôle du récepteur nPR dans la ponte. Si l'on rapproche ces informations avec nos données, l'hypothèse d'une inhibition de ponte liée à une action antagoniste des progestatifs sur le nPR au niveau gonadique peut être formulée. Cette hypothèse est renforcée par des données collectées dans une population sauvage de goujons exposée à des eaux usées d'une industrie pharmaceutique chez laquelle les femelles se caractérisaient par une hypertrophie gonadique (Sanchez et al., 2011). De façon remarquable, il a été démontré que les poissons étaient soumis à une contamination par de multiples stéroïdes pharmaceutiques dont des progestatifs de synthèse comme le levonorgestrel (Creusot et al., 2014). L'hypothèse selon laquelle l'action antagoniste des progestatifs de synthèse sur le nPR constituerait un mécanisme primaire à l'origine d'une inhibition de la ponte apparaît donc très cohérente mais doit être vérifiée expérimentalement. Dans le cas particulier de cette population de goujons, un effet

mélange des composés pharmaceutiques à activités stéroïdiennes multiples est aussi probable (Creusot et al., 2014). Quoi qu'il en soit, le modèle poisson zèbre n'est peut-être pas des plus pertinents pour étudier cette hypothèse en raison du cycle asynchrone des femelles. Des modèles biologiques avec un cycle reproducteur parfaitement synchronisé (*e.g.*, truite) semble plus approprié mais ces modèles présentent d'autres inconvénients au niveau expérimental.

La figure 21 propose, sur la base des informations ci-dessus, un schéma reliant les impacts des progestatifs depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau physiologique. Il est certain que d'autres études sont nécessaires pour une meilleure connaissance des rôles physiologiques supportés par le nPR que ce soit au niveau du système nerveux central (cerveau, hypophyse) ou au niveau gonadique pour mieux appréhender (et prédire) les effets des progestatifs.

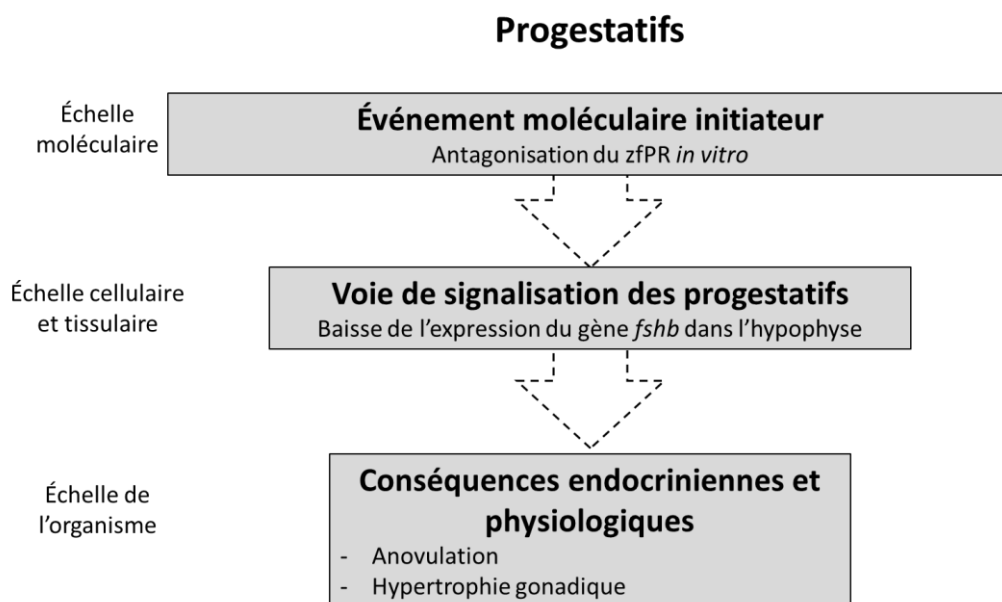


Figure 21 : AOP potentiel des progestatifs antagonistes du zfPR sur la voie de signalisation des progestatifs.

1.2. Induction œstrogéno-dépendante de l'aromatase cérébrale par les progestatifs de synthèse : conséquences sur le développement du SNC ?

Les résultats de la thèse montrent que les progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone présentent tous une activité œstrogénique et induisent de manière concentration-dépendante l'expression de la GFP dans les cellules gliales radiaires (articles 2 et 3). Il est donc possible que les progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone puissent affecter le développement du cerveau de par leur capacité à cibler les cellules gliales et à induire l'aromatase B (figure 22).

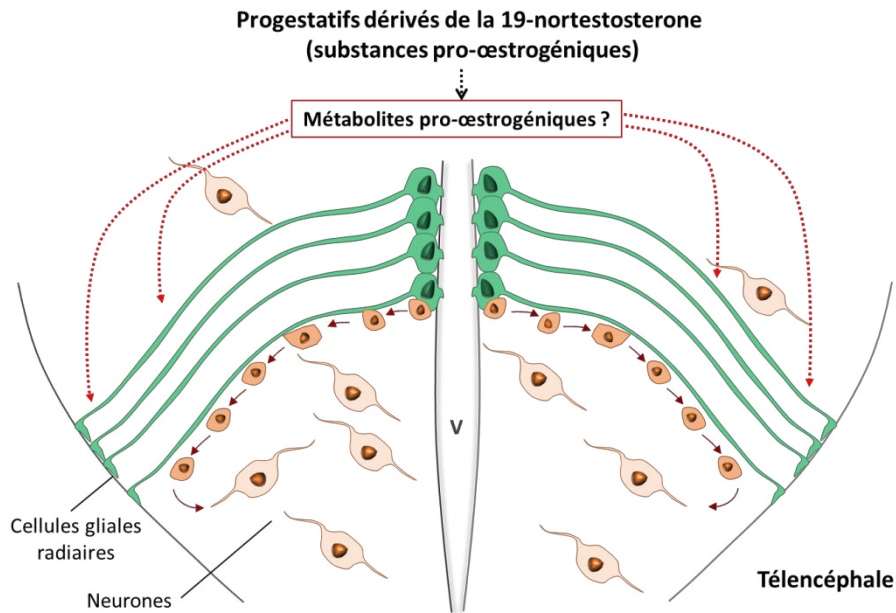


Figure 22 : Hypothèse de l'action des métabolites des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur les cellules gliales radiaires dans le télencéphale. V : ventricule. Les cellules gliales radiaires sont des précurseurs des neurones. D'après Pellegrini et al. 2007 et Kah et al. 2011.

En effet, chez les téléostéens et le poisson zèbre en particulier, de nombreux travaux ont permis de conclure sur le rôle des cellules gliales radiaires en tant que cellules progénitrices donnant naissance à de nouveaux neurones (Pellegrini et al., 2005, 2007) et l'implication de l'aromatase cérébrale et des neuro-œstrogènes dans la neurogenèse chez le poisson zèbre (Diotel, 2013; Pellegrini et al., 2016). Ainsi l'inhibition de la synthèse d'estradiol dans le cerveau par un inhibiteur enzymatique (ATD) ou bien l'inhibition de la voie ER par un antagoniste pur du récepteur ER (ICI 182,780) conduisent à une augmentation de la prolifération cellulaire dans différentes régions du cerveau (Diotel, 2013). Chez le poisson zèbre exposé à de faibles concentrations d'œstrogènes de synthèse, une augmentation du nombre de neurones GnRH a été mise en évidence et implique, directement ou indirectement l'interaction de cette molécule avec les récepteurs ERs (Vosges et al., 2010, 2012). Plus récemment, une étude portant sur les effets du bisphénol A (BPA) et de certains de ses dérivés chez les embryons de poissons zèbres rapporte une neurogenèse précoce dans l'hypothalamus (Kinch et al., 2015).

Chez les mammifères, dans le système nerveux central, la P4 exerce des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques importants (Brinton et al., 2008; Jayaraman & Pike, 2014) mais il existe très peu de données sur les effets des progestatifs sur des processus tels que l'apoptose et la prolifération cellulaire au niveau central. Cependant, des études récentes

réalisées dans le cadre de PROOFs chez des larves traitées à la norethistérone (un progestatif œstrogénique dans le cerveau) montrent que cette molécule induit des effets pro-apoptotiques notamment dans la région de l'hypothalamus (E. Pellegrini, C. Vaillant et O. Kah, communication personnelle). Dans des conditions expérimentales identiques, aucun effet de la P4 n'a pu être observé. L'estradiol quant à lui induit des effets qui ne peuvent se comparer à ceux de la norethistérone puisque qu'il induit un effet anti-prolifératif ce qui rejoint les observations faites dans le cerveau de poissons zèbres adultes exposés à ce stéroïde (Diotel et al. 2013; Pellegrini et al. 2016).

L'ensemble de ces données démontrent que les stéroïdes naturels (P4, E2) et la norethistérone induisent des réponses différentes dans le SNC. Les effets de la norethistérone ne peuvent se calquer sur ceux de l'estradiol bien que les deux molécules soient capables d'induire l'aromatase cérébrale. Comme évoqué précédemment, la norethistérone et les progestatifs en général se caractérisent par des profils toxicologiques complexes de par leurs capacités à interagir avec de nombreux récepteurs nucléaires. Dans le cas de la norethistérone, son activité androgénique a été rapportée *in vitro* sur le récepteur poisson zèbre (N. Creusot, Inserm, communication personnelle), sur des récepteurs ARs de poisson arc-en-ciel Murray–Darling (*Melanotaenia fluviatilis*) (P. a. Bain et al., 2015) et de vairon à tête de boule (*Pimephales promelas*) (Ellestad et al., 2014). Aussi est-il possible que l'effet pro-apoptotique de la norethistérone s'explique par son action sur le récepteur AR. Sur ce point, il convient de souligner que les rôles du récepteur AR et des androgènes dans le neuro-développement des poissons ne sont pas renseignés. Il s'agirait par conséquent d'entreprendre des travaux dans ce sens.

Quoi qu'il en soit ces données montrent des impacts de l'estradiol et de la norethistérone sur le neuro-développement. Il est clair qu'à ce jour il est difficile d'étendre ces observations à d'autres stéroïdes de types œstrogéniques ou à d'autres progestatifs de synthèse mais cela constitue une voie de recherche importante. En effet, il faut souligner que de plus en plus de travaux relatifs aux effets précoces des PE rapportent des effets neuro-endocriniens et comportementaux que ce soit chez les mammifères ou les poissons (Kinch et al., 2015; Le Page, Vosges, Servili, Brion, & Kah, 2011; Rosenfeld, 2017).

Les données nous ont permis d'établir un AOP potentiel des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur la voie de signalisation des œstrogènes dans le système nerveux central (figure 23).

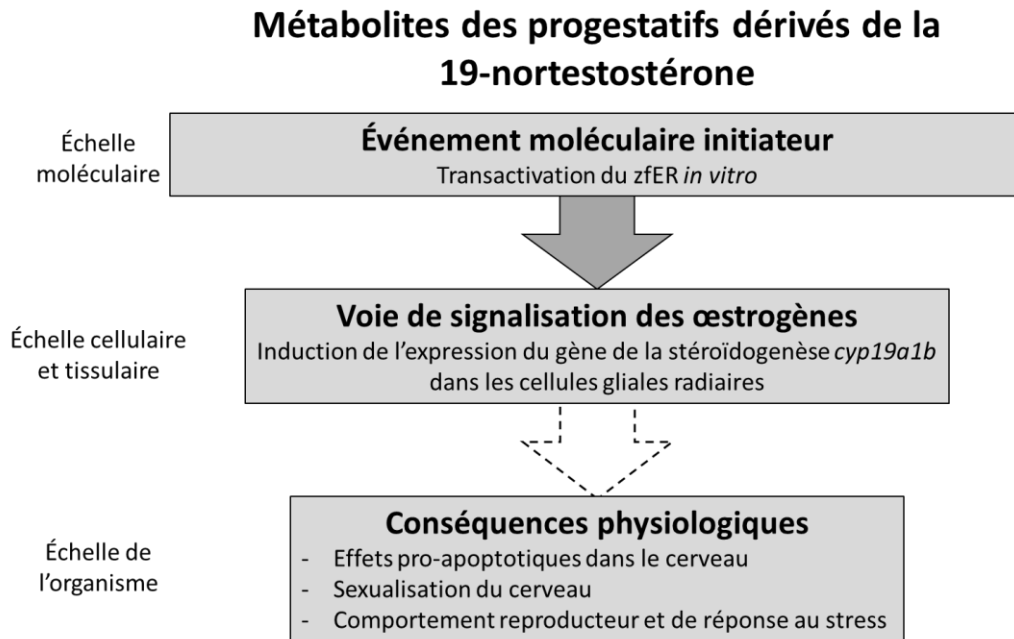


Figure 23 : AOP potentiel des métabolites des progestatifs dérivés de la 19-nortestostérone sur la voie de signalisation des œstrogènes dans le système nerveux central.

1.3. Dérégulation négative du GR et de la voie de signalisation des glucocorticoïdes par la norethistérone (NET) : conséquences fonctionnelles

Lors de cette thèse, nous avons développé un nouveau modèle poisson zèbre transgénique *cyp11c1*-GFP (article 4) et avons montré que certains progestatifs étaient capables d'inhiber la voie de signalisation GR-dépendante *in vitro* et la corticostéroïdogénèse *in vivo* (article 5). À l'échelle moléculaire, nous avons montré le caractère antagoniste du zfGR de la majorité des progestatifs. À l'échelle cellulaire et tissulaire, nous avons mis en évidence une altération de la corticostéroïdogénèse par la norethistérone. Cette altération se manifeste par l'inhibition concentration-dépendante de l'expression du gène *cyp11c1* codant pour l'enzyme 11 β -hydroxylase et par une diminution des concentrations en cortisol dans les larves. Cette diminution du cortisol est très probablement responsable des effets observés sur l'expression de *pomc* dans l'hypophyse antérieure. L'hypothèse de la dérégulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI) par la NET est présentée figure 24 (page suivante).

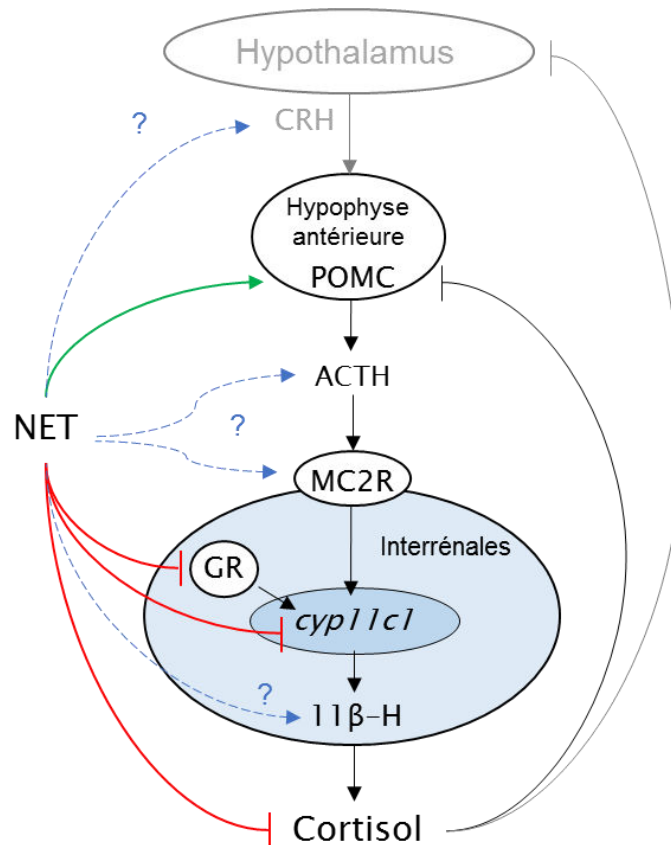


Figure 24 : Perturbation de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI) par la norethistérone (NET). CRH : corticolibérine ; POMC : pro-opiomélanocortine ; ACTH : hormone adrénocorticotrope ; 11β-H : 11β-hydroxylase ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MC2R : récepteur mélanocortine 2. Les flèches noires représentent la régulation normale de l'axe HPI. Les têtes de flèches indiquent une activation et les barres indiquent une inhibition. En rouge et en vert, l'hypothèse des effets de la NET inhibiteurs et activateurs respectivement. En bleu pointillé, des interactions possibles entre la NET et les cibles pointées.

La relation entre l'événement à l'échelle moléculaire (antagonisation du zfGR) et la résultante au niveau tissulaire (inhibition de l'expression de *cyp11*) est suggérée par nos résultats, mais il est difficile d'émettre une hypothèse sur la façon dont le gène *cyp11c1* est régulé. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier les effets de la NET à d'autres niveaux de l'axe HPI afin de déterminer quels sont les facteurs influençant les perturbations de l'axe. Par exemple, l'interaction de la NET avec le récepteur mélanocortine 2 (MC2R) pourrait être évaluée, de même que des effets potentiels directs ou indirects sur l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et des effets potentiels au niveau de l'hypothalamus. Il est clair qu'une analyse des facteurs régulateurs de ce gène permettrait de mieux appréhender la compréhension des mécanismes de régulation et l'impact potentiel des xénobiotiques. De même, le lien entre l'antagonisation du zfGR par NET et la baisse du signal GFP dans les cellules interrénales pourrait s'expliquer non pas par un effet direct sur l'expression du gène, mais plutôt par un effet de la NET au niveau enzymatique qui agirait sur l'activité de la 11β-

hydroxylase. Il pourrait être intéressant d'utiliser des modèles *in vitro* exprimant le *cyp11c1* et de suivre les cinétiques enzymatiques. La création de modèles mutants *in vitro* Knock-Out pour le *cyp11c1* apporterait des informations capitales pour mieux appréhender les mécanismes d'action impliqués. Le rôle du récepteur nucléaire des minéralocorticoïdes (MR) sur la régulation du cortisol pourrait également être investigué. En effet, pour beaucoup d'espèces, les voies de signalisation des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes sont relativement proches et il peut y avoir des *cross-talks* (Miyagawa et al., 2014). Chez l'humain, l'affinité du cortisol pour le MR est comparable à celle de l'aldostérone, le ligand MR endogène (Tokarz, Norton, Mo, Hrabe, & Adamski, 2013). Chez les téléostéens, le ligand endogène du MR n'est pas encore connu (il n'y a pas de synthèse d'aldostérone), mais des études récentes montrent que la 11-desoxycorticosterone pourrait être le ligand du MR téléostéen (Tokarz, Norton, et al., 2013) et le cortisol est souvent considéré comme étant à la fois un gluco- et un minéralocorticoïde (Bury & Sturm, 2007; Prunet, Sturm, & Milla, 2006). De plus, les récepteurs nucléaires GR et MR humains peuvent former des hétérodimères (Savory et al., 2001). De façon intéressante, la NET est un antagoniste entier du zfMR *in vitro* (N. Creusot, Inserm, communication personnelle). Ainsi, la NET pourrait déréguler l'axe HPI en interagissant avec le MR.

Les effets négatifs de la NET sur les niveaux de cortisol sont très importants à considérer dans l'évaluation du risque en raison de la multitude et de l'importance des processus régulés par cette hormone. Chez les vertébrés, le cortisol est l'hormone majeure du stress et peut agir via le récepteur des glucocorticoïdes (GR) pour médier des rôles clés des processus physiologiques très nombreux et variés comme la réponse immunitaire, le métabolisme, le développement, la reproduction, le système vasculaire, l'homéostasie sodique, la formation des os, des fonctions cérébrales, la réponse au stress et le comportement (Barnes, 2006; Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005; Lin, Hu, & Hwang, 2016; Migliaccio et al., 2007; Sapolsky, Romero, & Munck, 2000; J. Wang et al., 2005). Étant donné les rôles majeurs du cortisol dans les processus physiologiques du poisson, le fait que la NET puisse baisser les concentrations de cortisol implique de multiples conséquences potentielles au niveau fonctionnel et notamment dans la réponse au stress. Pour étudier ces effets, nous avons soumis des larves traitées à la NET à différents stress osmotiques ou lumineux (article 5). Nous avons montré que la NET semblait altérer la capacité des larves à répondre à un stress salin en cela que les larves exposées cessaient d'être actives plus tôt que les autres. Dans le test des réponses photomotrices, les larves exposées à la NET se sont montrées hyperactives

par rapport aux larves contrôle, suggérant un effet anxiogène de cette molécule ce qui est étonnant étant donné la baisse des niveaux de cortisol et les résultats de réponse au stress osmotique. Ainsi, la relation entre les événements moléculaires, cellulaire et tissulaire et les niveaux de cortisol avec des conséquences physiologiques comme le comportement de réponse au stress est difficile à établir. Ce lien pourrait être investigué grâce à l'utilisation de poissons zèbres mutants pour le gène homéotique *retinal homeobox gene 3 (rx3)*, un gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans le développement de l'œil. Les mutants *rx3* se caractérisent par une déficience en hormones corticotropes et des niveaux de cortisol circulants inférieurs à ceux des poissons sauvages (Dickmeis et al., 2007; Rojas-mun, Dahm, & Nu, 2005). Ainsi, des larves *rx3* $-/+$ ou *rx3* $-/-$ pourraient être soumises aux mêmes conditions de stress que nos larves traitées avec NET afin de comparer les réponses.

Dans l'ensemble, notre approche intégrative nous a permis d'établir un AOP potentiel du progestatif norethistérone sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes avec des effets potentiels à différentes échelles (figure 25).

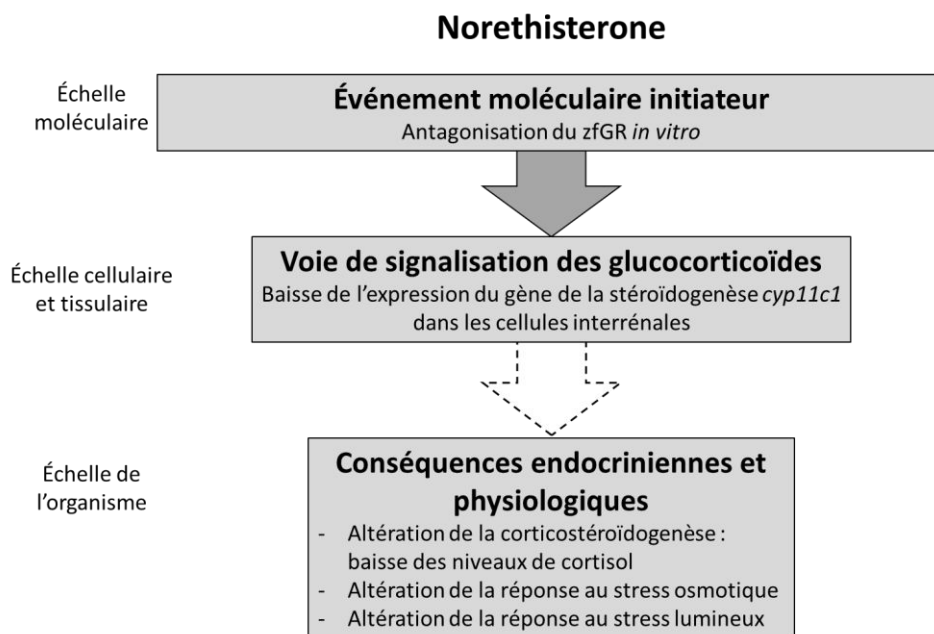


Figure 25 : AOP potentiel du progestatif norethistérone (NET) sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes.

La question des effets des autres progestatifs sur ces différents *endpoints* mérite d'être explorée afin de savoir si le schéma d'AOP peut être étendu à l'ensemble des progestatifs. Plusieurs progestatifs ont été testés sur la lignée cellulaire HG5LN-zfGR et les résultats montrent que la majorité antagonise le zfGR, suggérant des effets similaires à la NET *in vivo*.

Notre approche intégrative répond potentiellement au besoin d'outils pour étudier le GR rapporté par Schaaf et al. 2009, avec le développement d'un nouveau modèle poisson zèbre transgénique *cyp11c1*-GFP (article 4) pour évaluer l'expression du gène de la stéroïdogénèse *cyp11c1* et sa perturbation par des substances chimiques. En effet, l'utilisation de modèles poissons zèbres transgéniques semble être particulièrement adaptée à ce besoin. D'autres modèles poissons zèbres transgéniques récemment développés pourraient également combler le manque d'outils pour évaluer les effets de molécules sur l'axe HPI, par exemple le modèle POMC-EGFP développé par Sun et al. 2010 ou encore des modèles comme ceux de Krug et al. 2014; Weger et al. 2012; Benato et al. 2014 exprimant des rapporteurs fluorescents ou luminescents lorsque les GREs sont activés (SR4G-GFP, GRE:Luc et GRE-GFP respectivement).

L'outil *cyp11c1*-GFP ainsi que l'ensemble de notre approche sur l'axe HPI pourraient enrichir la stratégie actuelle préconisée par l'OCDE dans le contexte de la réglementation de l'évaluation des substances chimiques. En effet, les stratégies établies par l'OCDE à l'heure actuelle ne prennent pas en compte les impacts de substances sur la corticostéroïdogénèse, le fonctionnement de l'axe HPI et les conséquences sur le stress.

Dans l'ensemble, les données présentées dans cette thèse et leur discussion d'un point de vue conséquences fonctionnelles nous permettent d'avoir une vision qualitative des effets des progestatifs sur les poissons et constituent une base solide pour s'inscrire dans une démarche de toxicologie prédictive. À l'avenir, il serait intéressant de poursuivre ces efforts de recherche pour étudier les relations fonctionnelles et mieux prédire l'impact des progestatifs et des substances pharmaceutiques.

3. Bioanalyse *in vitro* des activités PR et identification des substances chimiques par EDA : apport des données obtenues au laboratoire sur les ligands purs

Conjointement aux travaux visant à étudier les mécanismes et les effets biologiques d'un ensemble de progestatifs, le projet PROOFs visait à renseigner l'occurrence environnementale de composés interagissant avec le récepteur de la progestérone (PR) à travers l'utilisation des bioessais *in vitro* hPR et zfPR et à identifier et quantifier la ou les

molécules responsables des activités (anti-)progestatives à travers une démarche combinant outils biologiques et analyses chimiques non ciblées (démarche EDA)⁴.

Le criblage des activités progestagéniques a été réalisé sur des extraits organiques de différentes matrices (eaux de surface, effluents, boues, sédiments) issues de sites de typologie différentes (pression urbaine, agricole, industrielle...). Sur l'ensemble des échantillons, 42 se sont révélés actifs soit dans la lignée U2OS-zfPR soit dans la lignée HELN-PRB. Les extraits actifs correspondent à des échantillons de station d'épuration urbaine ou hospitalière pour lesquels des différences marquées sont rapportées selon la lignée utilisée. En effet, aucun des échantillons investigués n'est actif dans les deux modèles à la fois. Ainsi, la majorité des sites actifs présentent une activité agoniste du zfPR et pas d'activité agoniste sur le nPR humain. À l'inverse, on retrouve des sites dont l'activité est agoniste du hPR mais n'a pas d'activité agoniste sur le nPR poisson zèbre.

Ces différences d'activités observées pour le récepteur PR selon l'espèce cible rejoignent les différences inter-espèces que nous avons mises en évidence dans ces mêmes modèles biologiques en criblant les progestatifs de synthèse (article 1). Si ces différences ne sont donc pas étonnantes au regard des informations acquises sur les ligands purs, il est remarquable de constater que pour les échantillons environnementaux ce sont des activités agonistes qui sont rapportées pour le zfPR alors que des activités anti-progestagéniques ont été quantifiées pour les progestatifs de synthèse (article 1). Sur la base de ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que les molécules actives vis-à-vis du zfPR dans les échantillons environnementaux ne correspondent pas à des progestatifs de synthèse.

Le criblage de polluants perturbateurs endocriniens fréquemment retrouvés dans les effluents de station d'épuration a donc été entrepris afin d'évaluer leur activité vis-à-vis des récepteurs hPR et zfPR. Il s'agissait de bisphénols (BPA, BPS, BPAF), d'alkylphénol (4-octylphénol), de dérivés de la benzophénone (BP2, BP3), de polychlorobiphényle (PCB77) et de dioxine (TCDD). Aucune de ces molécules ne s'est avérée capable d'activer le récepteur zfPR (résultats non montrés) suggérant qu'elles ne peuvent rendre compte des activités agonistes mesurées *in vitro* dans les échantillons environnementaux.

Pour aller plus loin, deux sites présentant des activités agonistes sur le zfPR mais pas sur le hPR ont été investigués plus avant. Les échantillons ont été fractionnés par RP-HPLC et les fractions collectées ont été analysées *in vitro* sur le zfPR et le hPR. Ce travail a permis de

⁴ Les expériences sur les activités *in vitro* ont été réalisées à l'INERIS (S. Aït-Aïssa, E. Maillot-Maréchal, N. Creusot) et l'identification des substances à l'Université de Bordeaux 1 (H. Budzinski, C. Gardia-Parège).

confirmer l'absence d'activité agoniste sur le hPR et d'identifier 4 fractions actives sur le zfPR. L'analyse chimique non-ciblée par LC-QTOF de ces fractions a permis d'identifier différents composés (Aït-Aïssa et al., en préparation) dont le 3-hydroxy-6-méthyl-20-oxopregnan-17-yl acetate. Ce composé correspond à un métabolite hydroxylé de l'acétate de médroxyprogestérone (MPA). Le MPA est un progestatif de synthèse dérivé de la 17-OH progestérone utilisé comme pharmaceutique (contraception, traitement de la ménopause et de l'endométriose) qui a été quantifié dans les eaux usées en Chine (Chang et al., 2009, 2008), aux États-Unis (Kolodziej et al., 2004) et plus récemment en Europe (König et al., 2017) à des concentrations allant de 0,03 à 452 ng/L. Le MPA ne présente pas d'activité agoniste vis-à-vis du récepteur zfPR dans la lignée U2OS-zfPR mais au contraire est antagoniste (article 1). S'agissant du métabolite hydroxylé du MPA aucune information toxicologique n'est disponible dans la littérature et il ne nous a pas été possible de l'évaluer dans nos différents modèles puisqu'il n'est pas disponible commercialement. Il est cependant probable que le changement de conformation de la molécule parent soit à l'origine de son changement d'activité biologique vis-à-vis du nPR (voir tableau 6 page 47) mais cela doit être vérifié expérimentalement.

Si aucune confirmation biologique n'a pu être apportée, l'identification d'un métabolite hydroxylé du MPA au sein d'eaux usées milite pour une meilleure connaissance du devenir des progestatifs au sein des organismes (métabolites) et des matrices environnementales (produits de transformation). Ce constat rejoint des données très récentes obtenues en Suisse qui démontrent la présence de métabolites majeurs de la 17-hydroxyprogesterone (17 α -hydroxypregnanolone) et de la progestérone (pregnanediol) à des concentrations excédant la centaine de ng/L (K. Zhang et al., 2017). Ces auteurs concluent sur le besoin de mieux étudier le devenir et le comportement des métabolites des progestatifs ainsi que leur toxicité (seuls et en mélange) étayant ainsi nos conclusions. Dans cette perspective, il apparaît raisonnable de proposer une démarche combinant analyses chimiques et outils biologiques *in vitro* et *in vivo*.

VI. Conclusion générale

Parmi les perturbateurs endocriniens, les stéroïdes de la classe des œstrogènes ont fait l'objet de nombreux travaux en raison des risques qu'ils représentent sur les organismes et les écosystèmes aquatiques. Néanmoins, d'autres composés stéroïdiens d'origine naturelle ou synthétique utilisés en tant que substances pharmaceutiques sont présents dans l'environnement aquatique et peuvent potentiellement exercer des effets PE sur les organismes exposés. Parmi ces composés, une attention particulière a été apportée aux progestatifs de synthèse dont la production et la consommation excèdent celles des œstrogènes. Cependant, l'état des connaissances sur leurs occurrences environnementales et leurs effets sur les organismes est succinct. Il en résulte un manque de données pour évaluer les dangers et les risques.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient d'étudier les mécanismes d'action et les effets biologiques d'un ensemble de 26 progestatifs sur le poisson zèbre en utilisant une combinaison de modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* basés sur les mécanismes d'action des PEs.

Cette stratégie nous a permis d'acquérir des informations nouvelles sur la capacité de ces ligands à interagir avec le système endocrinien chez le poisson zèbre. En particulier, nos travaux montrent :

- i) la multiplicité d'action des progestatifs *in vitro* vis-à-vis de différents récepteurs nucléaires stéroïdiens, *i.e.* des effets agonistes et antagonistes sur les récepteurs PR, ER et GR ;
- ii) des perturbations précoces de l'expression tissu-spécifique de gènes de la stéroïdogénèse chez les embryons et les larves de poisson zèbre, *i.e.* induction œstrogéno-dépendante de l'aromatase cérébrale et inhibition de la 11 β -hydroxylase dans les cellules interrénales ;
- iii) des effets sur les concentrations de cortisol et sur le comportement dans le cas d'une exposition à la norethistérone.

Dans l'ensemble, les travaux de cette thèse nous amènent à préconiser l'utilisation de modèles spécifiques du poisson, les informations issues de modèles humains n'étant pas nécessairement informatives. De plus, nous préconisons l'utilisation de modèles transgéniques *in vivo* permettant d'investiguer des effets précoces et tissu-spécifiques dans le cadre d'une évaluation des mécanismes et des effets de substances chimiques sur les poissons.

Les propriétés œstrogéniques des progestatifs posent la question de potentielles conséquences sur le neuro-développement. De même, les effets perturbateurs de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénal (HPI) suggèrent des conséquences sur les nombreux processus physiologiques régulés par cet axe. Néanmoins, les informations que nous avons apportées sur les effets des progestatifs sur différents récepteurs nucléaires stéroïdiens et différents gènes de la stéroïdogénèse ne permettent pas de prédire d'éventuels effets chroniques. Pour renseigner ces effets, il serait intéressant d'évaluer les impacts de ces composés sur le développement et la reproduction en réalisant des expositions chroniques à des concentrations environnementales. Dans cette perspective, il apparaît aussi nécessaire de pouvoir considérer les métabolites ou produits de transformation de progestatifs. Les données acquises dans le cadre du projet PROOFs ainsi que des études récentes rapportent la présence de métabolites de progestatifs, notamment des dérivés hydroxylés dont il s'agirait de mieux connaître les occurrences environnementales ainsi que les profils toxicologiques.

Dans l'ensemble, il est important de poursuivre les travaux de recherche sur cette famille de stéroïdes et leurs métabolites mais aussi sur d'autres composés à activité stéroïdienne de manière à appréhender au mieux la problématique des PEs.

Références bibliographiques

- Al-Odaini, N. A., Zakaria, M. P., Yaziz, M. I., & Surif, S. (2010). Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1217(44), 6791–806. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.033>
- Amer, M. A., Miura, T., Miura, C., & Yamauchi, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of Reproduction*, 65(4), 1057–66.
- Ammann, A. A., Macikova, P., Groh, K. J., Schirmer, K., & Suter, M. J. F. (2014). LC-MS/MS determination of potential endocrine disruptors of cortico signalling in rivers and wastewaters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(29), 7653–7665. <http://doi.org/10.1007/s00216-014-8206-9>
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., ... Villeneuve, D. L. (2010). Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 730–741. <http://doi.org/10.1002/etc.34>
- Ankley, G. T., LaLone, C. A., Gray, L. E., Villeneuve, D. L., & Hornung, M. W. (2016). Evaluation of the scientific underpinnings for identifying estrogenic chemicals in nonmammalian taxa using mammalian test systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(11), 2806–2816. <http://doi.org/10.1002/etc.3456>
- Arukwe, & Goksoyr. (1998). Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia*, 83, 225–241.
- Bain, P. a., Kumar, A., Ogino, Y., & Iguchi, T. (2015). Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray–Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquatic Toxicology*, 163, 97–101. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.021>
- Bain, P. A., Williams, M., & Kumar, A. (2014). Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(10), 2297–2307. <http://doi.org/10.1002/etc.2676>
- Barnes, P. J. (2006). How corticosteroids control inflammation : Quintiles Prize Lecture 2005, 245–254. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706736>

- Bartelt-Hunt, S. L., Snow, D. D., Kranz, W. L., Mader, T. L., Shapiro, C. A., Donk, S. J. van, ... Zhang, T. C. (2012). Effect of Growth Promotants on the Occurrence of Endogenous and Synthetic Steroid Hormones on Feedlot Soils and in Runoff from Beef Cattle Feeding Operations. *Environmental Science & Technology*, 46(3), 1352–1360. <http://doi.org/10.1021/es202680q>
- Baulieu, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 963–87.
- Bayaa, M., Booth, R. A., Sheng, Y., & Liu, X. J. (2000). The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12607–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.220302597>
- Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B., Wegener, J., & Cofino, W. P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, 225(1–2), 101–8.
- Benato, F., Colletti, E., Skobo, T., Moro, E., Colombo, L., Argenton, F., & Dalla Valle, L. (2014). A living biosensor model to dynamically trace glucocorticoid transcriptional activity during development and adult life in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 392(1–2), 60–72. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.04.015>
- Besse, J. P., & Garric, J. (2008). Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters*, 176(2), 104–123. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.012>
- Besse, J. P., & Garric, J. (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 157(12), 3485–3494. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.012>
- Billard, R., le Gac, F., & Loir, M. (1990). Hormonal control of sperm production in teleost fish. *Progress in Clinical and Biological Research*, 342, 329–35.
- Bluthgen, N., Castiglioni, S., Sumpter, J. P., & Fent, K. (2013). Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 1. Reproductive and early developmental effects. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 83–95. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.033>
- Bluthgen, N., Sumpter, J. P., Odermatt, A., & Fent, K. (2013). Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 2. Gene expression analysis and in vitro activity. *Aquatic Toxicology*, 144–145,

- 96–104. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.030>
- Briggs, J. P. (2002). The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1), R3-9. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00589.2001>
- Brinton, R. D., Thompson, R. F., Foy, M. R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C. E., ... Nilsen, J. (2008). Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 313–39. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.02.001>
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S. K., Chung, B. C., & Kah, O. (2012). Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 7(5), e36069. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>
- Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J., & Flammarion, P. (2004). Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68(3), 193–217. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.022>
- Brockmeier, E. K., Scott, P. D., Denslow, N. D., & Leusch, F. D. L. (2016). Transcriptomic and physiological changes in Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to progestins and anti-progestagens. *Aquatic Toxicology*, 179, 8–17. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.002>
- Bury, N. R., & Sturm, A. (2007). Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1–3), 47–56. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.03.009>
- Calogero, A. E., Burrello, N., Barone, N., Palermo, I., Grasso, U., & D'Agata, R. (2000). Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 Suppl 1, 28–45.
- Chang, H., Wan, Y., & Hu, J. (2009). Determination and Source Apportionment of Five Classes of Steroid Hormones in Urban Rivers, 43(20), 7691–7698.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., & Hu, J. (2011). Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*, 45(2), 732–740. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.046>
- Chang, H., Wu, S., Hu, J., Asami, M., & Kunikane, S. (2008). Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195(1–2), 44–

51. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.055>
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 19(8), 300–7. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2008.07.004>
- Chatterjee, S., Kumar, V., Majumder, C. B., & Roy, P. (2008). Screening of some anti-progestin endocrine disruptors using a recombinant yeast based in vitro bioassay. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 22(3), 788–98. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.12.006>
- Chen, S. X., Bogerd, J., García-López, A., de Jonge, H., de Waal, P. P., Hong, W. S., & Schulz, R. W. (2010). Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor. *Biology of Reproduction*, 82(1), 171–81. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077644>
- Chen, S. X., Bogerd, J., Schoonen, N. E., Martijn, J., De Waal, P. P., & Schulz, R. W. (2013). A progestin (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 185, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.01.005>
- Chishti, Y. Z., Feswick, A., & Martyniuk, C. J. (2014). Progesterone increases ex vivo testosterone production and decreases the expression of progestin receptors and steroidogenic enzymes in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) ovary. *General and Comparative Endocrinology*, 199, 16–25. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.01.004>
- Clarke, C. L., & Sutherland, R. L. (1990). Progestin Regulation of Cellular Proliferation. *Endocrine Reviews*, 11(2), 266–301. <http://doi.org/10.1210/edrv-11-2-266>
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378–84.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011). Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*, 159(1), 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.028>
- Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J. M., Balaguer, P., & Aït-Aïssa, S. (2009). A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicology in Vitro*, 23(8), 1450–1454.

<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.003>

- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., & Aït-Aïssa, S. (2012). Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *125*(2), 439–449. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr297>
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., ... Budzinski, H. (2014). Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology*, *48*(7), 3649–3657.
- Daughton, C. G. (2003). Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental Health Perspectives*, *111*(5), 757–74.
- Debarre, J.-M. (2013). Suspension de Diane35® et de ses génériques : une sur-réaction de l'ANSM non fondée au vu des connaissances médicales avérées ou acquises. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, *140*(6–7), 474–478. <http://doi.org/10.1016/j.annder.2013.04.093>
- DeQuattro, Z. a, Peissig, E. J., Antkiewicz, D. S., Lundgren, E. J., Hedman, C. J., Hemming, J. D. C., & Barry, T. P. (2012). Effects of progesterone on reproduction and embryonic development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, *31*(4), 851–6. <http://doi.org/10.1002/etc.1754>
- Dickmeis, T., Lahiri, K., Nica, G., Vallone, D., Santoriello, C., Neumann, C. J., ... Foulkes, N. S. (2007). Glucocorticoids Play a Key Role in Circadian Cell Cycle Rhythms. *PLoS Biology*, *5*(4), e78. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050078>
- Diotel, N. (2013). Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Hormones and Behavior*, *63*(2), 193–207.
- Diotel, N., Do Rego, J.-L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., ... Kah, O. (2011). Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, *34*(1), 45–56. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07731.x>
- Diotel, N., Do Rego, J.-L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Vaudry, H., & Kah, O. (2011). The Brain of Teleost Fish, a Source, and a Target of Sexual Steroids. *Frontiers in Neuroscience*, *5*, 137. <http://doi.org/10.3389/fnins.2011.00137>
- Diotel, N., Page, Y. Le, Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Vaillant, C., ... Kah, O.

- (2010). Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), 172–192. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003>
- Diotel, N., Servili, A., Gueguen, M., Mironov, S., Pellegrini, E., Vaillant, C., ... Anglade, I. (2011). Nuclear Progesterone Receptors Are Up-Regulated by Estrogens in Neurons and Radial Glial Progenitors in the Brain of Zebrafish, 6(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028375>
- Dulka, J. G., Stacey, N. E., Sorensen, P. W., & Kraak, G. J. Van Der. (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male–female spawning readiness in goldfish. *Nature*, 325(6101), 251–253. <http://doi.org/10.1038/325251a0>
- Ellestad, L. E., Cardon, M., Chambers, I. G., Farmer, J. L., Hartig, P., Stevens, K., ... Orlando, E. F. (2014). Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environmental Science and Technology*, 48, 8179–8187. <http://doi.org/10.1021/es501428u>
- Emmerich, J., Thomassin, C., & Zureik, M. (2014). Contraceptive pills and thrombosis: effects of the French crisis on prescriptions and consequences for medicine agencies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(9), 1388–1390. <http://doi.org/10.1111/jth.12661>
- Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P., & Brenner, R. (2007). Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: conventional treatment. *Chemosphere*, 66(8), 1535–44. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.020>
- Fayad, P. B., Prévost, M., & Sauvé, S. (2013). On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta*, 115, 349–60. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.038>
- Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 15(4–5), 477–88.
- Fent, K. (2015). Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environment International*, 84, 115–130. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.012>
- Fernandez, M. P., Ikonou, M. G., & Buchanan, I. (2007). An assessment of estrogenic

- organic contaminants in Canadian wastewaters. *The Science of the Total Environment*, 373(1), 250–69. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.018>
- Fick, J., Lindberg, R. H., Parkkonen, J., Arvidsson, B., Tysklind, M., & Larsson, D. G. J. (2010). Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environmental Science & Technology*, 44(7), 2661–6. <http://doi.org/10.1021/es903440m>
- Formoso, G., Perrone, E., Maltoni, S., Balduzzi, S., Amico, D. R., Bassi, C., ... Maestri, E. (2012). Short and long term effects of tibolone in postmenopausal women (Review). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- Fostier, A., Jalabert, B., & Terqui, M. (1973). Predominant action of a hydroxylated derivative of progesterone on the in vitro maturation of oocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, 277(4), 421–4.
- Frankel, T. E., Meyer, M. T., Kolpin, D. W., Gillis, A. B., Alvarez, D. A., & Orlando, E. F. (2016). Exposure to the Contraceptive Progestin, Gestodene, Alters Reproductive Behavior, Arrests Egg Deposition, and Masculinizes Development in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology*, 50(11), 5991–5999. <http://doi.org/10.1021/acs.est.6b00799>
- Frankel, T. E., Meyer, M. T., & Orlando, E. F. (2016). Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *General and Comparative Endocrinology*, 234, 161–9. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.007>
- Garcia-Becerra, R., Borja-Cacho, E., Cooney, A. J., Jackson, K. J., Lemus, A. E., Perez-Palacios, G., & Larrea, F. (2002). The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82(4–5), 333–341.
- Germain, P., & Bourguet, W. (2013). Dimerization of Nuclear Receptors (pp. 21–41). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-408143-7.00002-5>
- Gomez, C. F., Constantine, L., & Huggett, D. B. (2010). The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish. *Chemosphere*, 81(10), 1189–95. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.043>
- Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18(4), 502–519.
- Han, J., Wang, Q., Wang, X., Li, Y., Wen, S., Liu, S., ... Zhou, B. (2014). The synthetic

- progesterin megestrol acetate adversely affects zebrafish reproduction. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 150, 66–72. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.020>
- Hanna, R. N., Daly, S. C. J., Pang, Y., Anglade, I., Kah, O., Thomas, P., & Zhu, Y. (2010). Characterization and expression of the nuclear progesterin receptor in zebrafish gonads and brain. *Biology of Reproduction*, 82(1), 112–22. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078527>
- Hanna, R. N., & Zhu, Y. (2009). Expression of membrane progesterin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), 153–157. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.10.006>
- Hanna, R., Pang, Y., Thomas, P., & Zhu, Y. (2006). Cell-surface expression, progesterin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterin receptors alpha and beta in transfected cells. *The Journal of Endocrinology*, 190(2), 247–260. <http://doi.org/10.1677/joe.1.06694>
- Hao, R., Bondesson, M., Singh, A. V., Riu, A., McCollum, C. W., Knudsen, T. B., ... Gustafsson, J.-Å. (2013). Identification of estrogen target genes during zebrafish embryonic development through transcriptomic analysis. *PloS One*, 8(11), e79020. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079020>
- Hoffmann, F., & Kloas, W. (2012). The synthetic progesterone, Levonorgestrel, but not natural progesterone, affects male mate calling behavior of *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*, 176(3), 385–390. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.02.009>
- Hong, W.-S., Chen, S.-X., Zhang, Q.-Y., & Zheng, W.-Y. (2006). Sex organ extracts and artificial hormonal compounds as sex pheromones to attract broodfish and to induce spawning of Chinese black sleeper (*Bostrichthys sinensis* Lacepede). *Aquaculture Research*, 37(5), 529–534. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01462.x>
- Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., ... Gray, L. E. (2008). Fifteen years after “Wingspread”--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 105(2), 235–59. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfn030>
- Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liang, Y.-Q., Liu, Y.-S., & Liu, S.-S. (2013). Effects of steroid hormones on reproduction- and detoxification-related gene expression in adult male mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 158(1), 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.001>

- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., & Nagahama, Y. (2001). Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(2–3), 449–455.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., & Nagahama, Y. (2002). A novel progesterone receptor subtype in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *FEBS Letters*, *510*(1–2), 77–82. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03220-3](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03220-3)
- Jayaraman, A., & Pike, C. J. (2014). Differential effects of synthetic progestagens on neuron survival and estrogen neuroprotection in cultured neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *384*(1–2), 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.003>
- Jenkins, R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., & Kirk, M. (2003). Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *73*(1), 53–9. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfg042>
- Jenkins, R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., Kirk, M., Moore, R., ... Brown, A. (2004). Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers. *Environmental Health Perspectives*, *112*(15), 1508–11.
- Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randevara, H. S., & Thomas, P. (2006). Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(7), 1519–34. <http://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
- Kinch, C. D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.-H., Habibi, H. R., & Kurrasch, D. M. (2015). Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(5), 1475–80. <http://doi.org/10.1073/pnas.1417731112>
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T. L., Balch, G. C., & Metcalfe, C. D. (2003). Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *63*(4), 391–403.
- Kloet, E. R. De, Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). STRESS AND THE BRAIN : FROM ADAPTATION TO DISEASE, *6*(June), 463–475. <http://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Kolodziej, E. P., Harter, T., & Sedlak, D. L. (2004). Dairy wastewater, aquaculture, and

- spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 38(23), 6377–84.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), 1202–11.
- König, M., Escher, B. I., Neale, P. A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., ... Brack, W. (2017). Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environmental Pollution*, 220, 1220–1230. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011>
- Kontula, K., Paavonen, T., Luukkainen, T., & Andersson, L. C. (1983). Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. *Biochemical Pharmacology*, 32(9), 1511–1518.
- Kramer, V. ., Miles-Richardson, S., Pierens, S. ., & Giesy, J. . (1998). Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology*, 40(4), 335–360. [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00060-X](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00060-X)
- Kroupova, H. K., Trubiroha, A., Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Lutz, I., Grabic, R., ... Kloas, W. (2014). The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 154C, 154–162. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.008>
- Krug, R. G., Poshusta, T. L., Skuster, K. J., Berg, M. R., Gardner, S. L., & Clark, K. J. (2014). A transgenic zebrafish model for monitoring glucocorticoid receptor activity. *Genes, Brain, and Behavior*, 478–487. <http://doi.org/10.1111/gbb.12135>
- Kuch, H. M., & Ballschmiter, K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*, 35(15), 3201–6.
- Kumar, V., Johnson, A. C., Trubiroha, A., Tumová, J., Grabic, R., Kloas, W., ... Kroupová, H. K. (2015). Ecotoxicological Research : A Critical Review The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research : A Critical Review.
- Kuster, M. l, López De Alda, M. J. l, Hernando, l, Petrovic, M. l, Martín-Alonso, J. l, Barceló, D., ... Qiu, L. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river, 358(12), 112–123.

- Labadie, P., & Budzinski, H. (2005). Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(6), 1199–1205. <http://doi.org/10.1007/s00216-005-3055-1>
- Lange, I. G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., & Meyer, H. H. . (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta*, 473(1–2), 27–37. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00748-1](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00748-1)
- Larrea, F., García-Becerra, R., Lemus, A. E., García, G. A., Pérez-Palacios, G., Jackson, K. J., ... Cooney, A. J. (2001). A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha. *Endocrinology*, 142(9), 3791–9. <http://doi.org/10.1210/endo.142.9.8401>
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., ... Zalko, D. (2015). Cell-Specific Biotransformation of Benzophenone-2 and Bisphenol-S in Zebrafish and Human in Vitro Models Used for Toxicity and Estrogenicity Screening. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3860–3868. <http://doi.org/10.1021/es505302c>
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., ... Brion, F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 150–156. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.009>
- Le Page, Y., Vosges, M., Servili, A., Brion, F., & Kah, O. (2011). Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors in Teleost Fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(5–7), 370–386. <http://doi.org/10.1080/10937404.2011.578558>
- Lee, O., Green, J. M., & Tyler, C. R. (2014). Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(0), 1–18. <http://doi.org/10.3109/10408444.2014.965805>
- Lefebvre, P. (2010). Différences entre la progestérone et les progestatifs. *La Lettre Du Gynécologue*, 350(mars), 28–31.
- Lemaitre, M., Lastennet, G., Syr, D., Emmerich, J., & Zureik, M. (2015). Impact of the 2013 French Pill Crisis on Women's Behaviour Regarding Contraception. *Drugs - Real World Outcomes*, 2(1), 13–22. <http://doi.org/10.1007/s40801-015-0011-z>
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Liu, S.-S., Zhao, J.-L., Yang, Y.-Y., Chen, X.-W., ... Ying, G.-G. (2015). Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic*

- Toxicology*, 160, 172–179. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.006>
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liu, S.-S., Jiang, Y.-X., & Liu, S. (2014). Progesterone and norgestrel alter transcriptional expression of genes along the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos-larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 167C, 101–107. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.09.007>
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liu, S.-S., Jiang, Y.-X., Liu, S., & Peng, F.-J. (2015a). A time-course transcriptional kinetics of the hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in zebrafish eleutheroembryos after exposure to norgestrel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), 112–9. <http://doi.org/10.1002/etc.2766>
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liu, S.-S., Jiang, Y.-X., Liu, S., & Peng, F.-J. (2015b). The effects of progesterone on transcriptional expression profiles of genes associated with hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 128, 199–206. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.062>
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Zhao, J.-L., Shi, W.-J., Hu, L.-X., Tian, F., ... Ying, G.-G. (2017). Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 195, 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.005>
- Lin, C., Hu, H., & Hwang, P. (2016). Molecular and Cellular Endocrinology Cortisol regulates sodium homeostasis by stimulating the transcription of sodium-chloride transporter (NCC) in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422, 93–102. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.001>
- Linderoth, M., Ledesma, M., Zebühr, Y., & Balk, L. (2006). Sex steroids in the female zebrafish (*Danio rerio*). Effects of cyproterone acetate and leachate-contaminated sediment extract. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 192–200. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.011>
- Liu, S.-S., Ying, G.-G., Liu, S., Lai, H.-J., Chen, Z.-F., Pan, C.-G., ... Chen, J. (2014). Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), 7299–311. <http://doi.org/10.1007/s00216-014-8146-4>

- Liu, S.-S., Ying, G.-G., Liu, Y.-S., Yang, Y.-Y., He, L.-Y., Chen, J., ... Zhao, J.-L. (2015). Occurrence and removal of progestagens in two representative swine farms: Effectiveness of lagoon and digester treatment. *Water Research*, 77, 146–54. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.022>
- Liu, S., Chen, H., Xu, X.-R., Liu, S.-S., Sun, K.-F., Zhao, J.-L., & Ying, G.-G. (2015). Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *The Science of the Total Environment*, 502, 400–7. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.039>
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhang, R.-Q., Zhou, L.-J., Lai, H.-J., & Chen, Z.-F. (2012). Fate and occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 170, 190–201. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.016>
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., & Lai, H.-J. (2011). Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1218(10), 1367–78. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.014>
- Liu, S., Ying, G. G., Zhou, L. J., Zhang, R. Q., Chen, Z. F., & Lai, H. J. (2012). Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Research*, 46(12), 3754–3768. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.006>
- Liu, X. S., Ma, C., Hamam, A.-W., & Liu, X. J. (2005). Transcription-dependent and transcription-independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries. *Developmental Biology*, 283(1), 180–90. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.011>
- Liu, Z., Auboeuf, D., Wong, J., Chen, J. D., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., & O'Malley, B. W. (2002). Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7940–4. <http://doi.org/10.1073/pnas.122225699>
- Liu, Z., Ogejo, J. A., Pruden, A., & Knowlton, K. F. (2011). Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: a review. *The Science of the Total Environment*, 409(24), 5149–61. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.047>
- López de Alda, M. J., Gil, A., Paz, E., & Barceló, D. (2002). Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *The Analyst*, 127(10), 1299–304.

- Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Trubiroha, A., Krüger, A., Viehmann, V., Wiegand, C., ... Kloas, W. (2011). The synthetic gestagen Levonorgestrel disrupts sexual development in *Xenopus laevis* by affecting gene expression of pituitary gonadotropins and gonadal steroidogenic enzymes. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *124*(2), 311–9. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr241>
- Maack, G., & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, *62*(4), 895–906. <http://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x>
- Matthews, J. B., Fertuck, K. C., Celius, T., Huang, Y.-W., Fong, C. J., & Zacharewski, T. R. (2002). Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *82*(2–3), 181–94.
- McGonnell, I. M., & Fowkes, R. C. (2006). Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *The Journal of Endocrinology*, *189*(3), 425–39. <http://doi.org/10.1677/joe.1.06683>
- McPhee, S. R., Doyle, M. W., Davis, I. F., & Chamley, W. A. (1983). Multiple use of progesterone releasing intravaginal devices for synchronisation of oestrus and ovulation in cattle. *Australian Veterinary Journal*, *60*(2), 40–3.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.-M., Anglade, I., Pakdel, F., & Kah, O. (2005). Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *The Journal of Comparative Neurology*, *485*(4), 304–320. <http://doi.org/10.1002/cne.20497>
- Micevych, P., & Sinchak, K. (2008). Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *290*(1–2), 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.016>
- Migliaccio, S., Brama, M., Fornari, R., Greco, E., Spera, G., & Malavolta, N. (2007). Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: An Osteoblastic Disease. *Aging Clin Exp Res*, *19* (3 supp(6), 5–10.
- Miura, C., Higashino, T., & Miura, T. (2007). A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biology of Reproduction*, *77*(5), 822–8. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061408>
- Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., & Miura, C. (2006). Progestin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(19), 7333–8.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0508419103>

- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5774–8.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 261(3), 359–63. <http://doi.org/10.1002/jez.1402610316>
- Miyagawa, S., Lange, A., Tohyama, S., Ogino, Y., Mizutani, T., Kobayashi, T., ... Iguchi, T. (2014). Characterization of *Oryzias latipes* glucocorticoid receptors and their unique response to progestins. *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), 302–309. <http://doi.org/10.1002/jat.3020>
- Murack, P. J., Parrish, J., & Barry, T. P. (2011). Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 104(1–2), 121–5. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.006>
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*, 38(2), 217–29.
- Nagahama, Y. (1997). 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62(1), 190–6.
- Nagahama, Y. (2011). Endocrine regulation of gametogenesis in fish, 229(1994), 217–229.
- Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*, 50 Suppl 1, S195-219. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Nallani, G. C., Paulos, P. M., Venables, B. J., Edziyie, R. E., Constantine, L. A., & Huggett, D. B. (2012). Tissue-Specific Uptake and Bioconcentration of the Oral Contraceptive Norethindrone in Two Freshwater Fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 306–313. <http://doi.org/10.1007/s00244-011-9691-x>
- Neale, P. A., Munz, N. A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., ... Hollender, J. (2017). Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Science of The Total Environment*, 576, 785–795. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.141>
- Nilsen, J., & Brinton, R. D. (2002). Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport*, 13(6), 825–30.
- Overturf, M. D., Overturf, C. L., Baxter, D., Hala, D. N., Constantine, L., Venables, B., &

- Huggett, D. B. (2012). Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *62*(3), 455–464. <http://doi.org/10.1007/s00244-011-9723-6>
- Overturf, M. D., Overturf, C. L., Carty, D. R., Hala, D., & Huggett, D. B. (2014). Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquatic Toxicology*, *148*, 152–161. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.012>
- Pandian, T. J. (2013). *Endocrine sex differentiation in fish*. (CRC Press, Ed.). Taylor & Francis Group.
- Paulos, P., Runnalls, T. J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A. P., Sumpter, J. P., & Huggett, D. B. (2010). Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, *99*(2), 256–262. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.001>
- Pauwels, B., Noppe, H., De Brabander, H., & Verstraete, W. (2008). Comparison of Steroid Hormone Concentrations in Domestic and Hospital Wastewater Treatment Plants. *Journal of Environmental Engineering*, *134*(11), 933–936. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2008\)134:11\(933\)](http://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2008)134:11(933))
- Pellegrini, E., Diotel, N., Vaillant-Capitaine, C., Pérez Maria, R., Gueguen, M.-M., Nasri, A., ... Kah, O. (2015). Steroid modulation of neurogenesis: Focus on radial glial cells in zebrafish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.011>
- Pellegrini, E., Diotel, N., Vaillant-Capitaine, C., Pérez Maria, R., Gueguen, M.-M., Nasri, A., ... Kah, O. (2016). Steroid modulation of neurogenesis: Focus on radial glial cells in zebrafish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *160*, 27–36. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.011>
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., ... Kah, O. (2005). Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *142*(1–2), 60–66. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.003>
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.-M., ... Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology*, *501*(1), 150–167. <http://doi.org/10.1002/cne>
- Perry, G. A., Smith, M. F., & Geary, T. W. (2004). Ability of intravaginal progesterone

- inserts and melengestrol acetate to induce estrous cycles in postpartum beef cows. *J Anim Sci at USDA Natl Agricultural Library J. Anim. Sci.*, 82, 695–704.
- Petrovic, M., Solé, M., López De Alda, M. J., & Barceló, D. (2002). Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(10), 2146–2156. <http://doi.org/10.1002/etc.5620211018>
- Pinter, J., & Thomas, P. (1995). Characterization of a progestogen receptor in the ovary of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Biology of Reproduction*, 52(3), 667–75.
- Pinter, J., & Thomas, P. (1997). The ovarian progestogen receptor in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, demonstrates steroid specificity different from progesterone receptors in other vertebrates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 60(1–2), 113–9.
- Pinter, J., & Thomas, P. (1999). Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology*, 115(2), 200–209. <http://doi.org/10.1006/gcen.1999.7312>
- Pinto, C., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Pakdel, F., Brion, F., Aït-Aïssa, S., ... Balaguer, P. (2014). Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 60–69. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.020>
- Poling, K. R., Fraser, E. J., & Sorensen, P. W. (2001). The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 129(2–3), 645–51.
- Prunet, P., Sturm, A., & Milla, S. (2006). Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), 17–23. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.01.015>
- Rojas-mun, A., Dahm, R., & Nu, C. (2005). *chokh / rx3* specifies the retinal pigment epithelium fate independently of eye morphogenesis, 288, 348–362. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.046>
- Rosenfeld, C. S. (2017). Neuroendocrine disruption in animal models due to exposure to bisphenol A analogues. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.08.001>
- Rozenbaum, H. (2001). *Les Progestatifs* (second ed.).

- Runnalls, T. J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A. P., & Sumpter, J. P. (2013). Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environmental Science & Technology*, *47*(4), 2077–84.
- Runnalls, T. J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., & Sumpter, J. P. (2010). Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *16*(6), 1318–1338. <http://doi.org/10.1080/10807039.2010.526503>
- Safholm, M., Ribbenstedt, A., Fick, J., & Berg, C. (2014). Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1656), 20130577–20130577. <http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0577>
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., ... Porcher, J. M. (2011). Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International*, *37*(8), 1342–1348. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.002>
- Santos, E. M., Workman, V. L., Paull, G. C., Filby, A. L., Van Look, K. J. W., Kille, P., & Tyler, C. R. (2007). Molecular basis of sex and reproductive status in breeding zebrafish. *Physiological Genomics*, *30*(2), 111–22. <http://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00284.2006>
- Sapolsky, R. M., Romero, M., & Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*, *21*(1), 55–89.
- Savory, J. G., Préfontaine, G. G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R. F., Lefebvre, Y. A., & Haché, R. J. (2001). Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(3), 781–93. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.3.781-793.2001>
- Schaaf, M. J. M., Chatzopoulou, A., & Spaink, H. P. (2009). The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, *153*(1), 75–82. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.12.014>
- Schindler, A. E., Campagnoli, C., Druckmann, R., Huber, J., Pasqualini, J. R., Schweppe, K. W., & Thijssen, J. H. H. (2003). Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*, *46*(SUPPL. 1), 7–16. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2003.09.014>
- Schneider, J. S., Burgess, C., Sleiter, N. C., DonCarlos, L. L., Lydon, J. P., O'Malley, B., &

- Levine, J. E. (2005). Enhanced Sexual Behaviors and Androgen Receptor Immunoreactivity in the Male Progesterone Receptor Knockout Mouse. *Endocrinology*, *146*(10), 4340–4348. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0490>
- Schoonen, W. G., Deckers, G., de Gooijer, M. E., de Ries, R., Mathijssen-Mommers, G., Hamersma, H., & Kloosterboer, H. J. (2000). Contraceptive progestins. Various 11-substituents combined with four 17-substituents: 17 α -ethynyl, five- and six-membered spiromethylene ethers or six-membered spiromethylene lactones. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *74*(3), 109–23.
- Schoonen, W. G. E. J., de Ries, R. J. H., Joosten, J. W. H., Mathijssen-Mommers, G. J. W., & Kloosterboer, H. J. (1998). Development of a High-Throughput *In Vitro* Bioassay to Assess Potencies of Progestagenic Compounds Using Chinese Hamster Ovary Cells Stably Transfected with the Human Progesterone Receptor and a Luciferase Reporter System. *Analytical Biochemistry*, *261*(2), 222–224. <http://doi.org/10.1006/abio.1998.2681>
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., ... Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 390–411. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Schumacher, M., Sitruk-Ware, R., & De Nicola, A. F. (2008). Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Current Opinion in Pharmacology*, *8*(6), 740–6. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2008.10.002>
- Scott, A. P., & Sumpter, J. P. (1989). Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *General and Comparative Endocrinology*, *73*(1), 46–58.
- Scott, A. P., Sumpter, J. P., & Stacey, N. (2010). The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, *76*(1), 183–224. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02483.x>
- Siegenthaler, P. F., Bain, P., Riva, F., & Fent, K. (2017). Effects of antiandrogenic progestins, chlormadinone and cyproterone acetate, and the estrogen 17 β -ethinylestradiol (EE2), and their mixtures: Transactivation with human and rainbowfish hormone receptors and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, *182*(November 2016), 142–162. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.001>
- Sitruk-Ware, R. (2004). Pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, *47*(4), 277–283. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.01.001>
- Sitruk-Ware, R. (2005). New progestagens for contraceptive use. *Human Reproduction*

- Update*, 12(2), 169–78. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmi046>
- Sitruk-Ware, R., & Nath, A. (2010). The use of newer progestins for contraception. *Contraception*, 82(5), 410–417. <http://doi.org/10.1016/j.contraception.2010.04.004>
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Maréchal, E., Péry, A., Brion, F., & Aït-Aïssa, S. (2016). Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Science of The Total Environment*, 550, 934–939. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.187>
- Stacey, N. E., & Sorensen, P. W. (2009). Hormonal pheromones in fish. In D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. S. Etgen, S. Fahrbach, & R. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (2nd ed., pp. 1–43). Elsevier, San Diego.
- Stanczyk, F. Z., & Roy, S. (1990). Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception*, 42(1), 67–96.
- Steele, W. B., Garcia, S. N., Huggett, D. B., Venables, B. J., Barnes, S. E., & La Point, T. W. (2013). Tissue-specific bioconcentration of the synthetic steroid hormone medroxyprogesterone acetate in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1120–6. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.013>
- Stein, D. G. (2008). Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Research Reviews*, 57(2), 386–397. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.012>
- Sumpter, J. P. (1998). Xenoendocrine disrupters--environmental impacts. *Toxicology Letters*, 102–103, 337–42.
- Sumpter, J. P., & Jobling, S. (2013). The occurrence, causes, and consequences of estrogens in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 32(2), 249–51. <http://doi.org/10.1002/etc.2084>
- Sumpter, J. P., & Johnson, A. C. (2008). 10th Anniversary Perspective: Reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 10(12), 1476–85. <http://doi.org/10.1039/b815741n>
- Sun, L., Xu, W., He, J., & Yin, Z. (2010). In vivo alternative assessment of the chemicals that interfere with anterior pituitary POMC expression and interrenal steroidogenesis in POMC: EGFP transgenic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248(3), 217–25. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.015>
- Svensson, J. (2016). Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish Progestins. *Aquatic Toxicology*. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.010>

- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., & Brunström, B. (2013). The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Science & Technology*, *47*(4), 2043–51.
- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I., & Brunström, B. (2014). Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology*, *147*, 84–91. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.013>
- Tan, Q., Zagrodny, a., Bernaud, S., & Peng, C. (2009). Regulation of membrane progestin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, activin, TGF-?? and BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *312*(1–2), 72–79. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.011>
- Tang, H., Liu, Y., Li, J., Yin, Y., Li, G., Chen, Y., ... Cheng, C. H. K. (2016). Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific Reports*, *6*, 28545. <http://doi.org/10.1038/srep28545>
- Thomas, P. (2008). Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(2), 292–312. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.01.001>
- Thomas, P. (2012). Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *General and Comparative Endocrinology*, *175*(3), 367–83. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.032>
- Thomas, P., & Das, S. (1997). Correlation between Binding Affinities of C21 Steroids for the Maturation-Inducing Steroid Membrane Receptor in Spotted Seatrout Ovaries and their Agonist and Antagonist Activities in an Oocyte Maturation Bioassay¹. *Biology of Reproduction*, *57*(5), 999–1007. <http://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.999>
- Thomas, P., Dressing, G., Pang, Y., Berg, H., Tubbs, C., Benninghoff, A., & Doughty, K. (2006). Progestin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids*, *71*(4), 310–316. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.09.015>
- Thomas, P., Pang, Y., Zhu, Y., Detweiler, C., & Doughty, K. (2004). Multiple rapid progestin actions and progestin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids*, *69*(8–9), 567–573. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2004.05.004>
- Thomas, P., Zhu, Y., & Pace, M. (2002). Progestin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids*, *67*(6),

511–7.

- Tian, J., Kim, S., Heilig, E., & Ruderman, J. V. (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14358–63. <http://doi.org/10.1073/pnas.250492197>
- Todo, T., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, K., Yoshikuni, M., ... Nagahama, Y. (2000). Characterization of a testicular 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (a spermiation-inducing steroid in fish) receptor from a teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*)¹. *FEBS Letters*, 465(1), 12–17. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01714-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01714-7)
- Tokarz, J., Moller, G., Hrabě De Angelis, M., & Adamski, J. (2013). Zebrafish and steroids: What do we know and what do we need to know? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 165–173. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.003>
- Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., & Adamski, J. (2015). Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*, (June). <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>
- Tokarz, J., Norton, W., Mo, G., Hrabě, M., & Adamski, J. (2013). Zebrafish 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Is Important for Glucocorticoid Catabolism in Stress Response, 8(1), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054851>
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Oshima, T., Shimizuguchi, K., Fukuda, T., Sugita, E., ... Thomas, P. (2012). Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 177(1), 168–76. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.03.005>
- Tokumoto, T., Yamaguchi, T., Ii, S., & Tokumoto, M. (2011). In vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. *PLoS ONE*, 6(9), e25206. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025206>
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., ... Chung, B. (2009). A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 47(2), 67–73. <http://doi.org/10.1002/dvg.20459>
- Tricotel, A., Collin, C., & Zureik, M. (2015). Impact of the sharp changes in the use of contraception in 2013 on the risk of pulmonary embolism in France. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(9), 1576–1580. <http://doi.org/10.1111/jth.13053>

- Tricotel, A., Raguideau, F., Collin, C., & Zureik, M. (2014). Estimate of Venous Thromboembolism and Related-Deaths Attributable to the Use of Combined Oral Contraceptives in France. *PLoS ONE*, *9*(4), e93792. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0093792>
- Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry*, *63*, 451–86. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>
- Tubbs, C., & Thomas, P. (2008). Functional characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) subtypes: A review with new data showing mPR α expression in sea trout sperm and its association with sperm motility. *Steroids*, *73*(9–10), 935–941. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.022>
- Tubbs, C., & Thomas, P. (2009). Progesterin signaling through an olfactory G protein and membrane progesterin receptor-alpha in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. *Endocrinology*, *150*(1), 473–84. <http://doi.org/10.1210/en.2008-0512>
- Tyler, C. R., Jobling, S., & Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, *28*(4), 319–61. <http://doi.org/10.1080/10408449891344236>
- Ueda, H., Kambegawa, A., & Nagahama, Y. (1985). Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, *59*(1), 24–30.
- Van den Belt, K., Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Verheyen, R., & Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(4), 767–75.
- Van der Linden, S. C., Heringa, M. B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L. M., Brouwer, A., & Van der Burg, B. (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology*, *42*(15), 5814–20.
- Viglino, L., Aboufadel, K., Prévost, M., & Sauvé, S. (2008). Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, *76*(5), 1088–96. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.008>
- Vosges, M., Kah, O., Hinfray, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarous, Y., ... Brion, F.

- (2012). 17α -Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(2), 198–204. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.005>
- Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B.-C., Combarous, Y., Porcher, J.-M., Kah, O., & Brion, F. (2010). 17α -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 99(4), 479–91. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.009>
- Vulliet, E., Baugros, J.-B., Flament-Waton, M.-M., & Grenier-Loustalot, M.-F. (2007). Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2143–51. <http://doi.org/10.1007/s00216-006-1084-z>
- Vulliet, E., & Cren-olivé, C. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale , in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159(10), 2929–2934. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., & Grenier-Loustalot, M.-F. (2008). Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1210(1), 84–91. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.034>
- Wang, C., Liu, D., Chen, W., Ge, W., Hong, W., Zhu, Y., & Chen, S. X. (2016). Progesterin increases the expression of gonadotropins in pituitaries of male Zebrafish. *Journal of Endocrinology*, (April), JOE-16-0073. <http://doi.org/10.1530/JOE-16-0073>
- Wang, J. M., Irwin, R. W., Liu, L., Chen, S., & Brinton, R. D. (2007). Regeneration in a degenerating brain: potential of allopregnanolone as a neuroregenerative agent. *Current Alzheimer Research*, 4(5), 510–7.
- Wang, J., Rao, H., Wetmore, G. S., Furlan, P. M., Korczykowski, M., Dinges, D. F., & Detre, J. A. (2005). Perfusion functional MRI reveals cerebral blood flow pattern under psychological stress.
- Weger, B. D., Weger, M., Nusser, M., Brenner-Weiss, G., & Dickmeis, T. (2012). A chemical screening system for glucocorticoid stress hormone signaling in an intact vertebrate. *ACS Chemical Biology*, 7(7), 1178–83.
- Yang, Y.-Y., Gray, J. L., Furlong, E. T., Davis, J. G., Revello, R. C., & Borch, T. (2012). Steroid hormone runoff from agricultural test plots applied with municipal biosolids.

- Environmental Science & Technology*, 46(5), 2746–54. <http://doi.org/10.1021/es203896t>
- Yost, E. E., Meyer, M. T., Dietze, J. E., Williams, C. M., Worley-Davis, L., Lee, B., & Kullman, S. W. (2014). Transport of Steroid Hormones, Phytoestrogens, and Estrogenic Activity across a Swine Lagoon/Sprayfield System. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11600–11609. <http://doi.org/10.1021/es5025806>
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., & Länge, R. (2009). Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 28(12), 2663–70. <http://doi.org/10.1897/08-485.1>
- Zhang, K., Zhao, Y., & Fent, K. (2017). Occurrence and Ecotoxicological Effects of Free, Conjugated, and Halogenated Steroids Including 17 α -Hydroxypregnanolone and Pregnanediol in Swiss Wastewater and Surface Water. <http://doi.org/10.1021/acs.est.7b01231>
- Zhang, Q. Q., Zhao, J.-L., Ying, G.-G., Liu, Y.-S., & Pan, C.-G. (2014). Emission estimation and multimedia fate modeling of seven steroids at the river basin scale in China. *Environmental Science & Technology*, 48(14), 7982–92. <http://doi.org/10.1021/es501226h>
- Zhao, Y., Castiglioni, S., & Fent, K. (2015a). Environmental Progestins Progesterone and Drospirenone Alter the Circadian Rhythm Network in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 49(16), 10155–10164. <http://doi.org/10.1021/acs.est.5b02226>
- Zhao, Y., Castiglioni, S., & Fent, K. (2015b). Synthetic Progestins Medroxyprogesterone Acetate and Dydrogesterone and Their Binary Mixtures Adversely Affect Reproduction and Lead to Histological and Transcriptional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 150317142110007. <http://doi.org/10.1021/es505575v>
- Zhao, Y., & Fent, K. (2016). Progestins alter photo-transduction cascade and circadian rhythm network in eyes of zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Publishing Group*, (September 2015), 2–11. <http://doi.org/10.1038/srep21559>
- Zhu, Y., Bond, J., & Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2237–2242.
- Zhu, Y., Liu, D., Shaner, Z. C., Chen, S., Hong, W., & Stellwag, E. J. (2015). Nuclear progestin receptor (Pgr) knockouts in zebrafish demonstrate role for Pgr in ovulation but

- not in rapid non-genomic steroid mediated meiosis resumption. *Frontiers in Endocrinology*, 6(MAR), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00037>
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M., & Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2231–2236.
- Ziková, A., Lorenz, C., Hoffmann, F., Kleiner, W., Lutz, I., Stöck, M., & Kloas, W. (2017). Endocrine disruption by environmental gestagens in amphibians – A short review supported by new in vitro data using gonads of *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 181, 74–82. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.021>
- Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., ... Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097–110. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1422>
- Zucchi, S., Castiglioni, S., & Fent, K. (2012). Progesterins and Antiprogestins Affect Gene Expression in Early Development in Zebra fish (*Danio rerio*) at Environmental Concentrations. *Environmental Science & Technology*, 46(46), 5183–5192. <http://doi.org/10.1021/es300231y>
- Zucchi, S., Castiglioni, S., & Fent, K. (2013). Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 47(21), 12548–12556. <http://doi.org/10.1021/es403800y>
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., & Fent, K. (2014). Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 48(6), 3523–31. <http://doi.org/10.1021/es405584f>

Résumé

Chez les vertébrés, la progestérone (P4) est un progestatif endogène agissant via les récepteurs nucléaires et membranaires de la progestérone pour médier des processus clés du développement et de la reproduction. De nombreuses molécules sont conçues pour mimer l'action de la P4. Ces progestatifs synthétiques et la P4 sont très utilisés en tant que substances pharmaceutiques et certains sont retrouvés dans l'environnement aquatique, posant un risque pour les organismes. Cependant, les informations sont insuffisantes pour évaluer les dangers et les risques de ces substances pour l'environnement.

Dans ce travail de thèse, les mécanismes d'action et les effets biologiques des progestatifs sur le poisson zèbre ont été étudiés grâce à une combinaison d'outils *in vitro* et *in vivo* de type gène-rapporteur basés sur le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens.

Nous avons caractérisé le profil toxicologique complexe de 26 progestatifs vis-à-vis de différents récepteurs nucléaires stéroïdiens humain et poisson zèbre et vis-à-vis de l'expression tissu-spécifique de gènes de la stéroïdogénèse (*cyp19a1b* dans le cerveau et *cyp11c1* dans les interrénales).

Nos résultats montrent que certains progestatifs peuvent perturber différentes voies de signalisation chez les larves en développement au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire ainsi qu'au niveau physiologique. Dans l'ensemble, les résultats de cette thèse permettent une meilleure caractérisation des dangers des progestatifs sur différentes cibles endocriniennes.

Abstract

Among vertebrates, progesterone (P4) is an endogenous progestin acting through the nuclear and molecular progesterone receptor to mediate key processes of development and reproduction. Many molecules are designed to mimic the action of P4. These synthetic progestins and P4 are widely used as pharmaceuticals and some of them are found in this aquatic environment, thus posing risks to aquatic species. However, information is lacking to evaluate the dangers and risks of these substances for the environment.

This thesis studied the mechanisms of action and the effects of progestins on zebrafish, using a combination of reporter-gene *in vitro* and *in vivo* tools based on the mechanism of action of endocrine disruptors. We characterized the toxicological profile of 26 progestins towards different human and zebrafish nuclear steroid receptors and towards the tissue-specific expression of steroidogenic genes (*cyp19a1b* in the brain and *cyp11c1* in the interrenal cells).

Our results show that some progestins can disrupt different signaling pathways in developing larvae at the molecular level, cellular and tissular level, and physiological level. Overall, the results of this thesis allow for a better characterization of the dangers of progestins on several endocrine targets.